



Imię i nazwisko autora rozprawy: Małgorzata Puta  
Dyscyplina naukowa: biotechnologia

## ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Wpływ różnych metod utrwalania na wartość odżywczą i biologiczną oraz jakość mikrobiologiczną mleka ludzkiego

Tytuł rozprawy w języku angielskim: The effect of different preservation methods on the nutritional and biological value and microbiological quality of human milk.

Promotor	Drugi promotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
dr hab. inż. Hanna Staroszczyk prof. nadzw. PG	<Tytuł, stopień, imię i nazwisko>
Promotor pomocniczy	Kopromotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
dr hab. inż. Dorota Martysiak-Żurowska	<Tytuł, stopień, imię i nazwisko>

**Niniejsza rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach projektu OPUS nr DEC-2013/09/B/NZ9/01779: „Wpływ warunków pasteryzacji, wysokiego ciśnienia w temperaturze poniżej 0 °C i ogrzewania mikrofalowego na wartość odżywczą i biologiczną oraz jakość mikrobiologiczną mleka ludzkiego“ finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.**

*Serdecznie dziękuję*

*dr inż. Dorocie Martysiak-Zurowskiej za nieocenioną pomoc  
udzieloną w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej, cierpliwość  
i wyrozumiałość oraz motywację*

*dr hab. inż. Edycie Malinowskiej-Pańczyk za cenne wskazówki oraz  
poświęcony czas*

*promotor prof. dr hab. inż. Ilonie Kołodziejkiej*

*promotor dr hab. inż. Hannie Staroszczyk prof. nadzw. PG*

*pracownikom Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności  
za miłą atmosferę pracy*

*Rodzicom za wsparcie*

*Niniejszą pracę dedykuję mojemu narzeczonemu Michałowi*

## Streszczenie

Mleko kobiece zawiera w swoim składzie wszystkie niezbędne do prawidłowego rozwoju młodego organizmu składniki odżywcze oraz biologicznie aktywne. Istnieją jednak sytuacje, w których niemowlę nie może być karmione mlekiem własnej matki. W tym przypadku rekomendowane jest podanie dziecku mleka z Banku Mleka Kobiecego (BMK). Proces pasteryzacji holder (62,5°C; 30 min), któremu poddawane jest mleko uzyskane od dawczyni, zapewnia jego bezpieczeństwo mikrobiologiczne, lecz powoduje również częściową lub całkowitą degradację składników odżywczych oraz biologicznie aktywnych w nich zawartych. Głównymi beneficjentami BMK są dzieci chore lub urodzone przedwcześnie, dla których jakość biologiczna mleka jest niezwykle istotna dla prawidłowego rozwoju.

Przeprowadzone w pracy studium literaturowe przedstawia szeroko scharakteryzowane w piśmiennictwie metody utrwalania mleka ludzkiego zaadoptowane z przemysłu spożywczego (pasteryzacja holder, działanie wysokiego ciśnienia), jak również fragmentaryczne dane dotyczące techniki, która jak dotąd uważana była za nieodpowiednią do ogrzewania mleka ze względu na ryzyko przegrzania materiału biologicznego (ogrzewanie polem promieniowania mikrofalowego).

Za główny cel przedstawionej pracy przyjęto ocenę wpływu różnych parametrów czasowo-temperaturowych ogrzewania konwekcyjnego, ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego oraz działania wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze jako metod alternatywnych dla stosowanej w BMK pasteryzacji holder. W pracy przedstawiono wyniki badań, w których zastosowano pionierskie rozwiązanie technologiczne, dzięki któremu możliwa jest kontrola temperatury w czasie rzeczywistym podczas termicznej obróbki mleka z użyciem pola mikrofalowego.

Wykazano, iż wykorzystane w badaniach referencyjne drobnoustroje termowrażliwe: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* zawieszane w środowisku modelowym (mleko UHT) w ilości 5 log<sub>10</sub> j.t.k./mL inaktywowane są podczas ogrzewania konwekcyjnego w czasie uzyskania przez próbkę mleka temp. 66°C, natomiast drobnoustroje termoodporne z rodzaju *Enterococcus* po 10 minutach ogrzewania w temp. 70°C.

Na tym etapie badań wykazano, iż stosowane parametry procesu ciśnieniowania nie są wystarczające do obniżenia ilości analizowanych drobnoustrojów referencyjnych wprowadzonych do mleka w ilości 5 log<sub>10</sub> j.t.k./mL do poziomu niewykrywalności w 1 mL próby. Dlatego też metoda ta nie wykazuje potencjału do zastosowania w BMK.

W kolejnym etapie badań oznaczono wpływ temperatury przekazywanej w sposób konwekcyjny oraz generowanej polem promieniowania mikrofalowego na przeżywalność drobnoustrojów występujących w mleku kobiecym. Wykazano, iż efekt pasteryzacji, zarówno w przypadku ogrzewania konwekcyjnego, jak również ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego, zależy od składu jakościowego mikroflory mleka. Biorąc pod uwagę tylko wytyczne BMK dla mleka przed procesem pasteryzacji, które nie definiują poziomu drobnoustrojów termoodpornych, akceptowany przez BMK poziom bakterii po procesie pasteryzacji uzyskuje się już w czasie osiągnięcia przez mleko temperatury 62,5°C podczas ogrzewania konwekcyjnego. Jednak ze względu na możliwość wystąpienia w mleku drobnoustrojów charakteryzujących się wysoką termoodpornością, zmiana dotychczasowych parametrów obróbki termicznej tzn. pasteryzacji holder, nie jest wskazana. Zastosowanie ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego w kontrolowanej temperaturze do pasteryzacji mleka ludzkiego pozwala

na znaczne skrócenie czasu działania wysokiej temperatury potrzebnej do uzyskania równoważnego do pasteryzacji holder efektu bakteriobójczego. Stwierdzono, iż w celu uzyskania bezpieczeństwa mikrobiologicznego mleka kobiecego, w którym początkowa ilość drobnoustrojów jest na poziomie akceptowanym przez BMK wystarczy 5 minutowe ogrzewanie polem mikrofalowym w temperaturze 62,5°C.

Metoda utrwalania mleka mająca stanowić alternatywę dla obecnie stosowanej w BMK pasteryzacji holder powinna nie tylko zagwarantować bezpieczeństwo mikrobiologiczne utrwalanego mleka kobiecego, lecz również zapewnić możliwie optymalny skład mleka pomimo degradacyjnego działania wysokiej temperatury względem składników odżywczych biologicznie aktywnych. Dlatego też w kolejnym etapie badań określono wpływ powyższych metod utrwalania na składniki odżywcze (białka, tłuszcze, węglowodany), jak również zmiany w stężeniu/ aktywności składników biologicznie aktywnych mleka kobiecego takich jak: składniki przeciwutleniające (dysmutaza ponadtlenkowa – eng. superoxide dismutase SOD, katalaza, eng. catalase CAT, peroksydaza glutationowa, eng. glutathione peroxidase GPx, witamina C), przeciwdrobnoustrojowe (lizozym, laktoferyna), immunomodulujące i immunochronne (immunoglobulina A, cytokina TGF-β2), oraz lipaz.

Składniki odżywcze, kwasy tłuszczowe KT, SOD i cytokina TGF-β2 wykazują dużą odporność na działanie wysokiej temperatury w stosowanych w badaniu zakresach jej wartości i czasu stosowania. Nie stwierdzono różnic w poziomie degradacji składników przeciwutleniających mleka kobiecego bez względu na stosowaną technikę ogrzewania. Wykazano, iż zastosowane w pracy parametry obróbki termicznej nie powodowały zmian w wartości TAC mleka kobiecego, mimo znaczącej degradacji witaminy C. Wskazuje to na obecność w mleku innych nieenzymatycznych składników przeciwutleniających, wykazujących większą aktywność antyrodnikową w porównaniu z witaminą C. Wykazano, iż zastosowanie pasteryzacji z wykorzystaniem temperatury generowanej polem promieniowania mikrofalowego jest korzystniejsze pod względem zachowania aktywności CAT oraz zawartości laktoferyny, jak również ograniczenia niekorzystnych zmian w składnikach lipidowych, tj. powstawanie wtórnych produktów utleniania lipidów w mleku ludzkim w porównaniu z pasteryzacją holder. Lizozym i lipazy mleka kobiecego wykazują dużą wrażliwość na działanie wysokiej temperatury, jednak nie zaobserwowano różnic w poziomie degradacji tych enzymów w mleku poddanym pasteryzacji holder oraz pasteryzacji polem promieniowania mikrofalowego.

Uzyskane wyniki badań pozytywnie opiniują możliwość wykorzystania ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego jako metody alternatywnej wobec pasteryzacji holder wykorzystywanej w BMK. Konieczne jest jednak potwierdzenie czy promieniowanie mikrofalowe nie wywiera innego niż termiczny efekt, co może sugerować czasowy wzrost aktywności niektórych składników bioaktywnych mleka oraz czy korzystne jest, aby składniki bioaktywne aktywowały się w mleku przed podaniem go niemowlęciu.

## Spis treści

1.	Wstęp-charakterystyka problemu.....	10
2.	Banki mleka kobiecego .....	11
3.	Charakterystyka składników mleka kobiecego .....	14
3.1	Składniki odżywcze.....	14
3.1.1	Witaminy i minerały .....	17
3.2	Wybrane biologicznie aktywne składniki mleka kobiecego.....	19
3.2.1	Składniki przeciwdrobnoustrojowe .....	19
3.2.2	Składniki przeciwutleniające .....	21
3.2.3	Składniki immunochronne i immunomodulujące .....	25
3.2.4	Enzymy trawienne .....	27
3.2.5	Hormony.....	28
4.	Mikroflora mleka kobiecego .....	28
5.	Metody utrwalania mleka kobiecego .....	31
6.	Cel pracy .....	37
7.	Materiały i metody .....	37
7.1	Materiał biologiczny .....	37
7.2	Podłoża.....	38
7.3	Odczynniki .....	39
7.4	Aparatura.....	41
7.5	Drobny sprzęt laboratoryjny.....	42
8.	Postępowanie doświadczalne .....	42
8.1	Metody utrwalania.....	42
8.2	Metodyka oznaczeń.....	44
8.2.1	Oznaczenia mikrobiologiczne .....	44
8.2.2	Analiza mleka ludzkiego techniką IR.....	44
8.2.3	Oznaczanie produktów utleniania lipidów.....	45
8.2.4	Oznaczanie aktywności/ zawartości składników przeciwutleniających .....	48
8.2.5	Oznaczanie składników przeciwdrobnoustrojowych.....	53
8.2.6	Oznaczanie składników immunologicznych.....	55

8.2.7	Oznaczenie aktywności lipaz.....	57
8.2.8	Analiza statystyczna .....	58
9.	Omówienie wyników i dyskusja .....	59
9.1	Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania mikrofalowego na przeżywalność wybranych drobnoustrojów Gram dodatnich oraz Gram ujemnych celowo wprowadzonych do mleka krowiego UHT (badania modelowe) .....	60
9.2	Wpływ wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze (193 MPa, -20°C) na przeżywalność wybranych drobnoustrojów Gram dodatnich oraz Gram ujemnych celowo wprowadzonych do mleka krowiego UHT (badania modelowe) .....	71
9.3	Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowaniem mikrofalowego na przeżywalność drobnoustrojów występujących w mleku ludzkim.....	72
9.3.1	Ogrzewanie w temperaturze 62,5°C.....	73
9.3.2	Ogrzewanie w temperaturze 66°C .....	76
9.3.3	Ogrzewanie w temperaturze 70°C .....	79
9.4	Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego na wartość odżywcza mleka kobiecego.....	82
9.4.1	Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego na zawartość białka, tłuszczu, węglowodanów oraz wartość kaloryczną mleka ludzkiego .....	82
9.4.2	Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego na skład i zawartość KT .....	84
9.5	Wpływ ogrzewania konwekcyjnego oraz ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego na frakcję lipidową mleka ludzkiego.....	89
9.5.1	Pierwotne produkty utleniania lipidów.....	89
9.5.2	Wtórne produkty utleniania lipidów .....	90
9.6	Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego na wybrane biologicznie aktywne składniki mleka kobiecego.....	93
9.6.1	Składniki przeciwutleniające .....	93
9.6.1.1	Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD).....	93
9.6.1.2	Katalaza (CAT) .....	94
9.6.1.3	Peroksydaza glutationowa (GPx).....	95
9.6.1.4	Witamina C .....	96
9.6.1.5	Całkowita zdolność przeciwutleniająca (TAC).....	97
9.6.2	Składniki przeciwdrobnoustrojowe .....	100

9.6.2.1	Lizozym .....	100
9.6.2.2	Laktoferyna .....	101
9.6.3	Składnik immunologiczne .....	103
9.6.3.1	Immunoglobulina A (IgA) .....	103
9.6.3.2	Transformujący czynnik wzrostu TGF- $\beta$ 2 .....	104
9.6.4	Enzymy trawienne .....	106
9.6.4.1	Lipaza.....	106
10.	Wnioski.....	108
11.	Spis rysunków.....	110
12.	Spis tabel.....	113
13.	Piśmiennictwo .....	114



## Spis skrótów

ABTS <sup>++</sup>	- 2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)
ALA	- kwas tłuszczowy $\alpha$ -linolenowy, eng. $\alpha$ -linolenic acid fatty acid
AsA	- kwas askorbinowy
BDSL	- lipaza zależna od soli żółciowych, eng. bile salt dependent lipase
BHT	- butylowany hydroksytoluen
BMK	- bank mleka kobiecego
BSSL	- lipaza stymulowana solami żółciowymi, eng. bile salt-stimulated <i>lipase</i>
BALB	- kwas dimerkaptopropanolowo maślany, eng. dimercaptopropanol tributyrat acid
CAT	- katalaza, eng. catalase
CLA	- sprzężony kwas linolenowy eng. conjucted linolic acid
CMV	-cytomegalowirus, eng. cytomegalovirus
CoQ <sub>10</sub>	- koenzym Q <sub>10</sub>
DHA	- kwas dokozaheksaenowy, eng. docosahexaenoic acid
DHsA	- kwas dehydroaskorbinowy, eng. dehydroascorbic acid
DTT	- DL-ditiotreitol
DTNB	- kwas 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoesowy
EMBA	- Europejskie Stowarzyszenie Banków Mleka, eng. European Milk Bank Association
EMKT	- estry metylowe kwasów tłuszczowych
EPA	- kwas eikozapentaenowy, eng. eicosapentaenoic acid
FDA	- Federalny Urząd Żywności i Leków, eng. Food and Drug Administartion
GPx	- peroksydaza glutationowa, eng. glutathione peroxidase
GSH	- zredukowana postać glutationu
GSSG	- utleniona postać glutationu
GR	- reduktaza glutationowa, eng. glutathione reductase
HDL	- lipoproteina o wysokiej gęstości, eng. high density lipoprotein
HEPES	- kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo) piperazyn-1-ylo] etanosulfonowy)
HIV	- ludzki wirus niedoboru odporności, eng. human immunodeficiency virus
HMBANA	- Stowarzyszenie Banków Mleka Kobiecego Ameryki Północnej, eng. Human Milk Banking Association of North America
HMF	- wzmacniacz mleka kobiecego, eng. human milk fortifier
HMO	- oligosacharydy mleka kobiecego eng. human milk oligosaccharides
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa, eng. high-performance liquid chromatography
HPLT	- obróbka wysokociśnieniowa w niskiej temperaturze, eng. <i>high pressure low temperature</i>
HPP	- obróbka wysokociśnieniowa, eng. high pressure processing
HR-GC	- wysokorozdzielcza chromatografia gazowa, eng. high resolution gas chromatography
HTST	- obróbka wysokotemperaturowa w krótkim czasie, eng. high temperature short time
IR	- spektroskopia w podczerwieni, eng. infrared spectroscopy
KT	- kwas tłuszczowy

LA	- kwas linolowy, eng. linoleic acid
LC-PUFA	- długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe eng. long chain polyunsaturated fatty acids
LDL	- lipoproteina o niskiej gęstości, eng. low-density lipoprotein
LP	- nadtlenek lipidowy, eng. lipid peroxide
LPL	- lipaza lipoproteinowa, eng. lipoprotein lipase
LPS	- lipopolisacharyd
LR	- stopień linearyzacji
LTLT	- pasteryzacja niskotemperaturowa długotrwała, eng. low-temperature-long-time
MDA	- dialdehyd malonowy, eng. malondialdehyde
MUFA	- kwasy tłuszczowe jednonienasycone, eng. monounsaturated fatty acids
NADP <sup>+</sup>	- fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, eng. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	- zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, eng. reduced form nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NEC	- martwicze zapalenie jelit, eng. necrotizing enterocolitis
OLD	- ogólna liczba drobnoustrojów
PCM	- Polska Kolekcja Mikroorganizmów, eng. Polish Collection of Microorganisms
PUFA	- wielonienasycone kwasy tłuszczowe, eng. polyunsaturated fatty acids
ROP	- retinopatia wcześniacza, eng. retinopathy of prematurity
ROS	- reaktywne formy tlenu, eng. reactive oxygen species
RP-HPLC/UV	- wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych z detektorem UV, eng. reversed phase high performance liquid chromatographic with UV detection
SFA	- kwasy tłuszczowe nasycone, eng. saturated fatty acids
SOD	- dysmutaza ponadtlenkowa, eng. superoxide dismutase
TAC	- całkowita zdolność przeciwutleniająca, eng. total antioxidant capacity
TAG	- trójglicerydy
TBA	- kwas 2-tiobarbiturowy, eng. 2-thiobarbituric acid
TCA	- kwas trichlorooctowy, eng. trichloroacetic acid
TE	- ekwiwalent Troloxu, eng. Trolox equivalent
TGF- $\beta$	- transformujący czynnik wzrostu $\beta$ eng. transforming growth factor $\beta$
TMB	- tetrametylobenzydyna
TFA	- kwasu trifluorooctowy, eng. trifluoroacetic acid
VLDL	- lipoproteina o bardzo małej gęstości, eng. very low density lipoprotein
LAP	- eng. latency associated protein

## 1. Wstęp-charakterystyka problemu

Z roku na rok na świecie wzrasta liczba przedwczesnych porodów. Według światowych szacunków co 10 noworodek rodzi się jako wcześniak. Przyczyny tego zjawiska mają charakter środowiskowy, socjalny, jak również osobniczy (CDC, 2016). Dzieci urodzone przedwcześnie należą do grupy wysokiego ryzyka zachorowalności na retinopatię wcześniaczą (ROP), martwicze zapalenie jelit (NEC), ostre i przewlekłe infekcje dróg oddechowych, niedotlenienie wynikające z niedokrwienia (Sisc i in. 2007; Schanler i in. 2005; Wahlig i in. 1995; Wahlig i in. 1994). Stan zapalny towarzyszący większości z tych schorzeń prowadzi do aktywacji cytokin, które zakłócają procesy anaboliczne w organizmie. Terapia tlenowa stosowana u wcześniaków może prowadzić do hipoksji, co wzmacnia procesy zapalne. W skrajnych przypadkach pobieranie krwi do badań hematologicznych i biochemicznych może spowodować niedokrwistość (Stockman i in. 1984). Leki podawane dzieciom w trakcie hospitalizacji mogą mieć niekorzystny wpływ na metabolizm składników odżywczych. Katecholaminy hamują wytwarzanie i działanie insuliny. Kortykosteroidy wzmagają procesy kataboliczne, natomiast diuretyki ograniczają wchłanianie wapnia, fosforu oraz sodu niezbędnych do wzrostu kości. Stosowana w większości przypadków antybiotykoterapia prowadzi do ograniczenia kolonizacji jelit przez mikroflorę probiotyczną co zwiększa predyspozycję do wystąpienia NEC (Torrazza i in. 2013; Alexander i in. 2011). Prawidłowy rozwój dzieci urodzonych przedwcześnie zależy w znacznej mierze od jakości dostarczanego mu pokarmu. Koncerny produkujące sztuczne mieszanki mleko zastępcze do żywienia niemowląt dokładają starań, aby stworzyć preparat odpowiadający składem mleku kobiecemu. Złożoność oraz unikalność komponentów mleka uniemożliwia ten proces przy obecnym stanie technologii. Ograniczenia te dotyczą zarówno składników biologicznie aktywnych, jak również odżywczych.

Skład mleka matki dostosowuje się do potrzeb organizmu rozwijającego się dziecka na każdym etapie jego rozwoju. Mleko mam dzieci urodzonych przedwcześnie zawiera więcej składników bioaktywnych wspomagających obronę przed patogenami, jak również wspomagających układ immunologiczny i immunomodulujący (Lis i in. 2013).

Skład mleka pochodzącego z BMK znacznie różni się od pokarmu, który otrzymuje dziecko wprost z piersi. Różnice te są wynikiem przeprowadzenia szeregu procesów, którym musi zostać poddane mleko zanim trafi do beneficjenta BMK (Cooper i in. 2013). Przed podaniem mleka kobiecego niemowlęciu jest on przechowywany w warunkach chłodniczych, zamrażany, odmrażany w celu połączenia i pobrania prób do badań, rozlewany do docelowych butelek do pasteryzacji, pasteryzowany i ponownie zamrażany. Każde z kolejnych procesów prowadzi do zmian w mleku kobiecym zarówno pod względem zawartości składników odżywczych, jak również poza odżywczych. Jednak największe zmiany spowodowane są przez proces utrwalania termicznego jakiemu poddane jest mleko ludzkie (Wesołowska, 2018).

Chociaż stosowane powszechnie w BMK warunki pasteryzacji holder (62,5°C; 30 min) zapewniają bezpieczeństwo mikrobiologiczne utrwalonego mleka ludzkiego, to prowadzą również do całkowitej lub częściowej degradacji składników biologicznie aktywnych (rozdział 5). Warunki pasteryzacji holder zostały ustalone dla mleka krowiego. Natomiast poziom substancji biologicznie aktywnych w mleku kobiecym jest znacznie wyższy w porównaniu z mlekiem krowim. Konieczna jest zatem adaptacja metod wykorzystywanych w przemyśle lub poszukiwanie nowych, doskonalszych sposobów przedłużania trwałości mleka kobiecego. Proces ten może być prowadzony na kilku płaszczyznach, poprzez

optymalizację metod stosowanych lub poszukiwanie nowych metod utrwalania mleka termicznych, jak również nietermicznych.

Optymalizację procesu pasteryzacji holder można prowadzić w kierunku modyfikacji czasu ekspozycji na działanie wysokiej temperatury poprzez wprowadzenie mieszania w trakcie procesu ogrzewania. Czas ekspozycji próby na działanie wysokiej temperatury można modyfikować wykorzystując inną metodę jej generowania, np. przy użyciu pola promieniowania mikrofalowego. Zgodnie z zasadą utrwalania żywności, która mówi, iż drobnoustroje szybciej ulegają inaktywacji niż składniki odżywcze w miarę podwyższania temperatury ogrzewania (Pijanowski i in. 1997) racjonalnym jest również zastosowanie wyższych temperatur w krótszym czasie ich oddziaływania.

Wśród nietermicznych metod utrwalania mleka kobiecego badania światowe prowadzone są głównie w kierunku zastosowania wysokiego ciśnienia. Prowadzone dotychczas eksperymenty dotyczą parametrów prowadzenia procesu w zakresie ciśnień 200-700 MPa w temperaturach w zakresie 20-50°C. W zakresie temperaturowym od 20°C do 35°C drobnoustroje wykazują dużą odporność na działanie wysokiego ciśnienia. Korzystniejsze zarówno pod względem uzyskania pożądanego efektu bakteriobójczego, jak również zachowania składników bioaktywnych mleka ludzkiego będzie prowadzenie procesu ciśnieniowania w temperaturze poniżej 20°C.

## 2. Banki mleka kobiecego

Niepodważalnie najlepszym sposobem odżywienia niemowląt jest podanie mleka ludzkiego. Zdarza się, że niemowlę nie może być karmione mlekiem własnej matki. Przyczyny tego zjawiska są różne. Najczęściej wynikają z ograniczeń zdrowotnych matki bądź też dziecka (Tab. 1), lecz mogą wynikać również z sytuacji ekonomicznej, czy też losowego zdarzenia. W przypadku ograniczeń ze strony dziecka konieczne jest wprowadzenie żywienia preparatami do żywienia niemowląt o składzie modyfikowanym pod kątem danego schorzenia. W przypadku przeciwwskazań ze strony matki nie ma konieczności rezygnacji z podawania dziecku mleka kobiecego. Dzięki funkcjonowaniu Banków Mleka Kobiecego (BMK) możliwe jest podanie dziecku mleka od innej kobiety, które dzięki procesowi utrwalania jest bezpieczne mikrobiologicznie.

Tabela 1. Wybrane przeciwwskazania medyczne do karmienia naturalnego od strony matki i dziecka.

<b>Matka</b>	<b>Źródło</b>
Czynna, nieleczona gruźlica	Lamounier i in. 2004
Leczenie onkologiczne	Egan i in. 1985; Robinson i in. 1994
Opryszczka (występowanie na piersi)	Read i in. 2003
Zapalenie wątroby typu C	AAP, 2003
Nosicielstwo wirusa CMV	Hamprecht i in. 2001; Yasuda i in. 2003
Nosicielstwo wirusa HIV	AAP, 2003
<b>Dziecko</b>	
Galaktozemia	Chen, 2000
Hiperbilirubinemia (czasowe ograniczenie)	AAP, 2004

BMK jest to jednostka zajmująca się gromadzeniem, utrwalaniem oraz przechowywaniem mleka oddawanego przez kobietę w okresie laktacji w celu podania go dziecku innej kobiety. Dawczyni dzieli się nadwyżką mleka z własnej woli, w większości krajów w tym w Polsce nie otrzymując z tego tytułu gratyfikacji majątkowej. Pierwszy BMK (dawniej zwany „laktarium”) powstał we Wiedniu w 1909 roku (Jones, 2003). W Stanach Zjednoczonych pierwsza taka placówka powstała w Bostonie w 1919 (www.europeanmilkbanking.com). W latach 20-tych i 30-tych XX wieku jednostki te funkcjonowały na nieco odmiennych zasadach niż obecnie. Ze względu na brak ustalonych procedur utrwalania mleka nie było możliwe jego gromadzenie i przechowywanie. Mleko od dawczyń podawane było bezpośrednio dzieciom potrzebującym (Golden,1996). Laktaria działały prężnie do końca lat 50-tych XX wieku.

W kolejnych latach wśród lekarzy oraz młodych matek powstało przekonanie, iż sztuczna mieszanka mlekozastępcza stanowi bezpieczny substytut mleka kobiecego (Fomon 2001). Również wprowadzenie na rynek preparatów do żywienia niemowląt przeznaczonych dla noworodków z niską masą urodzeniową przyczyniło się do wygaszania działalności laktariów. W latach 80-tych zamknięto wiele tych placówek ze względu na obawy związane z możliwością przenoszenia przez mleko wirusa HIV (ludzki wirus niedoboru odporności, eng. Human Immunodeficiency Virus) (Dunn i in. 1992; Oxtoby 1988; Wharton 1987).

Wzrost wiedzy dotyczącej ewentualnych źródeł zakażeń wirusem HIV spowodował reaktywację BMK w latach następnych. W roku 1990 Amerykańskie stowarzyszenie Banków Mleka Kobiecego (HMBANA - Human Milk Banking Association of North America) opublikowało wytyczne dotyczące zbierania, utrwalania oraz przechowywania mleka kobiecego, które stały się podstawą do opracowywania wewnętrznych procedur obowiązujących w większości banków mleka. Według danych EMBA (European Milk Bank Association) w Europie na dzień dzisiejszy istnieje 206 czynnych banków, natomiast 13 placówek jest na etapie organizacji (www.europeanmilkbanking.com). W Polsce powstało dotychczas 9 BMK: w Toruniu, Rudzie Śląskiej, Wrocławiu, Opolu, Krakowie, Szczecinie, Wrocławiu, Rzeszowie, Poznaniu oraz dwa w Warszawie (Rys. 1).



Rysunek 1. BMK w Polsce (www.bankmleka.pl)

W bankach mleka w Polsce określono następującą kolejność beneficjentów (Wesołowska, 2017):

- noworodki przedwcześnie urodzone objęte żywieniem troficznym,
- noworodki przedwcześnie urodzone pozostające w ciężkim stanie,
- chore noworodki przedwcześnie urodzone,
- noworodki donoszone pozostające w ciężkim stanie,
- chore noworodki donoszone,
- noworodki i niemowlęta przed i po operacjach,
- dzieci będące pod opieką hospicjum,
- zdrowe noworodki,
- projekty badawcze.

Wykazano, iż karmienie mlekiem ludzkim (własnej matki lub dawczyni z BMK) zmniejsza ryzyko wystąpienia wielu chorób związanych z wcześniactwem. Pozwala to na generowanie oszczędności dla szpitala związane z leczeniem niemowlęcia (Arnold 2002). Analiza kosztów przeprowadzona w Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym im. L. Rydygiera w Toruniu, w której wdrożona została procedura dokarmiania wcześniaków i chorych noworodków mlekiem z BMK wykazała jej pozytywne aspekty. Stwierdzono statystycznie istotne skrócenie czasu żywienia pozajelitowego wcześniaków z 13 do 8 dni, średniego czasu antybiotykoterapii o 1 dobę oraz obniżenie częstotliwości występowania sepsy w późniejszym okresie noworodkowym. Zmniejszało to wydatki szpitala związane z kuracją antybiotykową dzieci z Oddziałów Intensywnej Terapii Noworodka o około 50%, oraz żywieniem pozajelitowym o około 20% (Wesołowska, 2017).

Dawczynią w BMK może zostać kobieta będąca w trakcie laktacji, u której ilość wytwarzanego mleka jest większa niż zapotrzebowanie żywieniowe jej dziecka. Rekrutacja kobiety karmiącej jako potencjalnej dawczyni przebiega w kilku etapach. W pierwszej kolejności zostaje przeprowadzony wywiad mający na celu ocenę stanu zdrowia kobiety, trybu życia (stosowanie używek, np. palenie papierosów), przebytych chorób oraz przyjmowanych leków (Baumer 2004). Po pozytywnej ocenie dawczyni wystawionej na podstawie wywiadu badana jest krew matki w celu wykluczenia obecności przeciwciał świadczących o zakażeniu HIV, wirusem żółtaczki typu B i C, cytomegalowirusem, oraz ludzkim wirusem T-limfotropowym, jak również krętkami kiły (Wesołowska 2012). Wystąpienie któregokolwiek z zakażeń powoduje dyskwalifikację kobiety jako dawczyni mleka (Baumer 2004). Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zaleca wyłączne karmienie dziecka mlekiem kobiecym do 6 miesięcy życia, oraz kontynuację do 2 roku z wprowadzeniem pokarmów uzupełniających ([www.who.int/en](http://www.who.int/en)). W literaturze światowej dostępne są dane dotyczące składu mleka mam długokarmiących (powyżej 2 lat). Wykazano, iż stężenie białka całkowitego, lizozymu oraz laktoferyny, czyli składników odpowiedzialnych za prawidłowy rozwój oraz ochronę przed patogenami, jest znacząco wyższe w takim mleku w porównaniu z mlekiem mam karmiących krócej niż rok. Zatem nie ma przeciwwskazań do tego aby kobieta długokarmiąca mogła być dawczynią mleka do banku mleka (Perrin i in. 2015; Sinkiewicz-Darol i in. 2015).

Mleko od zdrowych dawczyń pobierane jest przy użyciu laktatora lub ręcznie do pojemników, które dopuszczone zostały do kontaktu z żywnością (Wesołowska 2012), a następnie przechowywane jest w warunkach zamrażalniczych (-20°C). Okres przechowywania surowego mleka kobiecego nie powinien



przekraczać 3 miesiące ze względu na możliwość degradacji niektórych składników odżywczych, jak również bioaktywnych (Friend i in. 1983). Korzystniejsze ze względu na ograniczenie zmian w składnikach mleka wywołanych przechowywaniem zamrażalniczym będzie zastosowanie zamrażania szokowego.

Mleko przyjmowane od dawczyń do BMK musi spełniać odpowiednie wymagania jakości mikrobiologicznej. Jak podaje literatura stosowany w BMK proces utrwalania, tj. pasteryzacja długotrwała niskotemperaturowa LTLT (Low Temperature Long Time) w ściśle określonych parametrach (62,5°C; 30 minut), zwana pasteryzacją holder, powoduje inaktywację wszystkich form wegetatywnych drobnoustrojów, w tym chorobotwórczych oraz wirusów. Niektóre drobnoustroje mogą jednak być odporne na stosowane warunki ogrzewania, np. bakterie z rodzaju *Enterococcus* sp. lub też produkować termoodporne toksyny, np. *S. aureus* dlatego konieczne jest przeprowadzenie analizy mikrobiologicznej określającej ich poziom w mleku przed procesem utrwalania (Wesołowska 2012). Przekroczenie dopuszczalnych norm zawartości bakterii w surowym mleku kobiecym dyskwalifikuje kobietę jako dawczynię. Tabela 2 przedstawia wymagania mikrobiologiczne dla mleka kobiecego przyjmowanego do BKM oraz po procesie pasteryzacji.

Tabela 2. Wymagania mikrobiologiczne dla mleka kobiecego przyjmowanego do banku mleka oraz po procesie pasteryzacji (Rosiak i in. 2017).

Kryterium oceny	Maksymalna dopuszczalna liczba bakterii w surowym mleku [j.t.k./mL]	Maksymalna dopuszczalna liczba bakterii w mleku po procesie pasteryzacji [j.t.k./mL]
Ogólna liczba bakterii	<10 <sup>5</sup>	<10*
Liczba gronkowców koagulazododatnich	<10 <sup>4</sup>	Nieobecne w 1 mL
Liczba bakterii z grupy coli	<10 <sup>3</sup>	Nieobecne w 1 mL

\* -termoodporne enterokoki

Oprócz analizy mikrobiologicznej oznaczany jest również podstawowy skład przeznaczonego do utrwalania mleka dawczyń (białko, tłuszcze, węglowodany, sucha masa, kaloryczność). Pozwala to na indywidualne dopasowanie próbki mleka o odpowiedniej zawartości składników odżywczych, w szczególności białka, do zapotrzebowania żywieniowego noworodka, któremu przekazywana jest dana porcja mleka. W przypadku, gdy stężenie protein nie jest wystarczające, aby zapewnić prawidłowy rozwój dziecka praktykowane jest dodawanie tzw. wzmacniaczy mleka kobiecego (HMF- Human Milk Fortifier) produkowanych na bazie mleka krowiego (Rochow i in. 2013; Reali i in. 2010).

### 3. Charakterystyka składników mleka kobiecego

#### 3.1 Składniki odżywcze

Skład mleka kobiecego zmienia się w sposób dynamiczny. Bezpośrednio po porodzie wydzielana jest siara (colostrum), 5-15 dni po porodzie wydzielane jest mleko niedojrzałe (przejściowe), a po 15 dniach laktacji mleko dojrzałe (Aydin i in. 2006). Siara jest mniej kaloryczna niż mleko przejściowe i dojrzałe, ale zawiera większą ilość białka w porównaniu z mlekiem dojrzałym. Zawartość tłuszczów i cukrów w mleku rośnie w kolejnych etapach laktacji (Emmett i in. 1997). Skład mleka różnicuje się również podczas pojedynczego karmienia. Zmianom ulega np. ilość tłuszczu, która zwiększa się z ok. 1% do nawet 9% wagowych wraz z wydłużeniem czasu ssania (Martysiak-Żurowska i in. 2011). Na wartość

odżywczą mleka wpływa również terminowość porodu. Jeśli dziecko rodzi się przedwcześnie to mleko matki jest bogatsze w składniki energetyczne, odżywcze i biologicznie aktywne (Kowalewska-Kantecka, 2007).

### ***Białka***

Białka obecne w mleku kobiecym pełnią w organizmie noworodka wiele funkcji. Przede wszystkim stanowią one składnik budulcowy. Ponadto są biokatalizatorami reakcji np. laktoperoksydaza katalizuje reakcję utleniania tiocyjanków do związków o właściwościach przeciwbakteryjnych (Pawlus i in. 2005). Uczestniczą w modulacji jeszcze nie wykształconego systemu immunologicznego dziecka. Zawartość białka w mleku kobiecym jest zmienna w zależności od okresu laktacji, jak również od tego w którym tygodniu urodziło się dziecko. Mleko matek rodzących przedwcześnie zawiera więcej protein w porównaniu z mlekiem matek rodzących w terminie. W sianie matki rodzącej między 23 a 29 tygodniem ciąży stężenie białka wynosi ok. 2,6-2,8 g/100ml, natomiast u kobiet rodzących po 33 tygodniu ok. 2,2 g/100mL (Ballard i in. 2013; Bauer i in. 2011; Pawlus i in. 2004).

W mleku kobiecym, podobnie jak w mleku innych ssaków wyróżnia się trzy frakcje białek: białka serwatkowe, kazeinowe oraz białka otoczek kuleczek tłuszczowych (Lönnerdal, 2003; Liao i in. 2011). U człowieka proporcja białek kazeinowych do serwatkowych zmienia się w trakcie laktacji. W sianie wynosi ona odpowiednio 20:80, w mleku przejściowym 40:60, natomiast w mleku dojrzałym 50:50 (Lönnerdal, 2003). Kazeiny należą do białek, które pełnią w organizmie dziecka funkcję odżywczą oraz uczestniczą w odpowiedzi immunologicznej. W mleku ludzkim występuje kazeina  $\beta$  oraz  $\kappa$ . Białka serwatkowe są białkami globularnymi rozpuszczalnymi w wodzie, pośrednio lub bezpośrednio zaangażowanymi w procesy immunologiczne (Lis i in. 2013). Do tej grupy białek zaliczane są również enzymy których stężenie jest zmienne w zależności od fazy laktacji. Niektóre z nich wykazują aktywność już w samym mleku, inne są aktywowane dopiero w świetle przewodu pokarmowego oraz w nabłonku jelitowym lub innych tkankach docelowych organizmu dziecka (szczegółowy opis w rozdziale 3.2.4.) (Bernt i in. 1999; Carver i in. 1996). Dzięki odmiennej od izoenzymów tkankowych budowie niektóre z nich są odporne na destrukcyjne działanie kwasu solnego w żołądku oraz enzymów proteolitycznych w przewodzie pokarmowym (Burrin, 2002). Najmniejszą pod względem ilości grupę protein stanowią białka otoczek kuleczek tłuszczowych, do których zaliczane są przede wszystkim mucyny (Patton i in. 1986).

### ***Lipidy***

Lipidy zawarte w mleku ludzkim występują w postaci zemułgowanych kuleczek opłaszczonych membraną fosfolipidowo-białkową (Koletzko i in. 2001). Większość kuleczek tłuszczowych ma rozmiary rzędu 1  $\mu\text{m}$ , chociaż zdarzają się cząstki o średnicy do 4 $\mu\text{m}$ . Małe rozmiary zapewniają dużą powierzchnię właściwą, ok. 4,5  $\text{m}^2/100 \text{ mL}$ , co ułatwia dostęp enzymów np. lipaz, odpowiedzialnej za trawienie triacylogliceroli zwiększając tym samym przyswajalność lipidów (Emmett i in. 1997). Zawartość tłuszczu w mleku kobiecym zależy od fazy laktacji. W sianie wynosi średnio 2,6-2,8 g/100 mL, natomiast w mleku dojrzałym 3,8-4,2 g/100 mL. Tłuszcz mleka pokrywa 40-55% zapotrzebowania energetycznego niemowlęcia karmionego piersią. Pełni on nie tylko funkcję energetyczną, lecz jest również rezerwuarem wielu składników niezbędnych do prawidłowego rozwoju organizmu dziecka, np.



witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E, K) oraz komponentów lipidowych wspomagających rozwój układu nerwowego (cholesterol) (Greer, 2004; Sakurai i in. 2005; Seher i in. 2015).

Fracja lipidowa składa się w 98% triacylogliceroli. Pozostałe 2% stanowią fosfolipidy, cholesterol, diacyloglicerole, monoacyloglicerole oraz wolne kwasy tłuszczowe (Martysiak-Żurowska i in. 2011; Koletzko i in. 2001). Kwasy tłuszczowe (KT) zawarte w mleku ludzkim pochodzą w 60% z tkanki tłuszczowej matki, w 30% z diety oraz w 10-12% z syntezy *de novo* w gruczole sutkowym (Białek i in. 2011). We frakcji lipidowej dojrzałego mleka kobiecego Europejsek średnio 40% całkowitej zawartości KT stanowią nasycone KT. Pozostałą część stanowią nienasycone KT, głównie jednonienasycone, zwykle kwas oleinowy (C18:1 9c) stanowiący około 35% całkowitej zawartości KT (Martysiak-Żurowska i in. 2011). Z kolei najistotniejszymi wielonienasyconymi KT tłuszczu mleka ludzkiego są kwas linolowy (C18:2n-6, LA) występujący na poziomie 9-19% oraz  $\alpha$ -linolenowy (C18:3n-3, ALA) występujący w ilości 0,7-2,2% (Romeu-Nadal i in. 2008; Martysiak-Żurowska i in. 2011). LA i ALA są szczególnie ważne dla rozwoju młodego organizmu. Należą do prekursorów długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (LC-PUFA - Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids) rodziny n-6 i n-3, do których zaliczane są kwas arachidonowy (C20:4 n-6), dokozaheksanowy (C22:6 n-3), eikozapentaenowy (C20:5 n-3). Kwasy te są strukturalnym komponentem wszystkich błon komórkowych, jak również siatkówki oka. U dorosłych LC-PUFA syntetyzowane są w procesie enzymatycznej desaturacji (wytwarzanie podwójnych wiązań nienasyconych) i elongacji (wydłużanie łańcucha kwasu tłuszczowego) z prekursorów obu rodzin KT - LA i ALA. W pierwszym przypadku powstają pochodne szeregu n-6: kwas  $\gamma$ -linolenowy, kwas dihomogammalinolenowy, kwas arachidonowy (AA) oraz kwas dokozaetraenowy, natomiast w drugim syntetyzowany jest kwas eikozapentaenowy (EPA) i kwas dokozaheksaenowy (DHA) (Stolarczyk i in. 2002). Organizm niemowlęcia ze względu na częściowo wykształcony układ enzymatyczny nie jest w stanie wytworzyć wystarczającej ilości LC-PUFA, dlatego też muszą być one dostarczane wraz z pokarmem (Kent i in. 2006; Innis i in. 1999; Emmett i in. 1997).

W mleku ludzkim obecne są również izomery *trans* KT, zarówno te, które działają prozdrowotnie, tj. izomery sprzężonego kwasu linolowego (Conjugated Linolic Acid -CLA), jak również takie, które wywierają negatywny wpływ na organizm dziecka, tj. syntetyczne *trans* KT. Szkodliwe syntetyczne *trans* KT powstają pod wpływem temperatury oraz różnych czynników fizycznych i chemicznych podczas procesu rafinacji olejów roślinnych, a zwłaszcza ich uwodornienia (Innis i in. 1999). Wysokie stężenie szkodliwych izomerów *trans* występuje w mleku kobiecym, gdy w diecie matki przeważa żywność głęboko przetworzona lub zawierająca tłuszcze przetworzone (Samur i in. 2009). Szkodliwe działanie *trans* izomerów KT przejawia się wbudowywaniem w strukturę błon komórkowych upośledzając ich prawidłowe funkcjonowanie, jak również zaburzeniami w gospodarce lipidowej prowadzącymi do podwyższenia poziomu cholesterolu LDL i obniżenia stężenia cholesterolu HDL. Zmiany te są z kolei przyczyną podwyższenia poziomu insuliny we krwi oraz zaburzają prawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego (Genest, 2003; Katan i in. 1995).

## **Węglowodany**

Zawartość węglowodanów w mleku kobiecym zmienia się w zależności od fazy laktacji. Mleko początkowe zawiera ich około 6,6%, następnie ich ilość rośnie do poziomu średnio 6,9% w mleku przejściowym oraz do około 7,2 % w mleku dojrzałym (Emmett i in. 1997). Głównym składnikiem tej frakcji mleka jest laktoza, której zawartość w mleku dojrzałym wynosi średnio 7g/ 100 mL. Laktaza obecna w przewodzie pokarmowym niemowlęcia hydrolizuje ten dwucukier do łatwo przyswajalnych cukrów prostych glukozy i galaktozy, które pełnią istotną rolę w rozwoju młodego organizmu. Glukoza stanowi główne źródło energii dla mózgu, natomiast galaktoza uczestniczy w procesach mielinizacyjnych. Laktoza zwiększa również wchłanianie wapnia w przewodzie pokarmowym niemowlęcia, m. in. poprzez tworzenie z jonami wapnia rozpuszczalnych, biodostępnych kompleksów (Dolińska i in. 2009; Kim i in. 1978; Martin i in. 1969; Wasserman, 1964).

W mleku kobiecym występują również oligosacharydy, polisacharydy oraz aminocukry (Hutry i in. 2009; Pawlus i in. 2004). Oligosacharydy mleka kobiecego (HMO - Human Milk Oligosaccharides) zbudowane są z glukozy, galaktozy, N-acetyloglukozaminy, fukozy, kwasu sialowego oraz kwasu N-acetylneuraminowego. Skład oligosacharydów w mleku ludzkim jest osobniczy. Stwierdzono, że proporcje poszczególnych składowych są uzależnione między innymi od grupy krwi matki (Bode 2012). HMO nie stanowią źródła energii, gdyż nie są trawione w przewodzie pokarmowym dziecka. Pełnią rolę prebiotyków wspomagając rozwój prawidłowej mikroflory przewodu pokarmowego dziecka. HMO przyczyniają się również do zapobiegania adhezji mikroflory patogenicznej do nabłonka jelita (Boehm i in. 2007). Właściwości te określono między innymi wobec *E. coli*, *L. monocytogenes* oraz *C. jejuni*, której obecność w organizmie jest przyczyną występowania ostrej biegunki (Coppa i in. 2006; Waksmańska i in. 2014). Obecne w mleku oligosacharydy wspomagają ochronę przed zakażeniem wirusem HIV w trakcie karmienia przez matkę seropozytywną. Wysokie stężenie HMO na powierzchni błony śluzowej jelita dziecka zmniejsza ryzyko wchłonięcia wirusa do organizmu (Coutsoudis i in. 2004). W wyniku fermentacji zachodzącej w przewodzie pokarmowym dziecka z HMO powstają również krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (Ryzko, 2011).

### **3.1.1 Witaminy i minerały**

Organizm kobiety w trakcie laktacji priorytetowo zaopatruje w witaminy i składniki mineralne dziecko karmione w sposób naturalny poprzez zapewnienie odpowiedniego poziomu witamin w mleku. Dlatego też bardzo ważne jest spożywanie odpowiednich ilości witamin wystarczającej zarówno dla matki jak i dziecka. W przeciwnym razie witaminy będą dostarczane dziecku kosztem organizmu matki (Segura i in. 2016).

#### ***Witaminy rozpuszczalne w wodzie***

W mleku kobiecym obecne są witaminy rozpuszczalne w wodzie takie jak tiamina (wit. B<sub>1</sub>), ryboflawina (wit. B<sub>2</sub>), niacyna (wit. B<sub>3</sub>), pirydoksyna (wit. B<sub>6</sub>), cyjanokobalamina (wit. B<sub>12</sub>), kwas foliowy (wit. B<sub>9</sub>), kwas pantotenowy (wit. B<sub>5</sub>), biotylna (wit. H) oraz kwas askorbinowy (wit. C) (Emmett i in. 1997). Shi i in. (2011) wykazali, że zawartość witamin rozpuszczalnych w wodzie nie zmienia się istotnie w czasie laktacji. Stwierdzili również, że zarówno suplementacja witaminami, jak również stosowana dieta wpływa na zwiększenie stężenia tych substancji w mleku. Zawartość w organizmie

witamin rozpuszczalnych w wodzie jest regulowana. Nawet przyjęcie przez matkę bardzo wysokich dawek witaminy C nie powoduje jej nadmiernej zawartości w mleku (Martysiak-Żurowska i in. 2017).

### ***Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach***

Stężenie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E, K) w mleku ludzkim jest w niewielkim stopniu zależne od diety matki, ponieważ czerpane są one z zapasów zgromadzonych w organizmie kobiety (Tokuşoğlu i in. 2008; Muslimatun i in. 2001). Największe stężenie witaminy D znajduje się w mleku początkowym, 4 µg/100g, natomiast w dojrzłym tylko 0,005 µg/100g. Korzystny wpływ na ilość tego składnika w mleku ma zwiększona ekspozycja matki na promienie słoneczne (Ala-Houhala i in. 1988). Mleko kobiece zawiera niewielkie ilości witaminy K, tj. średnio 22,4 µg/100g w sianie i tylko 0,8µg/100g w mleku dojrzłym. Już kilka dni po porodzie w przewodzie pokarmowym niemowlęcia rozwija się mikroflora, która zapewnia produkcję witaminy K na wystarczającym poziomie względem zapotrzebowania dziecka (Shi i in. 2011; Riordan, 2010). Witamina A oraz E jako witaminy wykazujące właściwości przeciwutleniające opisano w rozdziale 3.2.2.

### ***Składniki mineralne***

Zawartość większości z wymienionych w tabeli 3 składników mineralnych w mleku kobiecym utrzymuje się mniej więcej na stałym poziomie na wszystkich etapach laktacji (Shi in. 2011). Wyjątek stanowi cynk oraz miedź. Ze względu na duże zapotrzebowanie dziecka na te pierwiastki w początkowym okresie życia, ich stężenie jest większe w sianie. Żelazo w mleku kobiecym występuje w stężeniu pięciokrotnie wyższym niż w mleku krowim. U dzieci karmionych naturalnie nie obserwuje się niedoboru tego pierwiastka (Riordan, 2010; Krachler i in. 1998). Zdolność przyswajania przez noworodka tych składników pokarmowych z mleka ludzkiego jest większa niż z mleka krowiego (Emmett i in. 1997). Przypuszcza się, iż spowodowane jest to większą odpornością ligandów transportujących składniki mineralne na trawienie w przewodzie pokarmowym dziecka (Lønnerdal 1987). Zawartość najistotniejszych składników mineralnych w mleku kobiecym zestawiono w tabeli 3. Oprócz wymienionych minerałów w mleku kobiecym znajdują się niewielkie ilości manganu, chromu, glinu oraz fluoru (Riordan, 2010).

Tabela 3. Zawartość głównych składników mineralnych w mleku kobiecym w różnych okresach laktacji (mg/100 mL)\* (Shi i in. 2011).

<b>Składnik/100ml</b>	<b>Siara</b>	<b>Mleko przejściowe</b>	<b>Mleko dojrzałe</b>
Ca [mg]	28,5 ± 3,6	28,0 ± 4,3	33,4 ± 7,0
P [mg]	14,1 ± 1,7	15,0 ± 2,5	16,7 ± 2,9
Cl [mg]	84,1 ± 8,2	89,7 ± 21,8	88,8 ± 21,2
Mg [mg]	3,5 ± 0,6	3,6 ± 0,8	3,7 ± 1,0
K [mg]	46,0 ± 11,1	46,3 ± 13,9	50,4 ± 14,6
Na [mg]	11,0 ± 3,3	16,3 ± 8,7	13,8 ± 5,6
Cu [µg]	61,3 ± 82,7	59,0 ± 48,3	36,7 ± 19,8
Fe [mg]	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02
Zn [mg]	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,02 ± 0,1
I [µg]	22,1 ± 14,3	33,1 ± 27,6	27,9 ± 17,1
Se [µg]	1,4 ± 0,5	1,9 ± 0,4	1,5 ± 0,6

\*- Średnia zawartość ± odchylenie standardowe, n= 80

### 3.2 Wybrane biologicznie aktywne składniki mleka kobiecego

Biologicznie aktywne składniki mleka ludzkiego wspomagają nie w pełni rozwinięty układ odpornościowy oraz trawienny noworodka. Organizm przeciwdziała infekcji dzięki obecności czynników odporności swojej, do których należą immunoglobuliny oraz nieswoistej, do których zalicza się m. in. lizozym i laktoferynę (Lønnerdal 2003; Ogundele i in. 1999). Odporność organizmu niemowlęcia wspomagana jest również przez komponenty przeciwutleniające takie jak enzymy: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa, witaminy: A, C, E oraz glutation, koenzym Q<sub>10</sub> i laktoferynę (Bryś i in. 2015). Niezwykle istotnym składnikiem wspomagającym układ odpornościowy niemowlęcia jest mikroflora probiotyczna mleka kobiecego (rozdział 4).

Mleko kobiece zawiera w swoim składzie również enzymy trawienne, które wspomagają rozkład składników odżywczych mleka w przewodzie pokarmowym dziecka. Zalicza się do nich amylazę, proteazy oraz lipazy (Chattertona i in. 2004; Lindberg i in. 1982; Hamosh i in. 1981)

#### 3.2.1 Składniki przeciwdrobnoustrojowe

##### *Lizozym*

Lizozym (LZ) wykazuje bezpośredni efekt bakteriobójczy w stosunku do bakterii Gram dodatnich. Enzym ten działa litycznie w stosunku do ściany komórkowej bakterii powodując degradację wiązań β-1,4-glikozydowych między atomem C-1 kwasu *N*-acetylmurainowego, a atomem C-4 *N*-acetyloglukozaminy prowadząc do rozkładu mureiny na disacharydy (Chipman i in. 1969). W reakcje enzymatyczne LZ zaangażowane są dwie reszty aminokwasowe: kwasu glutaminowego (Glu35) oraz asparaginowego (Asp52) (Doonan, 2008; Callewaert i in. 2010; Leyko, 1983; Artymiuk i in. 1979).

W synergicznym działaniu z laktoferyną lizozym działa bakteriobójczo również w stosunku do bakterii Gram ujemnych. Usunięcie lipopolisacharydu z zewnętrznej błony komórkowej przez laktoferynę umożliwia dostęp LZ do wewnętrznej matrycy proteoglikanowej membrany powodując rozkład peptydoglikanów ściany komórkowej co prowadzi do śmierci komórki (Ellison i in. 1991). Stwierdzono również, że forma zdenaturowana lizozymu, jak również niektóre peptydy powstałe w wyniku hydrolizy tego białka wykazują działanie degradacyjne w stosunku do błony komórkowej bakterii (Pellegrini i in.

1997). Przeciwdrobnoustrojowa aktywność zdenaturowanego enzymu wiąże się z amfipatycznym charakterem (zdolności utrzymywania się na granicy wodnej i lipidowej) jednego z czterech peptydów znajdujących się na C-końcu LZ. Dzięki zmianom konformacyjnym fragment ten wnika do wnętrza błon, gdzie dodatkowo naładowane reszty jego aminokwasów oddziałują z ujemnie naładowanymi składnikami błon. Konsekwencją tego jest ich uszkodzenie oraz śmierć komórki (Masschalck i in. 2001; Düring i in. 1999; Hisham i in. 1996). Na aktywność LZ wpływa temperatura, pH oraz stężenie chlorku sodu w środowisku. Optymalne warunki działania LZ to temperatura nie przekraczająca 60°C oraz pH 6-7. W środowisku pozbawionym NaCl działanie bójcze tego enzymu jest obniżone (Salton, 1957).

LZ występuje w organizmach zwierzęcych, roślinnych oraz wirusach. Zlokalizowany jest w ziarnach neutrofilów, makrofagów i monocytów. U człowieka występuje w osoczu krwi, łożach, ślinie, wydzielinach śluzowo-surowiczych dróg oddechowych oraz w mleku (Futoma-Kołoch i in. 2009; Gołąb i in. 2007). LZ mleka ludzkiego jest wytwarzany głównie przez makrofagi, które stanowią około 80% komórek mleka (Ballard i in. 2013). Zawartość LZ w mleku ludzkim jest zmienna i zależy od fazy laktacji. Do około 30 dnia po porodzie stężenie tego białka wynosi około 0,4 g/L, następnie zaczyna rosnąć i pomiędzy 57 a 84 dniem wynosi około 0,9 g/L (Pawlus i in. 2005; Montagne i in. 2001). Terminowość porodu również wpływa na stężenie LZ w mleku kobiecym. W mleku kobiet, które urodziły przed terminem oznaczono większe stężenie tego białka (Goldman, 2000).

Podczas badań nad tym białkiem zauważono znaczny wzrost jego zawartości w żołądku dziecka po procesie trawienia mleka. Wskutek tego procesu niszczone są błony komórkowe (zarówno plazmowe jak i organelli) makrofagów pochodzących z mleka matki co prowadzi do uwolnienia się LZ. Badacze wykazali, iż makrofagi w największej ilości degradowane są w końcowym etapie trawienia w żołądku, czyli przed jego opróżnieniem, co przyczynia się do większej dostępności LZ w górnym odcinku jelita cienkiego (Zhang i in. 2013).

