

## Sposób pasteryzacji mleka, zwłaszcza mleka ludzkiego

Przedmiotem wynalazku jest sposób pasteryzacji mleka, zwłaszcza mleka ludzkiego, mający zastosowanie do inaktywacji zanieczyszczeń mikrobiologicznych, zwłaszcza wegetatywnych form drobnoustrojów, które mogą być obecne w mleku, w tym w mleku ludzkim.

Znane są sposoby pasteryzacji mleka krowiego określane jako pasteryzacja termiczna. Sposoby te polegają na ekspozycji próbki mleka na działanie wysokiej temperatury przez określony okres czasu, a następnie natychmiastowe chłodzenie cieczy. Znany jest sposób termicznej pasteryzacji mleka krowiego określane jako pasteryzacja wysokotemperaturowa, krótkotrwała „HTST High Temperature Short Time”, podczas której mleko ogrzewa się konwekcyjnie do temperatury 72°C i utrzymuje w tej temperaturze przez 15-20 sekund. Pasteryzacja tą metodą powoduje znaczącą degradację biologicznie aktywnych składników mleka.

Znany jest również sposób pasteryzacji termicznej określane jako pasteryzacja niskotemperaturowa długotrwała „LTLT Low Temperature Long Time”, zwana również jako pasteryzacja „holder”, podczas której mleko ogrzewa się konwekcyjnie do temperatury 62,5°C, i przetrzymuje się w tej temperaturze przez 30 minut, a następnie natychmiast chłodzi do temperatury 4°C.

Z opisu patentowego WO 2014094189 znana jest metoda pasteryzacji mleka ludzkiego przy użyciu promieniowania ultrafioletowego zwana zimną pasteryzacją. W metodzie tej inaktywacja lub zmniejszenie ilości zanieczyszczeń biologicznych w mleku ludzkim następuje w wyniku działania światła ultrafioletowego o długości fali od 200 do 280 nm w urządzeniu nadającym mleku przepływ wirowy w celu ułatwienia ekspozycji mleka na promieniowanie UVC. Ekspozycja na działanie promieniowanie UVC powoduje jednak utlenianie lipidów mleka na drodze utlenianie fotosensybilizowanego.

Ludzkie mleko nie jest sterylne. Oprócz drobnoustrojów komensalnych, naturalnie występujących w mleku ludzkim, w tym o właściwościach probiotycznych, takich jak: *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., mogą w nim być wykrywane drobnoustroje potencjalnie chorobotwórcze i świadczące o niezachowaniu zasad higieny podczas odciągania mleka (m.in. *Staphylococcus aureus* i bakterie z grupy coli).

Aby zapewnić bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka pochodzącego od dawczyń a przeznaczonego dla małych dzieci, często wcześniaków i dzieci chorych, mleko poddawane jest pasteryzacji „holder”. W bankach mleka ludzkiego do pasteryzacji dopuszczane jest mleko ludzkie, w którym całkowita liczba bakterii wynosi poniżej  $10^5$  j.t.k./ml jednostek tworzących kolonie, oraz liczba gronkowców koagulazododatnich i bakterii z grupy coli jest mniejsza niż odpowiednio  $10^4$  i  $10^3$  j.t.k./ml.

Pasteryzacja „holder” jest obecnie stosowana w większości banków mleka ludzkiego na całym świecie. Banki mleka ludzkiego to profesjonalne laboratoria zajmujące się pozyskiwaniem, utrwalaniem, bezpiecznym przechowywaniem i dostarczaniem mleka kobiecego potrzebującym dzieciom, które z przyczyn losowych nie mogą być karmione przez własne mamy.

Pasteryzatory używane w bankach mleka to łaźnie wodne, które dają możliwość pasteryzacji wielu małych porcji mleka: do 150 ml mleka. W urządzeniach tych pasteryzacja prowadzona jest metodą konwekcyjną, ciepło przenoszone jest do pasteryzowanego mleka od źródła ogrzewania poprzez czynnik grzewczy - wodę i ścianki naczynia - butelki, w którym znajduje się płyn.

