

mgr Kamila Strom

Wpływ metod utrwalania mleka kobiecego na wybrane składniki bioaktywne i bezpieczeństwo mikrobiologiczne

Streszczenie

Mleko kobiece dzięki zawartym w nim składnikom odżywczym odgrywa kluczową rolę w prawidłowym rozwoju dziecka. Szczególną funkcję przypisuje się składnikom bioaktywnym stymulującym rozwój między innymi układu odpornościowego oraz pokarmowego. W przypadku braku możliwości karmienia dzieci (szczególnie wcześniaków) mlekiem własnej matki drugim wyborem zalecanym przez Światową Organizację Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) jest mleko dawczyń z banków mleka kobiecego (BMK). Celem tych instytucji jest przygotowanie bezpiecznej mikrobiologicznie porcji mleka, która jest podawana przedwcześnie urodzonym dzieciom o niskiej masie urodzeniowej. Standardowo mleko dawczyń jest utrwalane metodą pasteryzacji typu holder (ang. *holder pasteurization*, HoP), po której jest przechowywane w warunkach chłodniczych. Oba wymienione etapy pracy banków mleka kobiecego mogą przyczyniać się do spadku jakości mleka obniżając jego właściwości terapeutyczne.

Celem rozprawy doktorskiej była optymalizacja alternatywnej metody utrwalania mleka, paskalizacji (ang. *high-pressure processing*, HPP), oraz udoskonalenie sposobu przechowywania mleka kobiecego w bankach mleka kobiecego poprzez poddanie go liofilizacji. Przebadano wpływ tych metod oraz ich kombinacji na bezpieczeństwo mikrobiologiczne oraz na wybrane składniki bioaktywne mleka.

Ocenę jakości mikrobiologicznej próbek mleka oddanych do banków mleka kobiecego wykonano na podstawie danych statystycznych pochodzących z pierwszych lat pracy Regionalnego Banku Mleka Kobiecego w Warszawie (publikacja nr 1). Wpływ przetwarzania wysokociśnieniowego na właściwości bakteriobójcze mleka wykonano analizując wzrost bakterii *Escherichia coli* NCTC 9111 w procesowanym mleku (publikacja nr 2). W kolejnym etapie optymalizacji utrwalania mleka kobiecego oceniono wpływ techniki wysokich ciśnień i liofilizacji na czystość mikrobiologiczną oraz składniki bioaktywne mleka. Wykorzystując testy immunoenzymatyczne (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) określono koncentracje bioaktywnych komponentów takich jak: laktoferyna, insulina, leptyna, adiponektyna, czynnik wzrostu hepatocytów, immunoglobulina typu G, oraz zbadano metodą

fluorymetryczną aktywność lipazy w mleku poddanych analizowanym procesom. W trakcie prowadzonych badań mikrobiologicznych sprawdzono skuteczność alternatywnych metod utrwalania mleka pod kątem eliminacji natywnej mikroflory mleka oraz ich działania na potencjalnie patogenne szczepy. W tym celu w warunkach laboratoryjnych próbki mleka zostały zainokulowane szczepami *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Cronobacter sakazakii* ATCC 51329 i *Bacillus cereus* ATCC 14579, a następnie poddane analizowanym procesom utrwalania. Optymalizację procesu paskalizacji wykonano testując następujące parametry: 600 MPa, 200 MPa + 400 MPa, 100 MPa + 600 MPa, 200 MPa + 600 MPa oraz 450 MPa. Każdy z etapów badań wykonywano również dla mleka poddanego HoP (publikacje nr 3a, 3b, 4). W końcowej fazie badań określono wpływ czasu i sposobu przechowywania mleka na możliwość namnażania się bakterii sporulujących ze szczepu *Bacillus cereus* ATCC 14579. Analizowano różne warianty przechowywania mleka w temperaturach: 4 °C oraz -21 °C przed i po pasteryzacji typu holder. Analizę ilościową wegetatywnych form bakterii wykonano technikami hodowlanymi na podłożu wybiórczo-różnicującym, natomiast do zobrazowania spor wykorzystano badania mikroskopowe z zastosowaniem barwienia komórek zielenią malachitową oraz fioletem krystalicznym (publikacja nr 5).

Testowanie mikrobiologiczne próbek mleka oddanego przez kandydatki na dawczynię wykazało, iż mleko deponowane w Regionalnym Banku Mleka Kobiecego w Warszawie miało wysoką jakość mikrobiologiczną. W nielicznych próbkach wykazano obecność bakterii potencjalnie patogennych takich jak: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, co pokazuje zasadność wykonywania pasteryzacji mleka dawczyń przed podaniem go pacjentom (publikacja nr 1). Szczególną uwagę należy zwrócić na wykrywanie próbek mleka zanieczyszczonych bakteriami przetrwalnikującymi. Podczas przechowywania w warunkach chłodniczych inokulowanego laseczkami *B. cereus* mleka niepasteryzowanego oraz mleka pasteryzowanego obserwowano obecność endospor (publikacja nr 5).

Analizy wykazały, że paskalizacja jest dobrą, alternatywną techniką zapewniającą czystość mikrobiologiczną mleka. Mleko ciśnieniowane charakteryzowało się aktywnością bakteriobójczą wobec szczepu *E. coli* w zakresie: 29,60–50,34 %, wyższą niż dla mleka po HoP: 12,1 % (publikacja nr 2). W próbkach po procesowaniu (HPP, HoP) nie odnotowano wzrostu bakterii. Jednocześnie stężenia większości analizowanych czynników bioaktywnych były zachowane na znacznie wyższym poziomie po paskalizacji niż w mleku poddanym pasteryzacji typu holder. Najlepsze wyniki osiągnięto dla następujących wariantów HPP:

200 MPa + 400 MPa oraz 450 MPa. Ponadto wykazano, że liofilizowanie mleka poddanego HPP stanowi najlepszy sposób postępowania z mlekiem, znacznie ułatwiający przechowywanie próbek (publikacje nr 3a, 3b, 4).

Wnioski dotyczące możliwości zastosowania różnych metod utrwalania mleka dawczyń, wynikające z powyższych badań, mogą znacząco wpłynąć na usprawnienie pracy z mlekiem kobiecym w bankach mleka kobiecego w przyszłości. Zastosowanie paskalizacji jako techniki utrwalania może wpłynąć na to, że mleko dawczyń podawane wcześniakom, będzie spełniało wysokie standardy bezpieczeństwa mikrobiologicznego oraz będzie miało bardziej korzystny skład. Technika wykorzystująca wysokie ciśnienia stanowi dobrą alternatywę dla obecnie stosowanych metod utrwalania, a liofilizacja produktu końcowego pasteryzacji może przyczynić się do ułatwienia przechowywania pokarmu w bankach mleka kobiecego.