### **Laktoferyna**

Laktoferyna (LF) w organizmie ludzkim występuje w płynach ustrojowych i wydzielinach takich jak mleko, łzy oraz ślina. Białko to jest jednym z podstawowych składników mleka kobiecego wspomagających nie w pełni rozwinięty układ odpornościowy niemowlęcia. LF obecna w mleku ludzkim syntetyzowana jest w gruczole sutkowym przez komórki nabłonkowe, natomiast ekspresja tego białka regulowana jest przez prolaktynę. Białko występuje w mleku w formie zamkniętej (aktywnej), tj. zawierającej w swojej cząsteczce jon żelaza, dzięki czemu jest odporna na proteolizę (Brock, 2002, Masson i in. 1966). Zawartość LF w mleku ludzkim jest zmienna i zależy od fazy laktacji (od 5,8 g/L w sianie do 2,2 g/L w mleku dojrzałym) (Montagne i in. 2001).

LF wykazuje między innymi właściwości bakteriostatyczne, bakteriobójcze, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwtłeniące oraz przeciwwirusowe (Małaczewska i in. 2006; Wakabayashi i in. 2006; Sacharczuk i in. 2005).

Właściwości bakteriobójcze LF związane są z jej zdolnością do wiązania jonów żelaza, ograniczając tym samym dostępność tego pierwiastka dla bakterii, przez co następuje zahamowanie ich wzrostu (Reyes i in. 2005). Bakteriobójcze w stosunku do bakterii Gram ujemnych działanie LF wynika również z bezpośredniej interakcji z lipopolisacharydami (LPS). Białko to prowadzi do uwolnienia LPS ze ściany komórkowej bakterii zwiększając przepuszczalność membrany, co prowadzi do jej uszkodzenia i śmierci

komórki (Ellison i in. 1991; Coughlin i in. 1983). W przypadku bakterii Gram dodatnich efekt ten wspomagany jest wiązaniem się LF z kwasem lipoteichowym - składnikiem błony komórkowej bakterii, co powoduje zmniejszenie ładunku ujemnego ściany komórkowej, a tym samym wspiera działanie lizozymu (Leitch i in. 1999). Zdolność LF do wiązania jonów żelaza pośrednio przeciwdziała stresowi oksydacyjnemu w organizmie (Safaeina i in. 2015). Jony żelaza posiadają zdolność katalizowania reakcji tworzenia reaktywnych form tlenu, oraz wzmacniają reakcję Fentona (reakcja nadtlenu wodoru z jonami żelaza ( $Fe^{2+}$ ) z wytworzeniem rodnika hydroksylowego) (Emerit i in.2001; Belizi i in. 1999; Oliński i in. 1996).

LF wykazuje aktywność przeciwwirusową zarówno względem wirusa DNA jak i RNA. Mechanizmy działania LF przeciw wirusom nie zostały jednak jeszcze dokładnie scharakteryzowane. Przypuszcza się, że LF może blokować internalizację niektórych wirusów w komórce gospodarza (np. wirusa cytomegalii) jak również blokować replikację w komórce gospodarza (np. wirus zapalenia wątroby typu C lub rotawirus) (Beljaars i in. 2004; Ikeda i in. 2000; Superti i in. 1997). LF oprócz działania przeciwdrobnoustrojowego wspomaga układ odpornościowy noworodka m.in. poprzez stymulację wzrostu tkanek jelita, chroni przed translokacją bakterii jelitowych do układu krążenia (Artym i in. 2005).

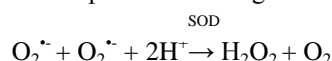
### 3.2.2 Składniki przeciwutleniające

W warunkach homeostazy reaktywne formy tlenu (RTF) uwalniane w ilościach fizjologicznych pełnią rolę mediatorów i regulatorów wielu procesów komórkowych (Valko i in. 2007). Ponadto ROS biorą udział w regulacji procesów odpornościowych poprzez nasilenie aktywacji limfocytów T oraz indukcję adhezji komórek leukocytarnych do śródbłonna, co umożliwia ich przenikanie z układu krążenia do miejsca reakcji zapalnej (Dröge i in. 2002; Los i in. 1995; Valko i In. 2007). W celu zapobiegania lub hamowania zmian wywołanych działaniem ROS organizm wykształcił mechanizmy obronne, czyli tak zwany system antyoksydacyjny (Zabłocka i in. 2008)

Stan stresu oksydacyjnego jest szczególnie niebezpieczny dla dzieci urodzonych przedwcześnie. Niestety w ich przypadku zazwyczaj konieczne jest zastosowanie terapii tlenowej, czego skutkiem może być hiperoksja, czyli wyższe niż normalne stężenie tlenu w komórkach. Stan ten sprzyja powstawaniu wolnych rodników, z którymi niedojrzały układ odpornościowy dziecka nie może sobie poradzić. Dlatego szczególnie ważne jest aby przeciwutleniacze dostarczane były do organizmu wraz z pokarmem (Czajka, 2006; Buonocore i in. 2006). W mleku kobiecym stwierdzono obecność przeciwutleniaczy enzymatycznych, do których zalicza się między innymi dysmutazę ponadtlenkową (Superoxide Dismutase - SOD), katalazę (CAT – Catalase), peroksydazę glutationową (GPx - Glutathione Peroxidase) jak również nieenzymatycznych tj. glutation, koenzym Q , witaminy A, C i E.

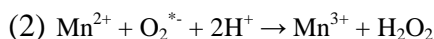
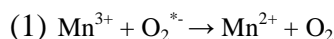
#### *Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)*

SOD katalizuje reakcję dysmutacji rodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru wg reakcji:



Proces ten przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie pod wpływem rodnika ponadtlenkowego następuje redukcja umiejscowionego w centrum aktywnym jonu metalu z jednoczesnym uwolnieniem cząsteczki tlenu (1). Następnie jon metalu ulega utlenieniu przy udziale kolejnej cząsteczki rodnika ponadtlenkowego oraz wodoru z wytworzeniem nadtlenu wodoru (2). Nadtlenek wodoru również

zaliczany do ROS rozkładany jest przez katalazę, kolejny enzym przeciwutleniający występujący w mleku ludzkim (Corvo i in. 2000).

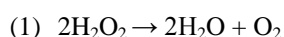


W mleku ludzkim występują dwie izoformy SOD, mitochondrialna zawierająca mangan oraz cytoplazmatyczna cynkowo-miedziowa (Kasapović i in. 2005). Formy te charakteryzują się różną odpornością na działanie czynników zewnętrznych. ZnCuSOD wykazuje wyższą odporność na działanie wysokiej temperatury oraz na proteolizę w porównaniu z MnSOD (Imlay i in. 1996). Największa aktywność SOD występuje w mleku początkowym i wynosi około 6,3 nmol/min/mL. Wraz z wydłużeniem się czasu laktacji następuje spadek aktywności tego enzymu do poziomu około 2 nmol/min/mL w mleku dojrzałym (Yuksel i in. 2015).

### ***Katalaza (CAT)***

Każda podjednostka katalazy posiada układ hemowy z centralnie wbudowanym atomem żelaza ( $\text{Fe}^{3+}$ ). W przypadku ludzkiej odmiany powyższego enzymu grupa ta osadzona jest głęboko we wnętrzu hydrofobowego kanału białka, który uniemożliwia dostęp do grupy hemowej cząsteczkom większym niż  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bayer i in. 1988). Enzym ten katalizuje reakcję dysproporcjonowania nadtlenu wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), powstającego między innymi w wyniku działania SOD, do cząsteczki wody i tlenu. W zależności od stężenia nadtlenu wodoru w środowisku enzym ten wykazuje zróżnicowane działanie. W przypadku wysokiej koncentracji  $\text{H}_2\text{O}_2$ , katalaza rozkłada nadtlenek wodoru do cząsteczki wody i tlenu (1). Natomiast gdy stężenie  $\text{H}_2\text{O}_2$  jest niskie dominuje aktywność peroksydazowa katalazy. Wówczas enzym katalizuje reakcję utleniania związków będących donorami wodoru między innymi  $\text{SH}_2$ , etanolu, metanolu, azotanów (III) (2) (Cadenas, 1997; Gaetani i in. 1996; Halliwell i in. 1993; Percy, 1984; Sun i in. 1994).

CAT



CAT



Reakcja dysproporcjonowania nadtlenu wodoru przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie reakcji katalazy z  $\text{H}_2\text{O}_2$  następuje redukcja nadtlenu wodoru do wody. W drugim etapie następuje utlenienie przez ten związek kolejnej cząsteczki nadtlenu wodoru, w wyniku tego powstaje tlen cząsteczkowy i woda (Chelikani i in. 2003; Kalko i in. 2001).

Aktywność katalazy w mleku ludzkim jest zróżnicowana i zależy od etapu laktacji. Wraz z wydłużeniem się czasu laktacji aktywność enzymu maleje z 26 nmol/min/mL w sianie do 1,8 nmol/min/mL w mleku dojrzałym (Yuksel i in. 2015).

### ***Glutation***

Glutation jest tripeptydem zawierającym w swoim składzie glutaminę, cysteinę oraz glicynę. W komórkach dominuje postać zredukowana glutationu (GSH). Postać utleniona stanowi mniej niż 1% całkowitej puli tego związku. W komórkach białko to zlokalizowane jest w cytoplazmie, mitochondriach

oraz jądrze komórkowym (Hwang i in. 1992). Stosunek stężeń postaci zredukowanej do utlenionej glutaionu (GSH/GSSG) stanowi miarę stanu oksydacyjno-redukcyjnego komórki (Gilbert 1995).

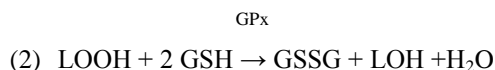
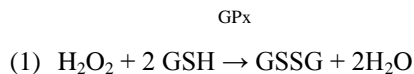
GSH inaktywuje reaktywne formy tlenu, czynniki rakotwórcze typu endogennego oraz egzogenne, jak również obniża stężenie wtórnych produktów utleniania lipidów (np. MDA- dialdehyd malonowy) powstających w wyniku utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (Ankrah i in. 2000). Ponadto utrzymuje w stanie funkcjonalnym inne substancje przeciwutleniające mleka (np. witaminę C) oraz wspomaga immunologiczną odpowiedź komórkową uczestnicząc w aktywacji limfocytów (Wells i in. 1995; Hamilos i in. 1985).

GSH w mleku kobiecym w największym stężeniu występuje w siarze, na poziomie około 250 mmol/L. Wraz z wydłużeniem czasu laktacji następuje obniżenie zawartości GSH do poziomu 160 mmol/L w mleku dojrzalym (Ankrah i in. 2000).

### **Peroksydaza glutationowa (GPx)**

Peroksydaza glutationowa jest białkiem tetramerycznym zbudowanym z 4 identycznych podjednostek, w których centrum aktywnym występuje atom selenu (Torres i in. 2003). Obecnie wyróżniono trzy podstawowe formy GPx, które różnią się między sobą strukturą podjednostek (cGPx, PH-GPx, eGPx), jak również miejscem występowania. Formy cGPx oraz PH-GPx zlokalizowane są w cytozolu komórki, natomiast eGPx występuje na zewnątrz komórki, w osoczu krwi (Saito i in. 1999).

Jednym z substratów reakcji katalizowanej przez GPx jest zredukowany glutation (GSH) drugim może być w zależności od specyficzności enzymu bądź nadtlenek wodoru (1), bądź wodorotlenek lipidowy (2) (Elias i in. 2008; Torres i in. 2003).



Peroksydaza glutationowa typu cGPx bierze udział w redukcji nadtlenu wodoru oraz organicznych wodoronadtlenków, natomiast PH-GPx ma zdolność bezpośredniego redukowania utlenionych fosfolipidów i cholesterolu w błonach komórkowych. Typ eGPx posiada zdolność redukowania zarówno wodoronadtlenków lipidowych jak i nadtlenu wodoru.

GPx łącznie z reduktazą glutationową wchodzi w skład enzymatycznego układu związanego z glutationem. W wyniku działania tego układu glutation pozostaje w cyklu forma utleniona-zredukowana (Jaeschke i in. 2002; Arai i in. 1999; Saito i in. 1999; Flohe, 1988).

Aktywność GPx jest stała przez cały okres laktacji i wynosi około 80 mU/mL mleka (L`Abbe i in. 2000).

### **Koenzym Q<sub>10</sub>**

Koenzym Q<sub>10</sub> (ubichinon) czyli 2,3-dimetoksy-5-metylo-6-poliprenylo-1,4-benzochinon należy do pochodnych benzochinonu (Siemieniuk i in. 2005).

Związek ten posiada właściwości zarówno pro-, jak i antyoksydacyjne. Działanie prooksydacyjne wykazuje rodnik ubisemichinonowy oraz anionrodnik ubisemichinonowy i polega na wytworzeniu ROS w wyniku reakcji z tlenem (James i in. 2004). Działanie antyoksydacyjne wykazuje postać zredukowana

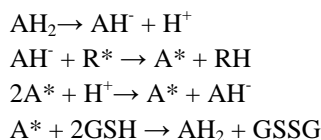


CoQ<sub>10</sub> -ubichinol, którego działanie bezpośrednie polega na wiązaniu wolnych rodników zapobiegając tym samym peroksydacji lipidów oraz oksydacyjnym modyfikacjom białek i DNA. Jego pośrednia funkcja polega na regeneracji zredukowanej, biologicznie aktywnej postaci  $\alpha$ -tokoferolu z jej postaci utlenionej (Ernster 1995).

Zawartość CoQ<sub>10</sub> w mleku kobiecym jest zmienna i zależy od fazy laktacji oraz terminowości porodu. Największe stężenie tego przeciwutleniacza oznaczono w siarze, średnio  $0,81 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$ , natomiast w mleku dojrzłym średnio  $0,75 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$  (Quiles i in. 2006).

### **Witamina C**

Witamina C zaliczana jest do przeciwutleniaczy rozpuszczalnych w wodzie. Witamina ta spełnia w organizmie wiele funkcji, m. in. hamuje inicjację łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych. Poprzez donację wodoru witamina C przekształca się w jon askorbinowy, a następnie z udziałem rodnika tlenowego w niereaktywny rodnik askorbinowy, który regenerowany jest do kwasu askorbinowego z udziałem glutationu (Sies i in. 1992). Witamina C jest aktywna biologicznie zarówno w formie nieutlenionej (kwas L-askorbinowy) jak i zredukowanej (kwas dehydroaskorbinowy) (Konopacka, 2004).



AH<sub>2</sub> - kwas askorbinowy, AH<sup>·</sup> - jon askorbinowy, A<sup>·</sup>- rodnik askorbinowy, R<sup>·</sup>- rodnik tlenowy, GSH- zredukowana postać glutationu, GSSG- utleniona postać glutationu

Ze względu na wysoką niestabilność witamina C jest wykorzystywana jako marker zmian zachodzących w trakcie przetwarzania żywności. Szybkość jej degradacji jest zależna od temperatury, pH, dostępu światła, obecności enzymów oraz dostępu tlenu (Steskova i in. 2006).

Średnie stężenie witaminy C w mleku kobiet pochodzących z rejonu Trójmiasta wynosi około 50 mg/L (Martysiak-Żurowska i in. 2017). Niedobór tej witaminy w organizmie dziecka w życiu płodowym może prowadzić do nieprawidłowości w rozwoju układu nerwowego (Tveden-Nyborg i in. 2012). Deficyt witaminy C w pokarmie prowadzi do zaburzenia przemian kwasów tłuszczowych, osłabienia naczyń włosowatych, jak również zmniejszenia odporności na infekcje (Tolonen, 1990).

### **Witamina A**

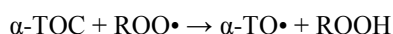
Witamina A jest przeciwutleniaczem rozpuszczalnym w tłuszczach. Dwie podstawowymi formami witaminy A są retinol oraz 3,4-didehydroretinol. Obydwie formy łatwo ulegają utlenieniu do aldehydów, a następnie kwasów (Moszczyński i in. 1999). Przeciwutleniające właściwości witaminy A polegają na reakcji retinolu z rodnikami nadtlenkowymi i przerwaniu reakcji łańcuchowej peroksydacji lipidów z wytworzeniem wodoronadtlenków. Witamina ta posiada ponadto zdolność do bezpośredniego reagowania z ROS z wytworzeniem 5,6-epoksydu retinoidowego (Palace i in. 1999). Prowitamina A czyli  $\beta$ -karoten oprócz zdolności „zmiatania” rodników nadtlenkowych powoduje wygaszanie tlenu singletowego. Proces ten zachodzi w dwojaki sposób. Poprzez bezpośrednie przeniesienie energii wzbudzenia na cząsteczkę karotenoidu i jej rozproszenia w postaci ciepła lub chemicznej reakcji z tlenem prowadzącej do nieodwracalnego uszkodzenia cząsteczki karotenoidu (Edge i in. 1997).

Zawartość witaminy A w mleku ludzkim jest najwyższa w mleku początkowym i wynosi około 1 µg/mL. Następnie w mleku dojrzałym spada do około 0,14 µg/mL (Macias iin. 2001).

Niedobór tej witaminy może powodować upośledzenie wzroku, jak również wysychanie błon śluzowych co powoduje zwiększenie ryzyka wystąpienia stanów zapalnych, między innymi układu oddechowego oraz pokarmowego (EFSA, 2006).

### **Witamina E**

Witamina E podobnie jak witamina A należy do przeciwutleniaczy rozpuszczalnych w tłuszczach. Aktywność witaminy E wykazuje 8 izoform, które zbudowane są z układu pierścieniowego 6-chromanolu i szesnasto węglowego łańcucha bocznego. Izoformy te można podzielić na tokoferole w których występuje nasycony łańcuch boczny oraz tokotrienole, które posiadają nienasycony łańcuch boczny. W zależności od położenia grup metylowych w pierścieniu chromanolu powyższe typy witaminy E klasyfikuje się jako formy  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (Moszczyński i in. 1999). Aktywność przeciwutleniająca tokoferoli polega na zdolności do przerywania łańcuchowej reakcji peroksydacji lipidów. Tokoferole reagując z rodnikami nadtlenkowymi tworzą względnie stabilne rodniki tokoferylowe.



Działanie antyoksydacyjne witaminy E zależy od obecności grupy -OH w pozycji 6 pierścienia chromanolu. Atom wodoru uczestniczy w wygaszaniu tlenu singletowego oraz hamowaniu tworzenia rodników nadtlenkowych (Burton, 1994). Najwyższe stężenie najbardziej reaktywnej formy witaminy E, tj.  $\alpha$ -tokoferolu występuje w mleku początkowym i wynosi około 10 µg/mL, a następnie spada do poziomu 3 µg/mL w mleku dojrzałym (Martysiak-Żurowska i in. 2013).

Niedobór witaminy E może powodować nieodwracalne uszkodzenie układu nerwowo - mięśniowego (Sokol i in. 1987; Socha i in. 1997). W przypadku niemowląt może on wpływać na rozwój niedokrwistości polegającej na podatności erytrocytów na hemolizę oraz obniżeniu syntezy hemoglobiny (Gawęcki, 2002).

### **3.2.3 Składniki immunochronne i immunomodulujące**

#### ***Immunoglobulina A (IgA)***

Układ odpornościowy niemowlęcia nie jest w pełni wykształcony, dlatego też ochronę przed patogenami zapewniają mu przeciwciała dostarczone wraz z mlekiem matki. Dominującą klasą przeciwciał w mleku jest IgA, która stanowi 80-90% wszystkich immunoglobulin (Agarwal i in. 2011; Brandtzaeg, 2003). IgA obecna w mleku ludzkim jest swoista wobec mikroflory układu oddechowego oraz pokarmowego matki. Antygeny dostające się do organizmu matki w trakcie laktacji „rozpoznawane” są przez komórki M na powierzchni błony śluzowej jelita cienkiego, gdzie są aktywowane miejscowe limfocyty. Kolejno limfocyty opuszczają przewód pokarmowy i przechodzą przez układ limfatyczny do gruczołu piersiowego (Kleinman i in. 1979), gdzie pobudzają komórki plazmatyczne do syntezy IgA. Białko to powstaje w gruczole pod błoną podstawową w postaci dimeru, który następnie przyłącza się do receptora poly-Ig i dyfunduje przez błonę podstawową do mleka (Janeway i in. 2001).

IgA obecna w mleku ludzkim wspomaga rozwój przewodu pokarmowego niemowlęcia. Ogranicza adhezję do błon śluzowych drobnoustrojów patogennych takich jak *E.coli*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*,

*C. difficile*, jak również neutralizuje wirusy takie jak polio, wirusy Coxsackie, jak również rotawirusy (Agarwal i in. 2011; Welsh i in. 1979).

Zawartość IgA w mleku kobiecym zależna jest od fazy laktacji. Największe stężenie tej immunoglobuliny oznaczane jest w siarze 6,5 g/L, następnie obniża się do poziomu 0,7 g/L w mleku dojrzałym (Castellote i in. 2011). W mleku ludzkim stwierdzono również obecność innych klas immunoglobulin: IgM, IgG, IgE, ale w mniejszych ilościach.

### ***Cytokiny mleka ludzkiego***

Cytokiny określane mianem lokalnych hormonów, działają w sposób autokryny oraz parakryny. W mleku ludzkim występują takie cytokiny jak IL-1 $\beta$ , IL-2, -6, -8, -10, -12, -18, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$  oraz cytokiny hematopoetyczne. Odgrywają one znaczącą rolę w procesach immunomodulacji oraz immunochrony. Regulują wzrost, różnicowanie, migrację komórek, formowanie oraz degradację składników macierzy zewnątrzkomórkowej, procesy chemotaksji oraz apoptozy (Stepień-Wyrobiec i in. 2008). Peptydy te wytwarzane są przede wszystkim przez komórki jednojądrzaste, głównie monocyty oraz limfocyty aktywowane w miejscu reakcji zapalnej (Krzemień, 2005; Robak, 1996).

Najbardziej znaczącą ilościowo cytokiną mleka ludzkiego stanowi transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF  $\beta$ ). TGF- $\beta$  powstaje w aparacie Golgiego w formie kompleksu z białkiem LAP (Niemczyk i in. 2005). TGF- $\beta$  wchodzący w skład tego kompleksu jest pozbawiony zdolności wiązania się ze swoimi receptorami i właśnie w takiej formie występuje w mleku kobiecym. Uwolnienie TGF- $\beta$  z kompleksów następuje pod wpływem różnych czynników, takich jak wahania temperatury i pH, promieniowanie jonizujące, działanie trombospondyny i plazminy (Bierie i in. 2006; Fleisch i in. 2006; Niemczyk i in. 2005). Aktywacja cytokiny następuje w niskim pH, w żołądku dziecka (Nakamura i in. 2009).

TGF- $\beta$  obecny w mleku ludzkim występuje w trzech izoformach tj. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, wśród których dominuje TGF- $\beta$ 2 (95%). Stężenie TGF- $\beta$ 2 w mleku kobiecym jest zróżnicowane w zależności od fazy laktacji i w siarze występuje w zakresie 1,3-5,3 ng/mL, natomiast w mleku dojrzałym w zakresie 0,6-2,7 ng/mL (Kalliomäki i in. 1999). Cytokina ta wspomaga układ odpornościowy noworodka między innymi poprzez regenerację uszkodzonych błon śluzowych przewodu pokarmowego, uszczelnienie bariery jelitowej oraz zwiększenie tolerancji immunologicznej (Maheshwari i in. 2011; Rautava i in. 2011). Zaraz po urodzeniu układ odpornościowy jest niedojrzały, synteza czynników immunologicznych w niedojrzałych jelitach dziecka jest minimalna. Dostarczany z mlekiem kobiecym TGF- $\beta$ 2, wspólnie z IL-10, odgrywa główną rolę w wytwarzaniu IgA w tym okresie (Penttilä i in. 1998; Hacsek i in. 1996; Perkkio i in. 1980). Zawarta w mleku kobiecym TGF- $\beta$  pobudza komórki B oraz komórki nabłonkowe jelit noworodka do endogennej produkcji IgA, kolejno wraz z wiekiem dziecka stężenie TGF- $\beta$  w mleku maleje (Penttilä i in. 1998; Seder i in. 1998; Zan i in. 1998; Christ i in. 1997).

### ***Czynniki wzrostu***

W mleku ludzkim zawarte są czynniki wzrostu, które pośrednio regulują działanie układu pokarmowego, naczyniowego, nerwowego oraz hormonalnego dziecka. Zalicza się do nich: czynnik wzrostu śródbłonka naczyń, insulinopodobne czynniki wzrostu, czynnik wzrostu naskórka, czynniki neurotroficzne pochodzące z mózgu i linii komórek gleju. Największe stężenie powyższych komponentów mleka kobiecego oznaczane jest w mleku początkowym matek wcześniaków. Wykazano,



iż nieprawidłowa regulacja aktywności czynnika wzrostu śródbłonna naczyń przyczynia się do zaburzenia unaczynienia siatkówki oka zwiększając ryzyko wystąpienia retinopatii wcześniaczej (Reynolds 2001). Z kolei insulinopodobny czynnik wzrostu przeciwdziała powstawaniu martwiczego zapalenia jelit (Baregamian i in. 2006). Również czynnik wzrostu naskórka wspomaga regenerację błony śluzowej uszkodzonego jelita (Khailova i in. 2009). Czynniki neurotroficzne występujące w mleku kobiecym stymulują rozwój jelitowego układu nerwowego noworodka regulując prawidłową perystaltykę jelit oraz zwiększając przeżycie neuronów (Boesmans i in. 2008; Fichter i in. 2011).

#### 3.2.4 Enzymy trawienne

Prawidłowy rozwój młodego organizmu dziecka uzależniony jest między innymi od dostarczenia oraz możliwości przyswajania składników odżywczych mleka kobiecego. Układ pokarmowy niemowlęcia posiada ograniczenia wynikające z niedostatecznej produkcji enzymów trawiennych.

W przypadku włączenia do diety dziecka produktów zawierających skrobię  $\alpha$ -amylaza zawarta w mleku ludzkim wspomaga hydrolizę cukrów złożonych przez co dzieci karmione naturalnie są w stanie trawić posiłki węglowodanowe znacznie wcześniej i znacznie lepiej w porównaniu z niemowlętami karmionymi preparatami do żywienia niemowląt (Heitlinger i in. 1983). Aktywność tego enzymu w organizmie dziecka jest niska i wynosi 0,2-0,5% w stosunku do aktywności u dorosłego (Jones i in. 1982). Wykazano, iż niemowlę nie posiada zdolności do produkcji endogennej  $\alpha$ -amylazy nawet do 2 roku życia (Zoppi i in. 1972). Największą aktywność tego enzymu oznaczono w siarze około 550 U/L, natomiast w mleku dojrzałym około 200 U/mL (Kocić i in. 2010).

Proteazy są enzymami katalizującymi rozkład białek. Wykazało, iż enzymy te są aktywne już w mleku, prowadząc do uwolnienia peptydów spełniających w organizmie niemowlęcia wiele funkcji, np. przeciwdrobnoustrojowe, immunomodulujące. W mleku ludzkim obecne są również inhibitory proteaz, które działając selektywnie prowadzą do zablokowania aktywności proteolitycznej wobec składników bioaktywnych, dzięki czemu mogą one spełniać swoje funkcje w dalszym odcinku przewodu pokarmowego (Dallas i in. 2017).

Lipidy mleka ludzkiego to w przeważającej mierze trójglicerydy TAG, których trawienie odbywa się przy udziale enzymów lipolitycznych. Lipazy są enzymami, które odszczepiają KT od szkieletu glicerolu. Mleko kobiece zawiera dwie lipazy: lipazę stymulowaną solami żółciowymi BSSL (bile salt stimulated lipase), czasem zwaną BDSL (bile salt dependent lipase) oraz lipazę lipoproteinową LPL (lipoprotein lipase).

BSSL katalizuje reakcję trawienia lipidów w jelicie niemowlęcia poprzez odszczepienie KT od cząsteczki TAG, mono- i diacyloglicerolu oraz estrów cholesterolu. BSSL hydrolizuje wszystkie trzy wiązania estrowe w cząsteczce TAG, nie jest specyficzny względem określonej pozycji KT w cząsteczce TAG (Hernel i in. 1994). Białko jest odporne na działanie trypsyny oraz niskie pH występujące w żołądku dziecka. Aktywacja enzymu zachodzi przy obecności soli żółciowych cholanowych oraz chenodeoksycholanowych obecnych w dwunastnicy dziecka (Wardell i in. 1984). Działanie BSSL pozwala na efektywne wykorzystywanie przez organizm dziecka cholesterolu, rozpuszczalnych w tłuszczach estrów witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, jak również długołańcuchowych wielonienasyconych KT (Hernell i in. 1994; Thompson 1971). Aktywność BSSL w mleku ludzkim jest



praktycznie stała przez cały okres laktacji (Wardell i in. 1984) i wynosi około 117 U/mL (Christen i in. 2013).

Głównym zadaniem LPL jest hydroliza TAG w chylomikronach i lipoproteinach o bardzo małej gęstości VLDL. W organizmie ludzkim LPL jest związana z proteoglikanami siarczanu heparanu na ścianach naczyń włosowatych. Niedobór tego enzymu w organizmie prowadzi do zaburzenia hydrolizy TAG, czego skutkiem może być zapalenie trzustki (Garanty-Bogacka i in. 2002).

U kobiet karmiących piersią działanie LPL regulowane jest poprzez działanie prolaktyny. Na krótko przed porodem następuje niemal całkowite obniżenie aktywności tego enzymu w tkance tłuszczowej, oraz aktywacja w gruczole sutkowym, która pozostaje na wysokim poziomie przez cały okres laktacji. Enzym ten reguluje absorpcję TAG, KT i cholesterolu przez gruczoł sutkowy wpływając na ilość i jakość wytwarzanego tłuszczu mlecznego. Mechanizm ten pozwala na wykorzystanie większości krążących w układzie KT do produkcji lipidów mleka (Iverson i in. 1995, Zinder i in. 1974, Hamosh i in., 1970; McBride i Korn 1964). LPL nie hydrolizuje lipidów w mleku prawdopodobnie z powodu braku czynnika surowicy, apolipoproteiny C-2, niezbędnej do jego aktywowania (Havel i in. 1973).

### 3.2.5 Hormony

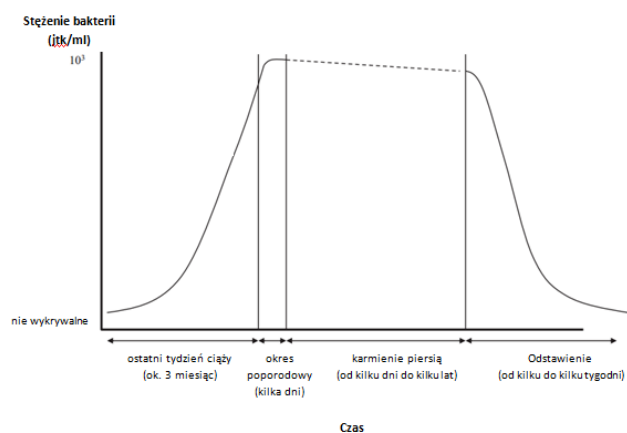
Do składników biologicznie aktywnych obecnych w mleku ludzkim zaliczane są również hormony, które biorą udział między innymi w regulacji metabolizmu, jak również w przyswajaniu składników odżywczych. Jednymi z nich jest insulina oraz adiponektyna, które biorą udział w metabolizmie glukozy. Stężenie insuliny w mleku kobiecym wynosi średnio 586 pg/mL natomiast adiponektyny średnio 19,5 ng/mL (Ley i in. 2011; Chan i in. 2017). Leptyna obecna w mleku kobiecym reguluje uczucie głodu i sytości, wpływając jednocześnie na prawidłowy przyrost masy dziecka (Chang i in. 2013). Jej stężenie w mleku wynosi średnio 349 pg/ mL (Chan i in. 2017).

## 4. Mikroflora mleka kobiecego

W mleku kobiecym oprócz składników decydujących o jego wartości odżywczej oraz właściwościach odpornościowych obecne są również drobnoustroje, zarówno patogenne jak i niepatogenne. Dawniej, uważano że mleko kobiece jest jałowe, jednak przeprowadzone badania wskazują, iż jest ono źródłem wielu drobnoustrojów w tym korzystnie wpływających na organizm dziecka (mikroflory probiotycznej) (Heikkilä i in. 2003). Mikroorganizmy znajdujące się w mleku pochodzą zarówno ze środowiska jak i z organizmu matki. Mikroflora skóry matki uważana jest za jedną z naturalnych składowych mikroflory mleka, a nie jego zanieczyszczenie. W skład mikroflory występującej na skórze matki oraz wyizolowanej z mleka kobiecego wchodzi bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, *Corynebacteria* i *Propionobacteria* (Kamianowska i in. 2008; Fernandez i in. 2013).

Przedstawione w tabeli 2 drobnoustroje uznawane są za naturalną mikroflorę mleka kobiecego, mimo, iż wśród nich znajdują się szczepy chorobotwórcze (Martin i in. 2004). Mikroflora komensalna obecna w mleku ludzkim chroni organizm niemowlęcia wytwarzając substancje takie jak kwasy organiczne, nadtlenek wodoru, bakteriocyny, które powodują inaktywację lub uniemożliwiają patogennej mikroflorze kolonizację przewodu pokarmowego niemowlaka (Olivares i in. 2006).

Mikroflora gruczołu sutkowego występuje w różnej ilości w zależności od okresu laktacji (Rys. 2). Największa ilość drobnoustrojów wykryto od momentu wytwarzania siary do chwili rozpoczęcia odstawiania dziecka od piersi, czyli nieregularnego odciągania mlek.

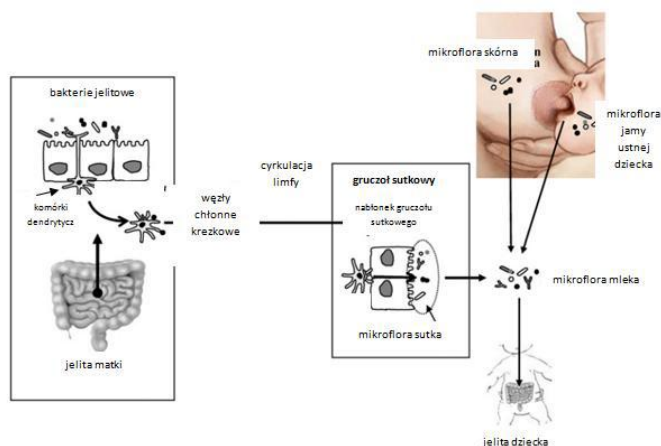


Rysunek 2. Zmiany zawartości mikroflory w gruczole piersiowym kobiety w trakcie laktacji (Fernandez i in. 2013).

W trakcie ciąży organizm kobiety ulega anatomicznym oraz fizjologicznym zmianom, aby zapewnić odpowiednie warunki dla rozwoju płodu. Zmiany te wpływają na prawie wszystkie układy w organizmie matki, tj. układ krążenia, oddechowy, moczowo-płciowy oraz trawienny. Przewód pokarmowy matki w tym okresie charakteryzuje się osłabioną barierowością dla bakterii. Zmiany te mogą sprzyjać zwiększonej translokacji mikroorganizmów w okresie ciąży i wczesnej laktacji (Berg, 1995; Hammond i in. 1997). Badania przeprowadzone przez Martin i in. (2003) wskazują, że bakterie znajdujące się w mleku pochodzą również z układu wewnętrznego organizmu matki, jednak autorzy nie określili sposobu w jaki mogłyby się tam przedostać. Albersharat i in. (2011) zasugerowali, że bakterie znajdujące się w mleku ludzkim mogą pochodzić z przewodu pokarmowego. Potwierdzeniem tego jest wyizolowanie z mleka bifidobacterii, które są ścisłymi beztlenowcami, zatem nie mogą stanowić mikroflory skóry matki (Hunt i in. 2011; Gueimonde i in. 2007; Martin i in. 2004). Mikroflora zasiedlająca przewód pokarmowy pokonując barierę nabłonka jelitowego łączy się z komórkami dendrycznymi, które przenoszą je do węzłów chłonnych krezkowych, a następnie wraz z limfą mikroorganizmy przenoszone są do nabłonka gruczołu sutkowego (Rys.3) (Fernandez i in. 2013). Tym szlakiem do mleka ludzkiego mogą przedostać się również drobnoustroje izolowane z krwi matki (Perez i in. 2007). Istnieje możliwość przeniesienia mikroorganizmów patogennych z organizmu matki do mleka. Przykładem drobnoustrojów chorobotwórczych dostających się do mleka kobiecego z jej organizmu są paciorkowce z grupy B (Le Doare i Kampmann 2014).

Kolejnym źródłem drobnoustrojów występujących w mleku kobiecym jest mikroflora jamy ustnej dziecka. Mikrobiom ten kształtowany jest poprzez kontakt z drogami rodnymi matki, oraz jej skórą (Mueller i in. 2015). Podczas naturalnego porodu następuje przeniesienie mikroflory z dróg rodnych matki do jamy ustnej niemowlęcia, skąd w wyniku tzw. przepływu wstecznego drobnoustroje zasiedlają gruczoły mlekne matki (Ramsay i in. 2004). Tą drogą przedostawać się mogą między innymi bakterie kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium* (Eli Aila i in. 2009). Szczepy bakterii kwasu mlekowego przekazane w trakcie porodu wspomagają odporność dziecka, jednak sugeruje się, iż nie kolonizują one trwale przewodu pokarmowego niemowlęcia w dalszym okresie życia (Makino i in. 2011; Matsumiya i in. 2002; Martin i in. 2007). Tym samym szlakiem do mleka kobiecego mogą się

również przedostawać drobnoustroje patogenne. Najczęściej jednak mikroflora chorobotwórcza dostaje się do mleka poprzez niewłaściwą higienę (zanieczyszczony sprzęt laktacyjny, brudne ręce).



Rysunek 3. Potencjalne źródła bakterii występujących w mleku kobiecym (Fernandez i in. 2013).

Tabela 4. Drobnoustroje wyizolowane z mleka kobiecego wg. Fernandez i in. (2013).

Rodzaj	Gatunek
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. gastricus</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. animalis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. oris</i>
<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. hominis</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Str. mitis</i> , <i>str. salivarius</i> , <i>Str. oris</i> , <i>Str. parasanguis</i> , <i>Str. australis</i> , <i>Str. gallolyticus</i> , <i>Str. vestibularis</i>
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. mundtii</i>
<i>Rothia</i>	<i>R. mucilaginoso</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescento</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i>
<i>Kocuria</i>	<i>K. rhizophila</i>
<i>Pediococcus</i> sp.	<i>P. pentosaceo</i>

Wśród wyizolowanych z mleka kobiecego bakterii znajdują się również szczepy probiotyczne takie jak: *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium infantis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidus* (Kamianowska i in, 2008; Lawrence i in, 2007). Korzystne działanie probiotyków obrazuje się kilkoma mechanizmami działania. Konkurują z mikroorganizmami patogennymi o kolonizację przewodu pokarmowego dziecka, wpływając na zwiększenie produkcji bakteriocyn oraz śluzu wzmacniają szczelność przewodu pokarmowego (Lawrence i in. 2007; Resta-Lenert i in. 2006). Obecność drobnoustrojów probiotycznych wpływa również na wzmocnienie układu odpornościowego niemowlęcia. Stwierdzono, że szczep *Lactobacillus rhamnosus*

GG wpływa na zwiększenie poziomu swoistych komórek wytwarzających antyretrowirusowe przeciwciała klasy IgA (Majamaa i in. 1995; Kaila i in. 1992).

W mleku ludzkim mogą być obecne również wirusy. Dużym zagrożeniem szczególnie dla dzieci urodzonych przedwcześnie jest obecność w mleku cytomegalowirusa (CMV). U kobiet nosicielek obecność CMV znacznie częściej jest rejestrowana w mleku niż w innych wydzielinach takich jak: mocza, ślina czy wydzielina pochwowa (Dworsky i in. 1983). Innym niebezpiecznym wirusem mogącym dostać się do organizmu niemowlęcia wraz z mlekiem jest ludzki wirus niedoboru odporności (HIV) (Vochem i in. 1998, Stagno i in. 1980). Wirus HIV może do organizmu niemowlęcia dostać się poprzez tzw. zakażenie wertykalne, tj. zakażenie dziecka przez łożysko, w czasie porodu, lub podczas karmienia piersią (Humphrey i in. 2010; Vochem i in. 1998, Stagno i in. 1980). Podwyższone ryzyko transmisji wirusa z mleka występuje w przypadku gdy zakażenie matki nastąpi podczas laktacji lub pod koniec ciąży, co związane jest z wysokim poziomem wirusii, który występuje przy pierwotnym zakażeniu wirusem (Humphrey i in. 2010). Wysokie ryzyko transmisji zależne jest również od okresu laktacji, poziom wirusii jest wyższy w sianie, niż w mleku badanym 14 dni po porodzie (Rousseau i in. 2003). Kolejnym czynnikiem wpływającym na ryzyko przeniesienia wirusa jest sposób karmienia dziecka. Jak podaje Mofenson i in. (2000) dzieci karmione wyłącznie mlekiem matki seropozytywnej rzadziej nabywają zakażenia wirusem HIV, niż niemowlęta karmione w sposób mieszany (mlekiem kobiecym, sokami, innymi płynami). Pokarm mieszany może powodować wprowadzenie zanieczyszczeń do przewodu pokarmowego dziecka co w następstwie może przyczyniać się do upośledzenia integralności błony śluzowej przewodu pokarmowego niemowlęcia zwiększając ryzyko zakażenia wirusem HIV (Coutsoudis i in. 1999). Dostępne dane wykazują, że stosowanie profilaktyki antyretrowirusowej u niemowląt, bądź też podawanie leków matkom znacząco zmniejsza, lecz nie eliminuje ryzyka transmisji wirusa (Mofenson i in. 2000). Horvath i in. (2009) uważają iż w krajach rozwiniętych, gdzie dostęp do pokarmu zastępczego jest powszechny skuteczne w zapobieganiu zarażeniu wirusem HIV noworodka po porodzie jest całkowite zaprzestanie karmienia piersią. W krajach Afryki, gdzie dostęp do wody pitnej niezbędnej do przygotowania mieszanki mleko zastępczej jest mocno ograniczony, zastosowanie tego typu rozwiązania przyczynia się do zwiększonej częstotliwości zachorowań noworodków na m. in. biegunki, co w większości przypadków kończy się zgonem.

W przypadku dzieci urodzonych przed terminem, czyli dzieci z grupy ryzyka występują przypadki w których niemowlę nie może być karmione bezpośrednio z piersi matki. W tej sytuacji mleko jest odciągane mechanicznie lub ręcznie. Jest to punkt krytyczny, w którym istnieje ryzyko zanieczyszczenia pokarmu organizmami patogennymi. Przestrzeganie kryteriów mikrobiologicznych dla mleka kobiecego odciąganego w ten sposób powinno zapewniać bezpieczeństwo zarówno w przypadku podania go niemowlętom bez obróbki termicznej, jak i po obróbce termicznej.

## **5. Metody utrwalania mleka kobiecego**

### ***Pasteryzacja niskotemperaturowa długotrwała LTLT (Low Temperature Long Time)***

Proces pasteryzacji mleka krowiego przeznaczonego dla niemowląt przeprowadził Gerber i Wieske w 1888 roku stosując temperaturę 65°C przez 1 godzinę (Gerber, Wieske, 1903). Kolejno w latach 20-tych ubiegłego wieku opracowano metodę pasteryzacji mleka krowiego, tzw. pasteryzację długotrwałą nisko temperaturową (LTLT - Low Temperature, Long Time - 62,5°C/30 min), inaczej zwaną pasteryzacją





holder. Mikroorganizmem krytycznym wykorzystanym do ustalenia parametrów pasteryzacji był *Mycobacterium tuberculosis*, jeden z głównych patogenów przenoszonych przez krowie mleko w tamtych czasach (North, Park, 1927). Metoda ta została oficjalnie przyjęta jako proces zapewniający bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka krowiego w 1924 roku w Stanach Zjednoczonych (Juffs i Deeth 2007).

Ten rodzaj pasteryzacji jest najczęściej wykorzystywany do utrwalania mleka ludzkiego w BMK (Wills i in. 1982). Proces ten zapewnia bezpieczeństwo mikrobiologiczne pokarmu podawanego dzieciom, jednak prowadzi do częściowej lub całkowitej degradacji składników biologicznie aktywnych, co było przedmiotem badań wielu naukowców (Tab. 5) (Gysel i in. 2012; Landers, Updegrave 2010; Tully i in. 2001; Van Zoeren-Grobbe i in. 1987). Większość badań wykazało, iż składniki odżywcze są względnie stabilne po tego rodzaju obróbce termicznej, mimo iż stosowane warunki ogrzewania prowadzą do wzrostu stężenia niektórych substancji świadczących o ich degradacji, takich jak np. pierwotne oraz wtórne produkty utleniania lipidów (Vieira i in. 2011; Kottri i in. 2016; Ding i in. 2015, Espinosa Martos i in. 2013). Zredukowana zawartość składników przeciwdrobnoustrojowych oraz odpornościowych (Tab. 5) obniża zdolność ochrony organizmu niemowlęcia przed patogenami pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego. Do składników wykazujących aktywność biologiczną obecnych w mleku ludzkim zaliczane są również przeciwutleniacze. Pasteryzacja holder w znacznym stopniu obniża zawartość przeciwutleniaczy w mleku zmniejszając tym samym zdolność obrony organizmu niemowlęcia przed ROS.

Innym niekorzystnym skutkiem traktowania mleka kobycego wysoką temperaturą jest inaktywacja enzymów trawiennych, w największym stopniu lipaz, co powoduje zmniejszone przyswajanie lipidów obecnych w mleku (Koletzko i in. 2001). Składową lipidów odporną na działanie temp. 62,5°C są długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe (LC-PUFA) (Henderson i in. 1998). Pasteryzacja holder prowadzi do obniżenia zawartości hormonów m.in. insuliny i adiponektyny w mleku zwiększając tym samym ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2 u dzieci w wieku późniejszym (Ley i in. 2011). Leptyna jest hormonem, który pozostaje aktywny po procesie pasteryzacji (Chang i in. 2013).

Tabela 5. Wpływ pasteryzacji holder (62,5°C/ 30 min) na wybrane składniki mleka kobycego.

Składnik mleka kobycego	Retencja [%]	Źródło
Białka	96	Vieira i in. 2011
Tłuszcze	95	
Laktoza	100	
Składniki odpornościowe i przeciwdrobnoustrojowe		
IgA	80	Sousa i in. 2014
IgG	77	
IgM	49	
Lizozym	46	Czank i in. 2009
Laktoferyna	19	
Enzymy trawienne		
Lipaza	0	Henderson i in. 1998
Amylaza	85	
Składniki przeciwutleniające		
TAC	33	Silvestre i in. 2008
Glutation	54	
GPx	37	
SOD	36	Marinković i in. 2016
Witaminy		
C	80	Molto-Puigmarti i in. 2011
A	100	Van Zoeren-Grobbe i in. 1987
B <sub>2</sub>	100	
B <sub>6</sub>	75	
B <sub>12</sub>	100	
Kwas foliowy	69	
E	100	
D	100	
Hormony		
Insulina	54	Ley i in. 2011
Adiponektyna	67	
Leptyna	100	Chang i in. 2013

### ***Pasteryzacja krótkotrwała HTST (High Temperature Short Time)***

Wykorzystanie pasteryzacji HTST jako metody alternatywnej dla obecnie stosowanej w BMK pasteryzacji holder od niedawna jest rozpatrywane przez naukowców. Przedstawione w piśmiennictwie wyniki badań wykazały, iż stosowane wartości czasu i temperatury pasteryzacji HTST (75°C; 15 s) zapewniają bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka kobycego. Metoda ta jest również bardziej zachowawcza w stosunku do składników białkowych, w tym peptydów odpornościowych (Klotz i in. 2017). Stosowanie tego rodzaju obróbki termicznej wykazuje pewne ograniczenia w przypadku mleka kobycego. Pierwszym z nich jest skala prowadzonego procesu (Fokke i in. 2007. Pojemność dostępnych urządzeń w których możliwe było by szybkie podgrzanie oraz schłodzenie materiału biologicznego

znacznie przekracza możliwości uzyskania przez BMK mleka od dawczyń. Badania przeprowadzone przez Dehghan i in. (2012) wykazały, iż podczas pasteryzacji HTST białka mleka mogą przylegać do wymienników ciepła, a tym samym ograniczać powierzchnię grzewczą, co stwarza ryzyko niedostatecznego ogrzania materiału biologicznego.

### ***Działanie wysokiego ciśnienia***

Technologia obróbki żywności przy zastosowaniu wysokich ciśnień HPP (High Pressure Processing) rzędu 400-600 MPa jest już stosowana w wielu krajach do utrwalania produktów spożywczych, takich jak dżemy i soki owocowe. Technika ta pozwala na inaktywację mikroorganizmów oraz enzymów przedłużając okres przydatności do spożycia utrwalanej żywności, jednocześnie w minimalnym stopniu wpływa na jakość odżywczą oraz organoleptyczną produktu (Daher i in. 2017).

Dość dobrze poznany jest wpływ wysokiego ciśnienia na składniki mleka krowiego, natomiast w mniejszym stopniu na występujące w mleku kobiecym. Bakterie Gram dodatnie i komórki w stacjonarnej fazie wzrostu są mniej wrażliwe na wysokie ciśnienie niż bakterie Gramujemne i komórki znajdujące się w logarytmicznej fazie wzrostu. Stopień inaktywacji mikroorganizmów przez HPP zależy także od poziomu zanieczyszczenia bakteriami, czasu trwania oraz temperatury procesu, a także pH i składu chemicznego środowiska (Alpas i in. 2000; Cheftel 1995). Bakterie wykazują najmniejszą wrażliwość na HPP w zakresie temperatur 20-35°C (Pandya i in. 1995; Simpson i Gilmour 1997; Reyns i in. 2000).

W literaturze dostępne są tylko nieliczne informacje dotyczące wpływu HPP na wirusy. W warunkach modelowych (surowica cielęca), wykazano, iż stosowanie ciśnienia 400 MPa w temp. 25°C pozwala na zmniejszenie liczby cząstek wirusa HIV oraz CMV odpowiednio o 5 oraz 4 rzędy wielkości (Nakagami i in. 1996; Nakagami i in. 1992).

Pod wpływem wysokiego ciśnienia zachodzi denaturacja białka, która może być odwracalna lub nie w zależności od rodzaju białka, jego pochodzenia oraz wielkości zastosowanego ciśnienia (Thakur i in. 1998). I tak np.  $\beta$ -laktoglobulina mleka krowiego jest bardziej podatna na denaturację pod wpływem wysokiego ciśnienia w porównaniu z  $\alpha$ -laktoalbuminą. Stosowanie ciśnienia 400 MPa nie wpływa na stężenie  $\alpha$ -laktoalbuminy, natomiast  $\beta$ -laktoglobulina ulega w tych warunkach denaturacji w 10% (Huppertz i in. 2002).

Enzymy mleka należą do składników stosunkowo odpornych na działanie HPP (Huppertz i in. 2002). Fosfataza alkaliczna zachowuje aktywność po zastosowaniu ciśnienia 400 MPa przez 60 min w temp. 20°C (Lopez-Fendino i in. 1996). Stopniowa inaktywacja tego enzymu następuje dopiero po traktowaniu mleka ciśnieniem powyżej 400 MPa i wydłużeniu czasu jego działania (Rademacher i in. 1998). Laktoperoksydaza obecna w mleku krowim pozostaje w pełni aktywna nawet po zastosowaniu ciśnienia rzędu 700 MPa w 20°C przez czas 40 minut. W przypadku laktoferyny mleka krowiego stwierdzono zmniejszenie jej aktywności wraz ze wzrostem ciśnienia od 400 MPa do 700 MPa w analogicznych parametrach czasu i temperatury (Mazri i in. 2012). Wg niektórych autorów na stopień inaktywacji enzymów w mleku wpływa czas ciśnieniowania (Rademacher i in. 1998; Mazri i in. 2012), natomiast wyniki innych autorów tego nie potwierdzają (Delgado i in. 2014). Mleko pochodzące od zwierząt wykazuje różnice w składzie w stosunku do mleka ludzkiego, więc nie można zakładać, że zmiany zachodzące pod wpływem działania HPP będą analogiczne.

Obecne w mleku matki immunoglobuliny zapewniają niemowlęciu, które nie ma jeszcze dostatecznie rozwiniętego układu odpornościowego obronę przed patogenami (Agarwal i in. 2011; Brandtzaeg, 2003). Dlatego immunoglobuliny stanowią grupę związków, których wysoka aktywność powinna być zachowana po procesie utrwalania. Stwierdzono, iż zawartość IgA nie zmienia się w mleku ludzkim traktowanym ciśnieniem 400 MPa przez 5 min w temp. 12°C. Zwiększenie ciśnienia do 600 MPa powoduje ok. 30% spadek stężenia tego białka (Permanyer i in. 2010). Ciśnienie 400 MPa nie powoduje również zmian w stężeniu IgM oraz IgG obecnych w mleku kobiecym (Contador i in. 2013).

Podobnie witaminy obecne w mleku ludzkim wykazują odporność na HPP. Wykazano, iż witamina C i E nie ulega degradacji pod wpływem działania ciśnienia 600 MPa (Molto-Puigmarti i in. 2011). Stosowanie wyższych ciśnień może natomiast wpływać m.in. na KT. Stwierdzono, iż, traktowanie mleka ludzkiego ciśnieniem 600 MPa prowadzi do istotnej zmiany zawartości niektórych KT, w tym: C15:0, C18:3 n-3, C18:3 n-6, C20:0, C20:4 n-6 oraz C22:6 n-3, a w efekcie do znaczącej zmiany w proporcjach poszczególnych grup KT, zwłaszcza znacząco niższego udziału wielonienasyconych KT z rodziny n-3 (Delegado i in. 2014).

W celu ustalenia czy użycie HPP do utrwalania mleka kobiecego może stanowić alternatywę dla stosowanej w BMK pasteryzacji holdera konieczne jest ustalenie warunków procesu zapewniających inaktywację wszystkich form wegetatywnych drobnoustrojów z jednoczesnym możliwie najlepszym zachowaniem składników biologicznie aktywnych.

#### ***Ogrzewanie polem promieniowania mikrofalowego***

Mikrofały są falami elektromagnetycznymi o częstotliwości z zakresu 1-300 GHz, co odpowiada długości fali od 1mm do 30cm. W przetwórstwie żywności i gospodarstwach domowych najczęściej wykorzystywana jest częstotliwość 2,45 GHz (Nuchter i in. 2004). Fale mikrofalowe, podobnie jak każdy inny rodzaj fal elektromagnetycznych mogą ulegać odbiciu, rozproszeniu lub absorpcji. Generowanie energii cieplnej możliwe jest jedynie przez fale zaabsorbowane przez materiał. Zdolność penetracji materiału jest zmienna w zależności od częstotliwości fal (Erle i Schubert 2001; Vega, Mercado i in. 2001). Generowanie temperatury polem promieniowania mikrofalowego związane jest z obecnością związków polarnych (wody i jonów) oraz ich zachowaniem w polu elektromagnetycznym. Absorpcja promieniowania mikrofalowego prowadzi do przyspieszenia jonów w polu elektromagnetycznym i rotacji dipoli, czego skutkiem jest generowanie energii cieplnej (Ahmed, Ramaswamy, 2007; Regier, Schubert 2001). W piśmiennictwie opisując działanie temperatury generowanej polem promieniowania mikrofalowego stosuje się zamiennie zwrot ogrzewanie mikrofalowe.

Ogrzewanie mikrofalowe znajduje obecnie zastosowanie w przemyśle spożywczym do rozmrażania, między innymi mięsa blanszowania warzyw oraz suszenia warzyw (Ahmed i in. 2007).

Niektórzy naukowcy uważają, że szybkości procesów chemicznych biegnących w polu promieniowania mikrofalowego są większe w porównaniu do zachodzących w warunkach konwencjonalnych, przy zachowaniu identycznych parametrów wartości temperatury. Jako przyczynę wskazują istnienie nietermicznego - specyficznego efektu mikrofalowego występującego w układach niepolarnych (Dworakowska i in. 2011). Inni natomiast, różnice w szybkościach procesów tłumaczą występowaniem efektu termicznego. Częstotliwość 2,45 GHz opowiada wartość energii równej 0,0016 eV. Energia ta nie jest wystarczająca do zerwania wiązań wodorowych. Energia dostarczana wraz

z promieniowaniem przybiera wartości porównywalne, co najwyżej z energią ruchów Browna. Zatem stwierdzić można, iż czynnikiem aktywującym cząsteczki związków organicznych w reakcjach wspomaganych polem mikrofalowym nie jest bezpośrednia aktywacja molekularna (Kappe, Stadler, 2003).

Tahir i in (2009) nie stwierdzili efektu bakteriobójczego działania pola mikrofalowego działającego przez czas 60s, 120s i 180s przy mocy urządzenia 800W w temperaturze kontrolowanej wynoszącej około 40°C na mikroorganizmy *P. vulgaris* PP25D, *S. aureus* bgh010, *B. subtilis* ase98, *E. coli* TRE04 oraz *Corynebacterium* spN33 zawieszony w bulionie odżywczym w ilości około 10<sup>5</sup>j.t.k./mL. Można zatem twierdzić, że nie samo promieniowanie, ale wywołana nim temperatura decyduje o możliwości wykorzystania tego rodzaju promieniowania do utrwalania żywności.