W pasteryzatorach stosowanych w bankach mleka temperatura cieczy mierzona jest poprzez umieszczenia czujnika temperaturowego w butelce kontrolnej, w rdzeniu cieczy. Przenoszenie ciepła w cieczy od ścianek do środka naczynia powoduje nierównomierne ogrzewanie się cieczy. Temperatura cieczy przy ściankach jest znacząco wyższa niż temperatura cieczy w środku pojemnika. Tym samym mleko znajdujące się przy ściankach butelki ma temperaturę istotnie wyższą niż pożądana temperatura  $62,5^{\circ}\text{C}$ . W stosowanej metodzie samo uzyskanie pożądanego temperatury cieczy trwa zwykle 15-20 minut. Czas ogrzewania mierzony jest od chwili gdy czujnik temperaturowy umieszczony w butelce kontrolnej odczyta pożądaną temperaturę i trwa 30 minut.

Pasteryzacja „holder” zapewnia bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka. Większość wegetatywnych form drobnoustrojów i wirusów, m.in. wirus HTLV, CMV, HIV i HPV zostaje wyeliminowanych. Jednocześnie powoduje jednak obniżenie zawartości i aktywności wielu składników bioaktywnych występujących w mleku ludzkim. W mleku ludzkim po pasteryzacji tego typu stwierdzono m.in. 33-60% spadek aktywności immunoglobuliny IgA, 21-57% spadek aktywności lizozymu, 64-83% spadek aktywności laktoferyny, 36-60% spadek zawartości witaminy C oraz praktycznie całkowitą degradację lipazy

lipoproteinowej.

Wciąż poszukuje się metod pasteryzacji, które umożliwiłyby uzyskanie mleka mikrobiologicznie bezpiecznego tj. pozbawionego zanieczyszczeń mikrobiologicznych a zarazem bogatego w dobroczynne składniki bioaktywne i odżywcze zawarte naturalnie w mleku.

Nieoczekiwanie okazało się, że ogrzewania mleka polem mikrofalowym o określonej charakterystyce przez ustalony czas, uzyskując zadaną temperaturę próbki mleka, prowadzi do skutecznej inaktywacji zanieczyszczeń mikrobiologicznej a jednocześnie w małym stopniu wpływa na składniki odżywcze i wartościowe elementy bioaktywne zawarte w mleku.

Sposób pasteryzacji mleka, zwłaszcza mleka ludzkiego, charakteryzuje się według wynalazku tym, że próbkę mleka ogrzewa się do zadanej temperatury z zakresu od 61°C do 70°C poprzez naświetlanie falami mikrofalowymi o częstotliwości od 2 do 3 GHz i mocy od 400 do 1000 W, przy czym czas uzyskiwania zadanej temperatury próbki mleka nie przekracza 3 minut, po czym próbkę mleka ogrzewa się falami mikrofalowymi przez okres do 10 minut, kontrolując temperaturę próbki mleka.

Korzystnie, próbkę mleka ogrzewa się do zadanej temperatury z zakresu od 61,5°C do 68°C i próbkę mleka ogrzewa się przez okres od 3 do 5 minut.

Korzystnie, próbkę mleka ogrzewa się do zadanej temperatury ogrzewania z zakresu od 61,5°C do 63,5°C i próbkę mleka ogrzewa się przez okres od 4 do 5 minut.

Korzystnie, w trakcie ogrzewania utrzymuje się stałą, zadaną temperaturę ogrzewania próbki mleka tak aby temperatura próbki mleka utrzymywała się w czasie w zakresie niezmiennym o więcej niż  $\pm 1^\circ\text{C}$  w stosunku do zadanej temperatury pożądanej.

Korzystnie, próbkę mleka ogrzewa poprzez przerywane w czasie naświetlanie falami mikrofalowymi, tak aby temperatura ogrzewania próbki mleka była stała i tak aby temperatura próbki mleka utrzymywała się w czasie ogrzewania i nie była różna o więcej niż  $\pm 1^\circ\text{C}$  w stosunku do zadanej temperatury pożądanej.