Ograniczeniami związanymi z wykorzystaniem mikrofal w przetwarzaniu żywności jest niejednorodność ogrzewanego produktu związana przede wszystkim z jego składem. Również kształt naczynia, w którym umieszczony jest ogrzewany materiał, tworzywoz którego wykonane jest naczynie (szkło pochłania energię promieniowania mikrofalowego, natomiast pojemniki plastikowe nie posiadają takich właściwości), oddalenie próbki od źródła napromieniowania i parametry pracy urządzenia mają wpływ na wartość uzyskanej temperatury (Sigman-Grant i in. 1992; Ohlsson, 1981). Zastosowanie tej metody ogrzewania pozwala na uzyskanie przez materiał porządanej temperatury w znacznie krótszym czasie w porównaniu z ogrzewaniem konwekcyjnym. Jak również jest bardziej efektywne w inaktywacji drobnoustrojów przy zastosowaniu tych samych wartości temperatury i czasu jej oddziaływania (Atmaca i in. 1996).

Aby ogrzewanie mikrofalowe mogło być stosowane w BMK należy ustalić parametry procesu, które przede wszystkim zapewnią bezpieczeństwo mikrobiologiczne przy możliwie najmniejszym stopniu degradacji składników odżywczych oraz biologicznie aktywnych. Obecnie istnieje zaledwie kilka doniesień naukowych na temat wpływu ogrzewania mikrofalowego na składniki odżywcze oraz bioaktywne obecne w mleku kobyecym. Wykazano, iż ogrzewanie mleka kobyeciego w temp.72°C-98°C przez 30s powoduje całkowity spadek aktywności lizozymu oraz IgA (Quan i in. 1992). Natomiast Ovesen i in. (1996) stwierdzili, że utrwalanie mleka kobyeciego polem promieniowania mikrofalowego nie powoduje istotnych strat w zawartości wybranych składników bioaktywnych oraz odżywczych pod warunkiem, że temperatura procesu nie przekracza 60°C.

## 6. Cel pracy

Głównym celem pracy jest ocena możliwości wykorzystania wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze, ogrzewania konwekcyjnego prowadzonego w różnych zakresach czasowych i temperaturowych oraz działania temperatury generowanej polem promieniowania mikrofalowego w różnych zakresach czasowych i temperaturowych, jako metod utrwalania mleka ludzkiego alternatywnych wobec pasteryzacji holder (62,5°C; 30 min) powszechnie stosowanej w BMK.

Dla zrealizowania celu głównego konieczne jest osiągnięcie celów cząstkowych:

- określenie optymalnych warunków inaktywacji bakterii Gram dodatnich oraz Gram ujemnych, które mogą stanowić zanieczyszczenie mleka ludzkiego przy zastosowaniu ogrzewania konwekcyjnego, działania wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze oraz ogrzewania mikrofalowego, badania modelowe - drobnoustroje celowo wprowadzone do mleka UHT,
- określenie wpływu ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania mikrofalowego prowadzonego w wybranych parametrach czasowych oraz temperaturowych ustalonych na podstawie badań modelowych oraz działania wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze, na przeżywalność drobnoustrojów występujących w mleku ludzkim,
- określenie wpływu ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania mikrofalowego w wybranych parametrach czasu i temperatury ustalonych na podstawie badań modelowych oraz działania wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze na zawartość białka odżywczego, białka całkowitego, tłuszczu, węglowodanów oraz wartość kaloryczną mleka ludzkiego,
- określenie wpływu ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania mikrofalowego w wybranych parametrach czasu i temperatury ustalonych na podstawie badań modelowych oraz działania wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze na skład i zawartość KT oraz na poziom degradacji lipidów w wyniku utleniania określany na podstawie zawartości pierwotnych i wtórnych produktów utleniania lipidów,
- określenie wpływu ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania mikrofalowego w wybranych parametrach czasu i temperatury ustalonych na podstawie badań modelowych oraz działania wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze na zawartość i/lub aktywność wybranych biologicznie składników mleka ludzkiego o działaniu przeciwutleniającym (SOD, CAT, GPx, witamina C), przeciwdrobnoustrojowym (lizozym, laktoferyna), immunochronnym oraz immunomodulującym (IgA, cytokina TGF-β2), oraz enzymów trawiennych (lipazy).

## 7. Materiały i metody

### 7.1 Materiał biologiczny

- mleko uzyskane od zdrowych matek rodzących terminowo na Oddziale Położniczym Szpitala Klinicznego w Gdańsku, pochodzących z Gdańska i okolic. Mleko odciągane było przez matki zgodnie z zasadami higieny. Próbkę mleka łączono w celu uzyskania średniej próby laboratoryjnej, a następnie rozdzielano na mniejsze porcje o objętości około 50 mL oraz przechowywano w warunkach zamrażalniczych (-80°C) do momentu analizy,
- mleko krowie UHT, 3,2 % tłuszczu,

- bakterie: *Staphylococcus aureus* PCM 2054, *Staphylococcus epidermidis* PCM 2118, *Escherichia coli* K-12, *Enterococcus faecalis* PCM 896 oraz PCM 1861, *Enterococcus hirae* PCM 2559 i *Enterococcus durans* PCM 1857, *Pseudomonas aeruginosa* PCM 499 z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

### Wymogi stosowane wobec kobiet oddających mleko na potrzeby badań

Dawczyniami mleka przeznaczonego do badań były kobiety zdrowe, prowadzące zdrowy styl życia dostosowany do wymogów obowiązujących kobiety karmiące własne dziecko. Łącznie w badaniu wzięło udział 99 kobiet. Na potrzeby badań od kobiet uzyskano informację, które zestawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Charakterystyka dawczyń.

Parametr	Średnia $\pm$ SD	Rozrzut
Wiek matki [lata]	30 $\pm$ 4,42	21 - 37
Tydzień ciąży	40 $\pm$ 0,99	38 - 42
Masa matki przed ciążą [kg]	63,3 $\pm$ 8,07	52 - 78
Masa matki przy porodzie [kg]	77,15 $\pm$ 11,97	59 - 97
Rodzaj porodu	33% cesarskie cięcie 68 % naturalny	
Masa dziecka przy porodzie [g]	3099 $\pm$ 717	1520 - 4180
Liczba punktów APGAR dziecka	9 $\pm$ 1,08	8 - 10
Dzień laktacji	59 $\pm$ 158,97	3 - 220

Kryteria kwalifikujące :

- zdrowe matki karmiące piersią własne dzieci;
- nadmiar wydzielanego mleka w stosunku do bieżących potrzeb dziecka;
- świadoma, zgoda na udział w badaniu, potwierdzone na piśmie;
- zgoda na pobieranie pokarmu do badań;
- zapoznanie się z procedurą postępowania ze sprzętem laktacyjnym oraz z odciganym mlekiem

Kryteria wykluczające:

- brak zgody na udział w badaniu;
- brak spełnienia kryteriów zdrowia przez dawczynię;
- położnice po porodzie noworodka z ciąży obumarłej

### 7.2 Podłoża

- bulion kazeinowo-sojowy o składzie: pepton kazeinowy - 7 g, pepton sojowy - 3 g, NaCl - 5 g, glukoza - 2,5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 2,5 g, woda - 1000 mL (pH 7,3), Merck Sp. z o.o., (podłoże sterylizowano w temp. 121°C, 20 minut);
- Tryptic Soy Agar (TSA) o składzie: pepton kazeinowy - 15 g, pepton sojowy - 5 g, NaCl - 5 g, agar - 15 g, woda - 1000 mL (pH 7,3), Merck Sp. z o.o., (podłoże sterylizowano w temp. 121°C, 20 minut);

- woda peptonowa 1% o składzie: pepton kazeinowy - 1 g; NaCl - 8,5 g; woda - 1000 mL (pH 7,3), (sterylizowano przez 20 minut w temp. 121°C);
- Chromocult® Coliform Agar - selektywne podłoże do izolacji wszystkich bakterii z grupy coli, w tym *Escherichia coli*; skład: pepton – 3 g, chlorek sodu – 5 g, dwuwodny fosforan sodu - 2,2 g, wodorofosforan di sodu - 2,7 g, pirogronian sodowy – 1 g, tryptofan – 1 g, agar - 10 g, sorbitol – 1 g, tergitol® - 70,15 g, mieszanina chromo-genna - 0,4 g, woda - 1000 mL (pH 6,8); Merck Sp. z o.o., (podłoże gotowano 45 minut);
- Chromocult® Enterococci Agar - selektywne podłoże do izolacji oraz różnicowania bakterii *Enterococcus* (głównie *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. duransii*, *E. hirae*), skład: pepton - 10 g, chlorek sodu - 5g, azydek sodu - 0,2 g, diwodorofosforan potasu - 3,4 g, diwodorofosforan potasu - 1,6 g, żółć - 0,5 g, Tween 80 - 1 g, mieszanina chromogenna - 0,25 g, agar - 11 g, woda - 1000 mL (pH 7,0); Merck Sp. z o.o., (podłoże gotowano 45 minut);
- Edwards Medium Base - selektywne podłoże do izolacji *Streptococcus*, skład: pepton - 10 g, ekstrakt wołowy - 10 g, eskulina - 1 g, chlorek sodu - 5 g, fiolet krystaliczny - 0,0013 g, siarczan talu - 0,33 g, agar - 15 g, woda - 1000 mL (pH 7,4); Biomaxima S.A (podłoże sterylizowano w temp. 121°C, 20 minut);
- Plate Count Agar (PCA) - podłoże do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów w produktach żywnościowych; skład: pepton kazeinowy - 5 g, ekstrakt drożdżowy - 2,5 g, glukoza - 1 g, agar - 14 g, woda - 1000mL (pH 7,0); Merck Sp. z o.o., (podłoże sterylizowano w temp. 121°C, 20 minut);
- Baird Parker Agar - selektywne podłoże do oznaczania gronkowców oraz różnicowania *S. aureus*, skład: enzymatycznie trawiona kazeina - 10 g, ekstrakt mięsny - 5 g, ekstrakt drożdżowy - 1 g, pirogronian sodowy - 10 g, glicyna - 12 g, chlorek litu - 5 g, agar - 15 g, woda 1000 mL (pH 6,8), Merck Sp. z o.o., (podłoże sterylizowano w temp. 121°C, 20 minut);
- żółtko jaja z telurem potasu- dodatek do podłoża Baird Parker, skład: żółtko jaja kurzego - 200 mL, woda sterylna - 800 mL, telurem potasu - 2 g, BTL Sp. z o. o;
- MRS agar- podłoże do wykrywania obecności i oznaczania liczby bakterii kwasu mlekowego rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium*, skład: glukoza - 20 g, ekstrakt drożdżowy - 5 g, ekstrakt mięsny - 10 g, pepton K - 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 5 g, cytrynian dwuamonowy - 2 g, octan sodu trójwodny - 5 g, sól A - 5 mL, Tween 80 - 1 mL, woda destylowana - 1000 mL (pH 6,3); skład sól A: MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O - 11,5 g, MnSO<sub>4</sub> - 2,8 g dopełnić do 100 mL

### 7.3 Odczynniki

- mieszanina niezamarzająca o składzie: alkohol etylowy - glikol propylenowy - woda (1:1:1);
- amoniak, cz.d.a., roztwór 10% (POCH S.A);
- alkohol etylowy, 96%, Polmos;
- eter dietylowy cz.d.a. (POCH S.A);
- n- heksan cz.d.a. (Merck Sp. z o.o);
- siarczan sodu, bezwodny, cz.d.a. (POCH S.A );
- azot sprężony (99,9%) (OXYGEN)
- wodorotlenek potasu, cz.d.a. ( POCH.S.A);



- trifluorek boru BF<sub>3</sub>, cz.d.a., roztwór 13% (Merck Sp. z o.o);
- chlorek sodu cz.d.a. (POCH S.A);
- mieszaniny wzorcowe estrów metylowych kwasów tłuszczowych (EMKT): Supelco 37 Component FAME mix; Supelco Mix C20:1 - C20:5; Mixture ME 64, Lardon, Fine Chemicals; Octadecadienoicacid, conjugated, methyl ester, (Sigma);
- octan etylu (POCH S.A);
- mieszanina płuczająca etanol/octan etylu 1:1 (v:v);
- nadsiarżan sodowy Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> cz.d.a. (POCH S.A);
- ABTS - 2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian), 98%, Sigma-Aldrich;
- Trolox, (Sigma);
- kwas trichlorooctowy (TCA) - cz. d. a., (POCH S.A);
- 3,5-di-tert-butyl-4-hydroksytoluen (BHT), 98%, (Sigma-Aldrich);
- kwas chlorowodorowy (HCl), 35 – 38%, (POCH S.A);
- kwas 2-tiobarbiturowy (TBA), 98%, (Fluka);
- 1,1,3,3-tetrametoksypropan (TMP), 99%, (Sigma-Aldrich);
- etanol, 99,8%, (POCH S.A);
- sprężony azot;
- kwas metafosforowy, 97%, (Merck Sp. z o.o.);
- DL-ditiotreitol (DTT), 1M, (Sigma-Aldrich);
- kwas L-askorbinowy, 99,8%, (Sigma-Aldrich);
- metanol, (POCH S.A);
- kwas octowy, 100%, (Merck Sp. z o.o.);
- acetonitryl do HPLC, 99,9%, (POCH S.A);
- laktoferyna mleka ludzkiego, 85%, (Sigma-Aldrich);
- kwas trifluoroctowy (TFA) (for synthesis), (Sigma-Aldrich);
- liofilizowane komórki *M. lysodeikticus* (Sigma-Aldrich);
- diwodorofosforan potasu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 99,5%, (POCH S.A);
- fosforan dipotasu (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), (Eurochem BGD Sp. z o. o.);
- octan kadmu (Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O), (Chempur);
- chloroform, cz.d.a., (POCH S.A);
- jodek potasu, 99,5%, (Merc Sp. z o.o.);
- HEPES - kwas2-[4-(2-hydroksyetylo)piperazyn-1-ylo]etanosulfonowy), 99,5% (Sigma-Aldrich);
- wodorotlenek sodu (NaOH), 98,8%, (POCH S.A);
- komercyjny zestaw firmy "Immun Diagnostik" - Lysozym ELISA, Ref. K6902, Lot No. K6902-150106;
- komercyjny zestaw firmy „Immun Diagnostic” – sIgA Elisa Kit, Ref. K 8870, Lot No. K 8870-170206;
- komercyjny zestaw firmy „Cayman”- Superoxide Dismutase Assay Kit, Item No. 706002;
- komercyjny zestaw firmy „Cayman”- Catalase Assay Kit, Item No. 707002;
- komercyjny zestaw firmy „Cayman”- Glutathione Peroxidase Assay Kit, Item No. 703102;

- komercyjny zestaw firmy „BioAssay Systems”- QuantiChrom™ Lipase Assay Kit, Item No. DLPS-100

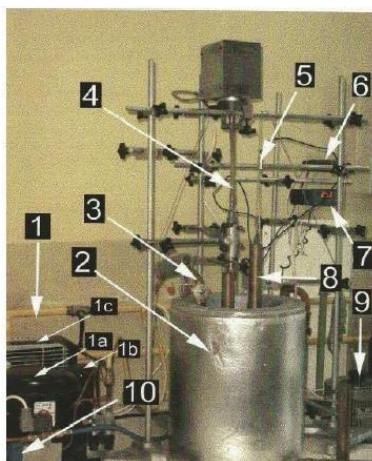
#### 7.4 Aparatura

##### *Aparatura komercyjna:*

- autoklaw pionowy Systec VX - 7,
- sterylizator Womed SP - 65G,
- hybrydowy czytnik wielodetekcyjny Synergy HT, BioTek,
- spektrometr Jenway model 6300,
- chromatograf cieczowy Perkin Elmer Series 200 składający się z: pompy Perkin Elmer Series 200, degazera Perkin Elmer Series 200, autosamplera Perkin Elmer Series 200, termostatu Perkin Elmer Series 200, detektora UV-VIS Perkin Elmer Series 200, kolumn analitycznych Agilent Zorbax, Kinetex C18 (4,0 x 150 mm, 5 μm, 100A, Phenomenex) z przedkolumną SB-C18 (4,6 x 12 mm) SB - C18, oprogramowania: Total Chrom™,
- chromatograf gazowy Hewlett Packard 5890 series II zaopatrzony w dozownik split- splitless, kolumnę kapilarną RTX 2330 (100 m, 0,25mm, 0,25μm) oraz detektor płomieniowo-jonizacyjny FID (Flame Ionization Detector).

##### *Aparatura prototypowa:*

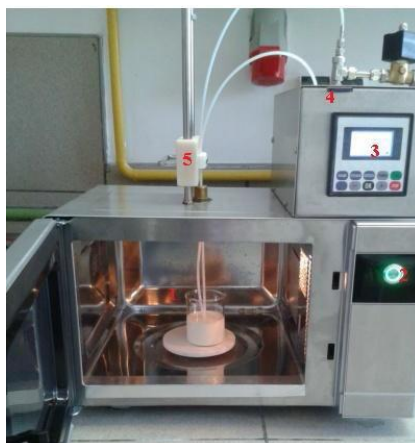
- aparatura do ciśnieniowania (Fot. 1) zestaw zaprojektowany i wykonany przez dr inż. Edwarda Dunajskiego w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej składający się z trzech niezależnie pracujących kriostatów, umożliwiających osiągnięcie stanu głębokiego przechłodzenia materiału biologicznego pod zwiększonym ciśnieniem (Dunajski, 1999, 2000)



Fot. 1. Zestaw aparaturowy umożliwiający generowanie wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze: 1 - agregat skraplający, 1a -jednostopniowa hermetyczna sprężarka tłokowa, 1b - zbiornik z czynnikiem chłodniczym, 1c - skraplacz, 2 - zbiornik z cieczą niezamarzającą, 3 - parownik rurowy z zaworem dławiącym, 4 - system mieszania, 5 - czujnik temperatury, 6 - elektroniczny termostat, 7 - mikroprocesowy miernik temperatury, 8 - wysokociśnieniowe pojemniki o średnicy wewnętrznej 13mm, 9 - autotransformator, 10 – zawór elektromagnetyczny.

- pasteryzator mikrofalowy (Fot.2) prototyp urządzenia wykonany przez firmę Enbio Technology Sp. z o.o. Urządzenie charakteryzuje się mocą 1600 W oraz częstotliwością fal

elektromagnetycznych 2450 Hz. Wyposażony w system sterowania umożliwiający stałą kontrolę temperatury i czasu prowadzenia procesu.



Fot. 2. Pasteryzator mikrofalowy: 1 - komora grzejna, 2 - włącznik, 3 - panel sterowania, 4 - karta pamięci, 5 - wężyki procesowe

### 7.5 Drobnny sprzęt laboratoryjny

- pH-metr elektroniczny, Metra Tronik V628;
- elektroniczne wagi laboratoryjne, Radwag;
- wytrząsarka powietrzna, Forma Scientific Inc. 4518;
- inkubator, Binder;
- medyczna łaźnia wodna, LW 102;
- łaźnia wodna SubAqua 5, Grant;
- łaźnia glicerynowa GLS400, Grant;
- wortex, Heidolph Reax Top;
- wieszadło magnetyczne Heidolph;
- wyparka obrotowa IKA RV 05 Basic;
- system do odparowywania próżniowego RapidVap, Labconco;
- termostat HB4, BasicIKA Werke;
- spektrometr Jenway, model 6300;
- wirówka Centrifuge typ MPW260R firmy MPW Med. Instruments;
- analizator składu mleka kobiecego Miris, Danlab;
- sonikator laboratoryjny Miris, Danlab

## 8. Postępowanie doświadczalne

### 8.1 Metody utrwalania

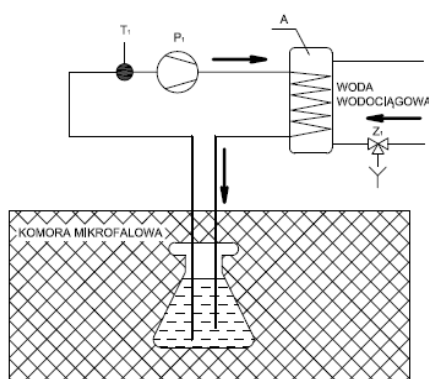
#### Ogrzewanie konwekcyjne

Próby mleka o objętości 50 mL przenoszono do jałowych butelek firmy Medela i umieszczano w wielostanowiskowej łaźni wodnej nagrzanej do odpowiedniej temperatury (temperatura zadana  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Próby ogrzewano do  $62,5^{\circ}\text{C}$ ;  $66^{\circ}\text{C}$   $70^{\circ}\text{C}$  oraz  $72^{\circ}\text{C}$  i utrzymywano w danej temperaturze maksymalnie przez 30 min. Próby do analiz pobierano po czasie uzyskania zadanej temperatury (czas „0”), a następnie co 10 min. Proces prowadzono w dwóch wariantach: „z,” i „bez” mieszania próby w trakcie ogrzewania.

W celu stałego kontrolowania temperatury procesu w łaźni umieszczono dodatkowy pojemnik z analogiczną jak w próbach badanych objętością mleka z umieszczonym wewnątrz termometrem. Po zakończonym procesie ogrzewania próby mleka umieszczano w łaźni lodowej.

### Ogrzewanie polem promieniowania mikrofalowego

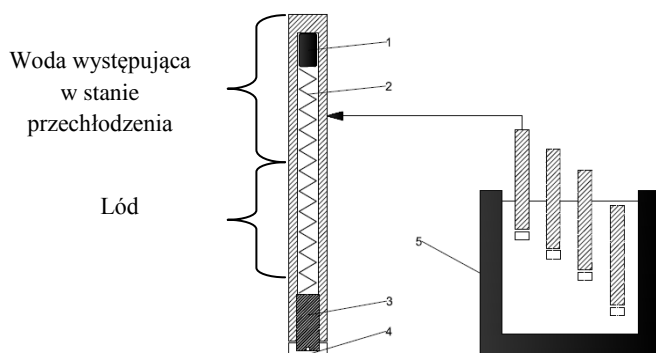
Próby mleka umieszczano w komorze pasteryzatora mikrofalowego (Fot. 2). W cieczy zanurzono wężyki procesowe, przez które następował przepływ badanego mleka, powodując jego mieszanie (Rys. 4). Po czasie uzyskania (czas „0”) oraz po 1, 3, 5, 10 minutach ogrzewania w zadanej temperaturze (62,5°C; 66°C; 70°C; 72°C) próby były automatycznie chłodzone do ok. 15°C (Rys. 4). Po procesie instalację płukano zimną wodą destylowaną, gorącą wodą (95°C, 5 minut), a następnie środkiem dezynfekującym i wodą jałową. Proces płukania i dezynfekcji prowadzono każdorazowo przed i po zakończeniu każdego doświadczenia.



Rysunek 4. Schemat procesu chłodzenia w pasteryzatorze mikrofalowym firmy Enbio Technology Sp. z o.o. T<sub>1</sub> - czujnik temperatury, P<sub>1</sub> - pompa, A - wymiennik chłodzący, Z<sub>1</sub> - zawór trójdrogowy

### Działanie wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze (193 MPa, -20°C)

Na potrzeby badań wysokie ciśnienie wytwarzano metodą opisaną przez Hayakawa i in. (1998). Dostępna w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności aparatura w której medium chłodniczym jest mieszanka wody destylowanej, alkoholu etylowego oraz glicerolu w stosunku (1:1:1, v:v:v) o temp. -20°C pozwala na uzyskanie ciśnienia 193 MPa (Kalichevsky i in. 1995). Próby mleka ludzkiego w ilości 3 ml przenoszono jałowo do szklanych probówek w taki sposób, aby w cieczy nie powstały pęcherzyki powietrza. Następnie umieszczano je w odtłuszczonych, metalowych, cylindrycznych pojemnikach wysokociśnieniowych wypełnionych wodą i dociskano metalową sprężyną utrzymującą próbę w niezamarzającej strefie pojemnika. Pojemniki zanurzano stopniowo od strony zamknięcia korkiem, w czterech etapach co 10 minut, w zbiorniku kriostatu (Rys. 5). Łączny czas dojścia do założonego końcowego ciśnienia wynosił zawsze 40 minut.



Rysunek 5. Schemat instalacji próbki w zbiorniku z medium chłodniczym. 1- próbówka z mlekiem kobiecym, 2- sprężyna, 3 - śruba, 4 - nakrętka, 5 - zbiornik z medium chłodniczym (Malinowska Pańczyk i in. 2013).

Powrót prób do wyjściowego ciśnienia i temperatury polegał na wynurzeniu pojemnika ze zbiornika kriostatu, a następnie ogrzaniu pojemnika w ciepłej kąpeli wodnej. Czas powrotu prób do wyjściowego ciśnienia wynosił 15 - 20 minut. Próby mleka do czasu oznaczeń przetrzymywano w łaźni lodowej.

## 8.2 Metodyka oznaczeń

### 8.2.1 Oznaczenia mikrobiologiczne

- Liczbę bakterii celowo wprowadzonych do mleka UHT (badania modelowe) w badanych próbach mleka surowego, oznaczono metodą posiewu wgłębnego. Próby z kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych badanych próbek mleka, wykonanych w wodzie peptonowej nanoszono na płytki i zalewano podłożem TSA. Próby inkubowano przez 24-48 godzin w temp. 37°C.
- Wybrane grupy drobnoustrojów naturalnie występujące w mleku kobiecym oznaczono w próbach mleka surowego i ogrzewanego konwekcyjnie, ogrzewanego mikrofalowo, poddanego działaniu wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze wykorzystując odpowiednie podłoża. Oznaczenie liczby gronkowców wykonano metodą posiewu powierzchniowego. Pozostałe drobnoustroje oznaczono wykorzystując metodę posiewu wgłębnego. Próby inkubowano przez 24-48 godzin w temp. 30°C (ogólna liczba drobnoustrojów (OLD), bakterie kwasu mlekowego) oraz 37°C (bakterie z grupy coli, bakterie z rodzaju *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*).

### 8.2.2 Analiza mleka ludzkiego techniką IR

Zawartość składników odżywczych, tj. białka całkowitego, białka odżywczego, tłuszczu, węglowodanów oraz wartość kaloryczną próbek mleka ludzkiego oznaczono wykorzystując analizator składu mleka ludzkiego Miris (Danlab). Badania wykonano przy uprzejmości BMK w Toruniu. Próby mleka kobiecego przed analizą ogrzano do temp. 40°C. Następnie pobierano 3 mL mleka, które podawano procesowi homogenizacji przez 4,5 s. Zhomogenizowaną próbę mleka kobiecego wprowadzano do układu pomiarowego urządzenia i odczytywano zawartość w/w składników oraz wartość kaloryczną mleka. Pomiar wykonano w trzech powtórzeniach.

### 8.2.3 Oznaczanie produktów utleniania lipidów

#### Zawartość nadtlenków

W celu oznaczenia zawartości nadtlenków, pierwotnych produktów oksydacji lipidów w mleku kobiecym wykorzystano metodę opisaną przez Balla i in. (1991). Metoda polega na ekstrakcji tłuszczu z mleka mieszaniną chloroform:metanol, a następnie spektrofotometrycznym pomiarze ( $\lambda = 353 \text{ nm}$ ) jodu wydzielonego podczas reakcji jodku potasu z nadtlenkami i wodoronadtlenkami zawartymi w badanym tłuszczu.

#### Analiza próby badanej

Do 3 mL mleka dodano 9 mL mieszaniny chloroform:metanol (2:1, v:v), całość dokładnie mieszano, a następnie odwirowano (6000 rpm, 10°C, 10 min). Po odwirowaniu górną warstwę wodną odrzucano. Organiczną warstwę dolną odparowano do sucha (40 min, 30°C, podciśnienie 200 bar - Rapid Vap, Labconco). Następnie tłuszcz doprowadzono do stałej masy poprzez odparowanie reszty rozpuszczalnika strumieniem sprężonego azotu. Uzyskany tłuszcz mleka kobiecego rozpuszczono w 1,8 mL mieszaniny kwas octowy:chloroform (3:2, v:v). Następnie dodano 120  $\mu\text{L}$  roztworu jodku potasu i inkubowano 15 minut w ciemności. Analogicznie sporządzono ślepą próbę (bez dodatku tłuszczu). W celu zatrzymania reakcji dodawano 1,8 mL 60 mM roztworu octanu kadmu. Zawiesinę wirowano (6000rpm, 10 min, 10°C). Absorbancję górnej warstwy wodnej zawierającej powstały jod mierzono przy  $\lambda = 353 \text{ nm}$  względem ślepej próby.

Zawartość nadtlenków obliczano na podstawie odczytanej absorbancji znając współczynnik  $\epsilon$  dla  $\text{J}^{3-}$  równy  $2,19 \times 10^4 \text{ (M} \times \text{cm)}^{-1}$  (Balla i in. 1991), zgodnie z poniższym wzorem:

$$\text{LP [nmol /mL mleka]} = A/\epsilon \times B \times C$$

gdzie:

LP-zawartość nadtlenków

$$\epsilon = 2,19 \times 10^4 \text{ (M} \times \text{cm)}^{-1}$$

A –absorbancja

B- objętość mieszaniny reakcyjnej

C- objętość mleka pobrana do analizy

#### Zawartość dialdehydu malonowego

Do oznaczenia zawartości dialdehydu malonowego MDA, jednego z markerów oceny zawartości wtórnych produktów utleniania lipidów w mleku kobiecym wykorzystano metodę opisaną przez Martysiak-Żurowską i in. (2006). Polega ona na wytworzeniu barwnego kompleksu dialdehydu malonowego MDA z kwasem tiobarbiturowym TBA. Zawartość powstałego kompleksu mierzono wykorzystując technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją VIS.

#### Analiza próby badanej

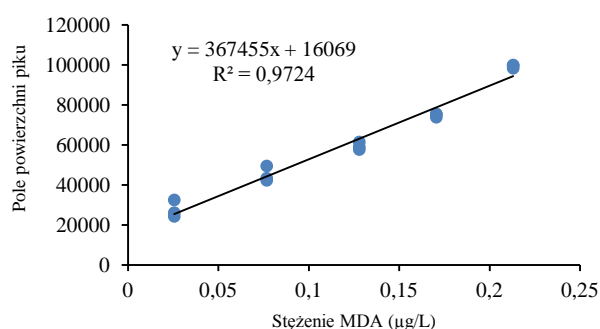
Do 1 mL mleka dodano 0,1 mL butylohydroksytoluenu BHT w etanolu i 1 mL mieszaniny reakcyjnej (15% kwas trichlorooctowy:0,375% TBA: 0,25M kwas solny HCL; 1:1:1; v:v:v). Mieszaninę wirowano (10000 rpm, 10°C, 10 min), następnie zebrano supernatant.

Pozostały osad zawieszono w 1 ml mieszaniny reakcyjnej i ponownie odwirowano (10000 rpm, 10 min, 10°C). Uzyskane supernatanty połączone i ogrzewano w temp. 95°C przez 30 minut. W celu zatrzymania reakcji roztwory ochładzano, a następnie uzupełniono wodą destylowaną do objętości 4 mL.

Do kolumny chromatograficznej ZORBAX SB-C18 (4,0 x 250 mm) nanoszono 20 µL próbki. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina: 5 mM bufor fosforanowy o pH 7: acetonitryl, (85:15; v:v). Natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 0,8 mL/min. W tych parametrach czas retencji kompleksu MDA:TBA wyniósł 6,5 minuty, a całkowity czas analizy chromatograficznej 8 minut.

#### **Wykonanie krzywej wzorcowej**

Roztwór wzorcowy MDA otrzymano poprzez kwaśną hydrolizę TMP (1,1,3,3-tetrametoksypropan). 1,5 mL roztworu o stężeniu 0,6011 µM TMP/ 1 mL inkubowano z 25 mL 0,01 M HCl w 40°C przez 40 minut. Uzyskano roztwór o stężeniu 0,0341 µM MDA w 1 mL. Postępując analogicznie jak z próbką badaną wykonano roztwory wzorcowe MDA w zakresie stężeń od 0,02558 do 0,213 µM/L. Po przeprowadzeniu analizy chromatograficznej, z chromatogramów odczytano pola powierzchni pików kompleksu MDA:2TBA dla poszczególnych stężeń. Na podstawie uzyskanych danych sporządzono wykres krzywej kalibracyjnej zależności pola powierzchni pików MDA:2TBA od stężenia MDA w roztworach wzorcowych (Rys. 6).



Rysunek 6. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczania zawartości dialdehydu malonowego MDA w mleku ludzkim (n=3).

#### **Izolacja tłuszczu z mleka ludzkiego**

Tłuszcz z mleka kobiecego izolowano metodą ekstrakcyjną Röse-Gottlieba wg normy PN-EN ISO 1211:2002. Do ok. 10 g mleka (zważonego z dokładnością do 0,01g) dodano 2 mL 10% amoniaku oraz 10 mL alkoholu etylowego, każdorazowo delikatnie mieszając. Z tak przygotowanej mieszaniny tłuszcz ekstrahowano eterem dietylowym i heksanem w ilości po 25 mL. Górną warstwę organiczną zebrano, a następnie osuszono przesączając przez bezwodny siarczan sodu. Rozpuszczalniki organiczne odparowano wykorzystując wyparkę obrotową. Zastosowano pojedynczą ekstrakcję tłuszczu z mleka, a nie jak podaje norma - dwukrotną. Z przeprowadzonych wcześniej w Katedrze Chemii Technologii i Biotechnologii Żywności badań wynika, że zwiększenie krotności ekstrakcji nie ma znaczącego wpływu na ilość tłuszczu wyizolowanego z mleka. Zalecane w normie usuwanie resztek rozpuszczalników poprzez suszenie wyizolowanego tłuszczu w temp. 102°C zastąpiono przedmuchiowaniem wyekstrahowanego tłuszczu strumieniem azotu do osiągnięcia stałej masy próbki. Zapobiegano w ten sposób utlenianiu i

degradacji KT pod wpływem wysokiej temperatury, co ma szczególne znaczenie przy analizie wysokonienasyconych KT.

#### ***Otrzymywanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych (EMKT)***

Do przeprowadzenia analizy składu KT występujących w wyizolowanym tłuszczu techniką GC konieczne jest przekształcenie kwasów w bardziej lotne pochodne, czyli estry metylowe kwasów tłuszczowych (EMKT). Estryfikację KT zawartych w uzyskanych próbkach tłuszczu przeprowadzono według normy PN- EN ISO 5509:2001. Do naważki wyekstrahowanego tłuszczu (nie większej niż 0,1g) dodano 2 mL 0,5M roztworu wodorotlenku potasu w metanolu. Próbkę zmydlano przez 10 minutowe ogrzewanie w łaźni wodnej o temp. ok 95°C. Po tym czasie dodano 4 mL 13% metanolowego roztworu BF<sub>3</sub> jako katalizatora. Estryfikację kontynuowano przez 10 minut. Następnie dodano 2 mL heksanu. Próby schłodzono do temperatury pokojowej. Skuteczność rozpuszczenia EMKT w heksanie zwiększono poprzez dodanie nasyconego roztworu NaCl. Po 5 minutach zebrano górną warstwę heksanową zawierającą EMKT. Roztwór osuszono bezwodnym siarczanem sodu. Rozpuszczalnik odparowano strumieniem sprężonego azotu. Z uzyskanych estrów sporządzono roztwory w heksanie o stężeniu 50mg EMKT/mL rozpuszczalnika. Przygotowane próbki przechowywano w temperaturze -20°C do momentu analizy chromatograficznej.

#### ***Analiza składu KT metodą wysokorozdzielczej chromatografii gazowej (HR-GC)***

Rozdzielanie EMKT przeprowadzono przy użyciu kolumny RTX2330 na podstawie różnic w długości łańcucha węglowego, obecności, położenia i liczby wiązań wielokrotnych oraz ich konfiguracji. Do kolumny nanoszono 1µL roztworu EMKT w heksanie.

Parametry rozdziału EMKT:

Gaz nośny:

- hel- objętościowe natężenie przepływu przez kolumnę: 0,61mL/min.

Gazy pomocnicze:

- wodór - objętościowe natężenie przepływu: 39,5 mL/min,
- powietrze - objętościowe natężenie przepływu: 335 mL/min.

Temperatura dozownika: 250°C

Temperatura detektora: 250°C

Program temperaturowy kolumny:

- temperatura początkowa: 155°C przez 30 min,
- przyrost temperatury: 1,5°C/min do osiągnięcia 210°C
- temperatura końcowa: 210°C

Podział strumienia: 1:72

Czas trwania analizy: 120 min.

#### ***Identyfikacja kwasów tłuszczowych***

Do identyfikacji kwasów tłuszczowych wykorzystano mieszaniny wzorców EMKT :

- Supelco 37 Component FAME mix,



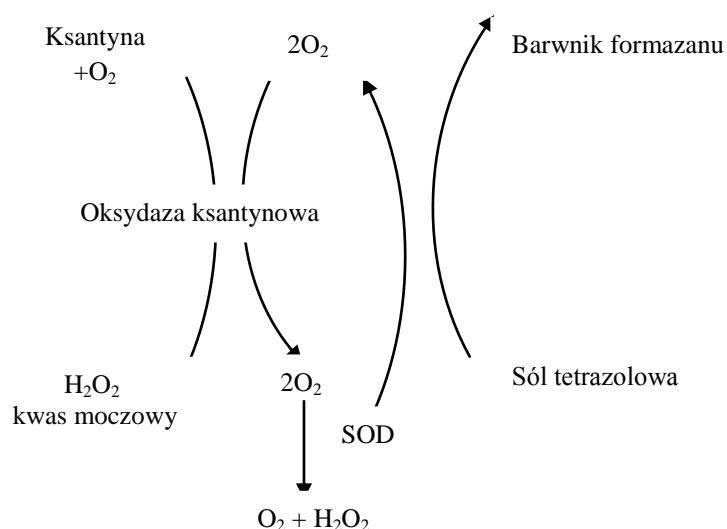
- Supelco Mix C20:1-C20:5,
- Mixture ME 64, Lardon, Fine Chemicals,
- Octadecadienoic acid, conjugated, methyl ester, Sigma.

Rozdzielenie wzorcowych EMKT prowadzono w warunkach identycznych jak EMKT analizowanych próbek mleka kobiecego. KT zidentyfikowane zostały na podstawie porównania względnych czasów retencji wzorców i próbek.

#### 8.2.4 Oznaczanie aktywności/ zawartości składników przeciwutleniających

##### Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

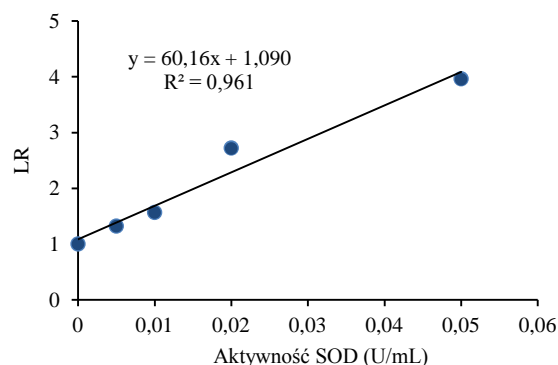
Aktywność SOD w próbach mleka kobiecego oznaczono stosując metodę spektrofotometryczną. Analizę przeprowadzono ściśle według procedury przedstawionej przez producenta wykorzystując test Superoxide Dismutase Assay Kit firmy Cayman, (USA). Metoda pomiaru oparta jest na wykorzystaniu soli tetrazolu jako indykatora do oznaczania nadtlenu generowanych przez oksydazę ksantynową i hipoksantynę (Rys. 7). Jednostkę aktywności SOD (U/mL) definiuje się jako ilość enzymu potrzebną do wywołania 50% dysmutacji rodnika ponadtlenkowego.



Rysunek 7. Schemat oznaczania aktywności SOD przy wykorzystaniu testu SuperoxideDismutaseAssay Kit firmy Cayman

##### *Analiza próby badanej*

Rozcieńczone próbki mleka kobiecego (5x) oraz standardy nanoszono do studzienek mikro płytki zawierających roztwór soli tetrazolu. Następnie w celu zainicjowania reakcji dodawano roztwór oksydazy ksantynowej. Płytkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej delikatnie wstrząsając. Następnie odczytano wartość absorbancji poszczególnych roztworów przy długości fali 450 nm. Kolejno obliczono wartość LR (stopa linearyzacji) dzieląc wartość absorbancji próby ślepej przez wartości absorbancji kolejnych standardów. Wykreślono krzywą kalibracyjną zależności aktywności SOD od wartości LR wykonanej przy użyciu roztworów wzorcowych załączonych do testu (Rys. 8).



Rysunek 8. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczania aktywności dysmutazy nadtlenkowej w mleku ludzkim (n=3).

Aktywność SOD (U/mL) w badanych próbach mleka kobiecego obliczono na podstawie równania krzywej kalibracyjnej i stosując przeliczenie wg wzoru:

$$SOD \left( \frac{U}{mL} \right) = \left[ \left( \frac{LR \text{ próby} - y}{x} \right) \times \frac{0,23 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \right] \times b$$

gdzie,

LR- stopa linearyzacji

b- współczynnik rozcieńczenia

0,23 mL- objętość mieszaniny reakcyjnej

0,01 mL- objętość próby

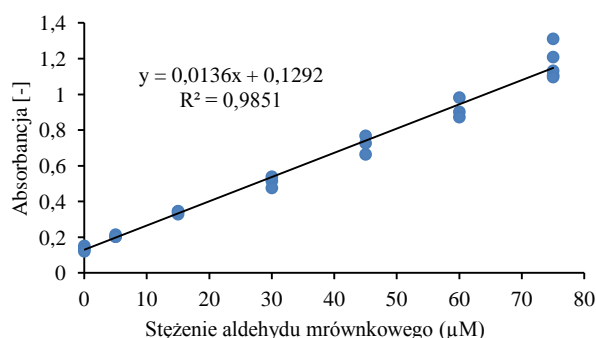
### **Katalaza (CAT)**

Aktywność katalazy w próbach mleka kobiecego oznaczono metodą spektrofotometryczną wykorzystując test Catalase Assay Kit firmy Cayman (USA). Analizę przeprowadzono ściśle według procedury podanej przez producenta. Metoda oznaczenia oparta jest na reakcji CAT z metanolem w obecności optymalnego stężenia nadtlenu wodoru. Powstały w trakcie reakcji aldehyd mrówkowy oznaczano kolorymetrycznie w obecności 4-amino-3-hydrazyno-5-merkaptio-1,2,4-triazolu. Jednostkę aktywności CAT (nmol/min/mL) definiuje się jako ilość enzymu, która powoduje tworzenie 1 nmol aldehydu mrówkowego w ciągu 1 minuty w temp. 25°C.

### **Analiza próby badanej**

Próbki mleka kobiecego, standardy oraz kontrolę nanoszono do studzienek mikropłytki zawierających bufor wraz z metanolem. W celu zainicjowania reakcji dodano roztwór nadtlenu wodoru. Płytkę inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej delikatnie mieszając. Następnie do każdej studzienki dodano roztwór wodorotlenku potasu w celu zatrzymania reakcji oraz 4-amino-3-hydrazyno-5-merkaptio-1,2,4-triazol, który pełni funkcję chromogenu. Po 10 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej do studzienek dodano roztworu jodku potasu, a następnie ponownie inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając. Absorbancję poszczególnych roztworów w

studzienkach odczytano przy długości fali 540 nm. Wykreślono krzywą kalibracyjną zależności stężenia aldehydu mrówkowego od wartości absorbancji wykonanej przy użyciu roztworów wzorcowych załączonych do testu (Rys. 9).



Rysunek 9. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczenia stężenia aldehydu mrówkowego w próbach mleka kobiecego (n=3).

Na podstawie równania krzywej obliczono stężenie aldehydu mrówkowego w badanych próbach wykorzystując wzór:

$$\text{Aldehyd mrówkowy } (\mu\text{M}) = \left[ \frac{A - y}{x} \right] \times \frac{0,17 \text{ mL}}{0,02 \text{ mL}}$$

gdzie,

A - absorbancja

0,17 mL- objętość mieszaniny reakcyjnej

0,02 mL- objętość próby

Aktywność CAT w badanych próbach mleka kobiecego obliczono stosując równanie:

$$\text{CAT}(\text{nM}/\text{min}/\text{mL}) = \left[ \frac{a}{20 \text{ min}} \right] \times b$$

gdzie,

a - stężenie aldehydu mrówkowego w próbce (µM)

b - współczynnik rozcieńczenia

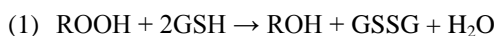
20 min – czas reakcji

### Peroksydaza glutationowa (GPx)

Oznaczenia aktywności GPx przeprowadzono ściśle według procedury przedstawionej przez producenta wykorzystując spektrofotometryczny test Glutathione Peroxidase Assay Kit firmy Cayman, (USA). Metoda oznaczania oparta jest na pośredniej reakcji peroksydazy glutationowej z reduktazą glutationową (1). Utleniony glutation (GSSG) powstały w reakcji z peroksydazą glutationową powraca do formy zredukowanej przy udziale reduktazy glutationowej (GR) oraz NADPH (2). Utlenieniu NADPH z  $\text{NADP}^+$  zawartego w próbce towarzyszy spadek absorbancji, którego szybkość jest wprost

proporcjonalna do aktywności GPx zdefiniowanej jako ilość enzymu, która powoduje utlenienie 1 nmol NADPH na minutę w temperaturze 25°C.

GPx



GR



### ***Analiza próby badanej***

Aktywność GPx oznaczono w supernatancie uzyskanym poprzez wirowanie mleka kobiecego (2000 rpm, 10 min, 4°C). Do wszystkich studzienek dodano bufor załączony do testu oraz mieszaninę reakcyjną (NADPH, glutation, reduktaza glutationowa), co stanowiło próbę ślepą. Kolejno do wydzielonych studzienek dodano kontrolę pozytywną oraz próbę badaną. Reakcje utleniania inicjonowano poprzez dodanie wodoronadtlenku kumenu do każdej ze studzienek. Kolejno zawartość studzienek rozmieszano poprzez delikatne wstrząśnięcie. Kinetykę reakcji utleniania mierzono poprzez odczyt absorbancji przy długości fali 340 nm przez 5 minut w interwale co 1 minuta.

Dla każdej studzienki sporządzono wykres zależności wartości absorbancji od czasu trwania reakcji. Kolejno od każdego nachylenia uzyskanego dla roztworów umieszczonych w poszczególnych studzienkach odjęto nachylenie z krzywej wykreślonej dla tła. W poniższym wzorze wartość ta oznaczona jest jako  $A_{340}/\text{min}$ . Następnie do wyznaczenia aktywności GPx skorzystano ze wzoru, w którym wykorzystano współczynnik ekstynkcji dla NADPH dla 340 nm równy  $0,00373 \mu\text{M}$ .

$$\text{GPx (nM/min/mL)} = \frac{A_{340}/\text{min}}{0,00373 \mu\text{M}} \times \frac{0,19 \text{ mL}}{0,02 \text{ mL}} \times b$$

gdzie,

$A_{340}$ - różnica nachylenia krzywej dla tła i próby

$0,00373 \mu\text{M}$ - współczynnik ekstynkcji NADPH

$0,19 \text{ mL}$ - objętość mieszaniny reakcyjnej

$0,02 \text{ mL}$ - objętość próbki

$b$ - współczynnik rozcieńczenia

### **Zawartość witaminy C**

Do oznaczenia zawartości witaminy C w mleku wykorzystano metodę rozdzielania chromatograficznego w układzie faz odwróconych z użyciem detektora UV (RP-HPLC/UV) opisaną przez Romeu-Nadal i in. (2008). Ze względu na występowanie witaminy C w dwóch formach – jako kwas askorbinowy (AsA) oraz kwas dehydroaskorbinowy (DHsA) w celu oznaczenia całkowitej zawartości witaminy C konieczne było przeprowadzenie DHsA w AsA przy użyciu czynnika redukującego - DL-ditiotreitolu (DTT). Aby uniknąć degradacji AsA podczas oznaczania, jako substancję stabilizującą stosowano 0,56% roztwór kwasu trimetafosforowego.

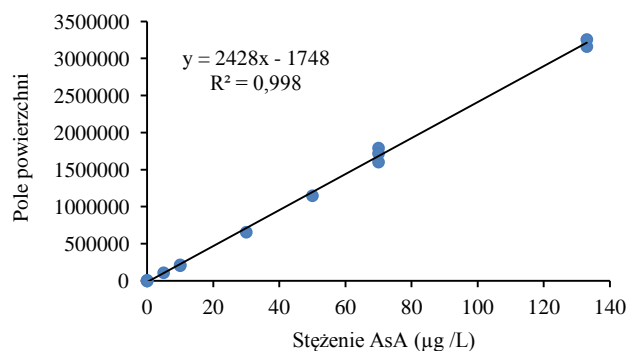
### **Analiza próby badanej**

Do próbek typu eppendorf pobierano 300  $\mu\text{L}$  próby mleka oraz 800  $\mu\text{L}$  0,1 M DTT. Roztwór wstrząsano przez 30 sekund i inkubowano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła przez 15 minut. Następnie dodawano 300  $\mu\text{L}$  0,56%  $\text{H}_3\text{O}_3\text{P}_9$  oraz 20  $\mu\text{L}$  5% TCA i ponownie wytrząsano przez 30 sekund. W kolejnym etapie mieszaninę wirowano dwa razy przez 10 minut przy 4500 rpm w temperaturze 10°C.

Anality zawarte w klarownych supernatantach rozdzielano techniką RP-HPLC/UV przy użyciu chromatografu cieczowego Perkin Elmer zaopatrzonego w kolumnę C-18 (Merck, Darmstadt, Germany) (125 x 4.0 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ) i detector UV-VIS. Dokolumny dozowano 25  $\mu\text{L}$  badanego roztworu. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina: 0,1% kwas octowy:metanol (95:5, v:v). Chromatogram rejestrowano przy długości fali  $\lambda = 245 \text{ nm}$ .

### **Wykonanie krzywej wzorcowej**

Ogólną zawartość witaminy C (mg/l) jako sumy AsA i DHsA w próbach mleka obliczano korzystając z równania krzywej kalibracyjnej zależności pola powierzchni generowanych pików od zawartości AsA w roztworach wzorcowych (Rys. 10). W celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej wykonano wyjściowy roztwór wzorcowy AsA o stężeniu 1 g/l w mieszaninie: 0,1% kwas octowy:metanol (95:5, v:v). Z przygotowanego roztworu wyjściowego sporządzono szereg rozcieńczeń, uzyskując stężenia w zakresie 1,5 - 30,0 mgAsA/L.



Rysunek 10. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczania całkowitej zawartości witaminy C w mleku kobiecym (n=3).

### **Całkowita zdolność przeciwutleniająca (TAC)**

W celu określenia całkowitej zdolności przeciwutleniającej (TAC - Total Antioxidant Capacity) mleka ludzkiego posłużono się metodą z użyciem odczynnika ABTS (Martysiak-Żurowska, Wenta, 2012). Podczas reakcji ABTS z nadsiarczanem sodu powstaje kationorodnik  $\text{ABTS}^{++}$ , który pełną stabilność w roztworze uzyskuje po upływie 6 godzin. Jest to związek o barwie niebieskozielonej, charakteryzujący się maksimum absorpcji przy długościach fali 417 nm, 645 nm, 734 nm i 815 nm.  $\text{ABTS}^{++}$  w obecności przeciwutleniaczy zawartych w próbce ulega redukcji do podstawowej formy ABTS, co wpływa na zmianę barwy. Stopień spadku intensywności zabarwienia zależy od sumarycznej zawartości i aktywności przeciwutleniaczy w badanym materiale oraz czasu reakcji. Aby wykluczyć wpływ innych składników badanej próbki na oznaczenie pomiar absorpcji prowadzi się w najbardziej

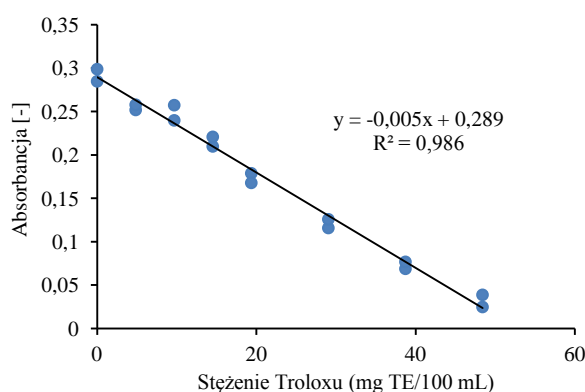
intensywnym i selektywnym dla ABTS<sup>•+</sup> paśmie przy długości fali 734 nm. Całkowitą aktywność przeciwutleniającą próbki wyraża się w ekwiwalentach Troloxu [TE] - rozpuszczalnego w wodzie analogu witaminy E, wykorzystując krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenia TE w roztworach wyjściowych.

#### ***Analiza próby badanej***

Do próbek wirówkowych dodano 2 mL metanolewego roztworu ABTS<sup>•+</sup> ( $A=0,700 \pm 0,002$ ; mierzona względem metanolu przy  $\lambda=734$  nm) oraz 20  $\mu$ L badanej próbki mleka ludzkiego. Po wymieszaniu próbę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła, a następnie wirowano (5 min, 8000 rpm). Natychmiast po odwirowaniu mierzono absorbancje klarownego supernatantu przy długości fali  $\lambda=734$  nm względem metanolu. Całkowity czas analizy nie mógł przekraczać 15 minut. Korzystając z równania krzywej wzorcowej obliczono wartości TAC dla poszczególnych prób mleka.

#### ***Wykonanie krzywej wzorcowej***

Do sporządzenia krzywej wzorcowej posłużono się wyjściowym roztworem Troloxu (TE) o stężeniu 0,968 mg/mL. Postępując analogicznie jak przy oznaczaniu TAC w próbach badanych, dla każdego roztworu wzorcowego wykonano trzy pomiary absorbancji. Na podstawie uzyskanych średnich wartości absorbancji wykonano krzywą kalibracyjną zależności absorbancji od stężenia Troloxu w roztworach wzorcowych (Rys. 11).



Rysunek 11. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczania TAC w próbach mleka kobiecego (n=2).

### **8.2.5 Oznaczenie składników przeciwdrobnoustrojowych**

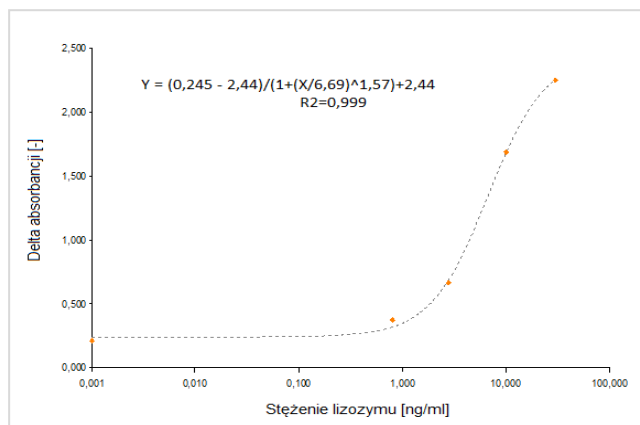
#### **Stężenie lizozymu**

Stężenie lizozymu w próbach mleka kobiecego oznaczono stosując metodę immunoenzymatyczną typu „sandwich”. Analizę przeprowadzono ściśle według procedury przedstawionej przez producenta wykorzystując test Lysozyme ELISA Kit, Immun Diagnostik AG (Bensheim, Niemcy).

#### ***Analiza próby badanej***

Rozcieńczone próbki mleka (10000x) oraz kontrole nanoszono do studzienek mikropłytki opłaszczonych wysoce specyficznymi przeciwciałami rozpoznającymi lizozym ludzki. Podczas pierwszej inkubacji lizozym łączył się z unieruchomionym na płycie przeciwciałem. Następnie do studzienek

dodawano swoiste dla lizozymu przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z enzymem – peroksydazą chrzanową, które łączyły się z lizozymem. Płytkę inkubowano przez godzinę, po czym do studzienek dodawano substrat dla peroksydazy – tetrametylobenzydynę (TMB). Podczas inkubacji płytki w ciemnym miejscu zachodziła reakcja między enzymem, a substratem, w wyniku której obserwowano zmianę zabarwienia. Następnie do studzienek dodawano kwaśny bufor „stop”, który powodował zatrzymanie reakcji pomiędzy substratem, a enzymem i zmianę barwy. Próby analizowano spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm oraz 620 nm. Stężenie lizozymu w badanych próbkach mleka kobiecego obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej wykonanej przy użyciu roztworów wzorcowych dołączonych do testu (Rys.12).



Rysunek 12. Przykładowa krzywa kalibracyjna do oznaczania stężenia lizozymu w próbkach mleka kobiecego sporządzana w programie Gen5 obsługujący hybrydowy czytnik wielodetekcyjny Synergy HT, BioTek (n=3).

### Stężenie laktoferyny

Zawartość laktoferyny w próbkach mleka ludzkiego oznaczono zmodyfikowaną procedurą opracowaną na podstawie metody przedstawionej przez Dračkova i in. (2009). Zawartość laktoferyny oznaczono techniką HPLC z detekcją przy 210 nm w układzie faz odwróconych. Do fazy ruchomej dodano kwasu trifluorooctowego (TFA) w celu polepszenia selektywności rozdzielania laktoferyny.

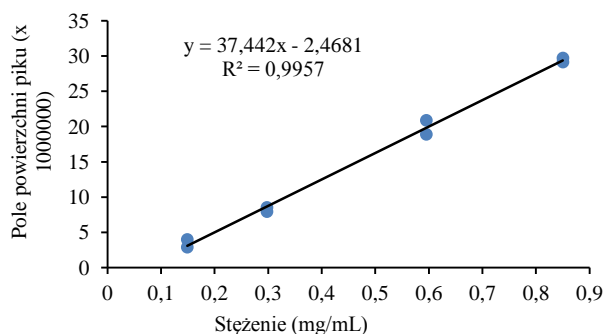
#### Analiza próby badanej

Próbkę mleka kobiece dokładnie wymieszano a następnie odwirowano. Supernatant mleka ludzkiego uzyskany po odwirowaniu próbki (12000 rpm, 20 minut, 4°C) rozcieńczono 1:5 dejonizowaną wodą destylowaną. Uzyskany roztwór poddano analizie technika chromatografii cieczowej.

Do kolumny chromatograficznej Kinetex C18 (4,0 x 150 mm, 5 μm, 100A, Phenomenex) z przedkolumną SB-C18 (4,6 x 12 mm) nanoszono 20 μL roztworu. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina 0,1% TFA w wodzie (A) i 0,1% TFA w acetonitrylu (B). Analizę chromatograficzną badanych roztworów uzyskano stosując elucję gradientową: czas od 0 do 2 minut – 65% A : 35% B, czas od 2 do 15 minut - liniowy wzrost zawartości fazy B do 50%, czas od 15 do 20 minut – liniowa zmiana gradientu do 65% A : 35% B. Natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 0,8 mL/min. W tych parametrach czas retencji LF był równy 6,1 minuty.

### Wykonanie krzywej wzorcowej

Roztwór wzorcowy sporządzono poprzez rozpuszczenie naważki LF (85% czystości) w dejonizowanej wodzie destylowanej. Wykorzystując roztwór wzorcowy LF o stężeniu 0,85 mg LF/mL wykonano serię rozcieńczeń w zakresie 0,149 do 0,850 mg LF/mL. Przeprowadzono analizę chromatograficzną roztworów wzorcowych z detekcją przy 210 nm, a następnie odczytano pola powierzchni uzyskanych pików. Na podstawie uzyskanych danych sporządzono linie kalibracyjną zależności pola powierzchni pików LF od stężenia analitu w roztworach wzorcowych (Rys. 13).



Rysunek 13. Przykładowa krzywa kalibracyjna zależności pola powierzchni pików uzyskanego techniką HPLC od stężenia laktoferyny (n=3).

Zawartość laktoferyny w analizowanych próbach mleka ludzkiego obliczono wykorzystując równanie linii kalibracyjnej, uwzględniając rozcieńczenia mleka oraz odzysk laktoferyny z mleka uzyskany stosowaną metodą analityczną (97,15%).

### 8.2.6 Oznaczanie składników immunologicznych

#### Stężenie immunoglobuliny A (sIgA)

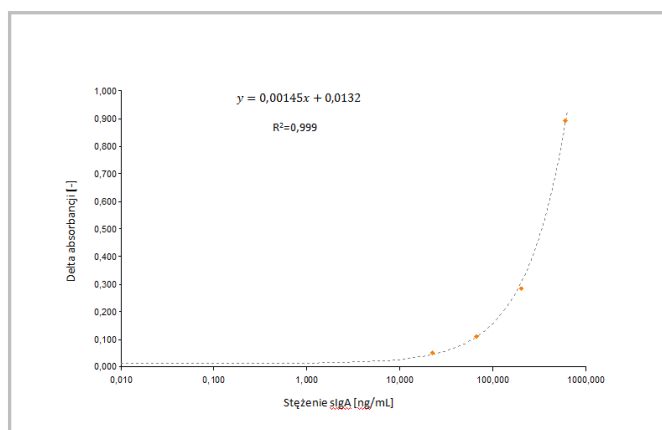
Stężenie sIgA w próbach mleka kobiecego oznaczono stosując metodę immunoenzymatyczną typu „sandwich”. Analizę przeprowadzono ściśle według procedury przedstawionej przez producenta wykorzystując test sIgA Elisa Kit firmy Immun Diagnostic, (Niemcy).

#### Analiza próby badanej

Rozcieńczone próbki mleka (20000 x), standardy oraz kontrole nanoszono do studzienek mikropłytki opłaszczonych wysoce specyficznymi przeciwciałami rozpoznającymi ludzką immunoglobulinę IgA. W pierwszym etapie inkubacji następowało związanie się IgA próby z przeciwciałami poliklonalnymi (królicze przeciwciała przeciwko ludzkiej IgA) unieruchomionymi na płytce testowej. Kolejno dodano koniugat znakowany peroksydazą, który rozpoznaje specyficzne związany IgA. W kolejnym etapie w celu usunięcia wszystkich niezwiązanych substancji dodawano tetrametylobezidyna (TMP). Następnie w celu zatrzymania reakcji dodano kwaśny bufor stop.

Oznaczono absorbancję roztworów przy długości fali 450 nm oraz 620 nm. Stężenie IgA w badanych próbach mleka kobiecego obliczono na podstawie równania krzywej kalibracyjnej zależności absorbancji od stężenia roztworów wzorcowych załączonych do testu (Rys. 14).





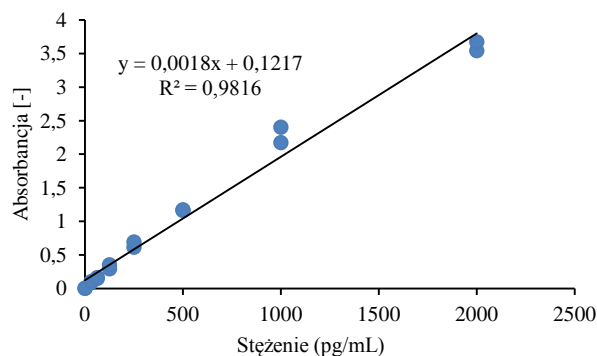
Rysunek 14. Przykładowa krzywa kalibracyjna do oznaczania stężenia sIgA w próbach mleka kobiecego sporządzana w programie Gen5 obsługujący hybrydowy czytnik wielodetekcyjny Synergy HT, BioTek (n=3).

### Stężenie cytokiny TGF-β2

Stężenie cytokiny TGF-β2 w badanych próbach mleka ludzkiego oznaczono wykorzystując komercyjny test immunoenzymatyczny typu „sandwich” Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Transforming Growth Factor Beta-2 (Cloud-Clone Corp, USA) postępując zgodnie z instrukcją producenta załączoną do testu.

#### *Analiza próby badanej*

Próbki mleka kobiecego dokładnie wymieszano, a następnie odwirowano (1000 rpm, 20 min, 4°C). Aktywację cytokiny zawartej w próbce przeprowadzono poprzez dodanie do uzyskanych supernatantów określonej objętości 1 M HCl oraz 1,2 M wodorotlenek sodu/ 0,5 M HEPES. Tak przygotowane próby oraz standardy dołączone do testu nanoszono do studzienek mikropłytki opłaszczonych wysoce specyficznymi przeciwciałami rozpoznającymi ludzką TGF-β2. Podczas pierwszej inkubacji TGF-β2 łączyła się z unieruchomionym na płytce przeciwciałem sprzężonym z biotyną. Następnie do studzienek dodawano awidynę sprzężoną z peroksydazą chrzanową. Podczas inkubacji płytki w ciemnym miejscu zachodziła reakcja między enzymem, a substratem, w wyniku której następowała zmiana zabarwienia roztworu na kolor niebieski. Następnie do studzienek dodawano roztwór kwasu siarkowego, który powodował zatrzymanie reakcji pomiędzy substratem a enzymem i zmianę barwy na kolor żółty. Próby analizowano spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm. Stężenie TGF-β2 w badanych próbkach mleka kobiecego obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej wykonanej przy użyciu roztworów wzorcowych dołączonych do testu (Rys. 15).



Rysunek 15. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczania stężenia TGF-β2 w próbach mleka kobiecego (n=3).

### 8.2.7 Oznaczenie aktywności lipaz

Aktywność lipaz w badanych próbach mleka ludzkiego oznaczono wykorzystując komercyjny test spektrofotometryczny QuantiChrom™ Lipase Assay Kit (DLPS-100) firmy BioAssay Systems (USA) postępując zgodnie z instrukcją producenta załączoną do testu. Metoda oznaczenia oparta jest na reakcji odszczepienia przez lipazę grupy –SH od kwasu dimerkaptopropanolowo maślanego (BALB). Wolne grupy –SH łączą się z kwasem 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoesowym (DTNB) tworząc kompleks oznaczany spektrofotometrycznie. Intensywność zabarwienia badanego roztworu jest proporcjonalna do aktywności lipaz w badanej próbce.

#### *Analiza próby badanej*

Rozcieńczone próby mleka ludzkiego (500x), wodę oraz kalibrator (roztwór lipazy o znanej aktywności) nanoszono do studzienek płytki. Następnie w celu zainicjowania reakcji dodawano roztwór roboczy załączony do testu (BALAB + DTNB). Mieszanina reakcyjna zabarwiła się na kolor żółty o intensywności zależnej od aktywności lipaz w badanym medium. Kolejno wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 412 nm po 10 oraz 20 minutach inkubacji. Aktywność lipaz mleka ludzkiego obliczono na podstawie wzoru:

$$\text{Aktywność lipazy } \left(\frac{U}{L}\right) = \frac{A_{20 \text{ min}} - A_{10 \text{ min}}}{A_{\text{kalibrator}} - A_{\text{woda}}} \cdot 735$$

gdzie:

$A_{10 \text{ min}}$ - absorbancja próbki po 10 min inkubacji ;

$A_{20 \text{ min}}$  - absorbancja próbki po 20 min inkubacji;

$A_{\text{kalibrator}}$ - absorbancja kalibratora po 20 min inkubacji;

$A_{\text{woda}}$ - absorbancja wody po 20 min inkubacji;

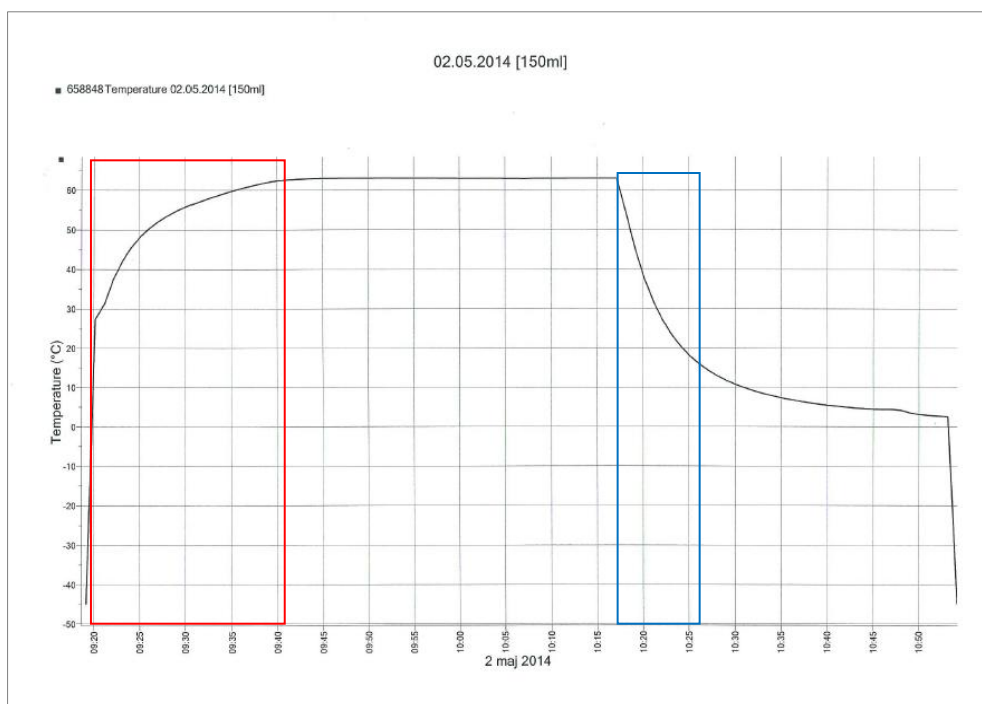
735- równoważnik aktywności kalibratora w warunkach testu (U/L)

### 8.2.8 Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki przedstawiono jako wartości średnie z podaniem odchylenia standardowego SD. Statystycznego oszacowania istotności różnic pomiędzy zawartościami poszczególnych analitów w surowym mleku ludzkim, mleku poddanym ogrzewaniu mikrofalowemu, ogrzewaniu konwekcyjnemu oraz działaniu wysokiego ciśnienia w ujemnych temperaturze dla danych o rozkładzie normalnym dokonano metodą ANOVA. Dla klasyfikacji jednoczynnikowej oraz testu *post-hoc* Tukeya, w przypadku gdy dane nie miały rozkładu normalnego wykorzystano test Kruskala-Wallisa wykorzystując program Graph Pad Prism 5. Za wartość graniczną poziomu istotności przyjęto  $p \leq 0,05$ .

## 9. Omówienie wyników i dyskusja

Stosowana w BMK pasteryzacja holder wymaga 30 minutowego przetrzymywania mleka krowiego w temp. 62,5°C. W jednostkach tych stosowane są pasteryzatory, w których czas uzyskania pożądanej temperatury materiału biologicznego ogrzewanego konwekcyjnie wynosi około 20 minut (Rys. 16).



Rysunek 16. Przykładowy wykres temperaturowy procesu pasteryzacji holder sporządzony przy wykorzystaniu oprogramowania załączonego do pasteryzatora STERIFEED-T30 wykorzystywanego w BMK w Toruniu, ■ - czas uzyskania temp. 62,5°C, ■ - czas chłodzenia do temp. 20°C

Proces ogrzewania konwekcyjnego, w prowadzonych na potrzeby pracy badaniach, odbywał się w sposób odzwierciedlający warunki pasteryzacji w BMK. Czas uzyskania temperatury 62,5°C wynosił od 17 do 19 minut podczas tego procesu prowadzonego bez mieszania próbki. Mieszanie mleka pozwoliło na skrócenie tego etapu o około 7 minut w przypadku temperatury 62,5°C. W wyższych temperaturach procesu różnica w czasie ich uzyskania była znacznie mniejsza i wynosiła 3 minuty dla 66°C oraz 2 minuty dla 70°C i 72 °C (Tab.7).

Wykorzystanie ogrzewania mikrofalowego pozwoliło uzyskać temp. 62,5°C już w ciągu 1,3 minuty, a tym samym skrócić pierwszy etap procesu o około 93% w porównaniu do ogrzewania konwekcyjnego (Rys. 17). Analogicznie temp. 66°C, 70°C i 72°C uzyskano w czasie krótszym w porównaniu z ogrzewaniem konwekcyjnym odpowiednio o 82%, 83% oraz 85%.



Rysunek 17. Wykres temperaturowy ogrzewania mikrofalowego sporządzony przy wykorzystaniu oprogramowania załączonego do prototypu pasteryzatora mikrofalowego skonstruowanego przez firmę Enbio Technology Sp. z o. o. ■ - czas uzyskania temp. 62,5°C, ■ - czas chłodzenia do temp. 20°C

Średnie czasy dojścia do zadanych temperatur podczas ogrzewania konwekcyjnego z i bez mieszania oraz ogrzewania mikrofalowego przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Średni czas ogrzewania prób, po którym badane próby mleka osiągnęły żądaną temperaturę (średnia  $\pm$  SD).

Czas (min)	Temperatura (°C)			
	62,5	66	70	72
Ogrzewanie konwekcyjne bez mieszania	18 $\pm$ 0,8	17 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1,2	19 $\pm$ 0,9
Ogrzewanie konwekcyjne z mieszaniem	11 $\pm$ 1,1	14 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1,6	17 $\pm$ 1,1
Ogrzewanie mikrofalowe	1,3 $\pm$ 0,3	3 $\pm$ 0,5	3 $\pm$ 0,5	3 $\pm$ 0,5

### 9.1 Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania mikrofalowego na przeżywalność wybranych drobnoustrojów Gram dodatnich oraz Gram ujemnych celowo wprowadzonych do mleka krowiego UHT (badania modelowe)

Ze względu na ograniczony dostęp do mleka kobiecego wstępną ocenę skuteczności pasteryzacji w różnych wartościach temperatury i czasu jej działania przeprowadzono w układzie modelowym, stosując mleko krowie UHT, w którym zawartość tłuszczu wynosiła 3,5%.

W celu uzyskania wiarygodnych wyników analiz do porównania skuteczności badanych metod inaktywacji mikroorganizmów wykorzystano drobnoustroje referencyjne. Gatunki niepatogennych szczepów bakterii pochodzących z kultur referencyjnych uzyskano z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu. Do badań wybrano gatunki bakterii zaliczane do mikroflory naturalnej mleka kobiecego oraz drobnoustroje które mogą się dostać do niego w skutek zanieczyszczenia krzyżowego.

Drobnoustroje będące przedstawicielami naturalnej mikroflory mleka tj. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans* nie stanowią zagrożenia dla zdrowia dzieci, u których prawidłowo funkcjonuje układ odpornościowy. Mleko kobiece może być również nośnikiem szczepów chorobotwórczych tych mikroorganizmów pochodzących

od matki i/lub otoczenia. Stanowią one zagrożenie dla dzieci chorych oraz urodzonych przedwcześnie, czyli głównych beneficjentów BMK.

*Staphylococcus aureus* jest najbardziej chorobotwórczym gatunkiem wśród gronkowców. Bakterie te ze względu na wysoką wirulentność oraz antybiotykooporność są głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń szpitalnych o ciężkim przebiegu. Posiadają zdolność produkowania termostabilnych enterotoksyn powodujących zatrucia pokarmowe, które nie są inaktywowane podczas ogrzewania w temperaturze 120°C przez 60 minut (Evenson, 2007). Według danych Federalnego Urzędu Żywności i Leków FDA (Food and Drug Administration) zatrucia enterotoksyną gronkowca następują po spożyciu pokarmu, w którym liczebność populacji *S. aureus* wynosi 5 log<sub>10</sub>j.t.k. w 1 ml lub 1 g żywności. Nieprawidłowe postępowanie z mlekiem kobiecym przed przyjęciem do BMK, np. przetrzymywanie w temperaturze pokojowej, może prowadzić do namnażania tych drobnoustrojów. Dlatego ważne jest monitorowanie zawartości *S. aureus* w mleku dawczyń (Becker i in. 2004, Murray i in. 2003, Kluytmans i in. 1997).

*Staphylococcus epidermidis* to bakterie naturalnie bytujące na skórze oraz błonie śluzowej zdrowych ludzi. Podobnie jak *S. aureus* szczepy *S. epidermidis* posiadają zdolność do nabierania cech zjadliwości oraz antybiotykooporności, dlatego uważane są za oportunistyczne patogeny, szczególnie niebezpieczne dla osób z obniżoną odpornością (Lim i in. 2005).

Użyte w badaniach drobnoustroje z gatunku *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* oraz *Enterococcus hirae* powszechnie izolowane są z mleka kobiecego. W przypadku bakterii *E. faecalis* w piśmiennictwie dostępne są dane określające jej termoodporność (Sörqvist, 2003), a pozostałe dwa analizowane gatunki opisane są fragmentarycznie. Bakterie z rodzaju *Enterococcus* sp. wchodzi w skład naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego człowieka, a w niewielkiej ilości zasiedlają skórę oraz drogi rodne. Przez wiele lat uważano te mikroorganizmy za względnie chorobotwórcze. Obecnie są powszechnie uznawane za drobnoustroje odpowiedzialne za większość trudnych w leczeniu zakażeń szpitalnych, ponieważ wykazują zarówno pierwotną, jak i nabytą odporność na wiele antybiotyków (Mohanty i in. 2006; Marothi i in. 2005). Szczególnie niebezpieczna ze względu na ograniczone możliwości leczenia jest sepsa wywołana obecnością bakterii z rodzaju *Enterococcus* sp. odpornych na wankomycynę. Wankomycyna zaliczana jest do antybiotyków glikopeptydowych, tzw. antybiotyków ostatniej szansy w leczeniu ciężkich zakażeń wielolekoopornych wywołanych przez bakterie z rodzaju *Enterococcus* sp. Źródłem infekcji są przede wszystkim krzyżowe zakażenia szpitalne (Choudhry i in. 2010.)

W badaniu wykorzystano również drobnoustroje, które nie występują w mleku kobiecym naturalnie, lecz dostają się do niego w wyniku zanieczyszczenia krzyżowego, tj. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Do zakażenia może dojść na każdym z etapów dystrybucji mleka dziecku, tj. podczas odciągania, zbierania, transportu, przechowywania czy też przygotowywania do karmienia. Wybrane gatunki mikroorganizmów stanowią jedną z najszcześniejszych przyczyn zakażeń szpitalnych na oddziałach intensywnej opieki noworodka (Cortese i in. 2016).

Bakterie *E. coli* to Gram ujemne, względnie beztlenowe komensalne pałeczki, bytujące w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Do tego gatunku należą jednakże szczepy, które wywołują stany chorobowe, np. zapalenie płuc, dróg moczowych oraz szczepy powodujące choroby przewodu pokarmowego (Zoja i in. 2010). *P. aeruginosa* bytuje głównie w glebie i wodzie, czasami izolowana jest ze skóry zdrowych ludzi. Głównym źródłem zanieczyszczenia mleka kobiecego *P. aeruginosa* jest sprzęt

medyczny i ręce personelu. Szczególniej uwagi wymaga utrzymanie w czystości armatury szpitalnej, ponieważ mikroorganizm ten posiada zdolność tworzenia odpornego na środki chemiczne biofilmu na powierzchniach mających częsty kontakt z wodą (Zafar i in. 2002; Crivaro i in. 2009; Moolenaar i in. 2000; Bert i in. 1998; Williams 2013). Zakażenie tą bakterią prowadzi do wystąpienia stanów chorobowych takich jak sepsa, zapalenie płuc, opon mózgowych, zapalenie skóry (Guen i in. 2003).

Najczęstszą przyczyną obecności *E. coli* i *P. aeruginosa* w mleku ludzkim jest niezachowanie odpowiednich warunków higienicznych podczas odciągania pokarmu.

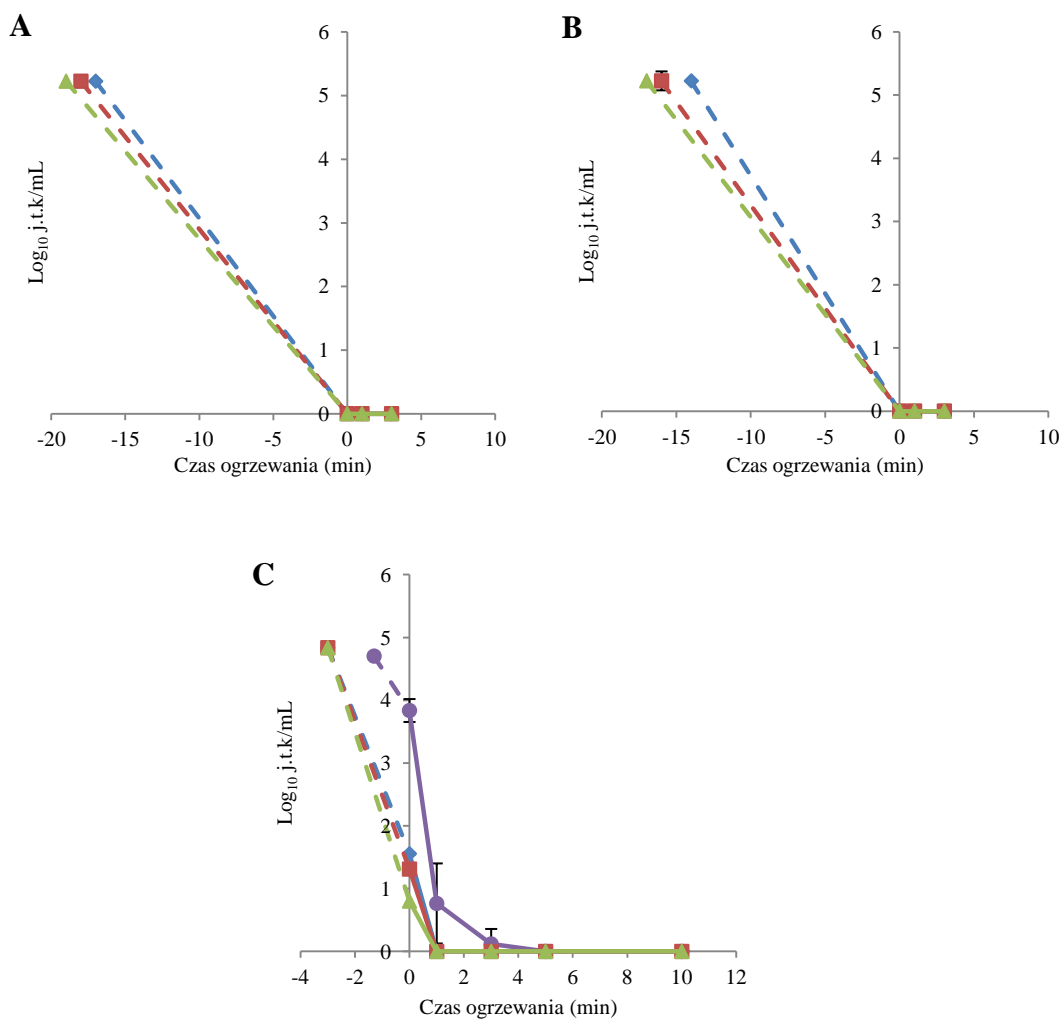
### ***Staphylococcus aureus* PCM 2045 i *Staphylococcus epidermidis* PCM 2118**

Warunki pasteryzacji holder zapewniają całkowitą inaktywację bakterii *S. aureus* i *S. epidermidis* obecnych w mleku kobiecym (Escuder-Vieco i in. 2018).

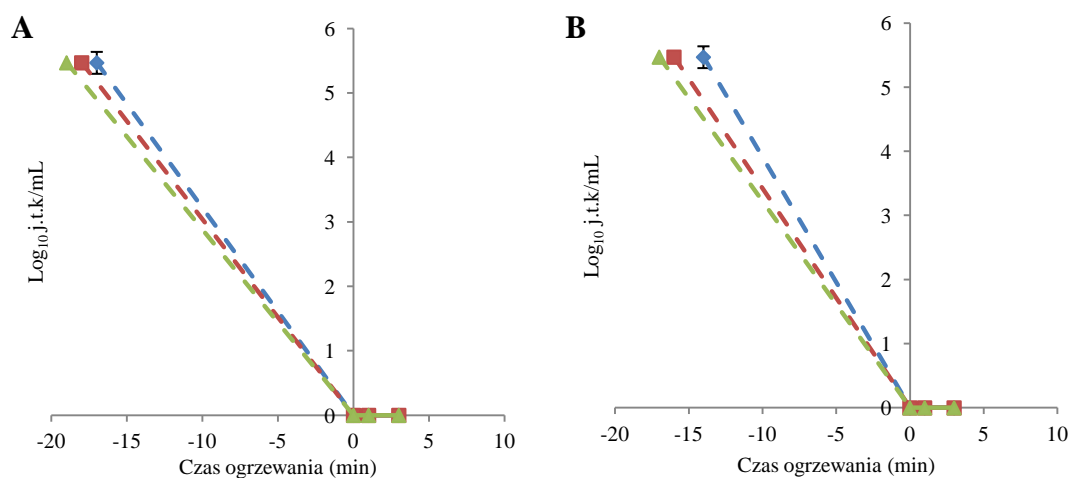
Wykazano, iż ogrzewanie konwekcyjne w wariancie z mieszaniem oraz bez mieszania powoduje całkowitą inaktywację bakterii *S. aureus* PCM 2045 oraz *S. epidermidis* PCM 2118 zawieszonych w mleku UHT w ilości 5 log<sub>10</sub> j.t.k./mL już w czasie dojścia do temp. 66°C (Rys. 18A, 18B, 19A, 19B).

Ogrzewanie mikrofalowe w temp. 62,5°C pozwoliło na uzyskanie pełnej inaktywacji obu badanych drobnoustrojów po 5 minutach przetrzymywania próbek mleka w tej temperaturze (całkowity czas procesu 6,3 minuty) (Rys. 18C, 19C). Podwyższenie temperatury procesu do 66°C, 70°C i 72°C skracało czas niezbędny do całkowitej redukcji liczby bakterii *S. aureus* do 1 minuty (Rys. 18C). W przypadku drobnoustrojów *S. epidermidis* dopiero w temperaturze 70°C i 72°C zaobserwowano redukcję czasu, w którym następowała ich inaktywacja odpowiednio do 1 minuty przetrzymywania próbki i czasu uzyskiwania temperatury procesu (Rys. 19C). Brak jest danych literaturowych określających wpływ ogrzewania mikrofalowego na przeżywalność *S. aureus* i *S. epidermidis* obecnych w mleku kobiecym. Atmaca i in. (1996) wykazali, iż bakterie te zawieszane w bulionie odżywczym w ilości 12 log<sub>10</sub> j.t.k./mL inaktywowane są po ogrzewaniu mikrofalowym w czasie 30 s przy zastosowaniu mocy mikrofal 550W. Na uwagę zasługuje fakt, iż badacze stosowali małe objętości mleka co powodowało, iż w przeprowadzonym przez nich procesie uzyskali temperature około 92°C. W związku z tym nie ma możliwości bezpośredniego porównania rezultatów przedstawionych przez Atmaca i in. z niniejszymi wynikami zawartymi w pracy.

Czas, w którym uzyskano zadane temperatury (czas 0) oznaczony został na wykresach linią przerywaną na ujemnej osi X.

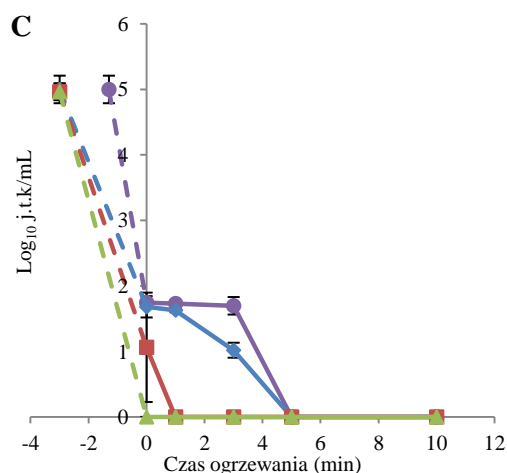


Rysunek 18. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii *S. aureus* PCM 2054 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia  $\pm$  SD), (62,5°C -●-, 66°C -◆-, 70°C -■-, 72°C -▲-)



Rysunek 19. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii *S. epidermidis* PCM 2118 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia  $\pm$  SD), (62,5°C -●-, 66°C -◆-, 70°C -■-, 72°C -▲-)





CD. Rysunek 19. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii *S. epidermidis* PCM 2118 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia±SD), (62,5°C-●, 66°C-◆, 70°C-■, 72°C-▲)

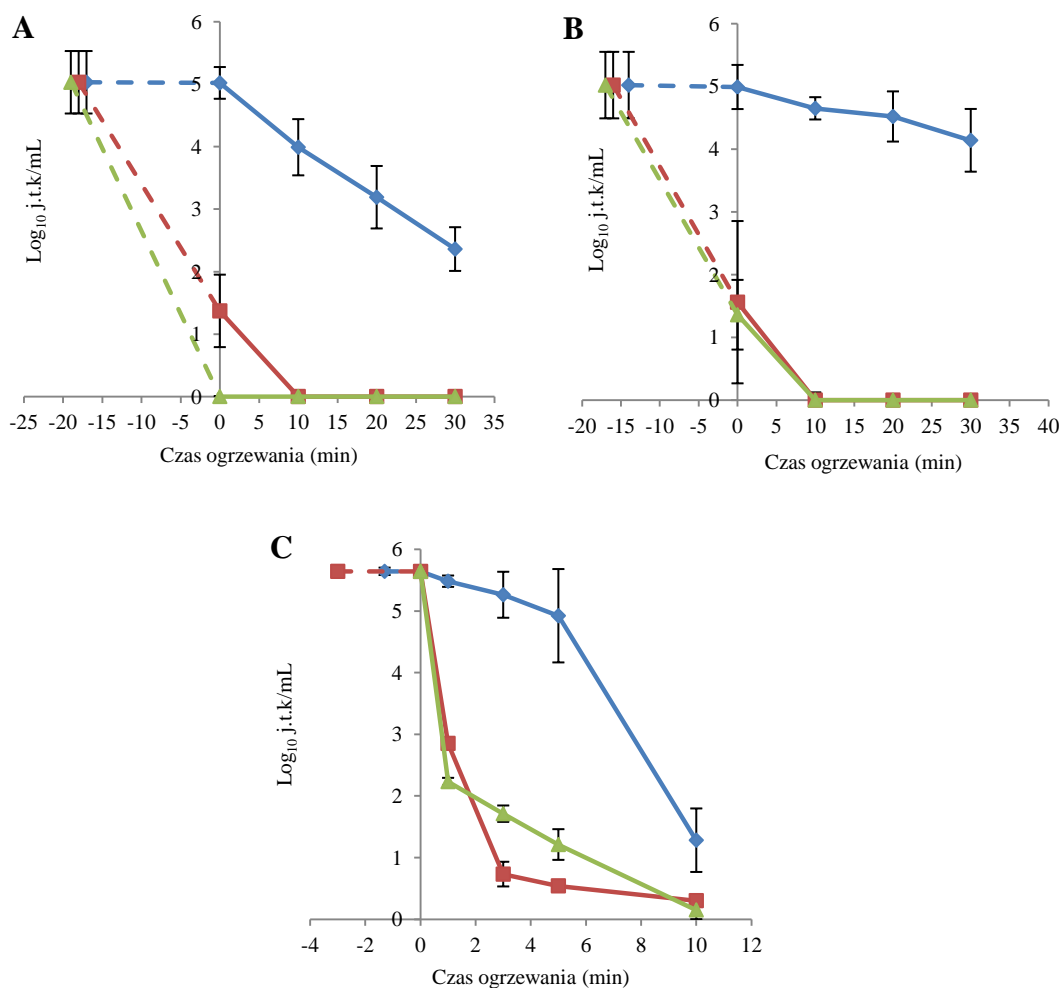
### *Enterococcus* sp.

#### *Enterococcus faecalis*

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* sp. charakteryzują się największą termoodpornością spośród bakterii nieprzetrawialnikujących, przeżywając ogrzewanie w temp. 60°C przez 30 minut (Perez i in. 1982).

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że nawet 30 minut ogrzewania konwekcyjnego w temp. 66°C nie jest wystarczające do inaktywacji bakterii *E. faecalis* PCM 896 jeżeli ich początkowa ilość w mleku wynosi 5 log<sub>10</sub> j.t.k./mL. W tych parametrach procesu następuje obniżenie liczby mikroorganizmów o około 2,5 i 1 log<sub>10</sub> j.t.k./mL odpowiednio w próbkach mleka mieszanych i nie mieszanych w trakcie procesu. Podwyższenie temperatury ogrzewania do 70°C prowadziło do całkowitej inaktywacji drobnoustrojów po 10 minutach działania temperatury, zarówno w przypadku procesu prowadzonego z mieszaniem, jak i bez mieszania (całkowity czas procesu wynosił odpowiednio 33 i 35 minuty). Ogrzewanie mleka w sposób konwekcyjny w wariancie bez mieszania w temp. 72°C powodowało redukcję liczby bakterii *E. faecalis* PCM 896 do poziomu ich niewykrywalności w 1 mL mleka w czasie dojścia do zadanej temperatury (19 minut), natomiast w wariancie z mieszaniem próbek po 10 minutach jej działania (całkowity czas procesu wynosił 27 minut) (Rys. 20A, 20B).

Ogrzewanie mikrofalowe prób mleka nie przyniosło zadowalających rezultatów względem bakterii *E. faecalis* PCM 896 zawieszonych w mleku UHT. Nawet działanie temp. 72°C przez 10 minut (całkowity czas procesu 13 minut) nie powodowało całkowitej inaktywacji tych mikroorganizmów. Po tym czasie w mleku obecne były jeszcze nieliczne żywe komórki tego szczepu (Rys. 20C).



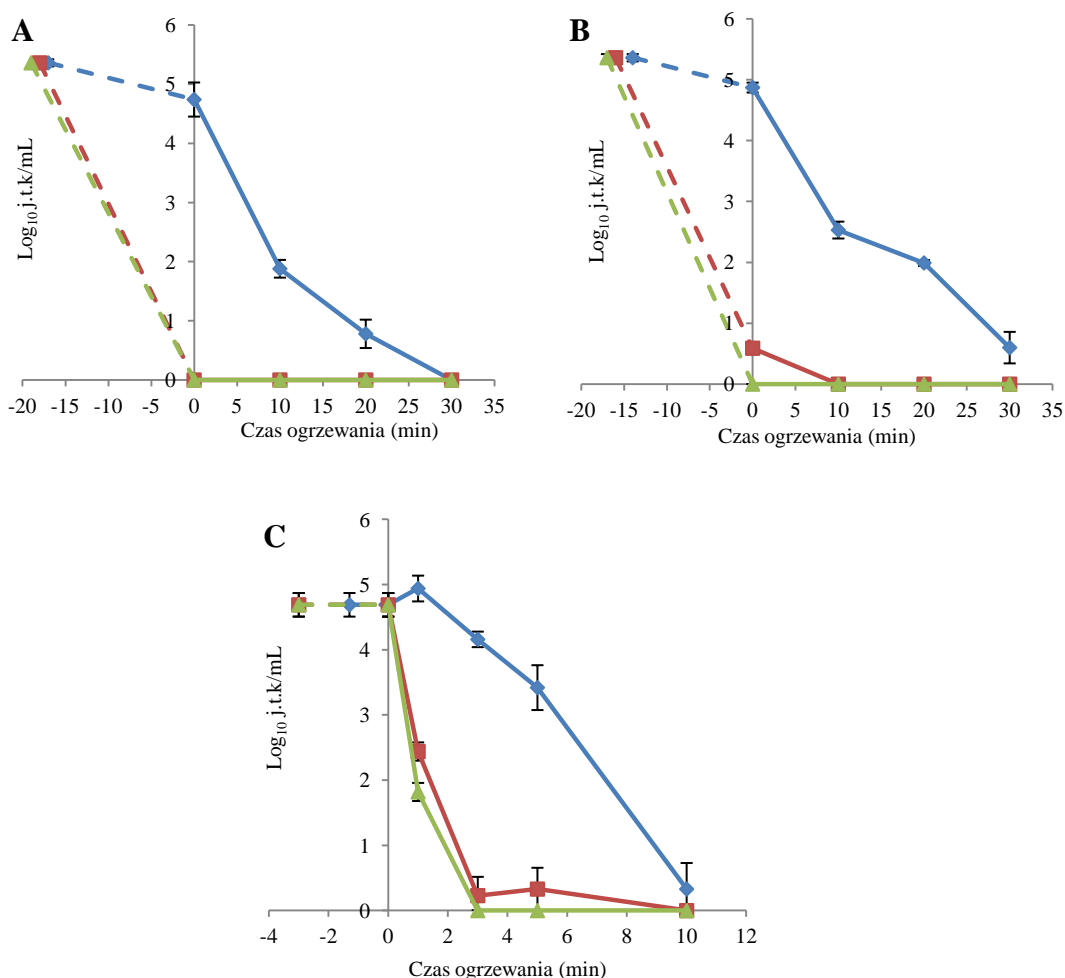
Rysunek 20. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii *E. faecalis* PCM 896 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia  $\pm$  SD), (66°C -  $\blacklozenge$ , 70°C -  $\blacksquare$ , 72°C -  $\blacktriangle$ )

#### *Enterococcus durans* PCM 1857

Całkowitą inaktywację bakterii *E. durans* PCM 1857 uzyskano po 30 minutach ogrzewania mleka w sposób konwekcyjny w temp. 66°C w wariancie bez mieszania próbki (całkowity czas procesu wynosił 47 minut). Zastawowanie tych samych wartości czasu i temperatury procesu w wariancie z mieszaniem prowadziło do obniżenia się ilości tych drobnoustrojów w badanej próbce o 4,6 log<sub>10</sub> j.t.k./mL. Działanie temp. 70°C redukowało liczbę *E. durans* do poziomu wykrywalności w 1 mL mleka w wariancie bez mieszania już w czasie dojścia do zadanej temperatury (18 minut). W procesie prowadzonym z mieszaniem próbki w celu uzyskania efektu pasteryzacji konieczne było przetrzymywanie mleka przez 10 minut (całkowity czas procesu wynosił 26 minut). Podwyższenie temperatury ogrzewania do 72°C powodowało, iż bakterie *E. durans* były całkowicie inaktywowane już w czasie jej uzyskania przez badany materiał biologiczny (Rys. 21A, 21B).

W pracy wykazano, że 10 minutowe ogrzewanie mikrofalowe próby mleka UHT w temp. 66°C powodowało obniżenie liczby zawieszonych w nim bakterii *E. durans* PCM 1957 o ok. 4 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (całkowity czas procesu wynosił 13 minut). Podwyższenie temperatury procesu do 72°C pozwoliło na

uzyskanie całkowitej redukcji tych drobnoustrojów po 5 minutach przetrzymywania (całkowity czas procesu wynosił 8 minut) (Rys. 21C).

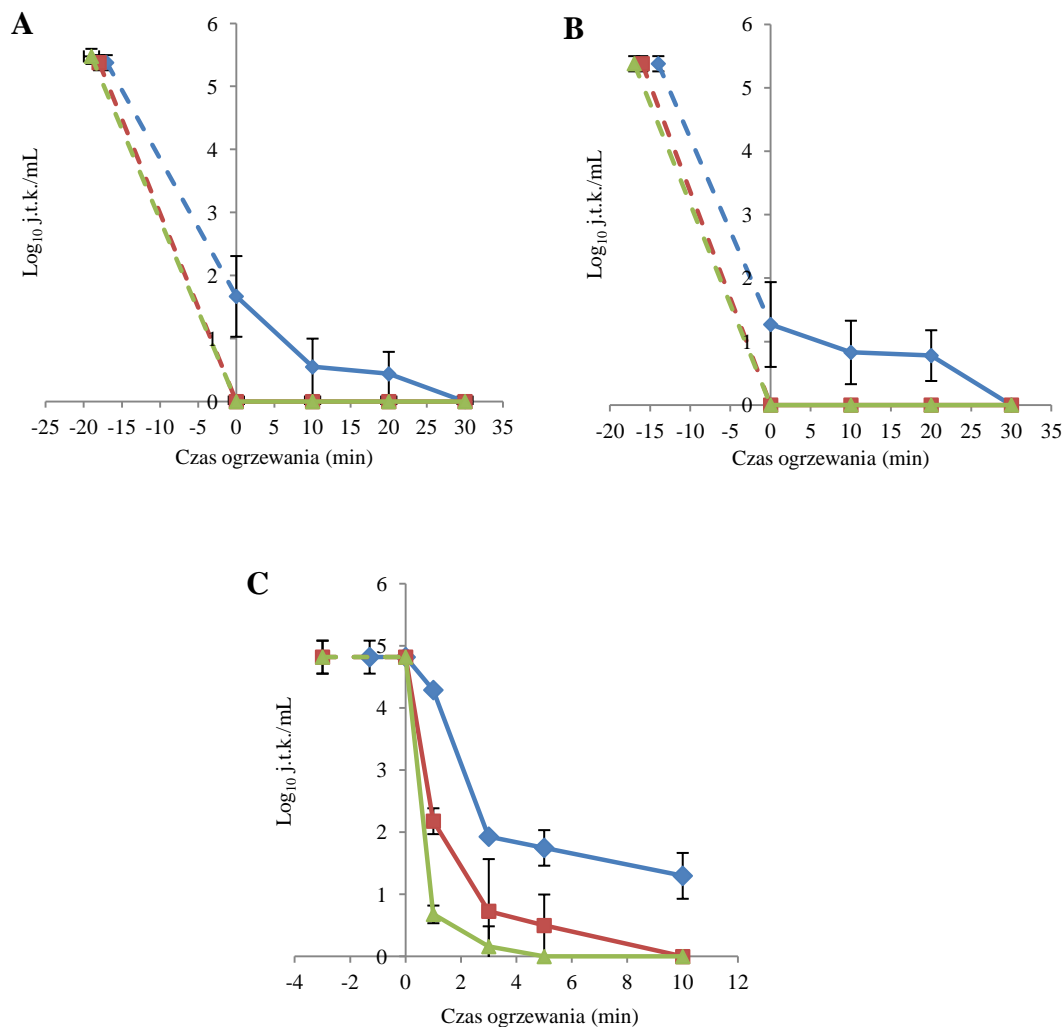


Rysunek 21. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii *E. durans* PCM 1957 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia  $\pm$  SD), (66°C -  $\blacklozenge$ , 70°C -  $\blacksquare$ , 72°C -  $\blacktriangle$ )

### *Enterococcus hirae* PCM 2559

Zaobserwowano, iż całkowitą inaktywację bakterii *E. hirae* 2559 zawieszonych w mleku w ilości 5 log<sub>10</sub> j.t.k./mL uzyskano w temp. 66°C podczas ogrzewania konwekcyjnego w wariancie z mieszaniem i bez mieszania próbki po 30 minutach prowadzenia procesu (całkowity czas procesu wynosił, odpowiednio, 44 i 47 minut). Podwyższenie temperatury ogrzewania do 70 i 72°C powodowało, iż bakterie *E. hirae* nie były wykrywane w 1 mL próby mleka już w czasie uzyskania zadanych temperatur w obu wariantach ogrzewania (Rys. 22A, 22B).

Z kolei ogrzewanie mikrofalowe próbki z zawieszonymi bakteriami *E. hirae* PCM 2559 w temp. 66°C przez 10 minut prowadziło tylko do obniżenia ich ilości o 3 log<sub>10</sub> j.t.k./mL. Natomiast w 70°C i 72°C uzyskano całkowitą inaktywację tych drobnoustrojów, odpowiednio, po 10 i 5 minutach ogrzewania (całkowity czas procesu wynosił, odpowiednio, 13 i 8 minut) (Rys. 22C).

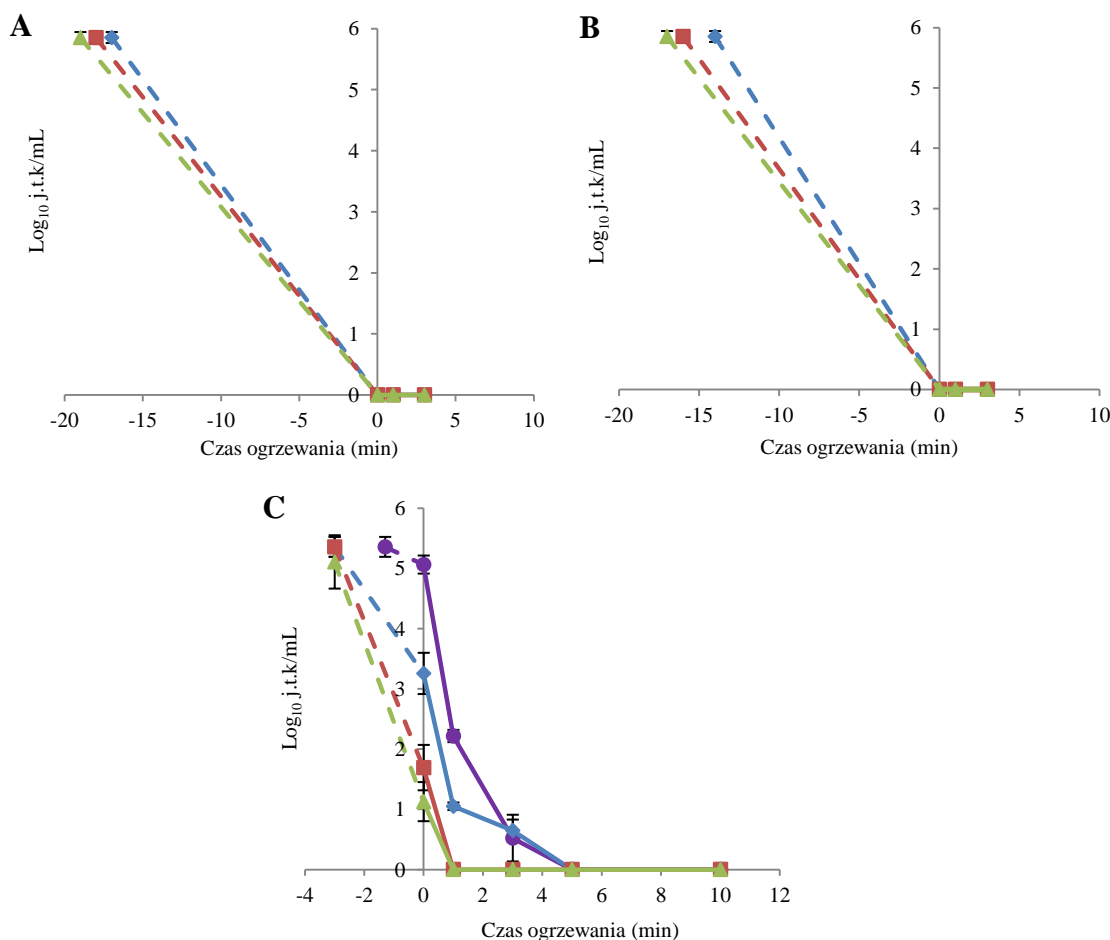


Rysunek 22. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii *E. hirae* PCM 2559 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia  $\pm$  SD), (66°C - ♦, 70°C - ■, 72°C - ▲).

#### ***Escherichia coli* K-12 i *Pseudomonas aeruginosa* PCM 499**

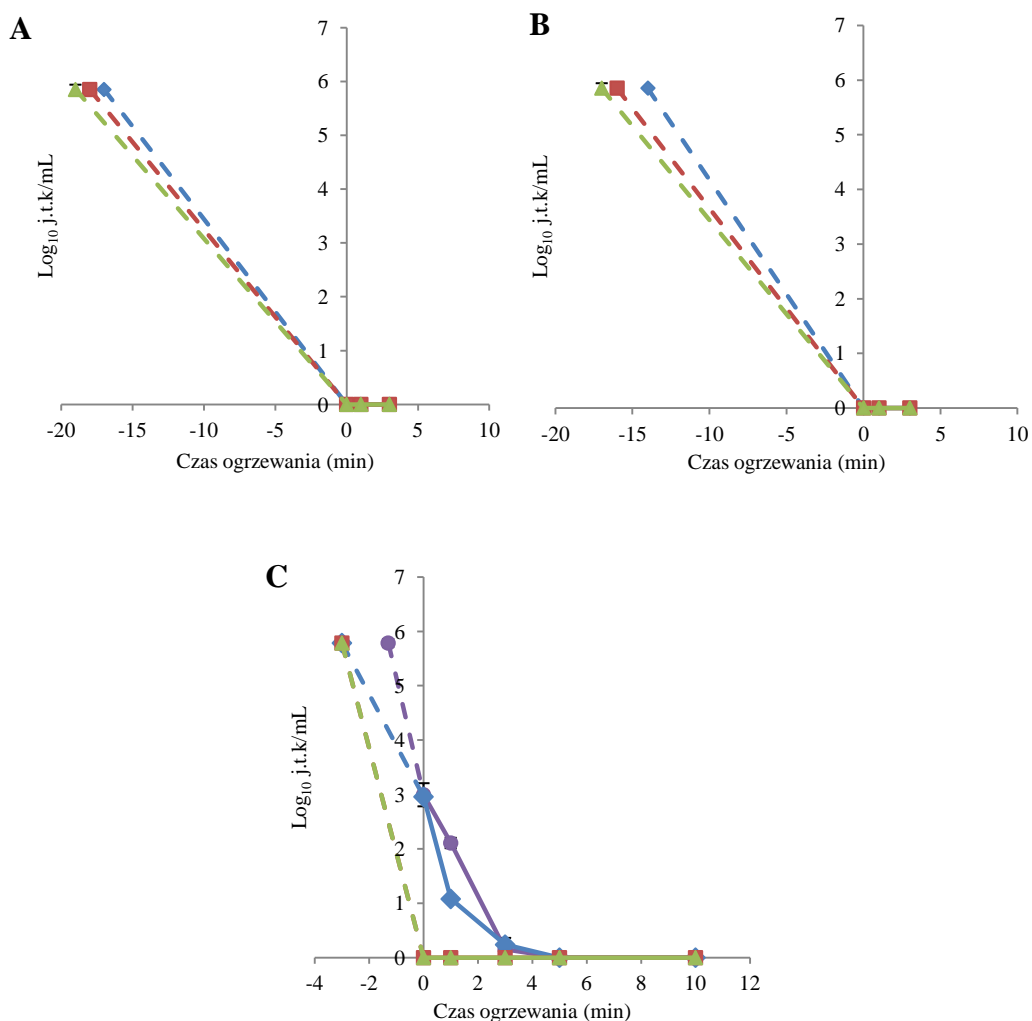
Pasteryzacja holder prowadzi do eliminacji *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* występujących w mleku kobicym w ilości około 5 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (Landers i in. 2010; Escuder-Vieco i in. 2018). W dostępnym piśmiennictwie nie ma natomiast danych o tym, czy taki efekt można uzyskać w krótszym czasie w wyższych temperaturach ogrzewania.

Wykazano, że bakterie *E. coli* K-12 i *P. aeruginosa* PCM 499 celowo wprowadzone do mleka UHT w ilości około 6 log<sub>10</sub> j.t.k./ml, inaktywowane były po ogrzewaniu metodą konwekcyjną bez mieszania próbki już w czasie uzyskania przez mleko temp. 66°C (17 minut) (Rys. 23A, 24A). Stosowanie mieszania podczas procesu pozwoliło na skrócenie czasu uzyskania zadanej temperatury do 14 minut, uzyskując równoważny efekt letalny (Rys. 23B, 24B).



Rysunek 23. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii *E. coli* K-12 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia  $\pm$  SD), (62,5°C -  $\bullet$ , 66°C -  $\blacklozenge$ , 70°C -  $\blacksquare$ , 72°C -  $\blacktriangle$ ).

Z kolei stosując ogrzewanie polem promieniowania mikrofalowego całkowitą inaktywację obu szczepów badanych bakterii zawieszonych w mleku UHT zaobserwowano po 5 minutach przetrzymywania prób w temp. 62,5°C (całkowity czas procesu wynosił 6,3 minut). Prowadzenie procesu w temp. 66°C powodowało, iż bakterie te były redukowane do poziomu wykrywalności w 1 ml mleka po 5 minutach ogrzewania. Dopiero podwyższenie temperatury procesu do 70°C i 72°C skracało czas, w którym następowała inaktywacja *E. coli* K-12 do 1 minuty (całkowity czas procesu wynosił 4 minuty). Żywe komórki *P. aeruginosa* PCM 499 nie były oznaczane w próbach mleka już w czasie uzyskania przez nie temperatury 70°C (Rys. 23C, 24C).



Rysunek 24. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii *P. aeruginosa* PCM 499 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia  $\pm$  SD), (62,5°C - ●, 66°C - ◆, 70°C - ■, 72°C - ▲).

## PODSUMOWANIE

Pasteryzacja holder (62,5°C; 30 minut) zaadoptowana została w BMK z przemysłu mleczarskiego. Wpływ tej metody, zarówno na mikroflorę, jak również składniki odżywcze oraz biologicznie aktywne mleka kobycego został obszernie opisany w dostępnym piśmiennictwie. Jak przedstawiono w części teoretycznej pracy, pasteryzacja holder inaktywuje wszystkie drobnoustroje vegetatywne obecne w mleku kobyceym, lecz również częściowo lub całkowicie degraduje składniki biologicznie aktywne.

Dla głównych beneficjentów BMK ważne jest nie tylko bezpieczeństwo mikrobiologiczne przyjmowanego pokarmu, lecz również jego wartość odżywcza oraz aktywność biologiczna.

W ramach pracy zastosowano, jak dotąd nieopisywane w literaturze, modyfikacje wartości czasu oraz temperatury ogrzewania konwekcyjnego, jak również inny sposób generowania temperatury (polem promieniowania mikrofalowym) w celu określenia czy mogą one stanowić alternatywę dla stosowanej w BMK pasteryzacji holder.