W sposobie według wynalazku zastosowano do ogrzewania próbki mleka energię elektromagnetyczną generowaną promieniowaniem mikrofalowym. Ekspozycja próbki mleka na promieniowanie mikrofalowe według wynalazku powoduje głównie wzrost temperatury cieczy dzięki efektom mikrofalowego ogrzewania dielektrycznego. Pasteryzacja według wynalazku następuje przez niekonwekcyjne ogrzewanie mleka

w określonej zadanej temperaturze generowanej polem mikrofalowym przez określony czas, co prowadzi do zabicia wegetatywnych form mikroorganizmów, w tym mikroorganizmów potencjalnie chorobotwórczych, do poziomu niewykrywalności w 1 ml mleka.

Według przeprowadzonych doświadczeń eksperymentalnych określono charakterystykę promieniowania mikrofalowego oraz czas jego działania, przy których dochodzi do skutecznego zniszczenia zanieczyszczeń mikrobiologicznych a jednocześnie w większym stopniu niż ma to miejsce przy zastosowaniu pasteryzacji „holder” zachowane zostają wartości odżywcze i bioaktywne mleka. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na określenie zakresu temperatur przy których wynalazek prowadzi do pożądanych efektów.

Energia elektromagnetyczna uzyskiwana z promieniowania mikrofalowego o częstotliwości do 3 GHz i mocy do 1000 W jest zbyt niska, by rozerwać wiązanie molekularne nawet tak słabe jak wiązania wodorowe. Zastosowane według wynalazku promieniowanie mikrofalowe nie generuje również reakcji chemicznych.

Zastosowane według wynalazku pola mikrofalowe o częstotliwości 2 - 3 GHz i mocy 400 – 1000 W do ogrzewania próbki mleka powoduje znacznie szybsze uzyskanie zadanej temperatury próbki mleka w bardzo krótkim czasie, nawet w ciągu kilkunastu sekund a ogrzewanie następuje praktycznie równomiernie w całej objętości cieczy tj. nie występują różnice pomiędzy temperaturą cieczy wewnątrz oraz przy ściankach ogrzewanego pojemnika, nawet w przypadku większych objętości cieczy. Ta charakterystyka znacząco odróżnia wynalazek od znanych sposobów konwekcyjnej pasteryzacji typu „holder”, które charakteryzuje dłuższy czas uzyskania pożądanej temperatury cieczy tj. 15-20 minut oraz której towarzyszy zjawisko nierównomiernego ogrzewania próbki mleka.

Wynalazek umożliwia uzyskanie mleka czystego mikrobiologicznie i zawierającego potrzebne składniki odżywcze i bioaktywne. Ekspozycja próbki mleka na pole mikrofalowe według wynalazku oraz szybkie ogrzanie mleka, do zadanej temperatury ogrzewania tj. maksymalnie w ciągu 3 minut, a następnie ogrzewanie próbki w zadanej temperaturze, stałej i jednorodnej w całej objętości próbki, z zakresu od 61°C do 70°C przez okres do 10 minut, korzystnie co najmniej 1 minuty, pozwala na uzyskanie analogicznych efektów bakteriobójczych w porównaniu do pasteryzacji niskotemperaturowej LTLT tzw. pasteryzacji „holder”, prowadzonej przez 30 min. Sposób według wynalazku jednocześnie pozwala na lepsze zachowanie aktywności / zawartości biologicznie aktywnych składników

mleka ludzkiego. Wynalazek nie prowadzi do negatywnych skutków w odniesieniu do lipidów tj. nie występuje oksydacja lipidów jak również nie generuje reakcji Maillarda.

Wynalazek pozwala na pasteryzację małych objętości cieczy, co jest pożądane w przypadku pasteryzacji mleka ludzkiego na potrzeby banków mleka. Istotne jest aby mleko pochodzące od dawczyń można było pasteryzować i przechowywać zamrażalniczo w małych objętościach rzędu 50-100 ml. Dzieci przedwcześnie urodzone, dla których w większości przeznaczone jest mleko z banków mleka, w pierwszych okresach życia potrzebują zaledwie kilku mililitrów mleka. Pasteryzacja i przechowywanie małych porcji pokarmu przeciwdziała mamowaniu niezużytego mleka ludzkiego, gdyż mleko zamrożone po pasteryzacji i rozmrożone nie może być ponownie zamrażane.