Analizy wykonane w układzie modelowym wykazały w przypadku ogrzewania konwekcyjnego, iż w czasie potrzebnym do uzyskania temperatury 66°C bakterie *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* oraz

*S. epidermidis* (termowrażliwe) ulegały całkowitej inaktywacji bez względu na to czy próbka podczas procesu była mieszana, czy nie. W przypadku termoodpornych bakterii z rodzaju *Enterococcus* sp. zawieszonych w mleku UHT, aby uzyskać całkowitą inaktywację tych mikroorganizmów należało podwyższyć temperaturę prowadzenia procesu ogrzewania. Inaktywacja *E. faecalis* PCM 896, charakteryzujących się największą termoodpornością zachodziła po 10 minutach ogrzewania w temperaturze 70°C.

W przypadku analizowanych w doświadczeniu drobnoustrojów termowrażliwych mieszanie próbki podczas ogrzewania pozwoliło na skrócenie czasu prowadzenia procesu, w którym następuje ich całkowita inaktywacja. Wbrew założeniom w przypadku drobnoustrojów termoodpornych stosowanie mieszania próbek w trakcie procesu wydłużało czas ogrzewania potrzebny do uzyskania pożądanej czystości mikrobiologicznej badanych prób. Zjawisko to wynika przypuszczalnie z ochronnej w stosunku do mikroorganizmów funkcji tłuszczu mleka. Proces homogenizacji, któremu poddawane jest mleko UHT prowadzi do zmniejszenia powierzchni kuleczek tłuszczu, co prowadzi do zwiększenia łącznej powierzchni frakcji tłuszczowej. Można założyć, że mieszanie w trakcie procesu ułatwia przyleganie lipidów mleka do komórki bakteryjnej, tworząc tzw. osłonkę. Dlatego też w kolejnym etapie badań określano wpływ ogrzewania konwekcyjnego na mikroflorę występującą w mleku kobiecym w wariancie bez mieszania.

Wpływ ogrzewania mikrofalowego na mikroorganizmy występujące w żywności został fragmentarycznie opisany w dostępnym piśmiennictwie. Badacze opisując wyniki swoich analiz posługują się głównie mocą urządzenia oraz czasem jego działania, nie mając wpływu na stabilizację temperatury procesu (Gedikli i in. 2008). W przeprowadzonych w ramach pracy badaniach problem ten rozwiązano poprzez wprowadzenie mieszania oraz stałą kontrolę temperatury badanego materiału biologicznego w trakcie trwania procesu (Rys.4). Wykorzystanie tego rozwiązania technologicznego pozwoliło na uniknięcie przegrzania analizowanego materiału.

Wykazano, iż ogrzewanie mikrofalowe pozwala na znaczne skrócenie całkowitego czasu procesu, w którym uzyskuje się efekt pasteryzacji porównywalny z ogrzewaniem konwekcyjnym, co przypuszczalnie zmniejszy straty w stężeniu i aktywności składników bioaktywnych mleka. Stwierdzono, iż działanie temp. 62,5°C generowanej polem promieniowania mikrofalowego przez 5 minut prowadzi do inaktywacji badanych bakterii porównywalnie do pasteryzacji holder. W przypadku termoodpornych mikroorganizmów z rodzaju *Enterococcus* sp. bezpieczeństwo mikrobiologiczne analizowanej próby uzyskuje się w takich samych parametrach czasu i temperatury jak podczas ogrzewania konwekcyjnego dla tego samego rodzaju bakterii, tj. 70°C, 10 minut, mimo znacznego skrócenia czasu w którym uzyskiwana była temperatura 70°C. Natomiast termoodporny szczep *E. faecalis* PCM 896 nie był inaktywowany nawet po ogrzewaniu w temp. 72°C przez 10 minut.

Wyniki powyższych badań określiły jak wybrane parametry czasu oraz temperatury ogrzewania konwekcyjnego i mikrofalowego wpływają na badane drobnoustroje wprowadzone do mleka UHT pojedynczo. Stanowiło to podstawę do zaprojektowania dalszego etapu badań dotyczących powyższych metod ogrzewania na naturalną mikroflorę mleka kobiecego.

## 9.2 Wpływ wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze (193 MPa, -20°C) na przeżywalność wybranych drobnoustrojów Gram dodatnich oraz Gram ujemnych celowo wprowadzonych do mleka krowiego UHT (badania modelowe)

Koncepcja nowoczesnych technik przedłużających trwałość żywności, alternatywnych do obecnie stosowanych metod opiera się na dążeniu do jej minimalnego przetwarzania. Metoda HPP jest obecnie najszerszej analizowanym nietermicznym procesem wykorzystywanym do utrwalania mleka różnych ssaków. Wpływ wysokiego ciśnienia na składniki, zarówno odżywcze, jak również biologicznie aktywne oraz mikroflorę mleka kobycego zostało szeroko opisane w literaturze.

Dostępne prace dotyczą stosowania ciśnień w zakresie 200-700 MPa w temperaturze w zakresie 20-50°C. Viazis (2008) wykazał, iż działanie ciśnienia 400 MPa w temperaturze 21-31°C przez czas 30 min powoduje iż żywe bakterie *S. aureus* ATCC6538 nie są wykrywalne w mleku kobyecym przy początkowym zanieczyszczeniu wynoszącym 8 log<sub>10</sub> j.t.k./mL. Natomiast Windyga i in. (2015) uzyskali równoważny efekt letalny dla tego samego szczepu bakterii wprowadzonego do mleka kobycego w ilości 8 log<sub>10</sub> j.t.k./mL w czasie o połowę krótszym, tj. 15 minutach lecz konieczne było podwyższenie ciśnienia do 500 MPa oraz zwiększenia temperatury do 50°C.

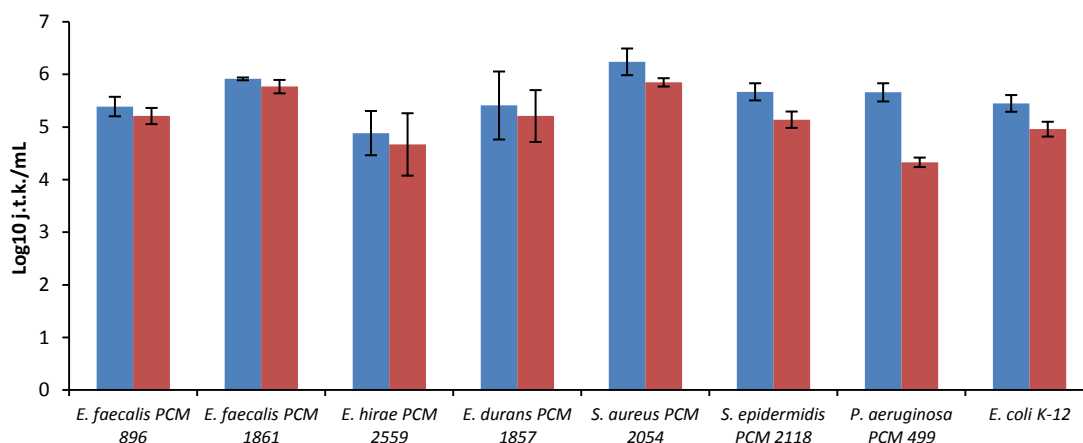
Opisane zostały również badania, w których proces ciśnieniowania prowadzony był w niskich temperaturach (HPLT- High Pressure Low Temperature). Dotyczą one głównie wpływu takiego procesu na zmiany w strukturze białek roślinnych oraz mleka krowiego (Barry i in. 1998; Koch i in. 1996). Dane dotyczące wpływu tego rodzaju ciśnieniowania w niskich temperaturach na mikroorganizmy są fragmentaryczne. Wykazano, iż działanie ciśnienia 300 MPa w temperaturze -20°C nie jest wystarczające do całkowitej inaktywacji bakterii *Listeria innocua* zawieszonych w roztworze soli fizjologicznej w ilości 9 log<sub>10</sub> j.t.k./ml oraz ciśnienia 250 MPa w temperaturze -25°C do całkowitej inaktywacji *Bacillus subtilis* zawieszonych w buforze ACES w ilości 7-8 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (Luscher i in. 2004; Benet i in. 2005).

Badania prowadzone przez Malinowską-Pańczyk i in. (2004) wykazały, iż działanie ciśnienia 193 MPa w temperaturze -20°C powoduje redukcję o 3,5 log<sub>10</sub> j.t.k./mL bakterii *Escherichia coli* K-12 oraz całkowitą inaktywację *Pseudomonas fluorescens* oraz *Thermus thermophilus* zawieszonych w buforze fosforanowym w ilości 8-9 log<sub>10</sub> j.t.k./mL. Uzyskane wyniki badań pozytywnie zaopiniowały powyższą metodę jako potencjalny proces mogący stanowić alternatywę dla stosowanej w BMK pasteryzacji LTLT.

W niniejszej pracy wykazano, iż działanie ciśnienia 193 MPa w temperaturze -20°C powoduje nieznaczne obniżenie się ilości zawieszonych w mleku UHT mikroorganizmów. Największą odporność na stosowane warunki procesu wykazywały bakterie *E. faecalis* PCM 896. Zaobserwowano obniżenie ich ilości jedynie o 0,15 log<sub>10</sub> j.t.k./mL. Natomiast najmniejszą odporność na działanie ciśnienia wykazywały bakterie *P. aeruginosa* PCM 499, gdyż jego liczba zmniejszyła się o 1,3 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (Rys. 25).

Uzyskane wyniki analiz sugerują odrzucenie stosowanych parametrów procesu ciśnieniowania w dalszych badaniach ze względu na brak możliwości zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego utrwalanego materiału biologicznego.





Rysunek 25. Wpływ wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze na przeżywalność bakterii zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia  $\pm$  SD), (■ - próba nieciśnieniowana, ■ - próba poddana procesowi ciśnieniowanemu)

### 9.3 Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowaniem mikrofalowego na przeżywalność drobnoustrojów występujących w mleku ludzkim

Celem tego etapu badań było określenie wpływu ogrzewania konwekcyjnego oraz mikrofalowego w wybranych na podstawie badań modelowych wartościach czasu i temperatury na przeżywalność mikroflory mleka kobycego. Ze względu na ograniczony dostęp do materiału biologicznego analizy przeprowadzone zostały przy wykorzystaniu różnych partii mleka kobycego. Objętości próbek mleka, czas uzyskiwania zadanych temperatur podczas ogrzewania konwekcyjnego i mikrofalowego były takie same jak w przypadku badań modelowych.

Procedura pozyskiwania i przechowywania próbek do badań była zgodna z wytycznymi dotyczącymi mleka przed pasteryzacją stosowaną w BMK (Wesołowska 2017). Badanie przeprowadzono na mleku kobycego pochodzącym z 17 partii. Partię mleka stanowiło świeże mleko uzyskane od 1 dawczyni. Badany materiał biologiczny odciągany był przez matkę w czasie 1 doby w warunkach zarówno domowych jak i szpitalnych. Maksymalna dopuszczalna OLD w mleku kobycego, które może być przyjęte do BMK, nie powinna być większa niż  $5 \log_{10}$  j.t.k./mL, liczba gronkowców koagulazododatnich  $4 \log_{10}$  j.t.k./mL, natomiast bakterii z grupy coli nie większa niż  $3 \log_{10}$  j.t.k./mL (Rożek i in. 2017). Nie dłużej niż 24 godziny od uzyskania mleko poddawane było procesowi ogrzewania, a bezpośrednio po nim analizie mikrobiologicznej. Zawartość drobnoustrojów w świeżym mleku oznaczana była równoległe z mlekiem po pasteryzacji.

W analizowanym mleku świeżym oraz ogrzewanym oznaczono ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD), liczbę bakterii z grupy coli oraz gronkowców koagulazododatnich. Ilość tych drobnoustrojów jest określana w mleku dawczyń przed przyjęciem do BMK, oraz po procesie pasteryzacji. Określono również przeżywalność bakterii kwasu mlekowego czyli grupy mikroorganizmów wpływających korzystnie na organizm dziecka, oraz bakterii z rodzaju *Streptococcus* sp. i *Enterococcus* sp, ze względu na możliwość występowania w tej grupie bakterii szczepów wywołujących infekcje.

Liczebność wszystkich badanych grup drobnoustrojów w partiach mleka kobycego mieściła się w przedziale  $2-7 \log_{10}$  j.t.k./mL. Wysoki poziom początkowego zanieczyszczenia mikrobiologicznego

mleka kobycego, OLD powyżej  $5 \log_{10}$  j.t.k./mL prawdopodobnie spowodowany był niezachowaniem odpowiednich warunków higienicznych podczas odciągania i przechowywania pokarmu

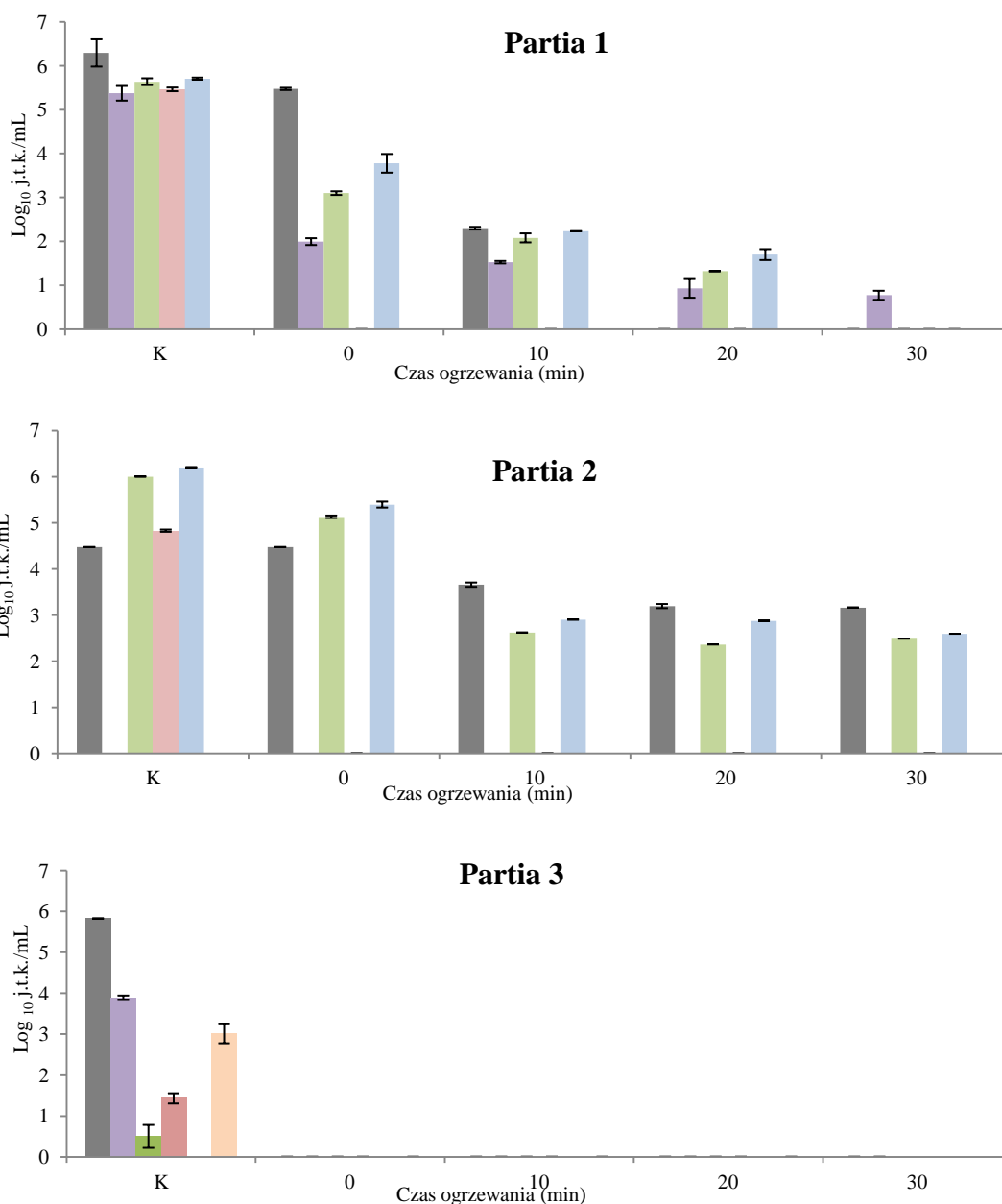
Na potrzeby badań wpływ zadanych temperatur i czasu ich działania ogrzewania konwekcyjnego i mikrofalowego na przeżywalność drobnoustrojów określono również w partiach mleka, w których ilość drobnoustrojów znacznie przekraczała dopuszczalne normy dla mleka przed przyjęciem do BMK.

### 9.3.1 Ogrzewanie w temperaturze $62,5^{\circ}\text{C}$

W mleku kobiecym pochodzącym z 1 partii OLD wynosiła około  $6 \log_{10}$  j.t.k./mL, a liczebność populacji każdej z pozostałych analizowanych grup drobnoustrojów około  $5 \log_{10}$  j.t.k./mL (Rys. 26/1). Ogrzewanie konwekcyjne mleka w temp.  $62,5^{\circ}\text{C}$  powodowało spadek liczby bakterii kwasu mlekowego, bakterii z rodzaju *Enterococcus* sp. i *Streptococcus* sp. odpowiednio o 3, 2, oraz  $1,5 \log_{10}$  j.t.k./mL już w czasie potrzebnym do uzyskania zadanej temperatury. Po 30 minutowym ogrzewaniu w  $62,5^{\circ}\text{C}$  (parametry pasteryzacji holder) w badanym mleku obecne były jedynie bakterie kwasu mlekowego w ilości około  $10 \log_{10}$  j.t.k./mL, co odpowiada standardom BMK dotyczącym jakości mikrobiologicznej mleka po procesie pasteryzacji.

W mleku z 2 partii OLD wynosiła około  $4 \log_{10}$  j.t.k./mL. Z kolei liczebność bakterii z grupy coli oznaczono w ilości około  $5 \log_{10}$  j.t.k./mL, a bakterii z rodzaju *Enterococcus* sp. i *Streptococcus* sp.  $6 \log_{10}$  j.t.k./mL. Obecne w tej partii mleka ludzkiego bakterie z grupy coli były całkowicie inaktywowane już w czasie uzyskania temperatury  $62,5^{\circ}\text{C}$  podczas ogrzewania konwekcyjnego. Przechowywanie prób mleka w tej temperaturze przez 10 minut prowadziło do redukcji liczby OLD o  $1 \log_{10}$  j.t.k./mL, natomiast bakterii z rodzaju *Enterococcus* sp. i *Streptococcus* sp. o  $3,5 \log_{10}$  j.t.k./mL. Wydłużenie czasu procesu nie powodowało dalszego zmniejszania liczby drobnoustrojów (Rys. 26/2). Mimo niższej niż dopuszczalna w bankach mleka kobycego ilości OLD w mleku świeżym ( $4 \log_{10}$  j.t.k./mL) nie uzyskano pożądanego efektu pasteryzacji. Może to świadczyć o obecności w mleku mikroorganizmów termoodpornych (np. z rodzaju *Enterococcus* sp.), do których inaktywacji zastosowane parametry ogrzewania ( $62,5^{\circ}\text{C}$ , 30 minut) nie są wystarczające.

W mleku z kolejnej partii OLD wynosiła około  $6 \log_{10}$  j.t.k./mL, ilość bakterii kwasu mlekowego  $4 \log_{10}$  j.t.k./mL, natomiast pozostałych bakterii nie więcej niż  $3 \log_{10}$  j.t.k./mL (Rys. 26/3). Pomimo przekroczenia ilości OLD całkowitą inaktywację analizowanych mikroorganizmów zaobserwowano już w czasie uzyskania temperatury  $62,5^{\circ}\text{C}$  przez próbę mleka.



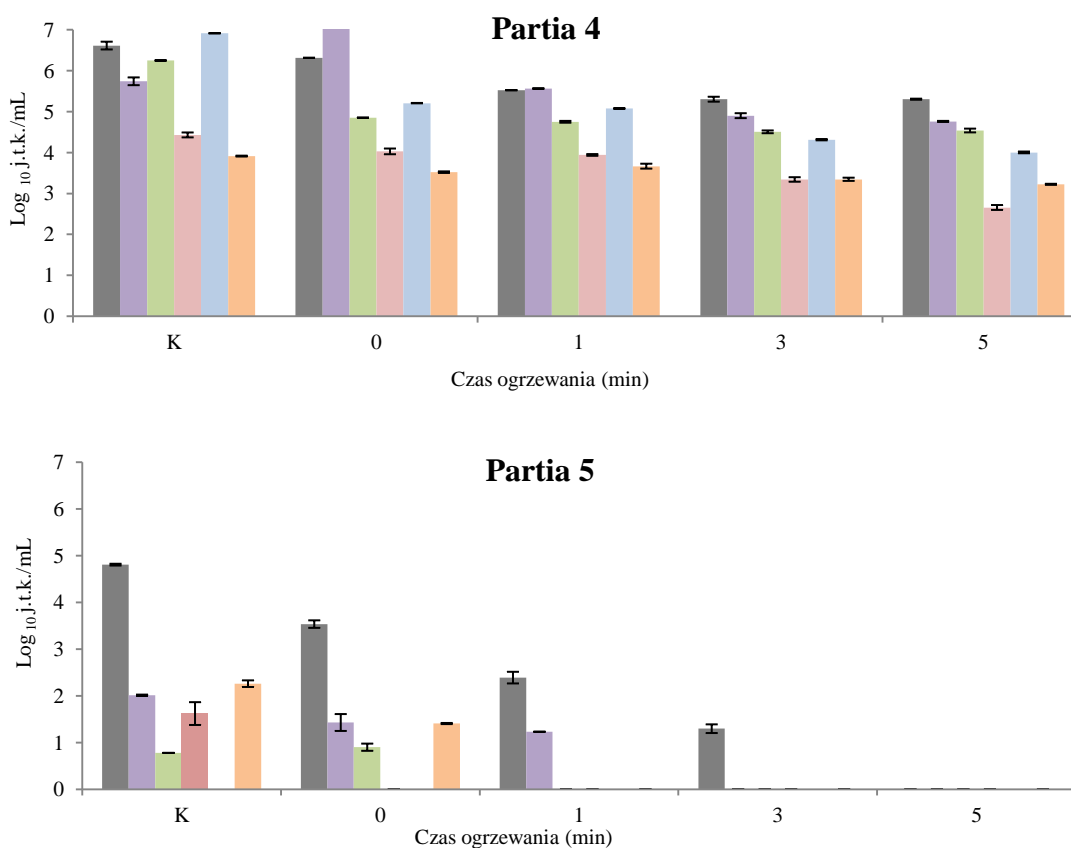
Rysunek 26. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego w temp. 62,5°C na przeżywalność OLD [■], bakterii kwasu mlekowego [■], z rodzaju *Enterococcus sp.* [■], z grupy coli [■], z rodzaju *Streptococcus sp.* [■] oraz gronkowców koagulazo-dodatnich [■], K- kontrola (mleko świeże), 0 – czas dojścia do zadanej temperatury (18 minut)

Wpływ ogrzewania mikrofalowego w 62,5°C na mikroflorę występującą w mleku ludzkim oznaczony został w mleku z partii o nr od 4 do 7. W mleku kobiecym pochodzącym z partii 4 OLD oraz liczebność populacji pozostałych grup mikroorganizmów znacznie przekraczała dopuszczalne normy ustalone dla mleka przyjmowanego do BMK i wynosiła nawet 7 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (Rys. 27/4). Ogrzewanie mikrofalowe w temp. 62,5°C przez 5 minut prowadziło jedynie do obniżenia ilości badanych mikroorganizmów, OLD o 1,3 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, natomiast pozostałych analizowanych grup drobnoustrojów w zakresie od 0,7 do 2,9 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (Rys. 27/4).

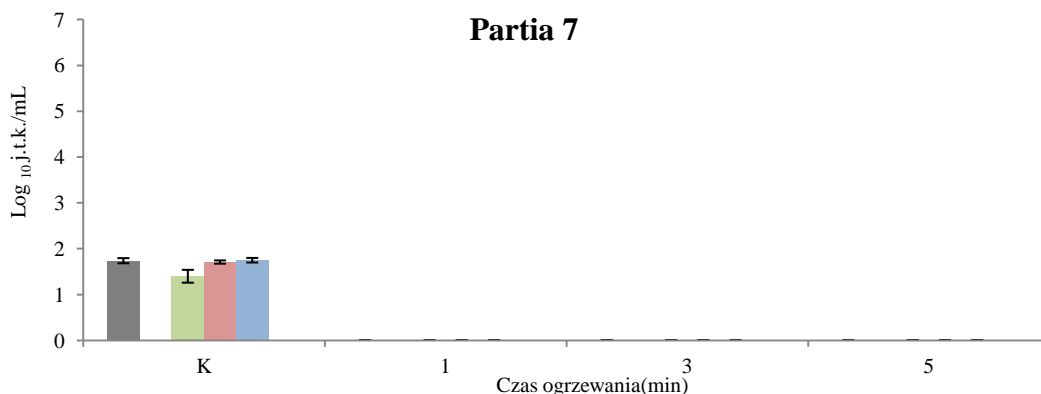
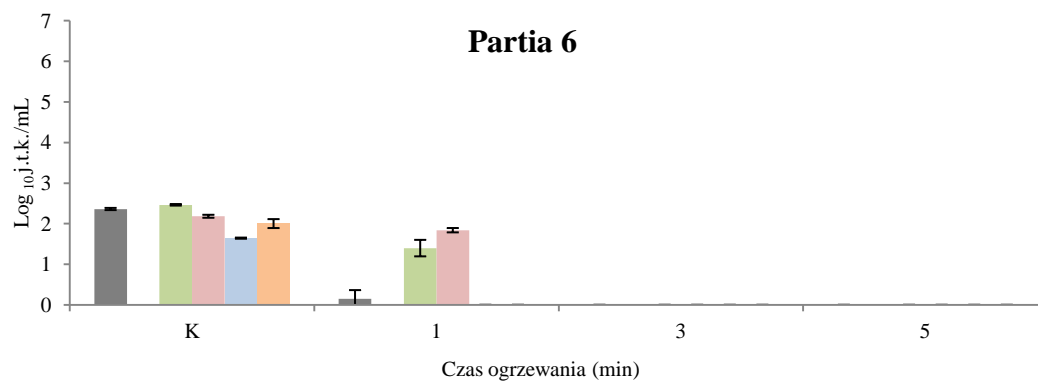
Wyjściowa OLD w mleku kobiecym z partii 5 wynosiła 4,8 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, natomiast liczebność bakterii kwasu mlekowego, z grupy coli i gronkowców koagulazo-dodatnich 2 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, w tym

bakterii z rodzaju *Enterococcus* sp. około 10 j.t.k./mL. Ogrzewanie mleka polem promieniowania mikrofalowego przez 3 minuty w temp. 62,5°C prowadziło do obniżenia OLD do poziomu 1,3 log<sub>10</sub> j.t.k./mL oraz inaktywacji pozostałych mikroorganizmów. Wydłużenie czasu działania powyższej temperatury do 5 minut powodowało, iż w badanym mleku nie były oznaczane żywe komórki bakterii (Rys. 27/5).

W przypadku gdy wyjściowa ilość OLD oraz pozostałych oznaczanych w mleku ludzkim bakterii nie przekracza 3log<sub>10</sub> j.t.k./mL redukcja liczby badanych mikroorganizmów do poziomu niewykrywalności w 1 mL mleka zachodziła już po 3 minutach ogrzewania w temperaturze 62,5°C (Rys. 27/6). Gdy początkowa liczba drobnoustrojów wynosiła mniej niż 2 log<sub>10</sub> j.t.k./mL jak miało to miejsce w parti nr 7 efekt pasteryzacji osiągnięto już po 1 minucie ogrzewania (Rys. 27/7).



Rysunek 27. Wpływ ogrzewania mikrofalowego w temp. 62,5°C na przeżywalność OLD [■], bakterii kwasu mlekowego [■], z rodzaju *Enterococcus* sp. [■], z grupy coli [■], z rodzaju *Streptococcus* sp. [■] oraz gronkowców koagulazo-dodatnich [■], K- kontrola (mleko świeże), 0 – czas dojścia do zadanej temperatury (1,3 minuty).



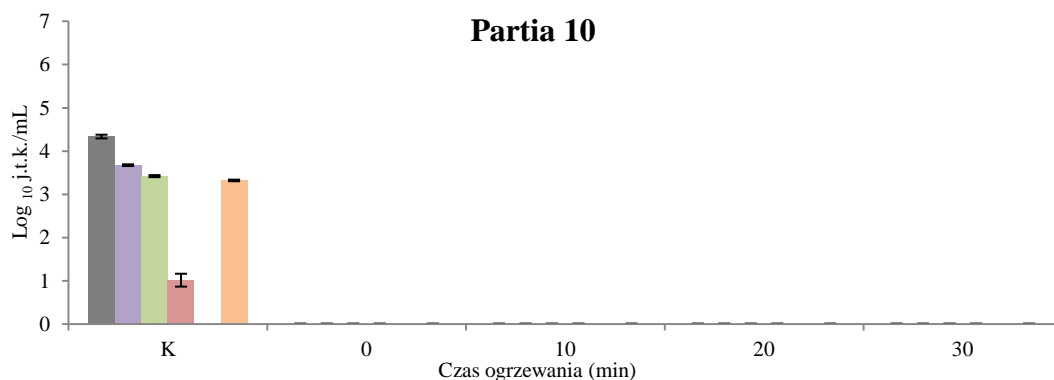
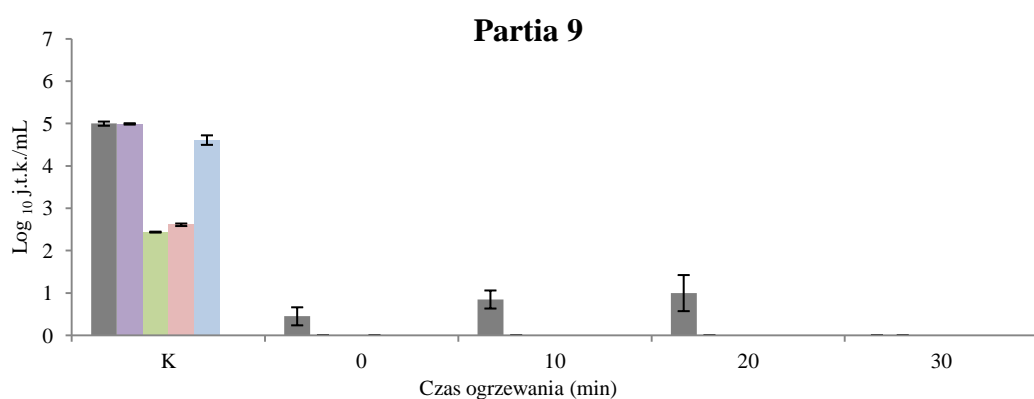
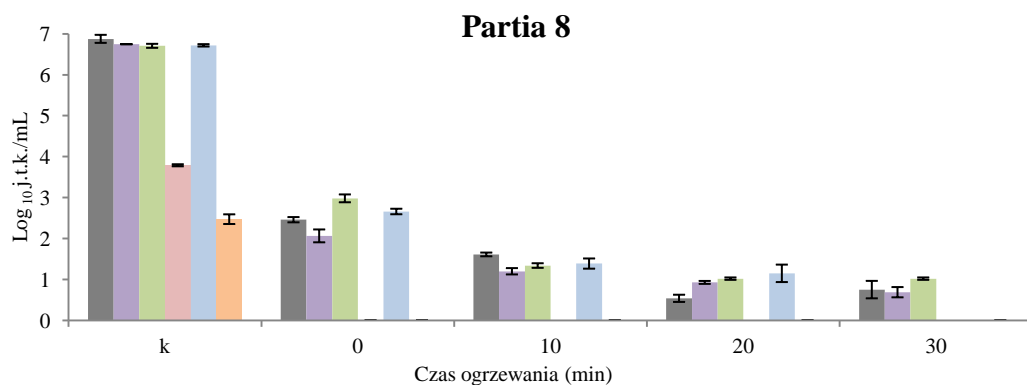
CD. Rysunek 27. Wpływ ogrzewania mikrofalowego w temp. 62,5°C na przeżywalność OLD [■], bakterii kwasu mlekowego [■], z rodzaju *Enterococcus sp.* [■], z grupy coli [■], z rodzaju *Streptococcus sp.* [■] oraz gronkowców koagulazo-dodatnich [■], K- kontrola (mleko świeże), 0 – czas dojścia do zadanej temperatury (1,3 minuty)

### 9.3.2 Ogrzewanie w temperaturze 66°C

W mleku kobiecym pochodzącym z partii nr 8 gdzie wyjściowa OLD, liczba bakterii kwasu mlekowego, bakterii z rodzaju *Enterococcus sp.* oraz bakterii z rodzaju *Streptococcus sp.* wynosiła około 7 log<sub>10</sub> j.t.k./mL ogrzewanie konwekcyjne mleka w temp. 66°C prowadziło do obniżenia liczby wszystkich badanych mikroorganizmów o około 4,7 log<sub>10</sub> j.t.k./mL już w czasie uzyskania zadanej temperatury. Wydłużenie czasu procesu powodowało dalsze obniżanie zawartości bakterii. Jednak nie zaobserwowano całkowitej inaktywacji drobnoustrojów nawet po maksymalnym czasie (30 minut) działania temperatury 66°C (Rys. 28/8).

Gdy ilość OLD, bakterii kwasu mlekowego, bakterii z rodzaju *Enterococcus sp.* oraz *Streptococcus sp.* w mleku świeżym wynosiła około 5 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (mleko z partii nr 9), już w czasie uzyskania temp. 66°C oznaczono OLD w ilości 10 j.t.k./ml, czyli poziomie akceptowanym przez BMK po procesie pasteryzacji (Rys. 28/9).

W przypadku gdy początkowa OLD wynosiła 4,5 log<sub>10</sub> j.t.k./ml, a zawartość pozostałych oznaczanych w mleku kobiecym drobnoustrojów nie przekraczała 4 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, całkowitą inaktywacją mikroorganizmów następowała już w czasie uzyskiwania przez ogrzewane mleko temp. 66°C (Rys. 28/10).



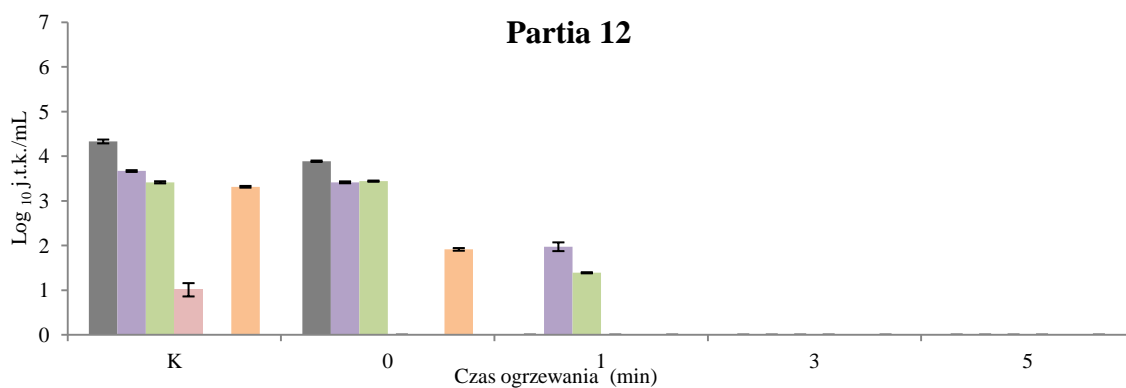
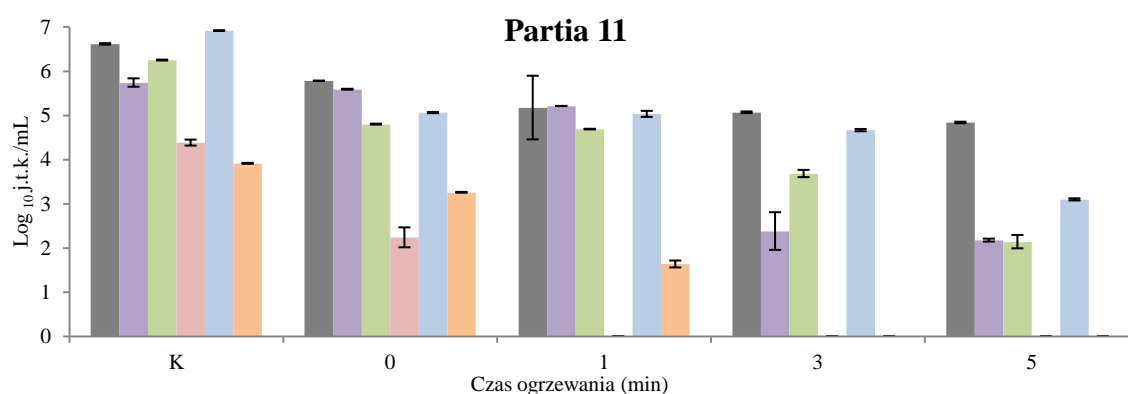
Rysunek 28. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego w temp. 66°C na przeżywalność OLD (■), bakterii kwasu mlekowego (■), z rodzaju *Enterococcus sp.* (■), z grupy coli (■), z rodzaju *Streptococcus sp.* (■) oraz gronkowców koagulazo-dodatnich (■), K- kontrola (mleko świeże), 0 – czas dojścia do zadanej temperatury (17 minut).

W mleku kobiecym pochodzącym z partii nr 11 ogrzewanym polem promieniowania mikrofalowego w temp. 66°C ilość OLD wynosiła 6,6 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, bakterii kwasu mlekowego 5,7 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, bakterii z rodzaju *Enterococcus sp.* 6,2 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, bakterii z rodzaju *Streptococcus sp.* 6,9 log<sub>10</sub> j.t.k./mL bakterii z grupy coli 4,4 log<sub>10</sub> j.t.k./mL oraz gronkowców koagulazo-dodatnich 4 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (Rys. 29/11). Stosowana temperatura procesu prowadziła do całkowitej inaktywacji bakterii z grupy coli oraz gronkowców koagulazo-dodatnich w mleku odpowiednio po 1 i 3 minutach ogrzewania. W przypadku pozostałych grup drobnoustrojów ich liczba uległa jedynie obniżeniu,

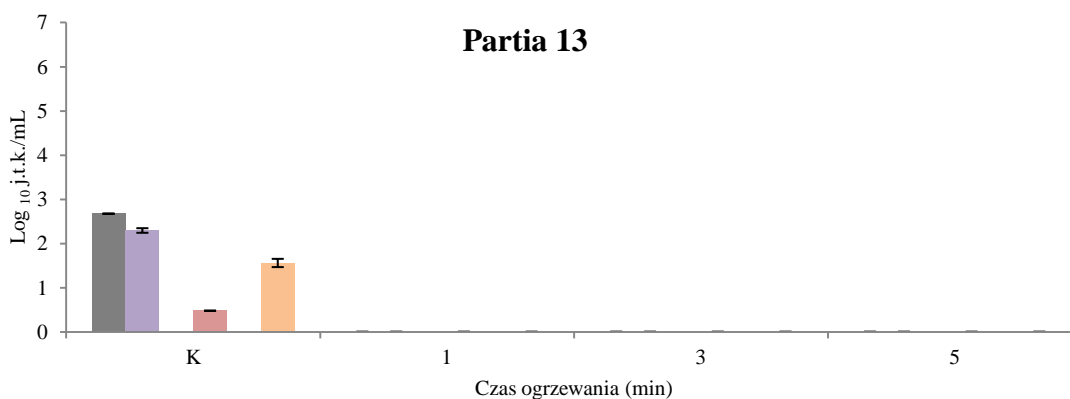
maksymalnie o 4 log<sub>10</sub> j.t.k./mL po 5 minutowym ogrzewaniu. W przypadku OLD zaobserwowano zmniejszenie liczby tylko 2 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (Rys. 29/11).

W mleku pochodzącym z kolejnej partii ilość OLD oznaczana była na poziomie akceptowanym przez BMK w mleku przed procesem pasteryzacji i wynosiła 4,3 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, natomiast pozostałe analizowane drobnoustroje wykrywane były na poziomie około 3,5 log<sub>10</sub> j.t.k./mL. Wykazano, że bakterie te nie były wykrywane w próbce mleka po ogrzewaniu polem promieniowania mikrofalowego w temp. 66°C przez 3 minuty (Rys. 29/12).

W ostatniej próbce mleka poddanej ogrzewaniu polem promieniowania mikrofalowego liczebność bakterii wyniosła nie więcej niż 3 log<sub>10</sub> j.t.k./mL. Całkowita inaktywacja drobnoustrojów obserwowana była już po 1 minucie ogrzewania (Rys. 29/13).



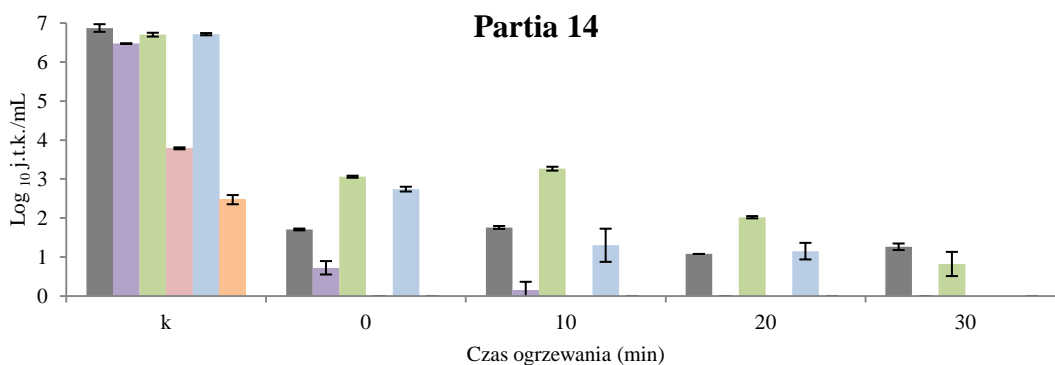
Rysunek 29. Wpływ ogrzewania mikrofalowego w temp. 66°C na przeżywalność OLD [■], bakterii kwasu mlekowego [■], z rodzaju *Enterococcus sp.* [■], z grupy coli [■], z rodzaju *Streptococcus sp.* [■] oraz gronkowców koagulazo-dodatnich [■], K- kontrola (mleko świeże), 0 – czas dojścia do zadanej temperatury (3 minuty).



CD. Rysunek 29. Wpływ ogrzewania mikrofalowego w temp. 66°C na przeżywalność OLD [■], bakterii kwasu mlekowego [■], z rodzaju *Enterococcus sp.* [■], z grupy coli [■], z rodzaju *Streptococcus sp.* [■] oraz gronkowców koagulazo-dodatnich [■], K- kontrola (mleko świeże), 0 – czas dojścia do zadanej temperatury (3 minuty).

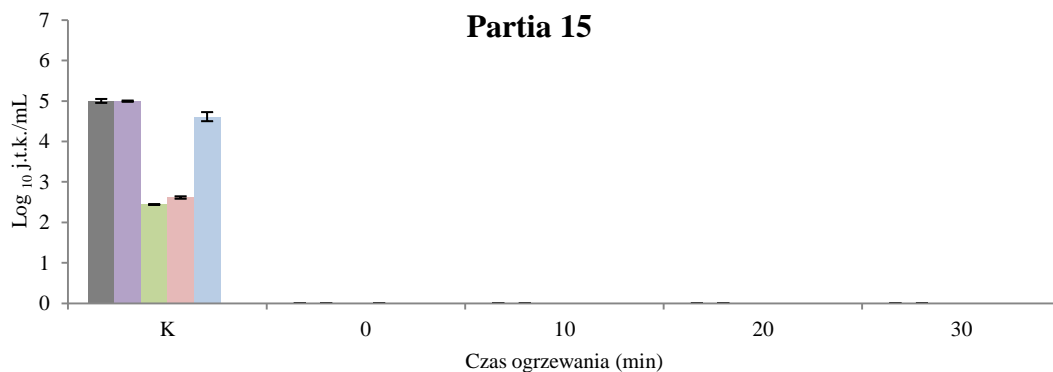
### 9.3.3 Ogrzewanie w temperaturze 70°C

Poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego mleka kobecego pochodzącego z partii 14 poddanego ogrzewaniu konwekcyjnemu w temp. 70°C wynosił około 7 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, z wyjątkiem bakterii z grupy coli i gronkowców koagulazo-dodatnich, których ilość wynosiła odpowiednio 3,8 i 2,5 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (Rys. 30/14). Wykazano, iż 30 minutowe ogrzewanie mleka w temperaturze 70°C nie było wystarczające do uzyskania pełnego efektu pasteryzacji. Po tym czasie OLD i liczba bakterii z rodzaju *Enterococcus sp.* w mleku wynosiła około 1 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (Rys. 30/14). Gdy ich ilość w mleku świeżym wynosiła około 5 log<sub>10</sub> j.t.k./mL całkowita redukcję liczby badanych mikroorganizmów zaobserwowano już w czasie uzyskania temp. 70°C (Rys. 30/15).



Rysunek 30. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego w temp. 70°C na przeżywalność OLD [■], bakterii kwasu mlekowego [■], z rodzaju *Enterococcus sp.* [■], z grupy coli [■], z rodzaju *Streptococcus sp.* [■] oraz gronkowców koagulazo-dodatnich [■], K- kontrola (mleko świeże), 0 – czas dojścia do zadanej temperatury (18 minut).

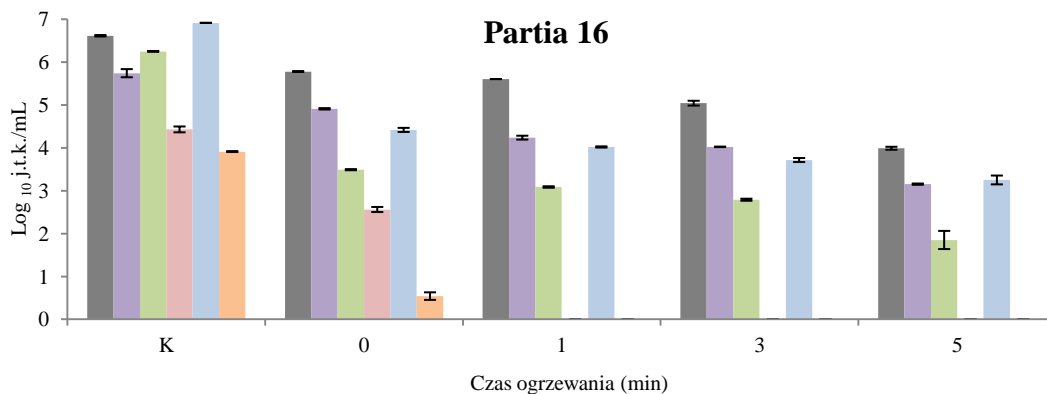




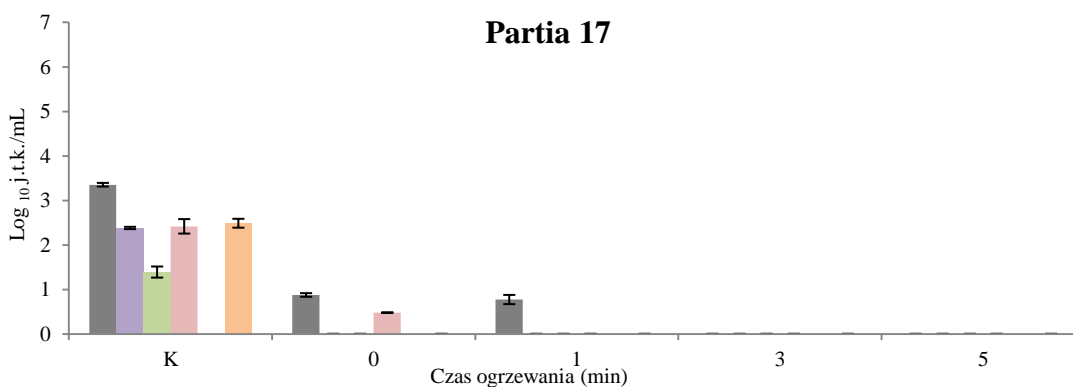
CD. Rysunek. 30. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego w temp. 70°C na przeżywalność OLD [■], bakterii kwasu mlekowego [■], z rodzaju *Enterococcus sp.* [■], z grupy coli [■], z rodzaju *Streptococcus sp.* [■] oraz gronkowców koagulazo-dodatnich [■], K- kontrola (mleko świeże), 0 – czas dojścia do zadanej temperatury (18 minut).

Ogrzewanie mikrofalowe w temp. 70°C nie zwiększało istotnie poziomu inaktywacji badanych mikroorganizmów w porównaniu z ogrzewaniem tą samą metodą w temp. 66°C, gdy ilość drobnoustrojów w mleku świeżym wynosiła 6-7 log<sub>10</sub> j.t.k./mL. Nawet 5 minutowe ogrzewanie mleka w tej temperaturze nie pozwalało na uzyskanie pełnego efektu pasteryzacji. OLD, liczba bakterii kwasu mlekowego zmniejszyła się o 2,6 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, natomiast bakterii z rodzaju *Enterococcus sp.* i *Streptococcus sp.* odpowiednio o 4,4 oraz 3,7 log<sub>10</sub> j.t.k./mL (Rys. 31/16).

Gdy liczebność populacji bakterii w próbce wynosiła 3-4 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, żywe komórki drobnoustrojów nie były wykrywane w mleku już po 3 minutach ogrzewania próbki polem promieniowania mikrofalowego w temp. 70°C (Rys. 31/17).



Rysunek 31. Wpływ ogrzewania mikrofalowego w temp. 70°C na przeżywalność OLD [■], bakterii kwasu mlekowego [■], z rodzaju *Enterococcus sp.* [■], z grupy coli [■], z rodzaju *Streptococcus sp.* [■] oraz gronkowców koagulazo-dodatnich [■], K- kontrola (mleko świeże), 0 – czas dojścia do zadanej temperatury (3 minuty).



Rysunek. 31. Wpływ ogrzewania mikrofalowego w temp. 70°C na przeżywalność OLD [■], bakterii kwasu mlekowego [■], z rodzaju *Enterococcus sp.* [■], z grupy coli [■], z rodzaju *Streptococcus sp.* [■] oraz gronkowców koagulazo-dodatnich [■], K- kontrola (mleko świeże), 0 – czas dojścia do zadanej temperatury (3 minuty).

## PODSUMOWANIE

Prawidłowa mikroflora mleka kobiecego nie stanowi zagrożenia dla zdrowia dziecka (Fernandez i in. 2013; Rodriguez 2013), a wręcz przeciwnie stanowi jedną ze składowych warunkujących prawidłowy rozwój i funkcjonowanie przewodu pokarmowego niemowlęcia. Istnieją jednak przypadki, w których niemowlę nie może być karmione mlekiem własnej matki. Proces ręcznego, czy też mechanicznego odciągania mleka obciążony jest ryzykiem jego krzyżowego zanieczyszczenia drobnoustrojami patogennymi, które wywołane jest brakiem higieny podczas odciągania i/lub przechowywania pokarmu. W przypadku dzieci urodzonych przedwcześnie, u których układ odpornościowy nie jest w pełni wykształcony, karmienie mlekiem pochodzącym od innej matki, nie poddany obróbce termicznej może stanowić zagrożenie (Landers i in. 2010).

W literaturze dostępne są dane określające wpływ ogrzewania konwekcyjnego jedynie na wybrane drobnoustroje wprowadzone do mleka kobiecego w ściśle określonej ilości (Viazis i in. 2008). Wpływ ogrzewania mikrofalowego na drobnoustroje obecne w mleku opisany został w literaturze z wykorzystaniem wyników badań prowadzonych na mleku krowim (Alkaladi i in. 2014). Brak jest natomiast danych przedstawiających wpływ powyższych metod ogrzewania na naturalną mikroflorę mleka kobiecego oraz drobnoustroje patogenne, które dostały się do mleka drogą kontaminacji w różnej ilości.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że nie tylko początkowa ilość, ale również rodzaj drobnoustrojów występujących w mleku kobiecym wpływa na skuteczność pasteryzacji prowadzonej z zastosowaniem ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego. Wykazano, iż aby osiągnąć bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka ludzkiego nie jest konieczne stosowanie długotrwałego ogrzewania konwekcyjnego w temp. 62,5°C, nawet gdy początkowa ogólna liczba drobnoustrojów wynosi około 6 log<sub>10</sub>j.t.k./mL o ile liczba bakterii kwasu mlekowego oraz gronkowców koagulazo-dodatnich nie przekracza 4 log<sub>10</sub> j.t.k./mL, natomiast bakterii z rodzaju *Enterococcus sp.* i z grupy coli 2 log<sub>10</sub>j.t.k./mL. Całkowitą inaktywację drobnoustrojów uzyskano już w czasie dojścia próby mleka do temperatury 62,5°C. Jednak gdy ilość bakterii z rodzaju *Streptococcus sp.* oraz bakterii kwasu mlekowego wynosi 5 log<sub>10</sub>j.t.k./mL, aby uzyskać poziom drobnoustrojów akceptowany przez BMK w mleku po procesie pasteryzacji należy temperaturę procesu podwyższyć do

66°C. Jednak w przypadku, gdy w mleku oznaczono wysoki poziom badanych drobnoustrojów (około 7 log<sub>10</sub>j.t.k./mL) maksymalny stosowany w doświadczeniu czas ogrzewania konwekcyjnego (30 minut) w temp. 70°C nie był wystarczający do uzyskania efektu pasteryzacji.

Całkowitą inaktywację drobnoustrojów występujących w mleku ludzkim w przypadku ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego próbek uzyskuje się w znacznie krótszym czasie w porównaniu z ogrzewaniem konwekcyjnym. W mleku kobiecym, w którym ilość OLD spełnia warunki przyjęcia mleko do BMK (maksymalnie 5 log<sub>10</sub>j.t.k./mL), a ilość każdego z analizowanych rodzajów mikroorganizmów wynosi około 2 log<sub>10</sub>j.t.k./mL pożądaną czystość mikrobiologiczną mleka uzyskuje się po 5 minutach ogrzewania w temp. 62,5°C. Zwiększenie temperatury ogrzewania mikrofalowego do 66°C i 70°C skraca czas, w którym uzyskuje się efekt pasteryzacji do 3 minut, gdy ogólna liczba mikroorganizmów mleku kobiecym nie przekracza 5 log<sub>10</sub>j.t.k./mL oraz drobnoustrojów termoodpornych 3 log<sub>10</sub>j.t.k./mL.

Wytyczne klasyfikacji mleka od dawczyń do przyjęcia do BMK nie określają ilości bakterii termoodpornych (np. z rodzaju *Enterococcus sp.*) mogących występować w mleku (Tab. 2). Zawartość tych drobnoustrojów może być oznaczana na bardzo wysokim poziomie, nawet gdy ilość OLD będzie się mieścić w zakresie dopuszczalnym przez BMK. Zbyt wysokie stężenie tych mikroorganizmów może spowodować, iż warunki ogrzewania mogą nie być wystarczające do ich pełnej inaktywacji, dlatego też w kolejnym etapie badań wydłużono czas ogrzewania mikrofalowego do 10 minut.

Uzyskane wyniki badań stanowią uzupełnienie informacji określających wpływ ogrzewania konwekcyjnego na naturalną mikroflorę mleka kobiecego. W przypadku ogrzewania mleka kobiecego polem promieniowania mikrofalowego uzyskane wyniki mają charakter pionierski, zatem nie można porównać ich z wynikami prezentowanymi w dostępnej literaturze.

Na podstawie uzyskanych wyników analiz wpływu ogrzewania konwekcyjnego oraz mikrofalowego na przeżywalność mikroflory występującej w mleku ludzkim, wybrano wartości czasu i temperatury powyższych procesów, w których oznaczono zmiany w składnikach odżywczych oraz biologicznie aktywnych.

#### **9.4 Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego na wartość odżywcza mleka kobiecego**

##### **9.4.1 Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego na zawartość białka, tłuszczu, węglowodanów oraz wartość kaloryczną mleka ludzkiego**

W badanych próbach surowego mleka ludzkiego zawartość białka całkowitego wynosiła 1,6 g/100 mL, węglowodanów 7,25 ± 0,05 g/100mL, tłuszczu 3,58 ± 0,08 g/100 mL, natomiast kaloryczność 69,67 ± 0,82 kcal/100 ml (Tab. 8, 9). Taki poziom głównych składników odżywczych jest charakterystyczny dla mleka dojrzałego (Zachariassen i in. 2013).

Tabela 8. Zawartość składników odżywczych w mleku kobyecym surowym i ogrzewanym konwekcyjnie w wybranych wartościach temperatury i czasu jej działania (zawartość średnia  $\pm$  SD).

Składnik [g/100mL]	Mleko surowe	Temperatura 62,5°C				Temperatura 66°C		
		Czas dojścia *	10 min	20 min	30 min	Czas dojścia *	10 min	20 min
Białko odżywcze	1,30 $\pm$ 0	1,33 $\pm$ 0,05	1,37 $\pm$ 0,05	1,32 $\pm$ 0,04	1,27 $\pm$ 0,08	1,27 $\pm$ 0,08	1,30 $\pm$ 0,11	1,28 $\pm$ 0,10
Białko całkowite	1,60 $\pm$ 0	1,63 $\pm$ 0,05	1,70 $\pm$ 0	1,65 $\pm$ 0,05	1,60 $\pm$ 0,11	1,60 $\pm$ 0,11	1,60 $\pm$ 0,11	1,60 $\pm$ 0,11
Węglowodany	7,25 $\pm$ 0,05	7,28 $\pm$ 0,04	7,30 $\pm$ 0	7,25 $\pm$ 0,05	7,32 $\pm$ 0,10	7,35 $\pm$ 0,10	7,30 $\pm$ 0	7,33 $\pm$ 0,05
Tłuszcz	3,58 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>	3,77 $\pm$ 0,10	3,82 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	3,82 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	3,77 $\pm$ 0,15	3,72 $\pm$ 0,13	3,68 $\pm$ 0,13	3,72 $\pm$ 0,13
Wartość energetyczna [kcal/100 mL]	69,67 $\pm$ 0,82 <sup>ab</sup>	71,00 $\pm$ 1,1	72,17 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	71,5 $\pm$ 0,55	71,17 $\pm$ 1,33	71,17 $\pm$ 1,17	72,17 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	70,67 $\pm$ 1,51

\*- czas dojścia do zadanej temperatury (18 min)

a, b, c, d, e, f, g, h, i - te same litery w wierszu wskazują na istotne statystycznie różnice w stężeniu składników odżywczych mleka kobyeciego (P < 0,05)

Tabela 9. Zawartość składników odżywczych w mleku kobyecym surowym i ogrzewanym mikrofalowo w wybranych wartościach temperatury i czasu jej działania (zawartość średnia  $\pm$  SD).

Składnik [g/100mL]	Mleko surowe	Temperatura 62,5°C				Temperatura 66°C		
		Czas dojścia *	1 min	3 min	5 min	Czas dojścia *	1 min	3 min
Białko odżywcze	1,3 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	1,15 $\pm$ 0,05 <sup>abcdef</sup>	1,27 $\pm$ 0,08	1,28 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	1,3 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	1,35 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	1,38 $\pm$ 0,04 <sup>e</sup>	1,33 $\pm$ 0,05 <sup>f</sup>
Białko całkowite	1,6 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	1,45 $\pm$ 0,05 <sup>abcdefg</sup>	1,62 $\pm$ 0,10 <sup>g</sup>	1,62 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	1,7 $\pm$ 0 <sup>d</sup>	1,7 $\pm$ 0 <sup>e</sup>	1,68 $\pm$ 0,04 <sup>f</sup>
Węglowodany	7,25 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	6,98 $\pm$ 0,04 <sup>abcdef</sup>	7,35 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	7,35 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	7,35 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	7,23 $\pm$ 0,05	7,3 $\pm$ 0 <sup>e</sup>	7,3 $\pm$ 0 <sup>f</sup>
Tłuszcz	3,58 $\pm$ 0,08 <sup>abc</sup>	3,17 $\pm$ 0,16 <sup>defghi</sup>	3,7 $\pm$ 0,15 <sup>d</sup>	3,75 $\pm$ 0,14 <sup>e</sup>	3,75 $\pm$ 0,16 <sup>f</sup>	3,85 $\pm$ 0,05 <sup>bg</sup>	3,87 $\pm$ 0,05 <sup>ch</sup>	3,78 $\pm$ 0,04 <sup>i</sup>
Wartość energetyczna [kcal/100 mL]	69,67 $\pm$ 0,82 <sup>abc</sup>	63,5 $\pm$ 0,84 <sup>defghi</sup>	70,17 $\pm$ 1,33 <sup>d</sup>	71 $\pm$ 1,55 <sup>e</sup>	71,5 $\pm$ 1,64 <sup>f</sup>	71,83 $\pm$ 0,75 <sup>bg</sup>	72,17 $\pm$ 0,98 <sup>ch</sup>	71,67 $\pm$ 0,52 <sup>i</sup>

\*- czas dojścia do zadanej temperatury (3 min);

a, b, c, d, e, f, g, h, i - te same litery w wierszu wskazują na istotne statystycznie różnice w stężeniu składników odżywczych mleka kobyeciego (P < 0,05)

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, iż ogrzewanie konwekcyjne w temp. 62,5 i 66°C nie powoduje istotnych statystycznie zmian w zawartości białka całkowitego, białka odżywczego oraz węglowodanów (Tab. 8). Uzyskane wyniki dotyczące wpływu ogrzewania konwekcyjnego na białko całkowite, odżywcze oraz węglowodany znajdują potwierdzenie w dostępnym piśmiennictwie (Garcia-Lara i in. 2013; Espinosa-Martos i in. 2013; Ley i in. 2011; Vieira i in. 2011; Silvestre i in. 2006; Góes i in. 2002). Istotną statystycznie wyższą zawartości tłuszczu, o około 7% stwierdzono w próbach mleka kobyeciego ogrzewanego konwekcyjnie w temp. 62,5°C przez 10 i 20 minut. W przypadku ogrzewania mikrofalowego również zaobserwowano wzrost zawartości tłuszczu, w mleku ogrzewanym w temp. 66°C o około 8% po 1 minucie ogrzewania. Ley i in. (2011) oraz Garcia-Lara i in. (2013) stwierdzili nieznaczny (3,5%) spadek zawartości tłuszczu w mleku ogrzewanym konwekcyjnie w temp. 62,5°C przez 30 min. Stwierdzona w niniejszej pracy wyższa zawartości tłuszczu spowodowana jest prawdopodobnie błędem przedanalizycznym wynikającym z niewłaściwej homogenizacji. Remillard i in. (1993) wykazali istotny wpływ wielkości kuleczek tłuszczowych na dokładność pomiarową zawartości tłuszczu w mleku wykorzystując metodę analizy w podczerwieni.

W próbach mleka kobyeciego ogrzewanego mikrofalowo w warunkach zapewniających efekt pasteryzacji (62,5°C, 5 minut) nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w stężeniu badanych

składników odżywczych w porównaniu z mlekiem surowym. Również zastosowanie wyższych temperatur nie wpływało na podstawowe odżywcze składniki w mleku ludzkim ogrzewanym polem promieniowania mikrofalowego (Tab. 9). Dane dotyczące wpływu ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego na składniki odżywcze mleka są fragmentaryczne. Tacken i in.(2009) prowadząc badanie wpływu ogrzewania mikrofalowego w zakresie temp. 35-40°C oraz czasie 15-30 s nie stwierdził zmian w odniesieniu do tych komponentów mleka kobiecego.

#### **9.4.2 Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego na skład i zawartość KT**

Na podstawie wykonanych analiz uśrednionych prób surowego mleka ludzkiego wykazano, iż największy udział w ogólnej zawartości KT tłuszczu mleka kobiecego mają: kwas oleinowy 18:1 9c (39%), kwas palmitynowy 16:0 (22%) oraz kwas linolowy 18:2, n-6 (11%). W badanym mleku stwierdzono obecność wielonienasyconych KT, a wśród nich kwasów:  $\alpha$ -linolenowego 18:3, n-3 (1,4%), linolowego 18:2 n-6 (0,8%), eikozapentaenowego 20:5 n-3 (0,1%), k dokozaapentaenowego 22:5 n-3 (0,16%) oraz dokozaheksaenowego 22:6n-3 (0,31%) (Tab. 10, 11). Uzyskany skład i zawartość KT jest charakterystyczny dla tłuszczu mleka kobiet pochodzących z Gdańska i okolic (Martysiak-Żurowska i in. 2011).

Zawartość niektórych KT w tłuszczu mleka kobiecego wynosi mniej niż 0,5%, co utrudnia rozpatrywanie wywołanych ogrzewaniem zmian zawartości każdego KT z osobna. W celu określenia wpływu czasu ogrzewania w stałej temperaturze, jak również działania różnej temperatury przez ten sam czas wykonano zestawienie grupowe, gdzie zsumowano KT: nasyconych (SFA - saturated fatty acids), jednonienasyconych (MUFA - monounsaturated fatty acids) oraz wielonienasyconych (PUFA - polyunsaturated fatty acids) osobno rodziny n-3 i n-6.

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, iż stosowane w trakcie doświadczenia parametry ogrzewania konwekcyjnego, jak również ogrzewania mikrofalowego nie powodują istotnych statystycznie zmian w zawartości i proporcji KT w ludzkim tłuszczu mleka kobiecego. Nie stwierdzono wpływu czasu przetrzymywania próbki w danej temperaturze, ani działania różnej temperatury w tym samym czasie przetrzymywania na skład i zawartość KT (Tab. 10, 11, 12, 13).

Tabela 10. Skład KT w tłuszczu mleka kobiecego surowego i ogrzewanego mikrofalowo w temp. 62,5°C w zadanych parametrach czasu (% ogólnej zawartości KT). \* ni - niezidentyfikowany, \*czas dojścia- czas uzyskania zadanej temperatury wyniósł około 3 minuty.

KT	Kontrola	Czas dojścia*	Czas ogrzewania [min]			
			1	3	5	10
8:0	0,12	0,11	0,14	0,10	0,12	0,12
10:0	1,02	0,97	1,15	1,02	1,08	1,11
12:0	3,68	3,57	3,87	3,63	3,81	3,85
14:0	4,26	4,21	4,27	4,25	4,29	4,27
14:1 t	0,08	0,09	0,10	0,08	0,09	0,11
14:1 9c	0,21	0,21	0,23	0,21	0,23	0,24
15:0	0,31	0,30	0,31	0,30	0,31	0,30
15:1 9c	0,05	0,06	0,06	0,06	0,08	0,07
16:0	22,36	22,45	22,10	22,58	22,29	21,99
Σ 16:1 t	0,55	0,54	0,55	0,53	0,55	0,53
Σ 16:1 c	2,69	2,68	2,74	2,71	2,73	2,69
16:1 9c	0,22	0,23	0,21	0,20	0,22	0,23
17:0	0,30	0,29	0,27	0,28	0,28	0,28
17:1 9c	0,21	0,20	0,19	0,20	0,21	0,22
18:0	6,36	6,44	6,23	6,35	6,23	6,26
Σ 18:1 t	0,60	0,52	0,48	0,52	0,51	0,50
18:1 9c	38,85	39,30	39,03	39,11	39,00	38,70
18:1 11c	2,16	2,18	2,17	2,17	2,18	2,17
18:2 n-6	10,91	10,96	11,07	11,00	10,97	10,97
ni	0,11	0,11	0,13	0,11	0,12	0,28
20:0	0,18	0,18	0,17	0,17	0,17	0,18
18:3 n-6	0,14	0,13	0,14	0,13	0,14	0,13
18:3 n-3	1,42	1,41	1,46	1,43	1,44	1,44
20:1 n-9	0,07	0,05	0,04	0,05	0,06	0,02
ΣCLA	0,80	0,76	0,79	0,79	0,76	0,83
20:2 n-6	0,25	0,25	0,24	0,25	0,25	0,25
22:0	0,33	0,32	0,32	0,32	0,33	0,33
20:3 n-6	0,07	0,06	0,07	0,06	0,07	0,05
20:4 n-6	0,56	0,56	0,57	0,55	0,54	0,55
22:1 n-9	0,10	0,09	0,09	0,09	0,10	0,08
22:2	0,13	0,13	0,12	0,12	0,13	0,18
20:5 n-3	0,10	0,09	0,11	0,10	0,11	0,12
24:1	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40
ni	0,12	0,06	0,11	0,11	0,10	0,10
22:5 n-3	0,16	0,18	0,18	0,17	0,20	0,19
22:6 n-3	0,31	0,29	0,31	0,29	0,30	0,27
SUFA	38,91	38,83	38,82	38,98	38,92	38,68
MUFA	45,88	46,13	45,89	45,93	45,94	45,95
PUFA	14,85	14,81	15,05	14,88	14,90	14,98
Σ n-3	1,99	1,97	2,06	1,98	2,05	2,01
Σ n-6	11,81	11,84	11,97	11,86	11,85	11,89

Tabela 11. Skład KT w tłuszczu mleka kobiecego surowego i ogrzewanego mikrofalowo w temp. 66°C w zadanych parametrach czasu (% ogólnej zawartości KT). \* ni - niezidentyfikowany, \*czas dojścia- czas uzyskania zadanej temperatury wyniósł około 3 minuty.

KT	Kontrola	Czas dojścia*	Czas ogrzewania [min]			
			1	3	5	10
8:0	0,12	0,18	0,15	0,17	0,15	0,17
10:0	1,02	1,26	1,19	1,31	1,29	1,47
12:0	3,94	3,61	3,474	3,72	3,63	4,07
14:0	4,26	4,75	4,57	4,44	4,70	5,00
14:1 t	0,08	0,10	0,09	0,11	0,08	0,10
14:1 9c	0,21	0,25	0,25	0,24	0,23	0,28
15:0	0,31	0,33	0,34	0,32	0,33	0,32
15:1 9c	0,05	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07
16:0	22,36	23,29	23,36	22,34	23,16	23,31
Σ 16:1 t	0,55	0,56	0,59	0,66	0,58	0,56
Σ 16:1 c	2,69	2,82	2,81	2,75	2,76	2,79
16:1 9c	0,22	0,21	0,26	0,31	0,21	0,20
17:0	0,30	0,27	0,30	0,28	0,28	0,29
17:1 9c	0,21	0,19	0,21	0,19	0,20	0,21
18:0	6,36	6,07	6,22	6,36	6,26	6,07
Σ 18:1 t	0,60	0,55	0,54	0,49	0,49	0,54
18:1 9c	38,85	37,60	37,86	38,17	37,88	37,06
18:1 11c	2,16	2,10	2,12	2,14	2,13	2,06
18:2 n-6	10,91	10,54	10,57	10,58	10,44	10,29
ni	0,11	0,14	0,07	0,11	0,05	0,13
20:0	0,18	0,16	0,17	0,18	0,17	0,15
18:3 n-6	0,14	0,12	0,14	0,12	0,14	0,13
18:3 n-3	1,42	1,38	1,39	1,35	1,35	1,32
20:1 n-9	0,07	0,05	0,06	0,05	0,06	0,05
ΣCLA	0,80	0,73	0,75	0,75	0,78	0,67
20:2 n-6	0,25	0,22	0,24	0,25	0,24	0,23
22:0	0,33	0,29	0,30	0,31	0,31	0,30
20:3 n-6	0,07	0,05	0,08	0,06	0,03	0,11
20:4 n-6	0,56	0,50	0,50	0,56	0,42	0,51
22:1 n-9	0,10	0,06	0,09	0,10	0,09	0,09
22:2	0,13	0,12	0,09	0,17	0,12	0,14
20:5 n-3	0,10	0,08	0,12	0,09	0,09	0,08
24:1	0,10	0,21	0,00	0,22	0,04	0,00
ni	0,12	0,09	0,12	0,11	0,11	0,10
22:5 n-3	0,16	0,17	0,12	0,19	0,18	0,15
22:6 n-3	0,31	0,26	0,28	0,30	0,29	0,26
SUFA	38,91	40,88	40,61	39,88	40,99	41,89
MUFA	45,88	44,76	44,93	45,49	44,80	43,99
PUFA	14,85	14,15	14,27	14,42	14,06	13,89
Σ n-3	1,99	1,88	1,90	1,93	1,90	1,82
Σ n-6	11,81	11,33	11,37	11,49	11,14	11,17

Tabela 12. Skład KT w tłuszczu mleka kobiecego surowego i ogrzewanego konwekcyjnie w temp. 62,5°C w zadanych parametrach czasu (% ogólnej zawartości KT). \* ni - niezidentyfikowany, \*czas dojścia- czas uzyskania zadanej temperatury wynosił około 18 minut.

KT	Kontrola	Czas dojścia*	Czas ogrzewania [min]		
			10	20	30
10:00	0,62	0,78	1,03	0,64	0,77
12:00	3,42	4,61	4,87	3,52	4,01
13:00	0,02	0,04	0,04	0,03	0,03
14:00	5,50	6,59	6,79	5,55	5,93
14:1 t	0,05	0,06	0,06	0,05	0,06
14:1 9c	0,16	0,20	0,21	0,16	0,17
15:00	0,36	0,40	0,40	0,36	0,37
15:1 9c	0,08	0,10	0,14	0,08	0,12
16:00	24,79	25,67	25,18	24,84	24,86
Σ 16:1 t	0,54	0,64	0,65	0,60	0,60
Σ 16:1 c	0,36	0,34	0,30	0,30	0,35
16:1 9c	2,17	2,41	2,46	2,19	2,24
17:00	0,35	0,32	0,30	0,34	0,33
17:1 9c	0,25	0,25	0,28	0,24	0,25
18:00	7,00	6,25	5,66	6,94	6,71
Σ 18:1 t	0,83	0,76	0,71	0,82	0,79
18:1 9c	35,66	33,83	33,89	35,59	34,27
18:1 11c	2,10	2,00	1,92	2,07	2,03
18:2 n-6	9,30	9,07	9,31	9,10	8,99
Σ 18:1 c	0,63	0,53	0,45	0,67	0,52
ni	0,13	0,07	0,08	0,14	0,13
20:00	0,23	0,19	0,15	0,22	0,21
18:3 n-6	0,07	0,08	0,08	0,07	0,07
18:3 n-3	1,33	1,33	1,35	1,27	1,25
20:1 n-9	0,69	0,57	0,54	0,65	0,64
ΣCLA	1,04	0,89	0,86	1,00	0,98
22:00	0,07	0,05	0,04	0,07	0,07
20:3 n-6	0,33	0,29	0,33	0,31	0,33
20:4 n-6	0,60	0,52	0,58	0,55	0,58
22:1 n-9	0,11	0,09	0,08	0,10	0,11
20:5 n-3	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11
24:01:00	0,11	0,08	0,07	0,06	0,07
22:5 n-3	0,06	0,03	0,10	0,05	0,06
22:6 n-3	0,19	0,16	0,19	0,18	0,19
SUFA	42,35	44,89	44,46	42,50	43,29
MUFA	43,75	41,86	41,76	43,59	42,21
PUFA	13,04	12,49	12,90	12,64	12,57
Σ n-3	1,70	1,63	1,75	1,61	1,61
Σ n-6	11,35	10,85	11,15	11,04	10,96



Tabela 13. Skład KT w tłuszczu mleka kobycego surowego i ogrzewanego konwekcyjnie w temp. 66°C w zadanych parametrach czasu (% ogólnej zawartości KT). \* ni - niezidentyfikowany, \*czas dojścia- czas uzyskania zadanej temperatury wynosił około 18 minut.

KT	Kontrola	Czas dojścia*	Czas ogrzewania [min]	
			10	20
10:00	0,62	0,62	0,66	0,80
12:00	3,42	3,37	3,57	4,00
13:00	0,02	0,03	0,03	0,03
14:00	5,50	5,41	5,69	5,66
14:1 t	0,05	0,05	0,06	0,06
14:1 9c	0,16	0,15	0,17	0,17
15:00	0,36	0,36	0,37	0,38
15:1 9c	0,08	0,10	0,10	0,12
16:00	24,79	24,80	25,12	25,17
Σ 16:1 t	0,54	0,59	0,60	0,58
Σ 16:1 c	0,36	0,34	0,36	0,34
16:1 9c	2,17	2,16	2,21	2,22
17:00	0,35	0,34	0,33	0,33
17:1 9c	0,25	0,25	0,25	0,24
18:00	7,00	7,16	6,85	6,77
Σ 18:1 t	0,83	0,85	0,84	0,83
18:1 9c	35,66	35,72	35,28	34,80
18:1 11c	2,10	2,10	2,09	2,08
18:2 n-6	9,30	9,17	9,15	9,09
Σ 18:1 c	0,63	0,53	0,62	0,54
ni	0,13	0,14	0,13	0,12
20:00	0,23	0,24	0,22	0,21
18:3 n-6	0,07	0,07	0,07	0,07
18:3 n-3	1,33	1,29	1,28	1,26
20:1 n-9	0,69	0,70	0,67	0,63
ΣCLA	1,04	1,05	1,02	0,96
22:00	0,07	0,08	0,07	0,07
20:3 n-6	0,33	0,33	0,32	0,33
20:4 n-6	0,60	0,60	0,58	0,57
22:1 n-9	0,11	0,12	0,11	0,10
20:5 n-3	0,12	0,12	0,11	0,12
24:01:00	0,11	0,12	0,11	0,96
22:5 n-3	0,06	0,06	0,06	0,05
22:6 n-3	0,19	0,19	0,18	0,18
SUFA	42,35	42,41	42,91	43,42
MUFA	43,75	43,80	43,47	43,65
PUFA	13,04	12,88	12,78	12,63
Σ n-3	1,70	1,65	1,63	1,61
Σ n-6	11,35	11,23	11,15	11,02

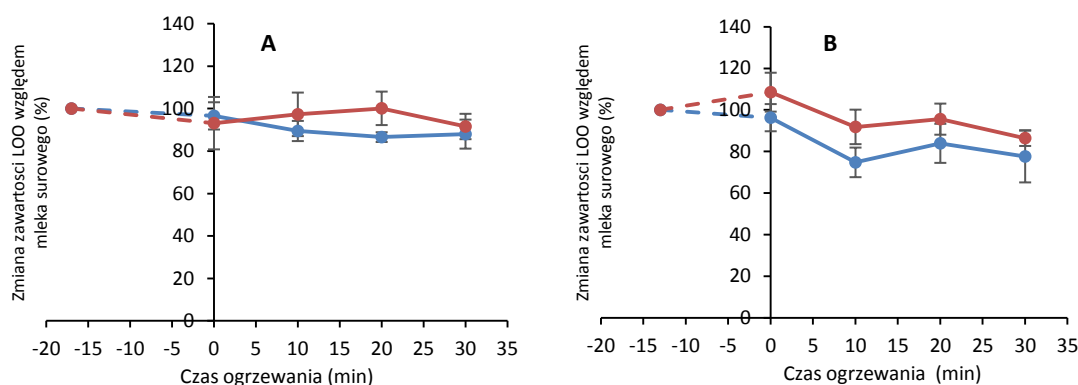
## 9.5 Wpływ ogrzewania konwekcyjnego oraz ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego na frakcję lipidową mleka ludzkiego

### 9.5.1 Pierwotne produkty utleniania lipidów

W badanych próbkach mleka ludzkiego stwierdzono niewielką zawartość pierwotnych produktów utleniania lipidów, tj. nadtlenków lipidowych LP, na poziomie 20 – 50 nM/mL mleka, co jest charakterystyczne dla mleka kobiecego (Turoli i in. 2004).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian w ilości LP w próbach mleka ogrzewanych konwekcyjnie w czasie uzyskania temp. 62,5 i 66°C. Wykazano, iż 30 minutowe ogrzewanie konwekcyjne mleka kobiecego w wariacie bez mieszania próby nie wpływa na wartość LP (Rys. 32A), natomiast w próbach mleka mieszanych w trakcie procesu ogrzewania konwekcyjnego zaobserwowano niższą o około 14% zawartość LP względem zawartości w mleku surowym (Rys.32B). Mieszanie mleka w trakcie ogrzewania konwekcyjnego powodowało zwiększenie się powierzchni kontaktu mleka z tlenem, co skutkowało intensyfikacją procesów utleniania lipidów.

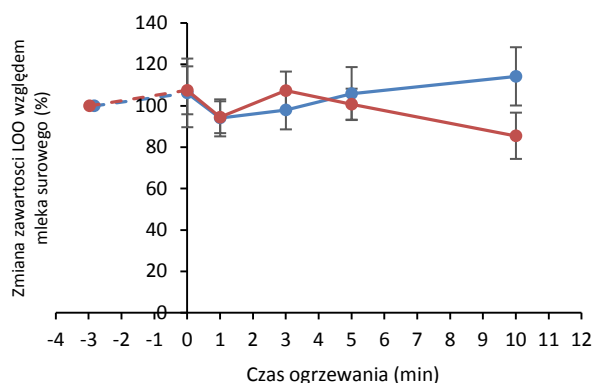
Czas, w którym uzyskano zadane temperatury oznaczony został na wykresach linią przerywaną na ujemnej osi X.



Rysunek 32. Wykres przedstawiający przebieg zmian zawartości LP [% zmian względem zawartości w mleku surowym ± SD] podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariacie bez mieszania (A) oraz w wariacie z mieszaniem (B). Temp. 62,5°C (●), 66°C (●)

Ogrzewanie mikrofalowe mleka kobiecego w temp. 62,5 i 66°C nie powodowało istotnych zmian w ilości LP w mleku czasie uzyskania. (Rys. 33). Dopiero ogrzewanie w temp. 66°C dłużej niż 5 minut skutkowało około 15% istotnym statystycznie spadkiem LP w mleku kobiczym.

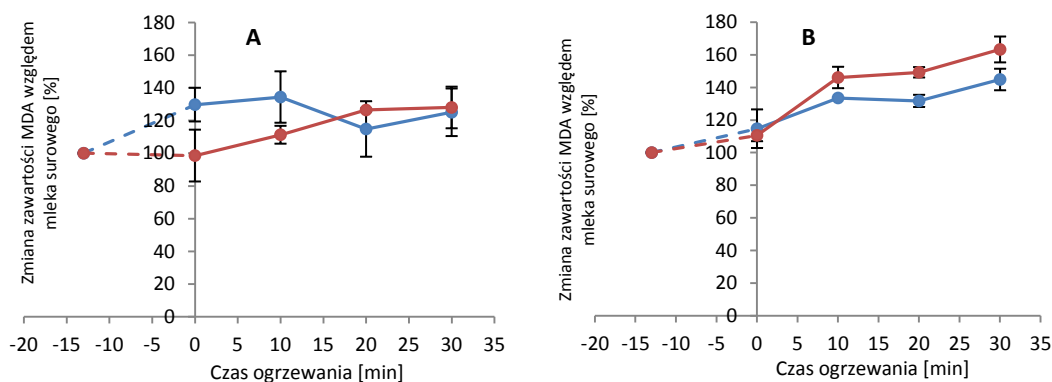
Pierwotnymi produktami reakcji utleniania lipidów są przede wszystkim wysoce niestabilne wodorotlenki z zachowaną strukturą łańcucha węglowego kwasu tłuszczowego (Maszewska i in. 2005). Obniżenie się ilości LP w badanych próbach mleka kobiecego ogrzewanych zarówno konwekcyjnie jak również przy wykorzystaniu pola mikrofalowego świadczy najprawdopodobniej o przekształceniu się ich we wtórne produkty utleniania lipidów (Wąsowicz i in. 2004).



Rysunek 33. Wykres przedstawiający przebieg zmian zawartości LP [%] zmian względem zawartości w mleku surowym  $\pm$  SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

### 9.5.2 Wtórne produkty utleniania lipidów

W badanych próbkach mleka surowego stwierdzono zawartość MDA, jednego z głównych wtórnych produktów utlenienia wielonienasyconych KT, średnio w ilości 11,8  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$  mleka. Z danych literaturowych wynika, że zawartość MDA w surowym mleku kobiecym wynosi od 14,21 do 24,49  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$  mleka. Można przypuszczać, że obecność wtórnych produktów utleniania lipidów w mleku związana jest z trybem życia kobiety karmiącej (Martysiak-Żurowska i in. 2006).

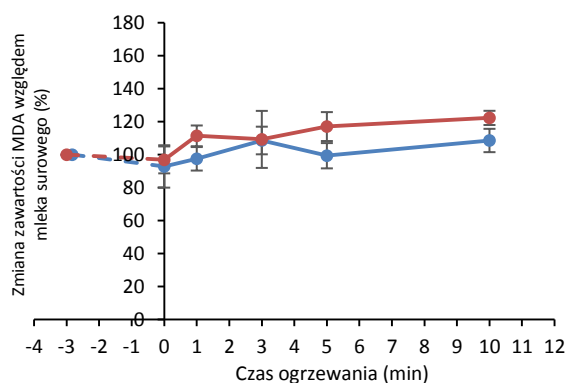


Rysunek 34. Wykres przedstawiający przebieg zmian zawartości MDA [%] zmian względem aktywności w mleku surowym  $\pm$  SD] podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariacie bez mieszania (A) oraz w wariacie z mieszaniem (B). Temp. 62,5°C (●), 66°C (●)

Ogrzewanie konwekcyjne mleka ludzkiego prowadzone w wariacie z mieszaniem i bez mieszania próbki prowadziło do wzrostu zawartości MDA w badanych próbkach. W przypadku procesu prowadzonego w wariacie bez mieszania przebieg zmian wartości MDA w mleku kobiecym nie był jednoznaczny. Zarówno w czasie uzyskiwania temp. 62,5°C jak również w efekcie 10 minutowego ogrzewania zaobserwowano większy w porównaniu z temp. 66°C wzrost stężenia MDA w mleku (Rys. 34A). Po 30 minutach ogrzewania mleka kobiecego bez mieszania następował statystycznie istotny wzrost zawartości MDA, o 25 i 28% odpowiednio w temp. 62,5 i 66°C względem zawartości początkowej (Rys. 34A). Według dostępnych danych literaturowych pasteryzacja holder (Elisia i Kitts, 2011; Silvestre i in. 2008), jak również działanie temp. 72°C przez 15s nie wpływa na zawartość MDA w mleku ludzkim (Silvestre i in. 2008). Rozbieżność w uzyskanych wynikach jest prawdopodobnie

spowodowana odmienną procedurą procesu ogrzewania konwekcyjnego. Silvestre i in. (2008) ogrzewali niewielką ilość (4 ml) mleka ludzkiego w termobloku (firmy VLM, HBV-Q-16-16). Mała objętość ogrzewanego materiału biologicznego powoduje szybkie uzyskanie zadanej temperatury, co przypuszczalnie ogranicza zmiany w składnikach mleka ludzkiego. W badaniach prowadzonych w ramach pracy czas ten wynosił 18 minut co było zbliżone z warunkami pasteryzacji prowadzonej w pasteryzatorach przeznaczonych do utrwalania mleka kobiecego

W próbach mleka kobiecego mieszanych w trakcie procesu ogrzewania konwekcyjnego zaobserwowano intensyfikację procesów utleniania lipidów czego skutkiem był wzrost zawartości MDA, tym większy im wyższą temperaturę i dłuższy czas procesu zastosowano. Po maksymalnym stosowanym czasie ogrzewania (30 min) zarówno w temp. 62,5°C jak 66°C oznaczono statystycznie istotny około 50% wzrost stężenia MDA w mleku ludzkim (Rys. 34B).



Rysunek 35. Wykres przedstawiający przebieg zmian zawartości MDA [% zmian względem aktywności w mleku surowym  $\pm$  SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●)

W mleku kobiecym ogrzewanym mikrofalowo wzrost zawartości MDA nie był tak znaczący w porównaniu z mlekiem ogrzewanym konwekcyjnie. W badanych próbach ogrzewanych mikrofalowo w warunkach w których uzyskano całkowitą inaktywację bakterii (62,5°C, 5 minut) zawartość MDA oznaczana była na takim samym poziomie jak w mleku surowym (Rys. 35). Wydłużenie czasu prowadzenia procesu do 10 min powodowało wzrost stężenia MDA o 8% względem zawartości początkowej. Ogrzewanie w analogicznym czasie w temp. 66°C prowadziło już do 22% wzrostu wartości MDA w analizowanych próbach.

## PODSUMOWANIE

Alternatywna do stosowanej obecnie w BMK metoda utrwalania mleka ludzkiego powinna nie tylko zapewniać bezpieczeństwo mikrobiologiczne utrwalonego pokarmu, lecz również w możliwie jak najmniejszym stopniu degradować składniki odżywcze oraz biologicznie aktywne. Jednocześnie powinna ograniczać generowanie potencjalnie szkodliwych dla zdrowia substancji powstających wskutek przemian składników mleka kobiecego. Głównymi beneficjentami BMK są dzieci chore lub urodzone przedwcześnie, dla których dostarczony pokarm musi być przede wszystkim bezpieczny. Ważne jest również, aby wartość biologiczna oraz odżywcza otrzymanego mleka była na poziomie zaspokajającym potrzeby rozwijającego się organizmu dziecka. Niedostateczna podaż składników energetycznych, jak

również budulcowych, przede wszystkim białka może skutkować między innymi zachwianiem rozwoju neuropoznawczego (Weisglas-Kuperus i in. 2009).

Przeprowadzone analizy wykazały, iż warunki ogrzewania konwekcyjnego (62,5°C; 30 min) oraz mikrofalowego (62,5°C; 5 min), w których uzyskuje się efekt pasteryzacji, jak również w pozostałych parametrach czasu i temperatury stosowanych na potrzeby pracy nie powodują zmian w zawartości składników odżywczych. Uzyskane wyniki badań pozytywnie opiniują analizowane parametry do dalszych prac badawczych mających na celu określenie wpływu proponowanych metod ogrzewania na biologicznie aktywne składniki mleka ludzkiego.

Dane literaturowe wskazują zarówno na brak wpływu ogrzewania w parametrach powszechnie stosowanych w BMK (62,5°C; 30 min), jak również długotrwałego ogrzewania w temp. 120°C na KT mleka ludzkiego (Romeu-Nadal i in. 2008; Fidler i in. 1998; Henderson i in. 1998). Również dane uzyskane w wyniku analizy składu KT w mleku ludzkim ogrzewanym mikrofalowo są zbieżne z literaturowymi. Ovesen [1996], stwierdził, że mikrofalowego ogrzewanie mikrofalowe mleka kobiecego nawet w temp. 77°C nie powodowało zmian w profilu wielonienasyconych KT

Lipidy mogą ulegać procesowi autooksydacji, jak również utlenieniu fotosensybilizowanemu. Produktami tych reakcji są pierwotne oraz wtórne produkty utleniania lipidów. Pierwotne produkty utleniania lipidów dostarczane do organizmu w niewielkiej ilości wraz z pożywieniem nie są wchłaniane w jelicie cienkim. Ulegają one metabolizmowi pod wpływem bakterii jelitowych lub przekształcane są do obojętnych hydroksykwasów przy udziale peroksydazy glutationowej. W przypadku gdy stężenie tych produktów w diecie jest wysokie mogą one zostać częściowo wchłonięte w jelicie powodując zwiększenie apoptozy komórek nabłonka jelitowego, zmniejszając tym samym barierowość jelit (Wąsowicz i in. 2004; Cichosz i in. 2011a; Wang i in. 2000; Knazawa i in. 1998). Stosowane parametry ogrzewania konwekcyjnego oraz ogrzewania mikrofalowego w którym uzyskano efekt pasteryzacji nie wpływały na zawartość pierwotnych produktów utleniania lipidów w mleku kobiecym.

Wtórne produkty utleniania lipidów stanowią znacznie większe zagrożenie dla organizmu. Charakteryzują się one wysoką reaktywnością biologiczną, prowadzi m. in. do uszkodzenia struktur komórkowych, ograniczają działanie enzymów oraz działają cytotoksycznie i mutagenie (Wąsowicz i in. 2004; Cichosz i in. 2011a; Cichosz i in. 2011b). Jednym z bardziej reaktywnych produktów utleniania lipidów jest dialdehyd malonowy (MDA), który powstaje z utleniania KT zawierających co najmniej trzy wiązania podwójne (Fenaille i in. 2001). Przeprowadzone analizy wykazały, iż parametry ogrzewania konwekcyjnego powszechnie stosowane w BMK (62,5°C; 30 min) powodują wzrost stężenia MDA w mleku kobiecym o około 25%. Mieszanie w trakcie procesu, w zamkniętych butelkach ale bez usunięcia powietrza z przestrzeni pod korkiem zwiększa stopień oksydacji lipidów mleka ludzkiego dwukrotnie. Korzystniejsze pod względem ograniczenia niekorzystnych zmian w składnikach lipidowych mleka, między innymi utleniania będzie ogrzewanie mikrofalowe. Warunki pasteryzacji w których uzyskano bezpieczeństwo mikrobiologiczne (62,5°C; 5 min) nie powodowały zmian w stężeniu MDA w stosunku do mleka surowego. Tłuszcz w mleku kobiecym występuje przeważającej ilości w formie związanej w postaci miceli (83%) , pozostałą część stanowi tłuszcz wolny (17%) (Martysiak-Żurowska, 2005). Lipidy w formie związanej wykazują odporność na procesu utleniania. Wynika to z budowy miceli, które składają się z rdzenia oraz otoczki, w której skład wchodzi białka, fosfolipidy, cholesterol oraz glikoproteiny stanowiące fizyczną barierę dla procesów utleniania (Park i in. 2014). Należy przypuszczać,

że wysoka aktywność składników przeciwutleniających w mleku ludzkim, które neutralizują wolne rodniki odpowiedzialne za inicjację procesu oksydacji w pewnym stopniu hamuje niekorzystne zmiany w składnikach lipidowych (Elisia i in. 2011).

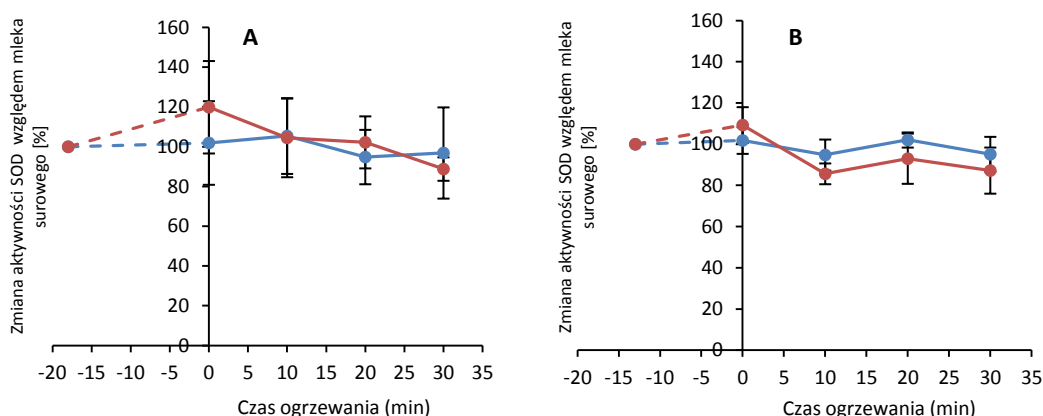
Jednym z ważniejszych substancji warunkujących prawidłowy rozwój w okresie prenatalnym, noworodkowym oraz niemowlęcym są kwasy tłuszczowe, a w szczególności LC-PUFA. Organizm dorosłego człowieka potrafi syntetyzować LC-PUFA na drodze enzymatycznej desaturacji i elongacji z ALA. Organizm niemowlęcia ze względu na nie w pełni wykształcony układ enzymatyczny nie jest w stanie wytworzyć wystarczającej ilości LC-PUFA, dlatego też muszą być one dostarczane wraz z pokarmem (Kent i in. 2006; Innis i in. 1999; Emmett i in. 1997). Ich dostateczna podaż wraz z pokarmem warunkuje między innymi prawidłowy rozwój układu nerwowego (Auestad i in. 2003). Pomimo wzrostu zawartości MDA, który powstaje w wyniku utleniania KT zawierających co najmniej 3 wiązania podwójne, w mleku kobiecym ogrzewanym konwekcyjnie oraz z użyciem pola mikrofalowego nie stwierdzono spadku zawartości wielonienasyconych KT, w tym ARA, EPA i DHA.

## 9.6 Wpływ ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego na wybrane biologicznie aktywne składniki mleka kobiecego

### 9.6.1 Składniki przeciwutleniające

#### 9.6.1.1 Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

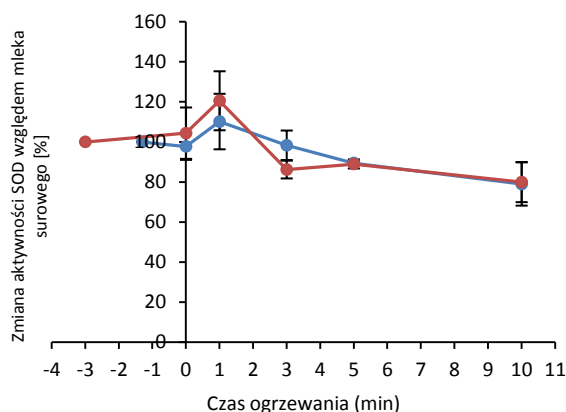
W badanych próbach surowego mleka kobiecego stwierdzono aktywność SOD w zakresie od 0,5 do 1,7 U/mL. Gutierrez-Repiso i in. (2014) aktywność tego enzymu w mleku kobiecym dojrzalym oznaczyli na poziomie średnio  $4,42 \pm 1,61$  U/mL. Wykazano, że SOD charakteryzuje się wysoką odpornością na działanie wysokiej temperatury. Ogrzewanie konwekcyjne mleka kobiecego zarówno w wariantcie z mieszaniem jak i bez mieszania próby w temp. 62,5 i 66°C nie powodowało statystycznie istotnych zmian w aktywności enzymu, nawet po maksymalnym stosowanym w doświadczeniu czasie działania temperatury (Rys.36AB).



Rysunek 36. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności SOD (% zmian względem aktywności w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariantcie bez mieszania (A) oraz w wariantcie z mieszaniem (B). Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, iż ogrzewanie polem promieniowania mikrofalowego w warunkach zapewniających bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka (62,5°C; 5 min) nie powodowało istotnych statystycznie zmian w aktywności SOD w stosunku do mleka surowego (Rys. 37). Na uwagę zasługuje fakt, iż w mleku kobiecym ogrzewanym w temp. 62,5 i 66°C przez

1 minutę zaobserwowano istotny statystycznie wzrost aktywności SOD odpowiednio o 10 i 20% względem aktywności w mleku surowym.



Rysunek 37. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności SOD [% zmian względem aktywności w mleku surowym  $\pm$  SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

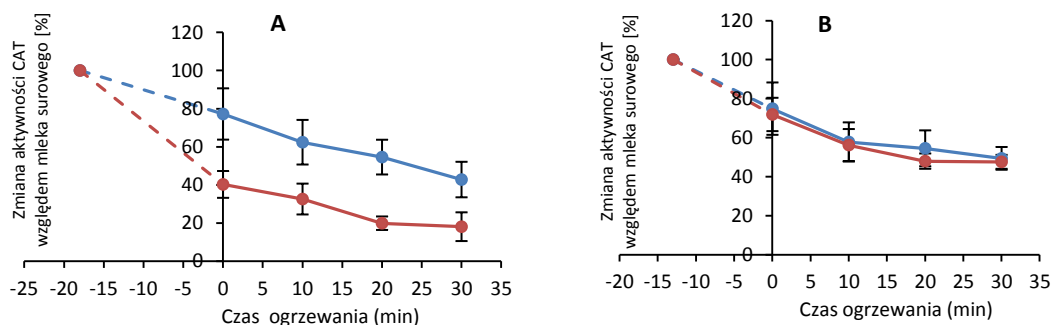
### 9.6.1.2 Katalaza (CAT)

W badanych próbach surowego mleka kobiecego oznaczono aktywność katalazy na poziomie 14,8 - 21,2 nmol/min/mL, co jest charakterystyczne dla mleka początkowego. Yuksel i in. (2015) oznaczyli aktywność CAT w mleku kobiecym początkowym na poziomie około 25 nmol/min/mL.

Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano, że CAT zawarta w mleku ludzkim w przeciwieństwie do SOD wykazuje dużą wrażliwość na działanie wysokiej temperatury.

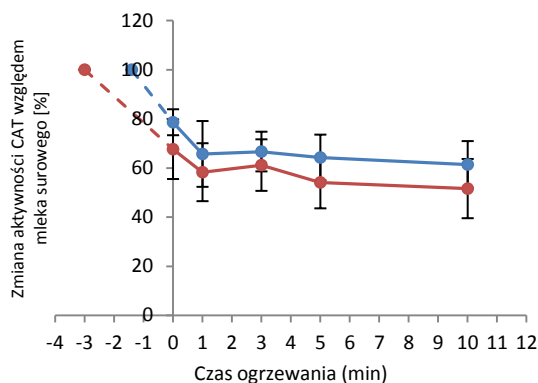
W mleku kobiecym ogrzewanym konwekcyjnie w wariacie bez mieszania w temp. 62,5 i 66°C zaobserwowano spadek aktywności badanego enzymu odpowiednio o 23 i 60% już w czasie uzyskania zadanych temperatur. Ogrzewanie prób w zadanych temperaturach powodowało dalsze obniżenie się aktywności enzymu. W efekcie ogrzewania mleka kobiecego w temp. 62,5 i 66°C przez czas 30 minut wykazano spadek aktywności CAT odpowiednio o 43 i 82% względem aktywności początkowej (Rys. 38A).

Wpływ mieszania próby na aktywność badanego białka w trakcie ogrzewania zauważalny był w procesie prowadzonym w temperaturze 66°C. Straty w aktywności CAT były w tym przypadku o 30% mniejsze niż w próbce niemieszanej (Rys. 38B).



Rysunek 38. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności CAT (% zmian względem aktywności w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariacie bez mieszania (A) oraz w wariacie z mieszaniem (B). Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, iż już w czasie uzyskania temp. 62,5 i 66°C generowanej polem promieniowania mikrofalowego następował znaczący spadek aktywności CAT w mleku ludzkim, odpowiednio o 22 i 33% (Rys. 39). Jednak dalsze ogrzewanie prób mleka w stałej temperaturze nawet przez maksymalny stosowany w doświadczeniu czas 10 minut nie powodowało dalszej degradacji białka (Rys. 39).



Rysunek 39. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności CAT (% zmian względem zawartości w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

### 9.6.1.3 Peroksydaza glutationowa (GPx)

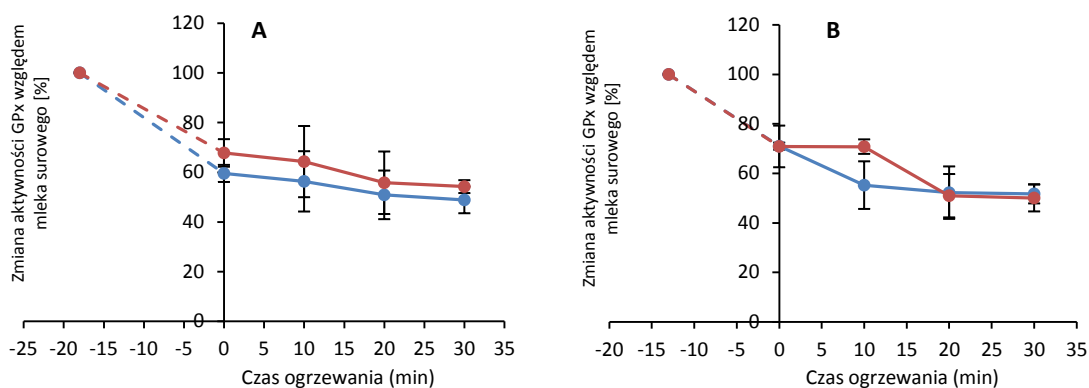
Aktywność GPx w badanych próbach surowego mleka kobiecego wynosiła od 4,5 do 15 nmol/min/mL. Gutierrez-Repiso i in. (2014) aktywność GPx w dojrzałym mleku ludzkim oznaczył na poziomie  $16,6 \pm 7,5$  nmol/min/mL.

Ogrzewanie konwekcyjne mleka kobiecego w wariacie z mieszaniem w temp. 62,5 i 66°C powodowało obniżenie aktywności GPx o około 30 % w czasie uzyskania przez próbki mleka zadanych temperatur (Rys. 40B). Brak mieszania w trakcie procesu intensyfikowało straty aktywności o 15 i 12% odpowiednio w temp. 62,5°C i 66°C (Rys. 41A).

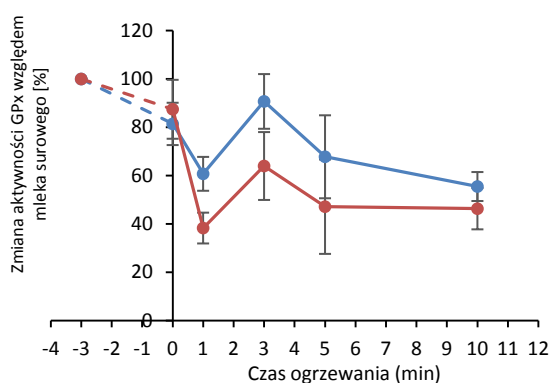
Ogrzewanie prób w temp. 62,5 i 66°C przez 30 minut powodowało około 50% spadek aktywności GPx zarówno w mleku mieszanym jak i nie mieszanym w trakcie procesu.

Ogrzewanie polem promieniowania mikrofalowego generującym temp. 62,5 i 66°C przez 1 minutę powodowało gwałtowne obniżenie się aktywności GPx w mleku ludzkim, odpowiednio o 40 i 60% (Rys. 41). Jednak podobnie jak w przypadku SOD, w próbach mleka ogrzewanych polem promieniowania mikrofalowego również zaobserwowano czasowy wzrost aktywności badanego enzymu. W parametrach czasu i temperatury w których uzyskano bezpieczeństwo mikrobiologiczne zaobserwowano około 30% obniżenie aktywności GPx w porównaniu z mlekiem nieogrzewanym. Wydłużenie czasu obróbki termicznej mleka kobiecego do 10 minut w obu zadanych temperaturach nie powodowało dalszych istotnych zmian w aktywności badanego enzymu (Rys. 41)





Rysunek 40. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności GPx (% zmian względem aktywności w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariancie bez mieszania (A) oraz w wariancie z mieszaniem (B). Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).



Rysunek 41. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności GPx (% zmian względem zawartości w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

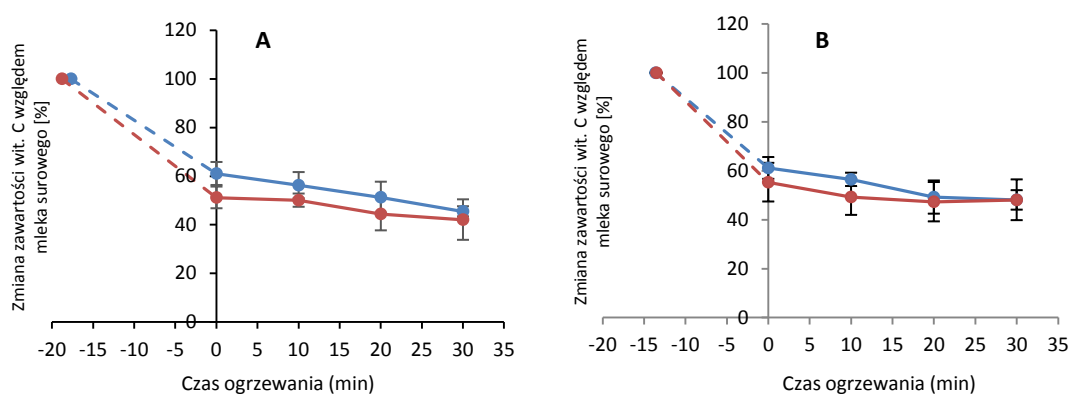
#### 9.6.1.4 Witamina C

Spośród witamin obecnych w mleku ludzkim, które wpływają na obronę organizmu przed ROS analizie ilościowej w mleku surowym oraz utrwalonym termicznie poddana została witamina C. Ze względu na wrażliwość tej witaminy na działanie czynników zewnętrznych, takich jak dostęp tlenu, czy działanie wysokiej temperatury używana jest jako marker zmian zachodzących podczas przetwarzania żywności. Stężenie witaminy C w surowym mleku kobiecym pochodzącym od różnych dawczyń było zmienne i wynosiło od 18,91 do 51,26 mg AsA/L, średnio 28,64 mg AsA/L. Wartości te porównywalne były ze średnim stężeniem witaminy C w surowym mleku ludzkim przedstawionymi przez Moltó-Puigmartí i in. (2011) na poziomie 55,6 mg AsA/l. Natomiast Romeu-Nadal i in. (2008) w swoich badaniach stwierdził średnie stężenie witaminy C w mleku wynoszące 35,5 mg AsA/L.

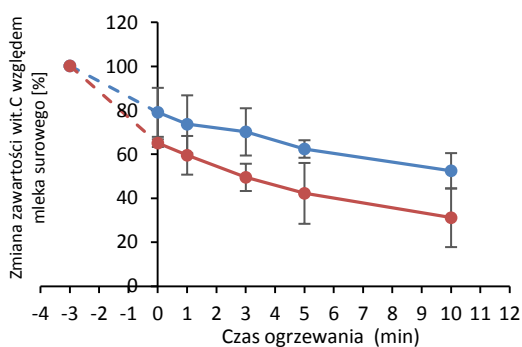
Mieszanie badanego materiału biologicznego podczas ogrzewania konwekcyjnego nie miało wpływu na poziom degradacji witaminy C. Zaobserwowano gwałtowny, blisko 40% spadek stężenia badanej witaminy w próbach mleka kobiecego pobranych do analizy w czasie uzyskania temp. 62,5°C i 66°C (Rys. 42AB). 30 minutowe ogrzewanie konwekcyjne, w obu wariantach procesu powodowało spadek stężenia witaminy C o dalsze 10% bez względu na stosowaną temperaturę. Abramovich i in. (2013) ogrzewając mleko kobiece w temp. 62,5°C przez 30 minut zaobserwowali około 40% spadek stężenia

witaminy C. Abramovich i in (2013) w swojej pracy stosował jednak ogrzewanie pod poduszką azotową co prawdopodobnie miało wpływ na niższy poziom degradacji wit. C niż przedstawiony w pracy.

Również wysoka temperatura generowana polem promieniowania mikrofalowego powodowała degradację witaminy C w mleku kobyecym. Już podczas uzyskiwania temperatury 62,5°C zaobserwowano spadek stężenia badanej witaminy o około 20% (Rys. 43). Ogrzewanie mleka kobyecgo w parametrach czasu i temperatury, w których uzyskano całkowitą inaktywację bakterii mleka kobyecgo (62,5°C; 5 minut) powodowało obniżenie zawartości witaminy C o około 50%. Wydłużenie czasu działania temperatury do 10 minut nie powodowało dalszego istotnego statystycznie zwiększenia poziomu degradacji witaminy C. Prowadzenie procesu w wyższej temp. (66°C) powodowało istotnie statystycznie większe straty witaminy C względem mleka ogrzewanego w temp. 62,5°C w analogicznym czasie ogrzewani



Rysunek 42. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia witaminy C (% zmian względem zawartości w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariacie bez mieszania (A) oraz w wariacie z mieszaniem (B). Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).



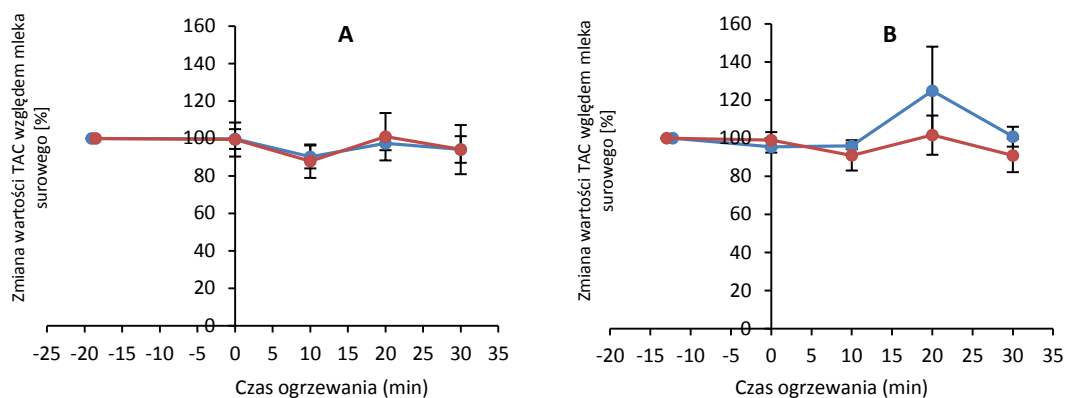
Rysunek 43. Wykres przedstawiający przebieg zawartości witaminy C (% zmian względem zawartości w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka kobyecgo. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

#### 9.6.1.5 Całkowita zdolność przeciwutleniająca (TAC)

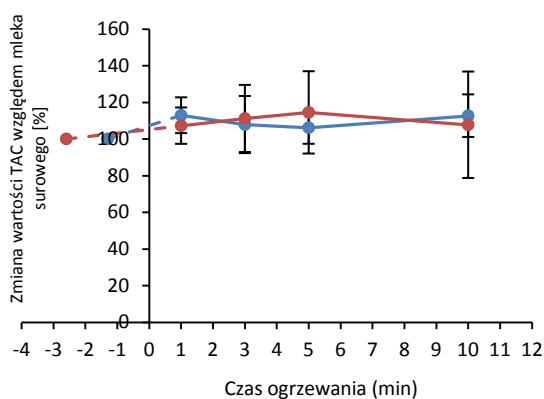
Wartość TAC w badanych próbach surowego mleka kobyecgo wynosiła od 21 do 33,9 mg TE/100mL. Wynik ten jest zgodny z danymi literaturowymi (Martysiak-Żurowska i in. 2012), gdzie TAC określona z wykorzystaniem testu ABTS dla surowego mleka ludzkiego wynosiła od 13,3 do 25,9 mg TE/100mL. Również Turoli i in. (2004) stosowali metodę wykorzystującą odczynnik ABTS do pomiaru TAC w mleku ludzkim, uzyskując średnią wartość równą  $3,15 \pm 0,63$  mmol TE/L, co odpowiada

78,84 mg TE/100mL. Na poziom wartości TAC w mleku matek karmiących może wpływać sposób żywienia, przebyte choroby czy przyjmowane przez kobiety używki (Szlagatys-Sidorkiewicz i in. 2012).

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, iż ogrzewanie konwekcyjne prowadzone w obu wariantach, jak również ogrzewanie polem mikrofalowym nie powoduje istotnych statystycznie zmian w wartości TAC (Rys. 44, 45), będącego miarą poziomu i aktywności nieenzymatycznych składników przeciwutleniających mleka kobiecego.



Rysunek 44. Wykres przedstawiający przebieg zmian wartości TAC (% zmian względem zawartości w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariacie bez mieszania (A) oraz w wariacie z mieszaniem (B). Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).



Rysunek 45. Wykres przedstawiający przebieg zmian wartości TAC (% zmian względem zawartości w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka kobiecego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

## PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, iż najbardziej odpornym na stosowane warunki ogrzewania konwekcyjnego, jak również polem promieniowania mikrofalowego enzymem przeciwutleniającym mleka ludzkiego jest SOD.

Porównując efekt pasteryzacji powszechnie stosowanej w BMK (62,5°C; 30 min) oraz ogrzewania mikrofalowego (62,5°C; 5 minut) zapewniającego bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka stwierdzono, iż bardziej zachowawcze w stosunku do aktywności CAT będzie zastosowanie ogrzewania mikrofalowego. W przypadku pozostałych analizowanych składników przeciwutleniających mleka

kobiecego nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie degradacji bez względu na stosowaną technikę ogrzewania.

Na uwagę zasługuje występowanie czasowego wzrostu aktywności SOD i GPx podczas procesu ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego odpowiednio po 1 i 3 minutach działania zadanych temperatur. Oba te enzymy zlokalizowane są w komórkach mleka kobiecego. W 1 ml mleka ludzkiego jest około 14000 komórek, w tym makrofagi, neutrofile, komórki nabłonkowe sutka oraz limfocyty (Cregan i in. 2007). Badania prowadzone przez Li i in. (2015) wykazały, iż działanie temp. 60°C przez 30 minut powoduje 97% spadek żywotności komórek somatycznych w mleku krowim. Można zatem przypuszczać, że czasowy wzrost aktywności SOD oraz GPx w próbkach mleka kobiecego ogrzewanych polem promieniowania mikrofalowego spowodowany jest uwolnieniem badanych enzymów ze struktur komórek mleka kobiecego wskutek ich rozpękania pod wpływem działania wysokiej temperatury. W mleku ogrzewanym konwekcyjnie nie zaobserwowano analogicznych zmian. Enzymy są z pewnością uwalniane z ludzkich komórek mleka również podczas pasteryzacji LTLT. Jednak temperatura próbki wzrasta w tym procesie bardziej stopniowo (62,5°C osiągnięto w około 12min) dlatego można założyć, że szybkość uwalniania enzymu z uszkodzonych komórek jest równoważona przez jego inaktywację pod wpływem działania wysokiej temperatury.

Czasowy wzrost aktywności enzymów może mieć też inną przyczynę, jednak dostępne w piśmiennictwie wnioski analiz wpływu ogrzewania mikrofalowego na enzymy nie są jednoznaczne. Wiele badań prowadzonych w ostatnich latach sugeruje raczej wyższą degradację enzymów w warunkach ogrzewania mikrofalowego niż w efekcie ogrzewania konwekcyjnego. Publikacje suponują że inaktywacja enzymów następuje pod wpływem innych niż termiczne oddziaływanie. Jednak symulacje wykazały, że zastosowane pole w typowym laboratoryjnym reaktorze mikrofalowym jest 3-4 rzędy wielkości zbyt niskie, aby wywołać zmiany konformacyjne w białkach lub enzymach (Damm i in. 2012). Inni autorzy na podstawie wyników badań sugerują występowanie korzystnego wpływu działania pola mikrofalowego na aktywność enzymów. Przedstawiają istnienie określonego nietermicznego efektu promieniowania mikrofalowego na strukturalne i funkcjonalne właściwości enzymów. Bezpośredni transfer energii między polem elektromagnetycznym i domenami białka polarnego może indukować modyfikację elastyczności enzymu, a w konsekwencji zmieniać właściwości enzymatyczne co może prowadzić do wyższej reaktywności grup funkcyjnych zaangażowanych w reakcję enzymatyczną (Mazumder, i in.2004). Horikoshi i in. (2016) wykazali, że promieniowanie mikrofalowe miało pozytywny wpływ na aktywność CAT, ale tylko w krótkim czasie, gdy czas ogrzewania wynosił mniej niż 3 minuty.

Zastosowane w pracy wartości parametrów obróbki termicznej nie powodowały istotnych statystycznie zmian w wartości TAC w mleku kobiecym, ale powodowały znaczącą degradację witaminy C w porównaniu z mlekiem surowym. Wynik ten może wydawać się niespójny, gdyż witamina ta jest jednym z nieenzymatycznych składników wykazujących działanie przeciwutleniające. Jednak wykazano również, że witamina C występująca w mleku na poziomie 50 mg/L ma tylko nieznaczący wpływ na wartość TAC oznaczoną metodą ABTS (Lebedeva 2017), co pokazuje jak istotny jest odpowiedni dobór metod oznaczania bioaktywnych składników tak skomplikowanej matrycy jak mleko kobiece.

Marinković i in. (2016) ogrzewając konwekcyjnie mleko kobiece w temperaturze 62,5°C przez 30 minut nie stwierdzili zmian wartości TAC mleka wykorzystując do oznaczenia metodę ORAC

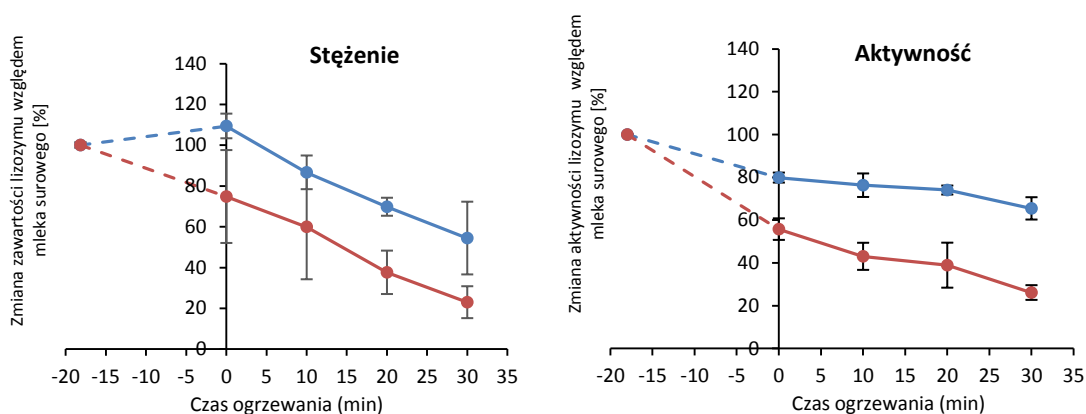
Mimo zadowalającego efektu ogrzewania konwekcyjnego prowadzonego w wariacie z mieszaniem w stosunku do składników przeciwutleniających należy pamiętać, że jednocześnie sprzyja to powstawaniu szkodliwych produktów utleniania lipidów. Dlatego też w kolejnym etapie badań skupiono się tylko na procesie ogrzewania konwekcyjnego prowadzonym bez mieszania.

## 9.6.2 Składniki przeciwdrobnoustrojowe

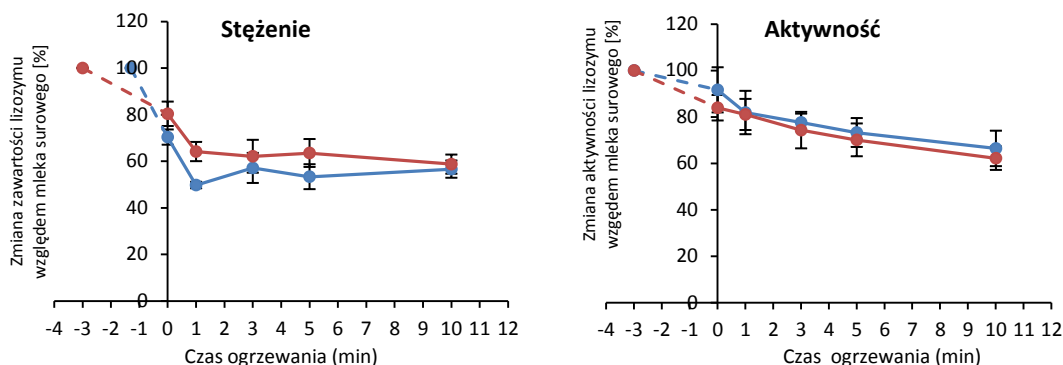
### 9.6.2.1 Lizozym

W badanych próbach surowego mleka ludzkiego zawartość lizozymu (LZ) wynosiła od 0,11 do 0,36 mg/mL, co jest charakterystyczne dla mleka dojrzałego. Montagne i in. (2001) oznaczyli stężenie LZ w mleku dojrzałym na poziomie 0,33 mg/mL. Oznaczona aktywność lizozymu w badanych próbach mleka kobiecego mieściła się w zakresie 22 300 – 25 800 U/mL. Sousa i in. (2014) aktywność LZ w mleku ludzkim odciągniętym w początkowej fazie laktacji (siarce) oznaczyli na poziomie około  $18\,000 \pm 570$  U/mL.

Ogrzewanie konwekcyjne powodowało spadek zarówno stężenia, jak i aktywności LZ w badanych próbach mleka ludzkiego, tym większy im wyższą temperaturę procesu i czas działania temperatury zastosowano (Rys. 46). Niewielki, około 10% wzrost stężenia LZ zaobserwowano w próbach mleka kobiecego pobranych w czasie uzyskania temp. 62,5°C (Rys. 46A). W mleku ludzkim ogrzewanym w temp. 66°C po analogicznym czasie stwierdzono spadek ilości badanego białka o 25% (Rys. 46A). Wraz ze spadkiem stężenia LZ w badanych próbach mleka kobiecego, wywołanego obróbką termiczną zaobserwowano jego niższą aktywność o około 20 i 40% odpowiednio w temp. 62,5 i 66°C (Rys 46B). Ogrzewanie mleka w stałej temperaturze prowadziło do dalszej degradacji badanego białka. Parametry ogrzewania konwekcyjnego powszechnie stosowane w BMK (62,5°C, 30 min) powodowały około 46% spadek zawartości oraz 35% spadek aktywności LZ. W mleku ogrzewanym w temp. 66°C przez 30 minut oznaczono niższą ilość badanego białka o 77%, natomiast aktywność o 74% (Rys. 46AB).



Rysunek 46. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia (A) oraz aktywności (B) LZ (% zmian względem zawartości/aktywności w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●)



Rysunek 47. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia (A) oraz aktywności (B) LZ (% zmian względem zawartości/ aktywności w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

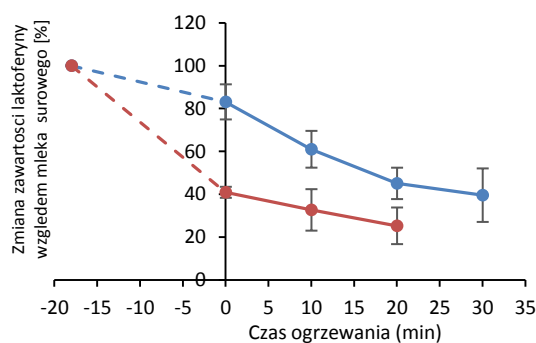
W parametrach czasu i temperatury ogrzewania mikrofalowego zapewniających bezpieczeństwo mikrobiologiczne (62,5°C; 5 min) zawartość LZ w mleku obniżyła się o ok. 50%, natomiast aktywność o ok. 27%. Działanie temp. 62,5°C przez maksymalny stosowany w trakcie ogrzewania mikrofalowego czas (10 min) nie prowadziło do dalszych istotnych statystycznie zmian w stężeniu oraz aktywności badanego białka (Rys. 47AB).

#### 9.6.2.2 Laktoferyna

W badanych próbach mleka kobiecego stężenie LF wynosiło średnio 1,86 g/L (zakres 1,74-2,1 g/L), co jest charakterystyczne dla mleka dojrzałego. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi. Zawartość LF w mleku ludzkim wynosi około 5,8 g/L w siarze, oraz około 2,2 g/L w mleku dojrzałym (Montagne i in, 2001).

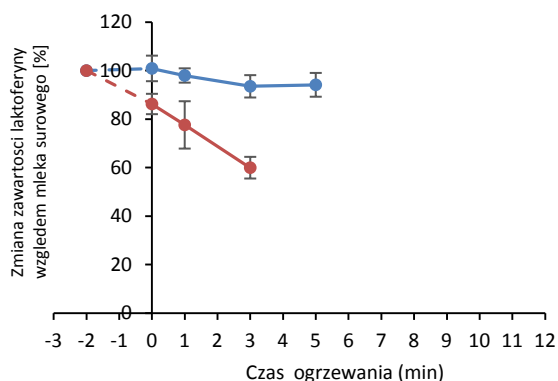
Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, iż badane białko wykazuje dużą wrażliwość na działanie wysokiej temperatury. Spadek stężenia był tym bardziej znaczący im wyższa temperatura i dłuższy czas procesu pasteryzacji stosowano. Ogrzewanie konwekcyjne mleka ludzkiego w temp. 62,5°C i 66°C powodowało spadek zawartości LF odpowiednio o około 20% i 60% w porównaniu do mleka surowego już zadanych czasie uzyskania przez próbę mleka zadanych temperatur (Rys. 48).

Pasteryzacja w stosowanych powszechnie w BMK parametrach (62,5°C; 30 min) spowodowała około 60  $\pm$  12,5% obniżenia się stężenia badanego białka. W próbce ogrzewanej w temp. 66°C przez 30 minut stężenie LF oznaczane było na poziomie 10% zawartości początkowej (Rys. 48).



Rysunek 48. Wykres przedstawiający przebieg zmian zawartości LF (% zmian względem zawartości w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

Poziom degradacji LF w mleku kobyecym ogrzewanym polem promieniowania mikrofalowego znacznie zależał od zastosowanej temperatury. Ogrzewanie mikrofalowe mleka kobyeciego prowadzonego w temp. 62,5°C przez czas 5 minut nie wpływało istotnie na stężenie LF w mleku ludzkim (Rys. 49). Zastosowanie wyższej temperatury procesu (66°C) powodowało zwiększenie poziomu degradacji badanego białka tym większy im dłuższy był czas prowadzenia procesu. W mleku kobyecym ogrzewanym w temp. 66°C przez 3 minuty około zaobserwowano 40% spadek stężenia LF (Rys. 49).



Rysunek 49. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia LF (% zmian względem zawartości w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

## PODSUMOWANIE

Składniki mleka kobyeciego wykazujące działanie przeciwdrobnoustrojowe wspomagają ochronę organizmu dziecka przed wpływem patogenów pochodzących ze środowiska zewnętrznego. Odporność lizozymu na wysoką temperaturę zależy między innymi od pH środowiska. W kwaśnym pH lizozym wykazuje dużą odporność na działanie wysokiej temperatury (Venkataramani i in. 2013). Odczyn mleka ludzkiego jest obojętny (pH 7-7,45) zatem można się spodziewać, że enzym ten będzie stosunkowo wrażliwy na stosowane parametry procesów. Stwierdzono, iż ogrzewanie konwekcyjne powoduje degradację lizozymu tym większą im wyższą temperaturę i dłuższy czas procesu zastosowano. W przypadku ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego wykazano, iż stosowane w doświadczeniu temperatury generują zbliżony efekt degradacyjny w stosunku do LZ. Zastosowanie ogrzewania konwekcyjnego i ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego w parametrach zapewniających bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka ludzkiego (odpowiednio 62,5°C; 30 min oraz 62,5°C; 5 min) powodują równoważny efekt degradacyjny względem badanego białka (około 50% spadek stężenia i około 30% aktywności). W przypadku ogrzewania konwekcyjnego uwzględniając odchylenia standardowe otrzymane wyniki są zgodne z tymi otrzymanymi przez Christen i in. (2013), którzy stwierdzili ok. 60% degradację ilości badanego białka oraz Viazis i in. (2007), którzy oznaczyli ok. 21% spadek aktywności.

W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć nieliczne dane o wpływie ogrzewania polem mikrofalowym na aktywność LZ w mleku kobyecym. Z badań przeprowadzonych przez Quan'a i in. (1992) wynika, że zastosowanie niskich mocy mikrofal pozwalających na uzyskanie średniej temperatury wynoszącej 33,5°C (zakres od 30°C do 53°C) przez 30s. Ogrzewanie w tych warunkach powodowało spadek aktywności lizozymu o ok. 20%. Użycie wysokiej mocy mikrofal generowało średnią temperaturę procesu wynoszącą 90,5°C (zakres od 72°C do 98°C) i w tych warunkach

analogiczny czas prowadzenia procesu powodował całkowitą degradację LZ. Szeroki zakres temperaturowy prowadzenia procesu ogrzewania polem mikrofalowym był spowodowany tym, iż badacze kontrolowali jedynie czas działania temperatury generowanej przy użyciu różnej mocy urządzenia, nie mieli możliwości pełnej kontroli temperatury, głównego czynnika degradacyjnego.

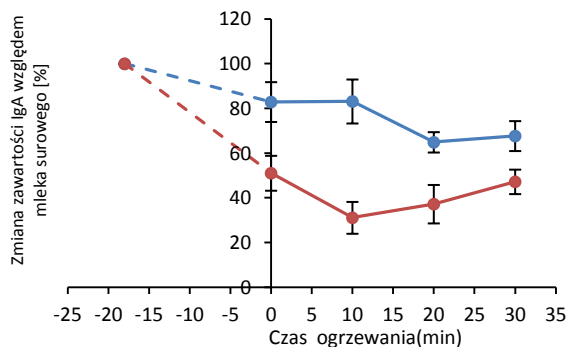
Wykazano, iż ogrzewanie mleka kobiecego polem promieniowania mikrofalowego w wartościach temperatury oraz czasu jej działania, w których uzyskuje się efekt pasteryzacji jest bardziej zachowawcze w stosunku do stężenia LF mleku kobiecym. W mleku ogrzewanym w tych parametrach oznaczono jedynie 5% spadek stężenia LF. Czank i in. (2009) wykazali, iż pasteryzacja holder prowadzi do  $77,6 \pm 14,7\%$  degradacji LF. Natomiast Chang i in. (2013) dla tych samych warunków ogrzewania określili  $66 \pm 35\%$  spadek stężenia tego enzymu w mleku ludzkim. W literaturze dostępne są jedynie dane dotyczące wpływu ogrzewania polem mikrofalowym na stężenie LF w sztucznej mieszance mleko zastępczej. Franco i in. (2012) wykazali, iż działanie promieniowania o mocy 450W i 550W przez 1 minutę nie powoduje zmian w zawartości LF w badanym roztworze mieszanki mleko zastępczej. Zwiększenie mocy urządzenia do 650W prowadzi do 30% spadku stężenia badanego białka. Trudno się jednak odnieść do powyższych wyników badań ze względu na brak informacji o wartości generowanej w tych warunkach temperatury.

### 9.6.3 Składnik immunologiczne

#### 9.6.3.1 Immunoglobulina A (IgA)

W badanych próbach mleka kobiecego stężenie IgA wynosiło średnio 1,1 g/L (zakres 0,86 - 1,34 g/L), co jest charakterystyczne dla mleka dojrzałego. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi przedstawionymi przez Araújo i in. (2005), który zawartość tego białka w mleku kobiecym dojrzałym oznaczył na poziomie około 0,90 g/L.

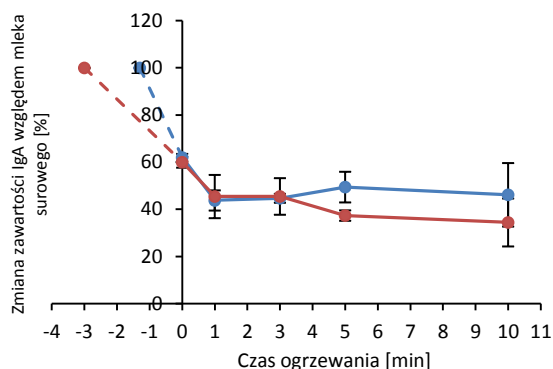
IgA jest białkiem podatnym na degradację pod wpływem wysokiej temperatury. Wykazano, iż zastosowanie ogrzewania konwekcyjnego mleka kobiecego powoduje spadek stężenia IgA o około 20% już w czasie dogrzewania próbek mleka do temperatury 62,5°C. Stosowane parametrów czasu i temperatury wykorzystywanych w BMK prowadziło do obniżenia ilości IgA w badanych próbach mleka kobiecego o 32% (Rys. 50). Prowadzenie procesu w temp. 66°C intensyfikowało poziom degradacji białka. W próbkach mleka kobiecego pobranych w czasie uzyskania zadanej temperatury stężenie IgA oznaczono na poziomie niższym o 55% w porównaniu z mlekiem surowym. W mleku ogrzewanym w tej temperaturze przez 30 minut nie zaobserwowano dalszego spadku zawartości badanego białka (Rys. 50).



Rysunek 50. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia IgA (% zmian względem zawartości w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu konwekcyjnego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).



Podczas ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego głównym etapem wpływającym na poziom degradacji IgA był czas uzyskania temp. 62,5°C i 66°C oraz pierwsza minuta ogrzewania w stałej temperaturze (Rys. 51). W tych parametrach czasu zaobserwowano obniżenie ilości badanego białka w próbach mleka kobiecego odpowiednio o około 40 i 55%. Dalsze przetrzymywanie próbek mleka w zadanych temperaturach nie wywierało już istotnego wpływu na poziom degradacji badanej immunoglobuliny (Rys. 51).



Rysunek 51. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia IgA (% zmian względem zawartości w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

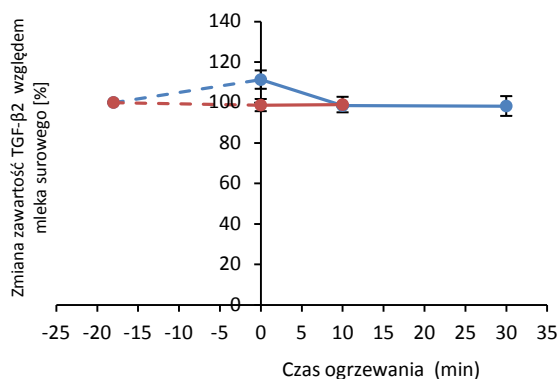
### 9.6.3.2 Transformujący czynnik wzrostu TGF- $\beta$ 2

Stężenie TGF- $\beta$ 2 w próbach mleka kobiecego nie poddanych ogrzewaniu oznaczano na poziomie średnio 220 pg/mL. Dane przedstawione w literaturze wskazują na bardzo szeroki zakres zawartości TGF- $\beta$ 2 w dojrzalym mleku ludzkim, od 592 do 2697pg/mL (Kalliomäki i in. 1999). Autorzy przedstawionych badań zasugerowali, że wahania zawartości TGF- $\beta$ 2 w mleku kobiecym związane są nie tylko z okresem laktacji, ale duży wpływ ma również zmienność osobnicza

Wykonane badania wykazały, że cytokina TGF- $\beta$ 2 obecna w mleku ludzkim jest odporna na działanie wysokiej temperatury przekazywanej w sposób konwekcyjny. Niespodziewanym rezultatem był niewielki, około 10% wzrost zawartości TGF- $\beta$ 2 w czasie uzyskania temp. 62,5°C przez badane próbki mleka kobiecego (Rys. 52).

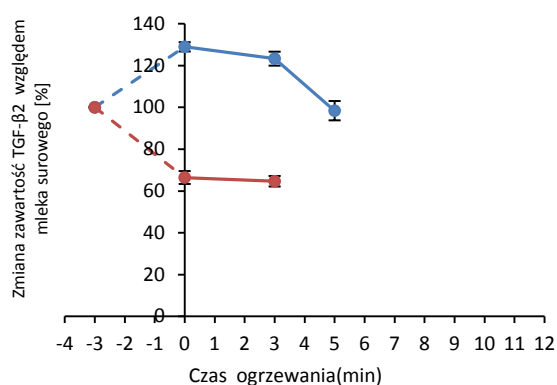
Prowadzenie procesu ogrzewania konwekcyjnego w temp. 62,5°C przez 30 minut nie powodowało istotnych statystycznie zmian w stężeniu badanego białka w stosunku mleka surowego (Rys. 52)

Podobnie jak w przypadku ogrzewania konwekcyjnego w mleku kobiecym ogrzewanym promieniowaniem pola mikrofalowego stwierdzono wzrost stężenia cytokiny TGF- $\beta$ 2 w czasie uzyskania temp. 62,5°C, jednak w tym przypadku był on wyższy i wynosił około 30 % (Rys. 53). W wartościach czasu i temperatury, w których uzyskuje się bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka ludzkiego ogrzewanego polem promieniowania mikrofalowego (62,5°C; 5 min) stężenie badanej cytokiny było porównywalne z stężeniem oznaczanym w mleku nie ogrzewanym (Rys. 53).



Rysunek 52. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia TGF-β2 (% zmian względem zawartości w mleku surowym ± SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

Zgola inny przebieg zmian zawartości TGF-β2 w mleku ludzkim zaobserwowano w efekcie ogrzewania mleka polem mikrofalowym w temp. 66°C (Rys. 49). Już na etapie uzyskania przez mleko kobiece zadanej temperatury zaobserwowano około 35% spadek stężenia badanej cytokiny. Przetrzywanie próbek w stałej temperaturze przez maksymalny zadany w trakcie doświadczenia czas nie powodowało dalszych zmian w zawartości.



Rysunek 53. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia TGF-β2 (% zmian względem zawartości w mleku surowym ± SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

## PODSUMOWANIE

Omawiane w pracy składniki immunochronne oraz immunomodulujące mleka ludzkiego wykazują zróżnicowaną odporność na działanie wysokiej temperatury. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, iż korzystniejsze ze względu na poziom zachowania IgA w mleku ludzkim jest pasteryzacja przy użyciu ogrzewania konwekcyjnego. Wpływ pasteryzacji holder na stężenie immunoglobuliny badał również Czank i in. (2009), który zaobserwował 27% obniżenie ilości badanego białka w mleku. Stwierdzono, iż ogrzewanie polem mikrofalowym w parametrach zapewniających bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka (62,5°C; 5 min) powoduje około 28% większą degradację badanego białka w porównaniu z parametrami ogrzewania konwekcyjnego powszechnie stosowanymi w BMK. Uzyskane analizy znajdują potwierdzenie w dostępnym piśmiennictwie. Quan i in. (1992) oznaczyli około 33%

spadek zawartości badanego białka ogrzewając polem mikrofalowym mleko ludzkie w zakresie temp. 20-53°C już po 30 sekundach działania temperatury. Podwyższając temperaturę prowadzenia procesu do 72-98°C zaobserwowali niemal całkowitą degradację IgA w mleku ludzkim.

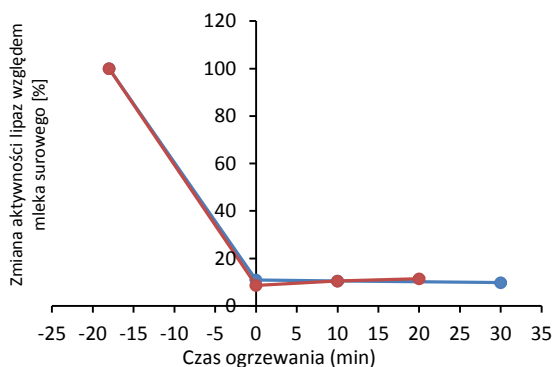
Z kolei cytokina TGF- $\beta$ 2 charakteryzowała się odpornością na stosowane warunki ogrzewania konwekcyjnego. Również Espinosa-Martos i in. (2013) wykazali, iż konwekcyjne ogrzewanie mleka ludzkiego w temp. 62,5°C przez 30 min nie powoduje degradacji TGF- $\beta$ 2, natomiast Akbache i in. (2011) wykazał, iż spadek zawartości cytokiny TGF- $\beta$ 2 w mleku krowim zachodzi dopiero w zakresie temperaturowym powyżej 66°C. Stosowany w niniejszym doświadczeniu czas ogrzewania konwekcyjnego w temperaturze 66°C przypuszczalnie nie był wystarczający do uwidocznienia zmian degradacyjnych badanej cytokiny. Wpływ ogrzewania polem mikrofalowym na cytokiny mleka kobiecego jak dotąd nie został opisany w dostępnej literaturze. Wzrost zawartości TGF- $\beta$ 2 w mleku ogrzewanym zarówno konwekcyjnie, jak i polem mikrofalowym w czasie dojścia do temp. 62,5°C podobnie jak w przypadku lizozymu oraz enzymów przeciwutleniających spowodowany jest prawdopodobnie uwolnieniem cytokiny z uszkodzonych struktur komórkowych komórek mleka kobiecego, takich jak limfocyty i monocyty (Li i in. 2015, McPherson i in. 2001). Przypuszczalnie zjawisko to występuje również w temp. 66°C, jednak dynamika zmian w tych parametrach może być tak znacząca, iż powoduje znacznie szybszą degradację badanego białka. Przypuszcza się, iż zmiany degradacyjne zaobserwowane w przypadku ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego spowodowane są wystąpieniem efektu nietermicznego działania pola mikrofalowego, który może powodować zmianę konformacji cząsteczki, przez co nie jest ona możliwa do oznaczenia wykorzystanym w badaniu testem diagnostycznym.

## 9.6.4 Enzymy trawienne

### 9.6.4.1 Lipaza

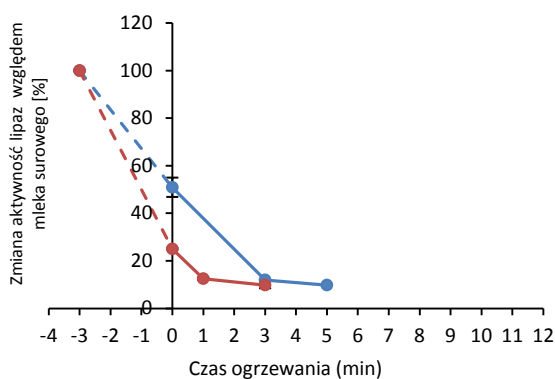
Aktywność lipaz w mleku kobiecym stwierdzono w zakresie 131,05 - 143,45 U/mL. Uzyskane wyniki są analogiczne do przedstawionych w dostępnych danych literaturowych. Christen i in. (2013) używając tego samego testu jak w prezentowanych badaniach oznaczył aktywność lipaz w surowym mleku kobiecym na poziomie około 120 U/mL.

W przypadku ogrzewania konwekcyjnego już w czasie dojścia temperatury próbek mleka zarówno do temp. 62,5°C jak 66°C stwierdzono około 90% spadek aktywności badanych enzymów (Rys. 54).



Rysunek 54. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności lipaz (% zmian względem aktywności w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

Działanie wysokiej temperatury generowanej polem promieniowania mikrofalowego również prowadziło do drastycznego spadku aktywności lipaz w badanych próbach mleka ludzkiego, jednak w tym przypadku przebieg zmian zachodził mniej gwałtownie. W czasie uzyskania przez mleko temp. 62,5°C i 66°C stwierdzono mniejszą aktywności tej grupy enzymów o odpowiednio 50 i 75% względem aktywności w mleku surowym. Prowadzenie procesu w stałej temperaturze powodowało dalsze obniżanie aktywności badanych enzymów. W mleku kobiecym ogrzewanym mikrofalowo w temp. 62,5°C przez 5 min, aktywność lipaz oznaczana była na takim samym poziomie jak w mleku ogrzewanym konwekcyjnie w temp. 62,5°C przez 30 min. tj. 10% aktywności początkowej (Rys. 55).



Rysunek 55. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności lipaz (% zmian względem aktywności w mleku surowym  $\pm$  SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego mleka ludzkiego. Temp. 62,5°C (●), 66°C (●).

## PODSUMOWANIE

Spośród analizowanych składników biologicznie aktywnych mleka kobiecego największą wrażliwość na obróbkę termiczną prowadzoną zarówno poprzez ogrzewanie konwekcyjne, jak również ogrzewanie polem promieniowania mikrofalowego wykazały lipazy. Stosowane parametry obu metod utrwalania, w których uzyskano efekt pasteryzacji, powodowały niemal całkowitą degradację lipaz obecnych w mleku ludzkim. Również Baro i in. (2001) oraz Henderson i in. (1998) wykazali, iż stosowane powszechnie w BMK pasteryzacja holder (62,5°C przez 30 min) powodują niemal całkowity spadek aktywności lipaz w mleku kobiecym. W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych dotyczących wpływu ogrzewania polem mikrofalowym na aktywność lipaz w mleku ludzkim.

Na dynamikę spadku aktywności lipaz w badanych próbach mleka ludzkiego ogrzewanym zarówno w sposób konwekcyjny jak również przy wykorzystaniu pola mikrofalowego ma prawdopodobnie wpływ szybkość przyrostu temperatury próbki. Generowanie temperatury przy wykorzystaniu pola mikrofalowego pozwala na znaczne skrócenie tego czasu (o ok. 85%), przez co możliwe było zaobserwowanie zmian aktywności zachodzących w trakcie ogrzewania.

## 10. Wnioski

1. Termowrażliwe drobnoustroje referencyjne: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* zawieszane w mleku UHT (badania modelowe) w ilości  $5 \log_{10} \text{ j.t.k./mL}$  inaktywowane są w czasie uzyskania przez próbę mleka temperatury  $66^{\circ}\text{C}$  podczas ogrzewania konwekcyjnego.
2. Aby uzyskać efekt pasteryzacji w przypadku drobnoustrojów termoodpornych z rodzaju *Enterococcus* sp konieczne jest zastosowanie ogrzewania konwekcyjnego mleka UHT w temperaturze  $70^{\circ}\text{C}$  przez czas 10 minut.
3. Mieszanie próby mleka UHT w trakcie ogrzewania konwekcyjnego pozwala skrócić czas działania wysokiej temperatury, w którym uzyskuje się efekt pasteryzacji jedynie względem bakterii termowrażliwych.
4. Ogrzewanie prób mleka UHT polem promieniowania mikrofalowego pozwala na uzyskanie efektu pasteryzacji wobec drobnoustrojów termowrażliwych i termoodpornych bakterii z rodzaju *Enterococcus* zawieszonych w mleku w ilości  $5 \log_{10} \text{ j.t.k./mL}$  w znacząco krótszym całkowitym czasie ogrzewania, niż przy zastosowaniu ogrzewania konwekcyjnego, odpowiednio o 67% i 53%.
5. Działanie ciśnienia 193 MPa w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  nie jest wystarczające do inaktywacji analizowanych w badaniach modelowych drobnoustrojów referencyjnych zarówno termoodpornych jak i termowrażliwych.
6. Akceptowany przez BMK poziom bakterii po procesie pasteryzacji uzyskuje się już w czasie osiągnięcia przez próbę mleka temperatury  $62,5^{\circ}\text{C}$ , biorąc jedynie pod uwagę wytyczne BMK dla mleka przed procesem pasteryzacji, które nie definiują poziomu drobnoustrojów termoodpornych. Jednak ze względu na możliwość wystąpienia w mleku drobnoustrojów charakteryzujących się wysoką termoodpornością, które nie są uwzględnione w wytycznych BMK zmiana dotychczasowo obowiązujących parametrów obróbki termicznej nie jest wskazana.
7. W wyniku ogrzewania mleka kobiecego polem promieniowania mikrofalowego efekt pasteryzacji na poziomie akceptowanym przez BMK uzyskuje się po zastosowaniu 5 minutowej obróbki termicznej mleka w temperaturze  $62,5^{\circ}\text{C}$ .
8. Ogrzewanie mleka kobiecego polem promieniowania mikrofalowego w wartościach temperatury i czasu jej działania, w których uzyskuje się efekt pasteryzacji oraz poddanie mleka pasteryzacji holder nie powoduje zmian w zawartości składników odżywczych, jak również nie wpływa na skład i zawartość kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka kobiecego, aktywność SOD, jak również na poziom cytokiny TGF- $\beta$ 2.
9. Ogrzewanie mleka kobiecego polem promieniowania mikrofalowego w wartościach parametrów, w których uzyskuje się efekt pasteryzacji nie generuje, ani pierwotnych ani wtórnych produktów utleniania lipidów. Długotrwałe działanie wysokiej temperatury podczas pasteryzacji holder działa degradacyjnie w stosunku do składników lipidowych mleka, co przejawia się statystycznie istotnym wzrostem zawartości wtórnych produktów utleniania lipidów.
10. Lizozym oraz lipazy mleka kobiecego wykazują dużą wrażliwość na obróbkę termiczną bez względu na sposób generowania temperatury pasteryzacji.

11. Zastosowanie techniki pasteryzacji z użyciem pola promieniowania mikrofalowego pozwala uzyskać wyższy poziom retencji CAT oraz LF w mleku kobyliczym w porównaniu z pasteryzacją holder.
12. IgA mleka kobyliczego wykazuje większą stabilność w mleku kobyliczym poddanym pasteryzacji holder w porównaniu z parametrami ogrzewania polem promieniowania mikrofalowego, w których uzyskuje się efekt pasteryzacji.
13. Uzyskane wyniki badań pozytywnie opiniują możliwość wykorzystania pasteryzacji termicznej polem promieniowania mikrofalowego jako metody alternatywnej wobec pasteryzacji holder wykorzystywanej w BMK. Jednak konieczne jest potwierdzenie czy mikrofałe nie wywierają innego niż termiczny efekt, co może sugerować czasowy wzrost aktywności niektórych składników bioaktywnych mleka podczas stosowania obróbki termicznej polem mikrofalowym.

## 11. Spis rysunków

Rysunek 1. BMK w Polsce (www.bankmleka.pl) .....	12
Rysunek 2. Zmiany zawartości mikroflory w gruczole piersiowym kobiety w trakcie laktacji (Fernandez i in. 2013).....	29
Rysunek 3. Potencjalne źródła bakterii występujących w mleku kobiecym (Fernandez i in. 2013).....	30
Rysunek 4. Schemat procesu chłodzenia w pasteryzatorze mikrofalowym firmy Enbio Technology Sp. z o.o. ....	43
Rysunek 5. Schemat instalacji próbki w zbiorniku z medium chłodniczym. (Malinowska Pańczyk i in. 2013).....	44
Rysunek 6. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczania zawartości dialdehydu malonowego MDA. ..	46
Rysunek 7. Schemat oznaczania aktywności SOD przy wykorzystaniu testu Superoxide Dismutase Assay Kit firmy Cayman .....	48
Rysunek 8. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w mleku ludzkim. ....	49
Rysunek 9. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczenia stężenia aldehydu mrówkowego w próbach mleka kobiecego .....	50
Rysunek 10. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczania całkowitej zawartości witaminy C.....	52
Rysunek 11. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczania TAC w próbach mlekaludzkiego.....	53
Rysunek 12. Przykładowa krzywa kalibracyjna do oznaczania stężenia lizozymu w próbach mleka kobiecego sporządzana w programie Gen5 obsługujący hybrydowy czytnik wielodetekcyjny Synergy HT, BioTek. ....	54
Rysunek 13. Przykładowa krzywa kalibracyjna zależności pola powierzchni pików uzyskanego techniką HPLC od stężenia laktoferyny (n=3). ....	55
Rysunek 14. Przykładowa krzywa kalibracyjna do oznaczania stężenia sIgA w próbach mleka kobiecego sporządzana w programie Gen5 obsługujący hybrydowy czytnik wielodetekcyjny Synergy HT, BioTek. ....	56
Rysunek 15. Przykładowa krzywa kalibracyjna oznaczania stężenia TGF-β2 w próbach mleka ludzkiego. ....	57
Rysunek 16. Przykładowy wykres temperaturowy procesu pasteryzacji holder sporządzony przy wykorzystaniu oprogramowania załączonego do pasteryzatora STERIFEED-T30 wykorzystywanego w BMK w Toruniu .....	59
Rysunek 17. Wykres temperaturowy ogrzewania mikrofalowego sporządzony przy wykorzystaniu oprogramowania załączonego do prototypu pasteryzatora mikrofalowego skonstruowanego przez firmę Enbio Technology Sp. z o. o.....	60
Rysunek 18. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii <i>S. aureus</i> PCM 2054 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia ±SD) .....	63
Rysunek 19. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii <i>S. epidermidis</i> PCM 2118 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia±SD) .....	63
Rysunek 20. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii <i>E. faecalis</i> PCM 896 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia ± SD) .....	65
Rysunek 21. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii <i>E. durans</i> PCM 1957 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia ± SD) .....	66
Rysunek 22. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii <i>E. hirae</i> PCM 2559 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia ± SD) .....	67

Rysunek 23. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii <i>E. coli</i> K-12 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia $\pm$ SD).....	68
Rysunek 24. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego bez mieszania (A) i z mieszaniem (B) oraz ogrzewania mikrofalowego (C) na przeżywalność bakterii <i>P. aeruginosa</i> PCM 499 zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia $\pm$ SD). .....	69
Rysunek 25. Wpływ wysokiego ciśnienia w ujemnej temperaturze na przeżywalność bakterii zawieszonych w mleku UHT (wartość średnia $\pm$ SD) .....	72
Rysunek 26. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego w temp. 62,5°C na przeżywalność OLD, bakterii kwasu mlekowego, z rodzaju <i>Enterococcus sp.</i> , z grupy coli, z rodzaju <i>Streptococcus sp.</i> oraz gronkowców koagulazo-dodatnich.....	74
Rysunek 27. Wpływ ogrzewania mikrofalowego w temp. 62,5°C na przeżywalność OLD, bakterii kwasu mlekowego, z rodzaju <i>Enterococcus sp.</i> , z grupy coli, z rodzaju <i>Streptococcus sp.</i> oraz gronkowców koagulazo-dodatnich.....	75
Rysunek 28. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego w temp. 66°C na przeżywalność OLD, bakterii kwasu mlekowego, z rodzaju <i>Enterococcus sp.</i> , z grupy coli, z rodzaju <i>Streptococcus sp.</i> oraz gronkowców koagulazo-dodatnich.....	77
Rysunek 29. Wpływ ogrzewania polem mikrofalowym w temp. 66°C na przeżywalność OLD, bakterii kwasu mlekowego, z rodzaju <i>Enterococcus sp.</i> , z grupy coli, z rodzaju <i>Streptococcus sp.</i> oraz gronkowców koagulazo-dodatnich . .....	78
Rysunek 30. Wpływ ogrzewania konwekcyjnego w temp. 70°C na przeżywalność OLD, bakterii kwasu mlekowego, z rodzaju <i>Enterococcus sp.</i> , z grupy coli, z rodzaju <i>Streptococcus sp.</i> oraz gronkowców koagulazo-dodatnich.....	79
Rysunek 31. Wpływ ogrzewania mikrofalowego w temp. 70°C na przeżywalność OLD, bakterii kwasu mlekowego, z rodzaju <i>Enterococcus sp.</i> , z grupy coli, z rodzaju <i>Streptococcus sp.</i> oraz gronkowców koagulazo-dodatnich.....	80
Rysunek 32. Wykres przedstawiający przebieg zmian zawartości LP[% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariancie z bez mieszania (A) oraz w wariancie z mieszaniem (B).....	89
Rysunek 33. Wykres przedstawiający przebieg zmian zawartości LP[% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego. ....	90
Rysunek 34. Wykres przedstawiający przebieg zmian zawartości MDA [% zmian względem aktywności w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariancie bez mieszania (A) oraz w wariancie z mieszaniem (B).....	90
Rysunek 35. Wykres przedstawiający przebieg zmian zawartości MDA [% zmian względem aktywności w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego. ....	91
Rysunek 36. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności SOD (% zmian względem aktywności w mleku surowym $\pm$ SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariancie bez mieszania (A) oraz w wariancie z mieszaniem (B).....	93
Rysunek 37. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności SOD [% zmian względem aktywności w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego. ....	94
Rysunek 38. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności CAT (% zmian względem aktywności w mleku surowym $\pm$ SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariancie bez mieszania (A) oraz w wariancie z mieszaniem (B).....	94
Rysunek 39. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności CAT (% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego. ....	95
Rysunek 40. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności GPx (% zmian względem aktywności w mleku surowym $\pm$ SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariancie bez mieszania (A) oraz w wariancie z mieszaniem (B).....	96
Rysunek 41. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności GPx [% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego. ....	96



Rysunek 42. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia witaminy C(% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariancie bez mieszania (A) oraz w wariancie z mieszaniem (B).....	97
Rysunek 43. Wykres przedstawiający przebieg zawartości witaminy C(% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego. ....	97
Rysunek 44. Wykres przedstawiający przebieg zmian wartości TAC [% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka ludzkiego w wariancie bez mieszania (A) oraz w wariancie z mieszaniem (B).....	98
Rysunek 45. Wykres przedstawiający przebieg zmian wartości TAC [% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego w temperaturze.....	98
Rysunek 46. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia (A) oraz aktywności (B) LZ(% zmian względem zawartości/aktywności w mleku surowym $\pm$ SD) podczas ogrzewania konwekcyjnego mleka kobycego.....	100
Rysunek 47. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia (A) oraz aktywności (B) LZ[% zmian względem zawartości/ aktywności w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego. ....	101
Rysunek 48. Wykres przedstawiający przebieg zmian zawartości LF(% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD) podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego.. ....	101
Rysunek 49. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia LF(% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD) podczas procesu ogrzewania mikrofalowego. ....	102
Rysunek 50. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia IgA [% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu konwekcyjnego mleka kobycego.....	103
Rysunek 51. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia IgA [% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego. ....	104
Rysunek 52. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia TGF- $\beta$ 2 [% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego.....	105
Rysunek 53. Wykres przedstawiający przebieg zmian stężenia TGF- $\beta$ 2 [% zmian względem zawartości w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego. ....	105
Rysunek 54. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności lipaz [% zmian względem aktywności w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania konwekcyjnego mleka kobycego.....	106
Rysunek 55. Wykres przedstawiający przebieg zmian aktywności lipaz [% zmian względem aktywności w mleku surowym $\pm$ SD] podczas procesu ogrzewania mikrofalowego .....	107

## 12. Spis tabel

Tabela 1. Wybrane przeciwwskazania medyczne do karmienia naturalnego od strony matki i dziecka. ...	11
Tabela 2. Wymagania mikrobiologiczne dla mleka kobiecego przyjmowanego do banku mleka oraz po procesie pasteryzacji (Rosiak i in. 2017). .....	14
Tabela 3. Zawartość głównych składników mineralnych w mleku kobiecym w różnych okresach laktacji (mg/100 mL)* (Shi i in. 2011). .....	19
Tabela 4. Drobnoustroje wyizolowane z mleka kobiecego wg. Fernandez i in. (2013). .....	30
Tabela 5. Wpływ pasteryzacji holder (62,5°C/ 30 min) na wybrane składniki mleka kobiecego. ....	33
Tabela 6. Charakterystyka dawczyń. ....	38
Tabela 7. Średni czas ogrzewania prób, po którym badane próby mleka osiągnęły żądaną temperaturę (średnia ± SD). .....	60
Tabela 8. Zawartość składników odżywczych w mleku kobiecym surowym i ogrzewanym konwekcyjnie w wybranych wartościach temperatury i czasu jej działania (zawartość średnia ± SD). .....	83
Tabela 9. Zawartość składników odżywczych w mleku kobiecym surowym i ogrzewanym mikrofalowo w wybranych wartościach temperatury i czasu jej działania (zawartość średnia ± SD). .....	83
Tabela 10. Skład KT w tłuszczu mleka kobiecego surowego i ogrzewanego mikrofalowo w temp. 62,5°C w zadanych parametrach czasu (% ogólnej zawartości KT). .....	85
Tabela 11. Skład KT w tłuszczu mleka kobiecego surowego i ogrzewanego mikrofalowo w temp. 66°C w zadanych parametrach czasu (% ogólnej zawartości KT). .....	86
Tabela 12. Skład KT w tłuszczu mleka kobiecego surowego i ogrzewanego konwencjonalnie w temp. 62,5°C w zadanych parametrach czasu (% ogólnej zawartości KT). .....	87
Tabela 13. Skład KT w tłuszczu mleka kobiecego surowego i ogrzewanego konwencjonalnie w temp. 66°C w zadanych parametrach czasu (% ogólnej zawartości KT). .....	88

### 13. Piśmiennictwo

1. Goldenberg RL., Hauth JC., Andrews WW. (2000) Intrauterine infection and preterm delivery. *The New England Journal of Medicine*, 342, 1500-1507
2. Abramovich M., Friel JK., Hossain Z. (2013) Polyunsaturated fatty acids, riboflavin and vitamin C: effect of different storage conditions of human milk. *Vitamins & Minerals*, doi:10.4172/vms.1000110
3. Agarwal S., Davis S., Gangur V. (2011) Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations. *Journal of Human Lactation*, 27, 171-186
4. Ahmed J., Ramaswamy HS. (2007) Microwave pasteurization and sterilization of foods. *Handbook of Food Preservation*, Second Edition (ed. M.S. Rahman), CRC Press LLC, London
5. Akbache A., Rocafi A., Saffon M., Lamiot E., Moroni O., Turgeon S., Richard C., Gauthier S., Pouliot Y. (2011) Effect of heating on the distribution of transforming growth factor- $\beta$ 2 in bovine milk. *Food Research International*, 44, 28-32
6. Ala-Houhala M., Koskinen T., Parviainen MT., Viskorpi JK., (1988) 25-Hydroxyvitamin D and vitamin D in human milk: effects of supplementation and season. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 48, 1057-1060
7. Albesharat R., Ehfmann MA., Korakli M., Yazaji S., Vogel RF. (2011) Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in fermented food, Breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*, 148-155
8. Alexander VN., Northrup V., Bizzarro MJ. (2011) Antibiotic exposure in the newborn intensive care unit and the risk of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatrics*, 159, 392-397
9. Alkaladi A., Afifi M., Kamal R. (2014) Application of microwave as an alternative home pasteurization method for camel milk; microbiological, physicochemical and biochemical study. *Bothalia Journal*, 44, 301-311
10. Alpas H., Kalchayanand N., Bozoglu F., Ray B. (2000) Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 33-42
11. American Academy of Pediatrics (2004) Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics*. 114, 297-316
12. American Academy of Pediatrics. (2003) Transmission of infectious agents via human milk. *Report of the Committee on Infectious Diseases*, 118-121
13. Ankrah NA., Appiah-Opong R., Dzokoto C. (2000) Human breastmilk storage and the glutathione content. *Journal of Tropical Pediatrics*, 46, 111-113
14. Arai M., Imai H., Koumura T., Yoshida M., Emoto K., Umeda M., Chiba N., Nakaqawa Y. (1999) Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 4924-4933
15. Araújo ED., Gonçalves AK., Cornetta MC., Cunha H., Cardoso ML., Morais SS., Giraldo PC. (2005) Evaluation of the secretory immunoglobulin A levels in the colostrum and milk of mothers of term and pre-term newborns. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 9, 357-362
16. Arnold L. (2002) The cost-effectiveness of using banked donor milk in the neonatal intensive care unit: prevention of necrotizing enterocolitis. *Journal of Human Lactation*, 18, 172-177.
17. Artym J., Zimecki M. (2005) Rola laktoferyny w prawidłowym rozwoju noworodka. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 59, 421-432.
18. Artymiuk P., Blake C., Grace D., Oatley S., Phillips D., Sternberg M. (1979) Crystallographic studies of the dynamic properties of lysozyme. *Nature*, 280, 563-568.
19. Atmaca S., Akdag Z., Dasdag S., Celik S. (1996) Effect of microwaves on survival of some bacterial strains. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 43, 371-378.
20. Auestad N., Scott DT., Janowsky JS., Jacobsen C., Carroll RE., Montalto MB., Halter R., Qiu W., Jacobs JR., Connor WE., Connor SL., Taylor JA., Neuringer M., Fitzgerald KM., Hall RT. (2003)

Visual, cognitive, and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. *Pediatrics*, 112, 177-183

21. Aydin S., Aydin S., Ozkan Y., Kumru S. (2006) Ghrelin is present in human colostrum, transitional and mature milk. *Peptides*, 27, 878-882.
22. Balla G., Jacob HS., Eaton JW. (1991) Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 11, 1700-1711
23. Ballard O., Morrow AL. (2013) Human milk composition nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60, 49-74
24. Baregamian N, Song J, Jeschke MG, Evers BM, Chung DH. (2006) IGF-1 protects intestinal epithelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Surgical Research*, 136, 31-7
25. Baro C., Giribaldi M., Arslanoglu S., Giuffrida M., Dellavalle G., Conti A., Tonetto P., Biasini A., Coscia A., Fabris C., Moro G., Cavallarin L., Bertino E. (2011) Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Frontiers in Bioscience*, 3, 818-829.
26. Barry H., Dumay EM., Cheftel JC. (1998) Influence of pressure-assisted freezing on the structure, hydration and mechanical properties of a protein gel. *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry*, Royal Society of Chemistry, 343-353
27. Bauer J., Gerres J. (2011) Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clinical Nutrition*, 30, 215-220.
28. Baumer JH. (2004) Guidelines for the establishment and operation of human milk banks. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*, 89, 27-28.
29. Becker K., Harmsen D., Mellmann A., Meier C., Schumann P., Peters, G., von Eiff C. (2004) Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of Staphylococcus species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4988-4995
30. Belizi S., Nazarova I., Klimova I., Prokof'ev V., Pushkina N. (1999) Antioxidant properties of lactoferrin from human milk. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 127, 471-473
31. Beljaars L., van der Strate B., Bakker H. (2004) Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Research*, 63, 197-208
32. Benet GU., (2005) High pressure low temperature processing of foods: impact of metastable phases on process and quality parameters. Doktorarbeit, der Technische Universität Berlin
33. Berg RD. (1995) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends in Microbiology*, 3, 149-154.
34. Bernt KM., Walker WA. (1999) Human milk as a carrier of biochemical messages. *Acta Paediatrica*, 430, 27-41.
35. Bert F., Maubec E., Bruneau B., Berry P., Lambert-Zechovsky N. (1998) Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 39:53-62
36. Beyer WF., Fridovich I. (1988) Catalases- with and without heme. *Basic Life Sciences*, 49, 651-661
37. Białek A., Tokarz A., Romanowicz M. (2011) The impact of selected nutritional factors on cis-9, trans-11 octadecadienoate content in milk of breastfeeding women. Part I. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 92, 840-843
38. Bierie B., Moses H. (2006) TGF b: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, 506-520
39. Bode L. (2012) Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22, 1141-1162
40. Boehm G., Stahl B. (2007) Oligosaccharides from milk. *The Journal of Nutrition*, 137, 847S-849S
41. Boesmans W., Gomes P., Janssens J., Tack J., Vanden Berghe P. (2008) Brain-derived neurotrophic factor amplifies neurotransmitter re-sponses and promotes synaptic communication in the enteric nervous system. *Gut*, 57, 314-322

42. Brandtzaeg P. (2003) Mucosal immunity: integration between mother and the breastfed infant. *Vaccine*, 21, 3382-3388.
43. Brock J. (2002) The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 1-6.
44. Bryś J., Gruszyńska E., Kowalska D. (2015) Mleko matki- Pierwsza żywność w życiu człowieka. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 96, 387-398
45. Buonocore G., Perrone S. (2006) Biomarkers of oxidative stress in the fetus and newborn. *Hematologica Rapports*, 2, 103-107
46. Burrin DG. (2002) Key nutrients and growth factors for the neonatal gastrointestinal tract. *Clinics in Perinatology*, 29, 56-96
47. Burton GW. (1994) Vitamin E: molecular and biological function. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53, 251-262
48. Cadenas E. (1997) Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6, 391-397
49. Callewaert L., Michiels C. (2010) Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, 35, 127-160
50. Carver JD., Barness LA. (1996) Trophic factors for the gastrointestinal tract. *Clinics in Perinatology*, 23, 265-85
51. Castellote C., Casillas R., Ramírez-Santana C., Pérez-Cano FJ., Castell M., Moretones MG., López-Sabater MC., Franch A. (2011) Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *The Journal of Nutrition*, 141, 1181-1187
52. Chan D., Goruk S., Becker AB., Subbarao P., Mandhane PJ., Turvey SE., Lefebvre D., Sears MR., the CHILD Study investigator., Field CJ., Azad MB. (2017) Adiponectin, leptin and insulin in breast milk: associations with maternal characteristics and infant body composition in their first year of life. *International Journal of Obesity*, 1-8
53. Chang J., Chen C., Fang L., Tsai Ch., Chang Y., Wang T. (2013) Influence of prolonged storage process pasteurization, and heat treatment on biologically active human milk proteins. *Pediatrics and Neonatology*, 54, 360-366
54. Chatterton DEW., Rasmussenb JT., Heegaardb CW., Sørensenb ES., Petersenb TE. (2004) In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Research on biological functions. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 373-383
55. Cheftel JC. (1995). Review: High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*, 1, 75-90
56. Chelikani P., Carpena X., Fita I., Loewen PC. (2003) An electrical potential in the Access channel of catalases enhances catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 31290-31296
57. Chen YT. (2000) Defects in galactose metabolism. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 16th ed. Philadelphia, 413-414
58. Chipman D., Sharon N. (1969) Mechanism of lysozyme action. *Science*, 165, 454-465
59. Choudhry O., Gathwala G., Singh J. (2010) Vancomycin resistant Enterococci in neonatal ICU-A Rising menace. *Indian Journal of Pediatrics*, 77, 1446-1447
60. Christ A., Blumberg R. (1997) The intestinal epithelial cell: immunological aspects. *Seminars in Immunopathology*, 18, 449-461
61. Christen L., Lai ChT., Hartman B., Geddes DT. (2013) Ultraviolet-C irradiation. A novel pasteurization method for donor human milk. *PLoS One*, 8, 6
62. Christen L., Lai ChT., Hartman B., Hartman PE., Geddes DT. (2013) The effect of UV-C pasteurization on bacteriostatic properties and immunological proteins of donor human milk. *PLoS One*, 8, 12
63. Cichosz G., Czeczot H. (2011) Rzekomo zdrowe tłuszcze roślinne. *Polski Merkuriusz Lekarski*, 31, 239-243
64. Cichosz G., Czeczot H. (2011) Stabilność oksydacyjna tłuszczów jadalnych – konsekwencje zdrowotne. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 44, 50-60

65. Cichosz G., Czczot H. (2011) Tłuszcz mlekowy- źródło antyoksydantów w diecie człowieka. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 1, 8-16
66. Contador R., Delegado-Adamez J., Delegado FJ., Cava R., Ramirez R. (2013) Effect of thermal pasteurisation or high pressure processing on immunoglobulin and leukocyte contents of human milk. *International Dairy Journal*, 32, 1-5
67. Cooper AR., Barnett D., Gentles E., Cairns L., Simpson JH. (2013) Macronutrient content of donor human breast milk. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*, 98, 539-541
68. Coppa GV., Zampini L., Galeazzi T., Facinelli B., Ferrante L., Capretti R., Orazio G. (2006) Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatric Research*, 59, 377-382
69. Cortese F., Scicchitano P., Gesualdo M., Filaninno A., De Giorgi E., Schettini F., Laforgia N., Ciccone MM. (2016) Early and late infections in newborns: where do we stand? *A Review Pediatrics and Neonatology*, 57, 265-273
70. Corvo ML., Boerman OC., Oyen WJ., Jorge JC., Cruz ME., Crommelin DJ., Storm G. (2000) Subcutaneous administration of superoxide dismutase entrapped in long circulating liposomes: *in vivo* fate and therapeutic activity in an inflammation model. *Pharmaceutical Research*, 17, 600-606
71. Coughlin R., Tonsager S., McGroaty E. (1983) Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 22, 2002-2007
72. Coutoudis A., Dabis F., Fawzi W., Gaillard P., Haverkamp G., Harris DR., Jackson JB., Leroy V., Meda N., Msellati P., Newell ML., Nsuati R., Read JS., Wiktor S. (2004) Late postnatal transmission of HIV-1 in breast-fed children: an individual patient data meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 189, 2154-2166
73. Coutoudis A., Pillay K., Spooner E., Kuhn L., Coovadia HM. (1999) Influence of infant-feeding patterns on early mother-to-child transmission of HIV-1 in Durban, South Africa: a prospective cohort study. South African Vitamin A Study Group. *The Lancet*, 7, 471-476
74. Cregan MD., Fan Y., Appelbee A., Brown ML., Klopčič B., Koppen J., Mitoulas LR., Piper KM., Choolani MA., Chong YS., Hartmann PE. (2007) Identification of nestin-positive putative mammary stem cells in human breastmilk. *Cell Tissue Research*, 329, 129-136
75. Crivaro V., Di Popolo A., Caprio A., Lambiase A., Di Resta M., Borriello T., Scarcella A., Triassi M., Zarrilli R. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures. *BMC Infectious Diseases*, 9, 70
76. Czajka A. (2006) Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu. *Nowiny Lekarskie*, 75, 582-586
77. Czank Ch., Prime DK., Hartmann B., Simmer K., Hartman PE. (2009) Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relation pasteurizer design and practice. *Pediatric Research*, 66, 374-379
78. Daher D., Le Gourrierc S., Pérez-Lamela C. (2017) Effect of high pressure processing on the microbial inactivation in fruit preparations and other vegetable based beverages. *Agriculture* 7, 72
79. Dallas DC., German JB. (2017) Enzymes in human milk. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 88, 129-136
80. Damm M., Nussold C., Cantillo D., Kappe C.O. (2012) Can electromagnetic fields influence the structure and enzymatic digest of proteins? A critical evaluation of microwave assisted proteomics protocols. *Journal of Proteomics*, 75, 5533-5543
81. Dehghan M., Jamalian K., Farahnaky A., Mesbahi G., Moosavi-Nasab M. (2012) The effect of microwave pasteurization on some physical and chemical characteristics of milk. *International Journal of Food Engineering*, 8, 1-12.
82. Delgado FJ., Cava R., Delgado J., Ramirez R. (2014) Tocopherols, fatty acids and cytokines content of holder pasteurised and high-pressure processed human milk. *Dairy Science and Technology*, 94, 145-156
83. Ding J., Asula MY., Tan V. (2015) Analysis of the influence of processing on human milk's macronutrient concentrations. *Neonatal Intensive Care*, 28, 19-22

84. Dolińska B., Mikulska A., Ryszka F. (2009) Factors enhancing calcium's absorption. *Annales Academiae Medicae Silesiensis*. 63, 76-83
85. Doonan S. Białka i peptydy. (2008) *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa
86. Dračková M., Borkovcová I., Janštová B., Naiserová M., Přidalová H., Navrátilová P. (2009) Determination of lactoferrin in goat milk by HPLC method. *Czech Journal of Food Sciences* 27, 102-104
87. Dröge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82,47-95
88. Dunajski E. (1999) Opracowanie i przygotowanie laboratoryjnego zestawu aparatury do badania przydatności wysokich ciśnień w technologii utrwalania żywności i biotechnologii. Sprawozdanie z realizacji umowy BW nr 0121846/044. *Maszynopis*. Katedra Chemii i Technologii Żywności, Politechnika Gdańska, Gdańsk
89. Dunajski E. (2000) Ocena możliwości zastosowania metody przechłodzenia i zamrażania pod ciśnieniem w technologii żywności i biotechnologii. Sprawozdanie z realizacji umowy BW nr 013523/039. *Maszynopis*. Katedra Chemii i Technologii Żywności, Politechnika Gdańska, Gdańsk.
90. Dunn DT., Newel ML., Ades AE., Peckham CS. (1992) Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding. *Lancet*, 340, 585-588
91. Düring K., Porsch P., Mahn A., Brinkmann O., Gieffers W. (1999) The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Letters*, 23, 93-100
92. Dworakowska S., Pisarek U., Bednarz Sz., Bogdał D. (2011) Zastosowanie promieniowania mikrofalowego w reakcjach utlenienia difentlometanu w układach wodoronadtlenek tetr-butylu chlorku metalu bloku-d. *Chemia, Czasopismo Techniczne*, Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej. 10, 53-58
93. Dworsky M., Yow M., Stagno S., Pass RF., Alford C. (1983) Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics*, 72, 295-299
94. Edge R., McGarvey DJ., Truscott TG. (1997) The carotenoids as anti-oxidants – a review. *Journal Photochemistry and Photobiology: Biology*, 41, 189-200
95. Egan PC., Costanza ME., Dodion P., Egorin MJ., Bachur NR. (1985) Doxorubicin and cisplatin excretion into human milk. *Cancer Treatment Reviews*, 69, 1387-1389
96. El Aila NA., Tency I., Claeys G., Verstraelen H., Saerens B., Santiago GL., De Backer E., Cools P., Temmerman M., Verhelst R., Vanechoutte M. (2009) Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora. *BMC Infectious Diseases*, 9, 167.
97. Elias RJ., Kellerby SS., Decker EA. (2008) Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48, 430-441
98. Elisia I., Kitts DD. (2011) Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 49, 147-152
99. Ellison R., Giehl T. (1991) Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *The Journal of Clinical Investigation*, 88,1080-1091
100. Emerit J., Beaumont C., Trivin F. (2001) Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 55, 333-339
101. Emmett PM., Rogers IS. (1997) Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early Human Development*, 49, 7-28
102. Erle U., Schubert H. (2001) Combined osmotic and microwave-vacuum dehydration of apples and strawberries. *Journal of Food Engineering*, 49, 193-199
103. Ernster L., Dallner G. (1995) Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1271, 195-204
104. Escuder-Vieco D., Espinosa-Martos I., Rodríguez JM., Corzo N, Montilla A., Siegfried P., Pallás-Alonso CR. Fernández L. (2018) High-temperature short-time pasteurization system for donor milk in a human milk bank setting. *Frontiers Microbiology*, 9, 926

105. Espinosa-Martos I., Montilla A., de Segura A., Escuder D., Bustos G., Palla's C., Rodriguez J., Corzo N., Fernandez L. (2013) Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurisation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56, 560-568
106. European Food Safety Authority (2006) Opinion of the scientific committee on food on the tolerable upper intake level of preformed vitamin (retinol and retinyl esters). *Tolerable Upper intake levels for vitamin and minerales*, 151-166
107. Evenson ML., Hinds MW., Bernstein RS., Befgdoll MS. (1988) Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk., *International Journal of Food Microbiology*, 7, 311-316
108. Fenaille F., Mottier P., Turesky RJ., Ali S., Guy PA. (2001) Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *The Journal of Chromatography A*, 921, 237-245
109. Fernandez L., Langa S., Martin V., Maldonado A., Jimenez E., Martin R., Rodriguez JM. (2013) The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69, 1-10
110. Fichter M., Klotz M., Hirschberg DL., Waldura B., Schofer O., Ehnert S., Schwarz LK., Ginneken CV., Schäfer KH. (2011) Breast milk contains relevant neurotrophic factors and cytokines for enteric nervous system development. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 1592-1596
111. Fidler N., Sauerwald TU., Koletzko B., Demmelmair H. (1998) Effects of human milk pasteurization and sterilization on available fat content and fatty acid composition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 27, 317-22
112. Fleisch M., Maxwell C., Barcellos-Hoff M. (2006) The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs. *Endocrine-Related Cancer*, 13, 379-400
113. Flohe L. (1988) Glutathione peroxidase. *Basic Life Sciences*, 49, 663-668
114. Fokke G. TerpstraFG., Rechtman DJ., Lee ML, Van Hoeij K., Berg H., Van Engelenberg FAC., Van't Wout AB. (2007) Antimicrobial and antiviral effect of high-temperature short-time (HTST) pasteurization applied to human milk. *Breastfeeding Medicine*, 2, 27-33
115. Fomon S, (2001) Infant feeding in the 20th century: formula and beikost. *The Journal of Nutrition*, 131, 409-420
116. Friend BA., Shahani KM., Long CA., Vaughn LA. (1983) The effect of processing and storage on key enzymes, B vitamins and lipids of mature human milk. Evaluation of fresh samples and effects of freezing and frozen storage. *Pediatric Research*, 17, 61-64
117. Futoma-Kołoch B., Bugła-Płoskońska G. (2009) Efektywność bakteriobójczego działania surowicy wynikająca z obecności układu dopełniacza i lizozymu wobec bakterii, które unikają odpowiedzi immunologicznej organizmu. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 63, 471-484
118. Gaetani GF., Ferraris AM., Rolfo M., Mangerini R., Arena S., Kirkman HN. (1996) Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 87, 1595-1599
119. Garanty-Bogacka B., Syrenicz M., Syrenicz A., Walczak M. (2002) Hiperlipidemie u dzieci i młodzieży. *Klinika Pediatryczna*, 10, 459-471
120. García-Lara N., Vieco D., De la Cruz-Bértolo J., Lora-Pablos D., Velasco N., Pallás-Alonso C. (2013) Effect of Holder pasteurization and frozen storage on macronutrients and energy content of breast milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57, 377-382
121. Gartner LM., Morton J., Lawrence RA. (2005) American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding: Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 115, 496-506
122. Gawęcki J. 2002. *Witaminy*. Praca zbiorowa. Poznań
123. Gedikli S., Tabak Ö., Tomsuk Ö., Çabuk A. (2008) Effect of microwaves on some gram negative and gram positive bacteria. *Journal of Applied Biological Sciences* 2, 67-71
124. Genest J. (2003) Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 26, 267-287



125. Gerber N., Wieske P. (1903) Pasteurisation des flacons dans la grande industrie (pasteurisation avec agitation). *Rev. gén. Lait*, 2 (8), 167-177
126. Gilbert HF. (1995) Thiol/disulfi de exchange equilibria and disulfi de bond stability. *Methods in Enzymology*, 251, 8-28
127. Góes H., Torres A., Donangelo C., Trugo N. (2002) Nutrient composition of banked human milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk fractions. *Nutrition*, 18, 590-594
128. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. (2007) *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
129. Golden JA. 1996. *Social History of Wet Nursing in America: From Breast to Bottle*. Cambridge University Press.
130. Goldman A. (2000) Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. *The Journal of Nutrition*, 130, 426-431
131. Greer FR. (2004) Vitamin K in human milk-still not enough. *Acta Paediatrica*, 93, 449-450
132. Gueimonde M., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. (2007) Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation. *Neonatology*, 92, 64-66
133. Gras-Le Guen C., Lepelletier D., Debillon T., Gournay V., Espaze E., Roze JC. (2003) Contamination of a milk bank pasteuriser causing a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 88, 434-435
134. Gutierrez-Repiso C., Velasco I., Garcia-Escobar E., Garcia-Serrano S., Rodriguez-Pacheco F., Linares F., Ruiz de Adana MS., Rubio-Martin E., Garrido-Sanchez L., Cobos-Bravo JF., Priego-Puga T., Rojo-Martinez G., Soriguer F., Eduardo Garcia-Fuentes E. (2014) Does dietary iodine regulate oxidative stress and adiponectin levels in human breast milk? *Antioxidants & Redox Signaling*, 20, 847-853
135. Gysel M., Cossey V., Fieuws S., Schuermans A. (2012) Impact of pasteurization on the antibacterial of human milk. *The European Journal of Pediatrics*, 171, 1231-1237
136. Hacesek G., Savilahti E. (1996) Increase in density of jejunal IgA2 cells during infancy without change in IgA1 cells. *Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition*, 22, 307-311
137. Halliwell B., Gutteridge JMC. (1993) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press
138. Hamilos DL., Wedner JH. (1985) The role of glutathione in lymphocyte activation I. Comparison of inhibitory effects of buthionine sulfoximine and 2-cyclohexen-1-one by nuclear size transformation. *The Journal of Immunology*, 135, 2740-2747
139. Hammond KA. (1997) Adaptation of the maternal intestine during lactation. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*, 2, 243-252
140. Hamosh M., Clary T., Cherniek S., Scow R. (1970) Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 210, 473-482
141. Hamosh M., Scanlon JW., Ganot D., Likel M., Scanlon KB., Hamosh P. (1981) Fat digestion in the newborn. Characterization of lipase in gastric aspirates of premature and term infants. *Journal of Clinical Investigation*, 67, 838-846
142. Hamprecht K., Maschmann J., Vochem M., Dietz K., Speer CP., Jahn G. (2001) Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet*, 357, 513-518
143. Havel R., Fielding C., Olivecrona T., Shore V., Fielding P., Egelrud T. (1973) Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoprotein lipase from different sources. *Biochemical*, 12, 1828-1833
144. Hayakawa K., Ueno Y., Kawamura S., Kato T., Hayashi R. (1998) Microorganism inactivation using high-pressure generation in sealed vessels under sub-zero temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 415-418
145. Heikkilä MP., Saris PEJ. (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 471-478

146. Heitlinger LA., Lle PC., Dillon WP., Labenthal F. (1983) Mammary amylase, a possible alternative pathway of carbohydrate digestion in infancy. *Pediatric Research*, 17, 15-18
147. Henderson T., Fay T., Hamosh M. (1998) Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *Journal of Pediatrics*, 132, 876-878
148. Hernell O., Bläckberg L. (1994) Human milk bile salt-stimulated lipase: functional and molecular aspects. *Journal of Pediatrics*, 125, 56-61
149. Hisham R., Ibrahim HR., Higashiguchi S., Juneja LR., Kim M., Takehiko Yamamoto T. (1996) A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1416-1423
150. Horikoshi S., Nakamura K., Kawaguchi M., Kondo J., Serpone N. (2016) Effect of microwave radiation on the activity of catalase. Decomposition of hydrogen peroxide under microwave and conventional heating. *RSC Advances*, 6, 48237-48244
151. Horvath T., Madi BC., Iuppa IM., Kennedy GE., Rutheford G., Read JS. (2009) Interventions for preventing late postnatal mother-to-child transmission of HIV. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 21, 1
152. Humphrey JH., Marinda E., Mutasa K., Moulton LM., Iliff PJ., Ntozini R., Childawanyika H., Nathoo KJ., Tavenqwa N., Jenkins A., Piwaz EG., Van de Perre P., Ward BJ. (2010). Mother to child transmission of HIV among Zimbabwean women who seroconverted postnatally: prospective cohort study. *BMJ*, 341, C6580
153. Hunt KM., Foster JA., Forney LJ., Schütte UME., Beck DL, Abdo Z., Fox LK, Williams JE, McGuire MK, McGuire MA. (2011) Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One*. 6, 21313
154. Huppertz T., Kelly AL., Fox PF. (2002) Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal*, 12, 561-572
155. Hutyra T., Iwańczak B. (2009) Nietolerancja laktozy: patofizjologia, objawy kliniczne, rozpoznanie i leczenie. *Polski Merkurusz Lekarski XXVI*, 148-152
156. Hwang C., Sinsky AJ., Lodish HF. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 257, 1496-1502
157. Ikeda M., Nozaki A., Sugiyama K, Tanaka T., Naganuma A., Tanaka K., Sekihara H., Shimotohno K., Saito M., Kato N. (2000) Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Research*, 66, 51-63
158. Imlay KR., Imlay JA. (1996) Cloning and analysis of sodC, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178, 2564-2571
159. Innis SM., Green TJ., Halsey TK. (1999) Variability in the trans fatty acid content of foods within a food category: implications for estimation of dietary trans fatty acid intakes. *Journal of the American College of Nutrition*, 18, 255-260
160. Innis SM., King DJ. (1999) Trans fatty acids in human milk are inversely associated with concentration of essential all-cis n-6 and n-3 fatty acids and determine trans, but not n-6 and n-3, fatty acids in plasma lipids and breast-fed infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 383-390
161. Iverson S., Hamosh M., Bowen W. (1995) Lipoprotein lipase activity and its relationship to high milk fat transfer during lactation in grey seals. *The Journal of Comparative Physiology B*, 165, 384-395
162. Jaeschke H., Gores GJ., Cederbaum AI., Hinson JA., Pessayre D., Lemasters JJ. (2002) Mechanism of hepatotoxicity. *Toxicological Science*, 65, 169-176
163. James AM., Smith RA., Murphy MP. (2004) Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial coenzyme Q. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423, 47-56
164. Janeway CA., Travers P., Whitton M., Shlomchik MJ. (2001) Immunobiology 5. *The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland.
165. Jones F. (2003) History of North American donor milk banking: One hundred years of progress. *Journal of Human Lactation*, 19, 313-318

166. Jones JB., Mehta NR., Hamosh M. (1982) Alpha-amylase in preterm human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1, 43-48
167. Juffs H., Deeth H. (2007) Scientific evaluation of pasteurisation for pathogen reduction in milk and milk products., Food Standards Australia New Zealand.
168. Kaila M., Isolauri E., Soppi E., Virtanen E., Laine S., Arvilommi H. (1992) Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatric Research*, 32, 141-144
169. Kalichevsky MT., Knorr D., Lillford PJ. (1995) Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 253-259
170. Kalko SG., Gelpi JL., Fita I., Orozco M. (2001) Theoretical study of the mechanisms of substrate recognition by catalase. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 9665-9672
171. Kalliomäki M., Ouwehand A., Arvilommi H., Kero P., Isolauri E. (1999) Transforming growth factor- $\beta$ 2 in breast milk: A potential regulator of atopic disease at an early age. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 104, 1251-1257
172. Kamianowska M., Szczepański M., Beko B., Kamianowski G., Milewski R. (2008) Analiza bakteriologiczna pokarmu kobiecego, uzyskanego w warunkach szpitalnych i domowych od matek noworodków z małą urodzeniową masą ciała. *Przegląd Pediatryczny*, 28, 291-297
173. Kanazawa K, Ashida H. (1998) Catabolic fate of dietary trilinoleoylglycerol hydroperoxides in rat gastrointestinal tract. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1393, 336-348
174. Kappe CO., Stadler A. (2003) Microwaves in organic and medicinal chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
175. Kasapović J., Pejić S., Mladenović M., Radlović N., Pajović SB. (2005) Superoxide dismutase activity in colostrum, transitional and mature human milk. *Turkish Journal of Pediatrics*, 47, 343-347
176. Katan MB., Zock PL., Mensink RP. (1995) Trans fatty acids and their effects on lipoprotein in human. *Annual Review of Nutrition*, 15, 73-93
177. Kent JC., Mitoulas LR., (2006) Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day. *Pediatrics*, 117, 340-387
178. Khailova L., Dvorak K., Arganbright KM., Williams CS., Halpern MD., Dvorak B. (2009) Changes in hepatic cell junctions structure during experimental necrotizing enterocolitis: effect of EGF treatment. *Pediatric Research*, 66, 140-144
179. Kim KI., Benevenga NL., Grummer RH. (1978) Estimation of the fraction of the lactose in high lactose diet available for fermentation in the cecum and colon of the rat. *The Journal of Nutrition*, 108, 79-89
180. Kleinman RE., Walker WA. (1979) The enteromammary immune system. An important new concept in breast milk host defence. *Digestive Diseases and Sciences*, 24, 876-882
181. Klotz D., Joellenbeck M., Winkler K., Kunze M., Huzly D., Hentschel R. (2017) High-temperature short-time pasteurisation of human breastmilk is efficient in retaining protein and reducing the bacterial count. *Acta Paediatrica*, 106, 763-767
182. Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H. (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 505-520
183. Kocić G., Bjelaković L., Cvetković T., Pop-Trajković Z., Jonović M., Bjelaković B., Sokolović D., Jevtović T., Stojanović D. (2010) Enzyme activity of human milk during the first month of lactation. *Acta Medica Medianae*, 49, 187-200
184. Koletzko B., Rodriguez-Palmero M., Demmelmair H., Fidler N., Jensen R., Sauerwald T. (2001) Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development*, 65, 3-18
185. Konopacka M. (2004) Role of vitamin C in oxidative DNA damage. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 58, 343-348
186. Kotrri G., Fusch G., Kwan C., Choi D., Choi A., Al Kafi N., Rochow N., Fusch Ch. (2016) Validation of correction algorithms for near-IR Analysis of human milk in an independent sample set-effect of pasteurization. *Nutrients*, 8, 119

187. Kowalewska-Kantecka B. (2007) Karmienie pokarmem matki złotym standardem żywienia noworodków niemowląt. *Pediatrics Współczesna*, 9, 63-68
188. Krachler M., Rossipal SE., Irgolic KJ. (1998) Changes in the concentration of trace elements in human milk during lactation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 12, 159-176
189. Krzemień S., Knapczyk P. (2005) Aktualne poglądy dotyczące znaczenia transformującego czynnika wzrostu b (TGF-b) w patogenezie niektórych stanów chorobowych. *Wiadomości Lekarskie*, 58, 536-539
190. L'Abbe MR., Friel JK. (2000) Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 31, 270-274
191. Lamounier JA., Moulin ZS., Xavier CC. (2004) Recommendations for breastfeeding during maternal infections. *Journal of Pediatrics*, 80, 181-188
192. Landers S., Updegrave K. (2010) Bacteriological screening of donor human milk before and after Holder pasteurization. *Breastfeeding Medicine*, 5, 117-121
193. Lawrence R., Pane C. (2007) Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 37, 7-36
194. Le Doarea K., Kampmann B. (2014) Breast milk and Group B streptococcal infection: vector of transmission or vehicle for protection? *Vaccine*, 32, 3128-3132
195. Lebedeva A. (2016) Wpływ stężenia witaminy C w mleku ludzkim na całkowitą zdolność przeciwutleniającą mleka. Praca inżynierska. Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska
196. Leitch EC., Willcox MD. (1999) Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. *Journal of Medical Microbiology*, 48, 867-871
197. Ley S., Hanley A., Stone D., O'Connor D. (2011) Effects of pasteurization on adiponectin and insulin concentrations in donor human milk. *Pediatric Research*, 70, 278-281
198. Leyko W. (1983) Biofizyka dla biologów. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa
199. Li N., Richoux R., Perruchot M., Boutinaud M., Mayol J., Gagnaire V. (2015) Flow cytometry approach to quantify the viability of milk somatic cell counts after various physico-chemical treatments. *PLoS One*, 10, e0146071
200. Liao Y., Alvarado R., Phinney B., Lönnerdal B. (2011) Proteomic characterization of human milk fat globule membrane proteins during a 12 month lactation period. *Journal of Proteome Research*, 10, 3530-3541
201. Lim SM., Webb SA. (2005) Nosocomial bacterial infections in Intensive Care Units. I. Organisms and mechanisms of antibiotic resistance. *Anaesthesia*, 60, 887-902
202. Lindberg T., Skude G. (1982) Amylase in human milk. *Pediatrics*, 70, 235-238
203. Lis J., Orczyk-Pawilowicz M., Kątnik-Prastowska I. (2013) Białka mleka ludzkiego zaangażowane w procesy immunologiczne. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67, 529-547
204. Lönnerdal B. (1987) Trace element binding ligands in human milk: function in trace element utilization. In: Goldman AS., Atkinson SA., Hanson LÅ. (eds) *Human Lactation 3*. Springer, Boston
205. Lönnerdal B. (2003) Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1537-1543
206. Lopez-Fendino R., Carrascosa AV., Olano A. (1996) The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheesemaking properties of raw milk. *Journal of Dairy Sciences*, 79, 929-936
207. Los M., Dróge W., Stricker K., Baeuerle PA., Schulze-Osthoff K. (1995) Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *European Journal Immunology*, 25, 159-165
208. Luscher C., Balasa A., Fröhling A., Ananta E., Knorr D. (2004) Effect of high-pressure-induced ice I-to-ice III phase transitions on inactivation of *Listeria innocua* in frozen suspension. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4021-4029
209. Macias C., Schewigert FJ. (2001) Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 42, 82-85

210. Maheshwari A., Kelly D., Nicola T., Ambalavanan N., Jain S., Murphy-Ullrich J., Athar M., Shimamura M., Bhandari V., Aprahamian C., Dimmitt R., Serra R., Ohls R. (2011) TGF- $\beta$ 2 suppresses macrophage cytokine production and mucosal inflammatory responses in the developing intestine. *Gastroenterology*, 140, 242-253
211. Majamaa H., Isolauri E., Saxelin M., Vesikari T. (1995) Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 20, 333-338
212. Makino H., Kushiro A., Ishikawa E., Muylaert D., Kubota H., Sakai T., Oishi K., Martín R., Ben Amor K., Oozeer R., Knol J., Tanaka R. (2011) Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 6788-6793
213. Małaczewska J., Rotkiewicz Z., Siwicki A. (2006) Laktoferyna - mechanizmy działania przeciwwirusowego. *Medycyna Weterynaryjna*, 62, 1104-1107
214. Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejaska I., Dunajski E., Rompa M., Cwalina S. Effect of high Pressure and sub-zero Temperature on some gram-negative bacteria (2004) *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 13, 279-283
215. Malinowska-Pańczyk E., Walecka M., Pawłowicz R., Tylingo R., Kołodziejaska I. (2013) The effect of high pressure at subzero temperature on proteins solubility, drip loss and texture of fish (cod and salmon) and mammal's (pork and beef) meat. *Food Science and Technology International*, 20, 383-395
216. Marothi YA., Agnihotri H., Dubey D. (2005) *Enterococcal* resistance: an overview. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23, 214-219
217. Martin DL., De Lucca HF. (1969) Influence of sodium on calcium transport by the rat small intestine. *American Journal of Physiology*, 216, 1351-1359
218. Martín R., Heilig GH., Zoetendal EG., Smidt H., Rodriguez JM. (2007) Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2638-2644
219. Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín ML., Olivares M., Boza J., Jimenez J., Fernandez L., Xaus J., Rodriguez M. (2004) The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 121-127
220. Martin R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E., Marin ML., Xaus J., Fernandez L., Rodriguez JM. (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*, 9, 754-758
221. Martysiak-Żurowska D. (2005) Wybrane problemy bezpieczeństwa zdrowotnego i jakości zdrowotnej preparatów do żywienia niemowląt. *Rozprawa doktorska*. Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.
222. Martysiak-Żurowska D., Stołycho A. (2006) Content of malondialdehyde (MDA) in infant formulae and follow-on formulae. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 15, 323-328
223. Martysiak-Żurowska D., Szlagatys-Sidorkiewicz A., Zagierski C. (2013) Concentrations of alpha- and gamma-tocopherols in human breast milk during the first months of lactation and in infant formulas. *Maternal and Child Nutrition*, 9, 473-482
224. Martysiak-Żurowska D., Wenta W. (2012) A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 11, 1, 83-89
225. Martysiak-Żurowska D., Zagierski M., Woś-Wasilewska E., Szlagatys-Sidorkiewicz A. (2017) Higher absorption of vitamin C from food than from supplements by breastfeeding mothers at early stages of lactation. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 86, 81-87
226. Martysiak-Żurowska D., Żórska K., Zagierski M., Szlagatys-Sidorkiewicz A. (2011) Skład i zawartość kwasów tłuszczowych w mleku kobiet z Gdańska i okolic w różnych okresach laktacji. *Medycyna Wieku Rozwojowego*, 2, 167-177

227. Masschalck B., Van Houdt R., Van Haver E., Michiels C. (2001) Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 339-344
228. Masson P., Heremans J., Dive C. (1966) An ironbinding protein common to many external secretions. *Clinica Chimica Acta*, 14, 735-739
229. Maszewska M., Krygier K. (2005) Badanie zależności występowania pierwotnych i wtórnych produktów utleniania w rafinowanym oleju rzepakowym i słonecznikowym. *Rośliny Oleiste*, 26, 611-620
230. Matsumiya Y., Kato N., Watanabe K., Kato H. (2002) Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 8, 43-49
231. Mazri C., Sanchez L., Ramos SJ., Calvo M., Pérez MD. (2012) Effect of high-pressure treatment on denaturation of bovine lactoferrin and lactoperoxidase. *Journal of Dairy Science*, 95, 549-557
232. Mazumder S., Laskar DD., Prajapati D., Roy MK. (2004) Microwave-induced enzyme-catalyzed chemoselective reduction of organic azides. *ChemistryandBiodiversity*, 1, 925-929
233. McBride O., Korn E. (1964) Uptake of free fatty acids and chylomicron glycerides by guinea pig mammary gland in pregnancy and lactation. *Journal of Lipid Research*, 5, 453-458
234. McPherson R., Wagner C. (2001) The effect of pasteurization on transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 2 concentrations in human milk. *Advances in ExperimentalMedicineandBiology*, 501, 559-566
235. Mofenson LM., McIntyre JA. (2000) Advances and research directions in the prevention of mother to child transmission. *Lancet*, 2237-2244
236. Mohanty S., Dhawan B., Gadepalli RS., Lodha R., Kapil A. (2006) Vancomycin- resistant *enterococcus faecium* Van A phenotype: first documented isolation in India. *Southeast Asian JournalofTropical MedicineandPublic Health*. 37, 335-337
237. Molto-Pouigmarti C., Castellote AI., Permanger M., Franch A., López-Sabater MC. (2011) Effects of Holder pasteurization and high pressure processing on the vitamin C and fatty acids content of mature human milk. *Food Chemistry*, 124, 697-702
238. Montagne P., Cuillière M., Molé C., Béné M., Faure G. (2001) Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. *Advances in ExperimentalMedicineandBiology*, 501, 241-247
239. Moolenaar RL., Crutcher JM., San Joaquin VH., Sewell LV., Hutwagner LC., Carson LA., Robison DA., Smithee LM., Jarvis WR. (2000) A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staffingnails play a role in disease transmission? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21, 80-85
240. Moszczyński P., Pyć R. (1999) Biochemia witamin. Część II: Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa
241. Mueller NT., Bakacs E., Combellick J., Grigoryan Z., Dominguez-Bello MG. (2015) The infant microbiome development: mom matters. *Trends in Molecular Medicine*, 21, 109-117
242. Muslimatun S., Schmidt MK., West CE., Schultink W., Hautvast JG., Karyadi D. (2001) Weekly vitamin A and iron supplementation during pregnancy increases vitamin A concentration of breast milk but not iron status in Indonesian lactating women. *Journal of Nutrition*, 131, 2664-2669
243. Nakagami T., Ohno H., Shigehisa T., Otake T., Mori H., Kawahata T., Morimoto M., Ueba N. (1996) Inactivation of human immunodeficiency virus by high hydrostatic pressure. *Transfusion*, 36, 475-476
244. Nakagami T., Shigehisa T., Ohmori T., Taji S., Hase A., Kimura T., Yamanishi K. (1992) Inactivation of herpes viruses by high hydrostatic pressure. *Journal of Virological Methods*, 38, 255-262
245. Nakamura Y., Miyata M., Ando T., Shimokawa N., Ohnuma Y., Katoh R., Ogawa H., Okumura K., Nakao A. (2009) The latent form of transforming growth factor- $\beta$  administered orally is activated by gastric acid in mice. *Journal of Nutrition*, 139, 1463-1468

246. Niemczyk M., Foroniewicz B., Mucha K. (2005). Rola TGF $\beta$ . *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 113, 401-408
247. Nuchter M., Ondruschka B., Bonrath W., Gum A. (2004) Microwave assisted synthesis - a critical technology overview. *Green Chemistry*, 6, 128-141
248. Ogundele M. (1999). Anti-complement activities of human breast-milk. *Inflammation Research*, 48, 437-445
249. Ohlsson T. (1981) Methods for measuring temperature distribution in microwave ovens. *Microwave World*, 2, 14-17
250. Oliński R., Jurgowiak M. (1996) Reaktywne formy tlenu - uniwersalny czynnik patogenny? Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie. Barciszewski J., Łastowski K., Twardowski T. (ed.) *Wydawnictwo Sorus*. Poznań, 373-400
251. Olivares MP., Di'az-Ropero R., Marti'n JM., Rodri'guez J., Xaus J. (2006) Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 72-79
252. Ovesen L., Jakobsen J., Leth T., Reinholdt J. (1996) The effect of microwave heating on vitamins B1 and E, and linoleic and linolenic acids, and immunoglobulins in human milk. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 47, 427-436
253. Oxtoby MJ. (1988) Human immunodeficiency virus and other viruses in human milk: placing the issues in broader perspective. *Pediatric Infectious Disease*, 7, 825-835
254. Palace VP., Khaper N., Qin Q., Singal PK. (1999) Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 746-761
255. Pandya Y., Jewett F., Hoover D.G. (1995) Concurrent effects of high hydrostatic pressure, acidity and heat on the destruction and injury of yeasts. *Journal of Food Protection*, 58, 301-304
256. Park CW., Drake MA. (2014) The distribution of fat in dried dairy particles determines flavor release and flavor stability. *Journal of Food Science*, 79, 452-459
257. Patton S., Houston GE. (1986) A method for isolation of milk fat globules. *Lipids*, 21, 170-174
258. Pawlus B., Kordek A., Łoniewska B. (2004) Podstawowe składniki mleka kobiecego- najnowsze wiadomości. *Medycyna Rodzinna*, 5, 213-216
259. Pawlus B., Kordek A., Łoniewska B. (2005) Enzymy mleka kobiecego - najnowsze wiadomości. *Przegląd Pediatryczny*, 35, 168-170
260. Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Klauser S., Hunziker P., von Fellenberg R. (1997) Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 372-378
261. Pentilla I., van Spriël A., Zhang M., Xian C., Steeb C., Cummins A., Zola H., Read L. (1998) Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatric Research*, 44, 524-531
262. Percy ME. (1984) Catalase: an old enzyme with a new role? *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 62, 1006-1014
263. Perez BS., Lorenzo PL., Garcia ML., Hernandez PE., Ordonez JA. (1982) Heat resistance of enterococci. *Milchwissenschaft*, 37, 724-726
264. Perez P., Doré J., Leclerc M., Levenez F., Benyacoub J., Serrant P., Segura-Roggero I., Schiffrin EJ., Donnet-Hughes A. (2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells. *Pediatrics*, 119, 724-732
265. Perkkio M., Savilahti E. (1980) Time of appearance of immunoglobulin-containing cells in the mucosa of the neonatal intestine. *Pediatric Research*, 14, 953-955
266. Permanyer M., Castellote C., Ramirez-Santana C., Audi C., Perez-Cano FJ., Castell M., Lopez-Sabater MC., Franch A. (2010) Maintenance of breastmilk immunoglobulin A after high pressure processing. *Journal of Dairy Science*, 93, 877-883
267. Perrin M., Fogleman A., Allen J. (2015) A longitudinal study of human milk composition beyond one year postpartum. *FASEB Journal*, 29, 582
268. Pijanowski in. 1997. *Ogólna Technologia Żywności*, Wydanie 6, 324

269. PN- EN ISO 5509:2001. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce -- Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych (Norma wycofana i zastąpiona przez PN-EN ISO 12966-2:2011)
270. PN-EN ISO 1211:2002. Mleko - oznaczanie zawartości tłuszczu - Metoda grawimetryczna (metoda odwoławcza. Wycofana i zastąpiona przez PN-EN ISO1211-2010)
271. Quan R., Yang Ch., Rubinstain S., Lewiston NJ., Sunshine P., Stevenson DK., Kerner JA. (1992) Effects of microwave radiation on anti-infective factors in human milk. *Pediatrics*, 89, 667-669
272. Quiles JL., Ochoa JJ., Ramirez-Tortosa MC., Linde J., Bompadre S., Battino M., Narbona E., Maldonado J., Mataix J. (2006) Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free RadicalResearch*, 40, 199-206
273. Rademacher B., Pfeiffer B., Kessler HG. (1998) Inaktivation of microorganisms and enzymes in pressure-treated raw milk. *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry*, 145-151
274. Ramsay DT., Kent JC., Owens RA., Hartmann PE. (2004) Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics*, 113, 361-367
275. Rautava S., Nanthakumar N., Dubert-Ferrandon A., Ly L., Rautava J., Walker W. (2011) Breast milk-transforming growth factor-beta2 specifically attenuates IL-1beta-induced inflammatory responses in the immature human intestine via an SMAD6- and ERK-dependent mechanism. *Neonatology*, 99, 192-201
276. Read JS. (2003) American Academy of Pediatrics, Committee on Pediatric AIDS. Human milk, breastfeeding, and transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the United States. *Pediatrics*. 112, 1196-1205
277. Reali A., Greco F., Fanaro S., Atzei A., Puddu M., Moi M., Fanos F. (2010) Fortification of maternal milk for very low birth weight (VLBW) pre-term neonates. *Early Human Development*, 86, 33-36
278. Regier M., Schubert H. (2001) Microwave processing. In: Thermal technologies in food processing (ed. P. Richardson). *CRC Press*, New York, 178-207
279. Rémillard N., Robin O., Martel R., Paquin P. (1993) Influence of homogenization efficiency on milk fat content determination by infrared analysis. *International Dairy Journal*, 3, 197-208
280. Resta-Lenert S., Barrett KE. (2006) Probiotics and commensals reverse TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 130, 731-746
281. Reyes R., Manjarrez H., Drago M. (2005) El hierro and la virulencia bacteriana. *Enf Inf Microbiol*, 25, 104-107
282. Reynolds JD. (2001) The management of retinopathy of prematurity. *Paediatric Drugs*, 3, 263-272
283. Reyns KMFA., Sootjens CCF., Cornelis K., Weemaes CA., Hendrickx E., Michiels ChW. (2000) Kinetic analysis and modeling of combined high-pressure-temperature inactivation of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 199-210
284. Riordan J. (2010) The biological specificity of breastmilk. Breastfeeding and human lactation. Riordan R., Wambach K. (red.), *Jones & Bartlett Learning*, 117-161
285. Robak E., Sysa-Jędrzejowska A., Robak T. (1996) Cytokiny w układowym toczniu rumieniowym. *Przegląd Lekarski*, 53, 623-626
286. Robinson PS., Barker P., Campbell A., Henson P., Surveyor I., Young PR. (1994) Iodine-131 in breast milk following therapy for thyroid carcinoma. *Journal of Nuclear Medicine*, 35, 1797-1801
287. Rochow N., Fusch G., Choi A., Chessell L., Elliott L., McDonald K., Kuiper E., Purcha M., Turner S., Chan E., Xia M., Fusch C. (2013) Target fortification of breast milk with fat, protein, and carbohydrates for preterm infants. *Journal of Pediatrics*, 163, 1001-1007
288. Rodríguez JM. (2014) The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Advances in Nutrition*, 5, 779-784
289. Romeu-Nadal M., Castellote AI., Gayà A., López-Sabater MC. (2008) Effect of pasteurisation on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. *Food Chemistry*, 107, 434-438



290. Romeu-Nadal M., Castellote AI., Lopez-Sabater MC. (2008) Effect of cold storage on vitamins C and E and fatty acids in human milk. *Food Chemistry*, 106, 65-70
291. Rosiak E., Malinowska-Pańczyk E. (2017) Potencjalne zagrożenia związane z mlekiem kobiecym z banku mleka. *Banki Mleka w Polsce. Funkcjonowanie w podmiotach leczniczych – idea i praktyka*. 149-155
292. Rousseau CM., Nduati RW., Richardson BA. Steele MS., John-Stewart GC., Mbori-Ngacha DA., Kreiss JK., Overbaugh J. (2003) Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 RNA in breast milk and of its relationship to infant infection and maternal disease. *Journal of Infectious Disease*, 78, 741-747
293. Rudloff S., Stefan C., Pohlentz G., Kunz C. (2002) Detection of ligand for selectins in the oligosaccharide fraction of human milk. *European Journal of Nutrition*, 41, 85-92
294. Ryżko J. (2011) Zastosowanie probiotyków w gastroenterologii dziecięcej. *Pediatrics Współczesna, Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, 13, 115-119
295. Sacharczuk M., Zagulski T., Sadowski B., Barcikowska M., Pluta R. (2005) Laktoferyna w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 6, 482-489
296. Safaeian L., Javanmard SH., Mollanoori Y., Dana N. (2015) Cytoprotective and antioxidant effects of human lactoferrin against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Advanced Biomedical Research*, 4, 188
297. Saher G., Stumpf SK. (2015) Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851, 1083-1094
298. Saito Y., Hayashi T., Tanaka A., Watanabe Y., Suzuki M., Saito E., Takahashi K. (1999) Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 2866-2871
299. Sakurai T., Furukawa M., Asoh M., Kanno T., Kojima T., Yonekubo A. (2005) Fat-soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 51, 239-247
300. Salton M. (1957) The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bacteriological Reviews*, 21, 82-100
301. Samur G., Topcu A., Turan S. (2009) *Trans* fatty acids and fatty acid composition of mature breast milk in Turkish women and their association with maternal diet's. *Lipids*, 44, 405-413
302. Schanler RJ., Lau C., Hurst NM., Smith EO. (2005) Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mother's own milk in the feeding of extremely premature infants. *Pediatrics*, 117, 400-406
303. Seder R., Marth T., Sieve M., Strober W., Letterio J., Roberts A., Kelsall B. (1998) Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *Journal of Immunology*, 160, 5719-5728
304. Seguraa SA., Ansóteguib JA., Díaz-Gómezc NM. (2016) The importance of maternal nutrition during breastfeeding: Do breastfeeding mothers need nutritional supplements? *Anales de Pediatría*, 84, 1-7
305. Shi Y., Sun G., Zhang Z., Deng X., Kang X., Liu Z., Ma Y., Sheng Q. (2011) The chemical composition of human milk from Inner Mongolia of China. *Food Chemistry*, 127, 1193-1198
306. Siemieniuk E., Skrzydlewska E. (2005) Koenzym Q10 – biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmach zwierząt i człowieka. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 59, 150-159
307. Sies H., Stahl W., Sundquist RR. (1992) Antioxidant functions of vitamins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669, 7-20
308. Sigman-Grant M., Bush G., Anantheswaran R. (1992) Microwave heating of infant formula: a dilemma resolved. *Pediatrics*, 90, 412-415
309. Silvestre D., Ferrer E., Gayá J., Jareño E., Miranda M., Muriach M., Romero F. (2006) Available lysine content in human milk: Stability during manipulation prior to ingestion. *Biofactors*, 26, 71-79

310. Silvestre D., Miranda M, Muriach M., Almansa I., Jareño E., Romero FJ. (2009) Frozen breast milk at -20 C and -80 C: a longitudinal study of glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration. *Journal of Human Lactation*, 16, 35-41
311. Silvestre D., Miranda M., Muriach M., Almansa I., Jereno E., Romero FJ. (2008) Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatrica*, 97, 1070-1074
312. Simpson RK., Gilmour A. (1997) The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods. *Food Microbiology*, 14, 567-573
313. Sinkiewicz-Darol E., Bernatowicz-Łojko U., Wesółowska A., Kaczmarek K., Puta M., Martysiak-Żurowska D., Karzel K. (2015) Can mothers beyond one year of lactation be donors of human milk for preterm infants. *Neo BFHI Conference*. Upsala
314. Sisk PM., Lovelady CA. (2007) Early human milk feeding is associated with a lower risk of NEC in VLBW infants. *Journal of Perinatology*, 428-433
315. Socha P., Koletzko B., Pawłowska J., Proszynska K., Socha J. (1997) Treatment of cholestatic children with water soluble vitamin E, (alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate): effects on serum vitamin E, lipid peroxides, and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 24, 189-193
316. Sokol RJ. (1987) Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate therapy for vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis. *Journal of Pediatrics*, 11, 830-836
317. Sörqvist S. (2003) Heat resistance in liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44, 1-19
318. Sousa SG., Delgado I., Saraiva JA. (2014). Effect of thermal pasteurisation and high pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human milk colostrums. *Food Chemistry*, 151, 79-85
319. Stagno S., Reynolds DW., Pass RF., Alford CA. (1980) Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *New England Journal of Medicine*. 302, 1073-1076
320. Stępień-Wyrobiec O., Hrycek A., Wyrobiec G. (2008) Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-beta) – budowa, mechanizmy oddziaływania oraz jego rola w patogenezie toczenia rumieniowatego układu. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 62, 688-693
321. Steskova A., Morochovicova M., Leskova E. (2006) Vitamin C degradation during storage of fortified foods. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45, 55-61
322. Stockman JA., Clark DA. (1984) Weight gain: a response to transfusion in selected preterm infants. *American Journal of Diseases of Children*, 138, 828-830
323. Stolarczyk A., Socha P. (2002) Tłuszcze w żywieniu niemowląt. *Nowa Pediatria*, 3, 200-203
324. Sun W., Kadima TA., Pickard MA., Dunford HB. (1994) Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity. *Biochemistry and Cell Biology*, 72, 321-331
325. Superti F., Ammendolia M., Valenti P., Seganti L. (1997) Antiviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Medical Microbiology and Immunology*, 186, 83-91
326. Szlagatys-Sidorkiewicz A., Zagierski M., Jankowska A., Łuczak G., Macur K., Bączek T., Korzon M., Krzykowski G., Martysiak-Żurowska D., Kamińska B. (2012) Longitudinal study of vitamins A, E and lipid oxidative damage in human milk throughout lactation. *Early Human Development*, 6, 421-424
327. Tacke KJM., Vogelsang A., Lingen RA., Slotstra J., Dikkeschei BD., Van Zoeren-Grobbe D. (2009) Loss of triglycerides and carotenoids in human milk after processing. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 94, 447-450
328. Tahir A., Mateen IB., Univerdi S, KaraGoban O., Zengin M. (2009) Simple method to study the mechanism of thermal and non thermal bactericidal action of microwave radiations on different bacterial species. *Journal of Bacteriology Research* Vol. 1, 58-63

329. Thakur BR., Nelson PE. (1998) High pressure processing and preservation of foods. *Food Reviews International*, 14, 427-447
330. Thompson GR. (1971) Absorption of fat-soluble vitamins and sterols. *Journal of Clinical Pathology*. Supplement, 5, 85-89
331. Tokuşoğlu O., Tansuğ N., Akşit S., Dinç G., Kasirga E., Ozcan C. (2008) Retinol and alpha-tocopherol concentrations in breast milk of Turkish lactating mothers under different socio-economic status. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 59, 166-174
332. Tolonen M. (1990) Vitamins and minerals in health and nutrition. *Chichester, Elias Horwood Ltd.*
333. Torrazza RM., Neu J. (2013) The altered gut microbiome and necrotizing enterocolitis. *Clinics in Perinatology*, 40, 93-108
334. Torres A., Farré R., Lagarda MJ., Monleón J. (2003) Determination of glutathione peroxidase activity in human milk. *Food/Nahrung* 47, 430-433
335. Tully DB., Jones F., Tully MR. (2001) Donor milk: what's in it and what's not. *Journal of Human Lactation*, 17, 152
336. Turoli D., Testolin G., Zanini R., Bellu R. (2004) Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatrica*, 93, 1569-1574
337. Tveden-Nyborg P., Vogt L., Schjoldager JG., Jeannet N., Hasselholt S., Paidi MD., Christen S., Lykkesfeldt J. (2012) Maternal vitamin C deficiency during pregnancy persistently impairs hippocampal neurogenesis in offspring of guinea pigs. *PLoS One*, 7, 48488
338. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M., Mazur M., Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84
339. Van Zoeren-Grobbe D., Schrijver J., Van den Berg H., Berger H.M. (1987) Human milk vitamin content after pasteurization, storage or tube feeding. *Archives of Disease in Childhood*, 62, 161-165.
340. Van Zoeren-Grobbe D., Schrijver J., Van den Berg H., Berger H.M. (1987) Human milk vitamin content after pasteurization, storage or tube feeding. *Archives of Disease in Childhood*, 62, 161-165
341. Vega-Mercado H., Angora-Nieto M.M., Bartosa-Cánovas G.V. (2001) Advances in dehydration of food. *Journal of Food Engineering*, 49, 271-289
342. Venkataramani S., Truntzer J., Coleman D. (2013) Thermal stability of high concentration lysozyme across varying pH: A Fourier Transform Infrared study. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5, 148-153
343. Viazis S., Farkas B., Allen J. (2007) Effects of high-pressure processing on immunoglobulin A and lysozyme activity in human milk. *Journal of Human Lactation*, 23, 253-261
344. Viazis S., Farkas B.E., Jaykus A. (2008) Inactivation of bacterial pathogens in human milk by high-pressure processing. *Journal of Food Protection*, 71, 109-118
345. Vieira A., Soares F., Pimenta H., Abranches A., Moreira M. (2011) Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and other processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Human Development*, 87, 577-580
346. Vochem M., Hamprecht K., Jahn G., Speer CP. (1998) Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 17, 53-58
347. Wahlig TM., Gatto CW., Boros SJ., Mammel MC., Mills MM., Georgieff MK. (1994) Metabolic response of preterm infants to variable degrees of respiratory illness. *Journal of Pediatrics*, 124, 283-288
348. Wahlig TM., Georgieff MK. (1995) The effects of illness on neonatal metabolism and nutritional management. *Clinics in Perinatology*, 22, 77-96
349. Wakabayashi H., Yamauchi K., Takase M. (2006) Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16, 1241-1251
350. Waksmańska W., Rutkiewicz J., Mikulska M. Kamylobakterioza u dzieci do lat 4 zamieszkujących powiat bielski i miasto Bielsko-Biała. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 95, 149-154

351. Wang TG., Gotoh Y., Jennings MH., Rhoads CA., Aw TY. (2000) Lipid hydroperoxide-induced apoptosis in human colonic CaCo-2 cells is associated with an early loss of cellular redox balance. *FASEB Journal*, 14, 1567-1576
352. Wardell J., Wright A., Bardsley W., D'Souza S. (1984) Bile salt-stimulated lipase and esterase activity in human milk after collection, storage, and heating: nutritional implications. *Pediatric Research*, 18, 382-386
353. Wąsowicz E., Gramza A., Hęś M., Jeleń H., Korczak J., Małecka M., Mildner-Szkudlarz S., Rudzińska M., Samotyja U., Zawirska-Wojtasiak R. (2004) Oxidation of lipids in food. *Polish Journal of Food Nutrition Science*, 13, 87-100
354. Wasserman RH. (1964) Lactose –stimulated intestinal absorption of calcium: a theory. *Nature*, 201, 997-999
355. Weisglas-Kuperus N., Hille E., Duivenvoorden H., Finken M., Wit J., van Buuren S., van Goudoever J., Verloove-Vanhorick S. (2009) Intelligence of very preterm or very low birthweight infants in young adulthood. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 94, 196-200
356. Weisman LE., Dobson FM. (1991) The potential impact of group B streptococcal anti-bodies in breast milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 310, 345–351
357. Wells WW., Xu DP., Washburn MP. (1995) Glutathione: dehydroascorbate oxidoreductases. *Methods in Enzymology*, 252, 30-38
358. Welsh JK., May JT. (1979) Anti-Infective Properties of Breast Milk. *Journal of Pediatrics*, 93, 1-9
359. Wesołowska A. (2017) Żywienie pacjentów oddziałów neonatologicznych mlekiem z banku mleka kobiecego w świetle medycyny opartej na dowodach. *Banki Mleka w Polsce. Funkcjonowanie w podmiotach leczniczych – idea i praktyka*. 62-76
360. Wesołowska A. 2012. Banki mleka jako promocja karmienia piersią. *OPM* 9-10.
361. Wesołowska A. 2017. Zmiany w składzie mleka wynikające z procesu mrożenia, rozmrażania i przechowywania w warunkach chłodniczych oraz podgrzewania. *Banki mleka w Polsce. Funkcjonowanie w podmiotach leczniczych- idea i praktyka*, 186-199.
362. Wharton BA. (1987) Nutrition and feeding of the preterm infant. *Blackwell*, 208-228
363. Williams M, Armbruster CR, Arduino MJ. (2013) Plumbing of hospital premises is a reservoir for opportunistically pathogenic microorganisms: a review. *Biofouling*, 29, 147-162
364. Wills ME., Han VE., Harris DA., Braun JD. (1982) Short time low temperature pasteurization of human milk. *Early Human Development*, 7, 71-80
365. Windyga B., Rutkowska M., Sokołowska B., Skapska S., Wesołowska A., Wilińska M., Fonberg-Broczek M., Rzoska S. (2015) Inactivation of *Staphylococcus aureus* and native microflora in human milk by high pressure processing. *High Pressure Research*, 35, 181-188
366. www.cdc.gov
367. Yasuda A., Kimura H., Hayakawa M., Ohshiro M., Kato Y., Matsuura O., Suzuki C., Morishima T. (2003) Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatrics*, 111, 1333-1336
368. Yuksel S., Yigit AA., Cinar M., Atmaca N., Onaran Y. (2015) Oxidant and antioxidant status of human Breast milk during lactation. *Dairy Science and Technology*, 95, 295-302
369. Zabłocka A., Janusz M. (2008) Dwa oblicza wolnych rodników. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 62, 118-124
370. Zachariassen G., Fenger-Gron J., Hviid M., Halken S. (2013) The content of macronutrients in milk from mothers of very preterm infants is highly variable. *Danish Medical Journal*, 60, 4631
371. Zafar AB., Sylvester LK., Beidas SO. (2002) Pseudomonas aeruginosa infections in a neonatal intensive care unit. *American Journal of Infection Control*, 30, 425- 429
372. Zan H., Cerutti A., Dramitinos P., Schaffer A., Casali P. (1998) CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu—>ES alpha and sequential S mu—>gamma, S gamma—>alpha DNA recombination. *Journal of Immunology*, 161, 5217-5225

373. Zhang Q., Cundiff J., Maria S., McMahon R., Wickham M. S., Faulks R., van To E. (2013) Differential digestion of human milk proteins in a simulated stomach model. *Journal of Proteome Research*, 13, 1055-1064
374. Zinder O., Hamosh M., Clary Fleck T., Scow R. (1974) Effect of prolactin on lipoprotein lipase in mammary gland and adipose tissue in rats. *American Journal of Physiology*, 226, 744-748
375. Zoja C., Buelli S., Morigi M. (2010) Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatric Nephrology*, 25, 2231-2240
376. Zoppi G., Andreotti G., Pajno-Ferrara F., Njai DM., Gaburro D. (1972) Exocrine pancreas function in premature and full term neonates. *Pediatric Research*, 6, 880-886