#### Przykład 1

Próbkę mleka ludzkiego o objętości 50 ml umieszcza się w szklanej butelce. Butelkę umieszcza się w znanym zamkniętym urządzeniu generującym pole mikrofalowe o charakterystyce 2,45 GHz, 600 W i ogrzewa przez okres 1,8 minuty do uzyskania zadanej, pożądanej stałej temperatury próbki mleka wynoszącej 62,5°C. Po uzyskaniu zadanej temperatury ogrzewania próbkę mleka utrzymuje się w zadanej temperaturze przez 5 minut. W trakcie ogrzewania falami mikrofalowymi o podanej charakterystyce, kontroluje się temperaturę próbki mleka znanym sposobem, w zależności od zastosowanego urządzenia generującego pole mikrofalowe np. za pomocą termostatu, tak aby temperatura próbki mleka nie zmieniała się w czasie ogrzewania o więcej niż  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Jedną z możliwości uzyskania stabilności temperatury ogrzewania próbki mleka w czasie jest sposób ogrzewania tej próbki mleka poprzez przerywane w czasie naświetlanie falami mikrofalowymi przy zastosowaniu magnetronu w sekwencjach: 3 sekundy włączony – 2 sekundy wyłączony. Dzięki temu temperatura próbki mleka w trakcie ogrzewania jest stała w zakresie  $\pm 1^\circ\text{C}$  w stosunku do zadanej temperatury pożądanej 62,5°C, tzn. nie jest niższa od 61,5°C i nie jest wyższa od 63,5°C. Przerywanie w czasie pole mikrofalowe stanowi jedynie przykład realizacji utrzymania zadanej, pożądanej temperatury 62,5°C nie zmieniającej się w czasie ogrzewania o więcej niż  $\pm 1^\circ\text{C}$  i może być realizowany w inny sposób, w zależności od urządzenia, które generuje fale i utrzymuje stałą zadaną temperaturę w jednostce czasu. Po tym czasie pasteryzacji, butelkę zamyka się jałową

nakrętką a następnie próbka mleka natychmiast zostaje ochłodzona do temperatury 15°C poprzez umieszczenie jej w łaźni wodnej.

Sposób umożliwia ogrzewanie próbki w zadanej temperaturze, która jest jednorodna w całej objętości cieczy. Zastosowanie wymienionych parametrów pasteryzacji pozwala na uzyskanie całkowitej inaktywacji populacji naturalnej mikroflory mleka o początkowej liczbie ok.  $10^5$  j.t.k./ml, w tym bakterii mlekowych, enterokoków, bakterii z grupy coli, gronkowców koagulazoujemnych i koagulazododatnich.

Ponadto pasteryzacja tą metodą pozwala na uzyskanie mleka ludzkiego, w którym aktywność enzymów przeciwutleniających została zachowana na poziomie: katalaza CAT 64%, peroksydaza glutationowa GPx 68%, dysmutaza ponadtlenkowa SOD 75%, a zawartość witaminy C pozostała na poziomie 63% względem surowego mleka kobiecego, przed pasteryzacją. W wyniku pasteryzacji stężenie lizozymu spada do poziomu 50% zawartości początkowej, a aktywność tego enzymu do poziomu 84% aktywności początkowej. W tych warunkach stężenie immunoglobuliny IgA pozostaje na poziomie 49% stężenia względem stężenia w mleku nie poddanym pasteryzacji. Laktoferyna zachowuje 90% a lipaza lipoproteinowa około 5% aktywności początkowej.

Skład i zawartość kwasów tłuszczowych w uzyskanym spasteryzowanym mleku ludzkim nie uległ zmianie w porównaniu do składu i zawartości KT w tym samym mleku surowym, nie poddanym obróbce temperaturowej. Zawartość pierwotnych produktów oksydacji lipidów: nadtlenuki i wodoronadtlenki, pozostaje na poziomie analogicznym jak w mleku przed pasteryzacją. Zawartość dialdehydu malonowego MDA, wskaźnika zawartości wtórnych produktów utleniania lipidów, również nie wzrasta. W mleku ludzkim po pasteryzacji nie stwierdza się wzrostu zawartości furozyny stanowiącego wskaźnik reakcji Maillarda.

#### Przykład 2

Sposób przeprowadza się jak opisano w przykładzie 1 z tym, że próbkę mleka krowiego o objętości 40 ml, do którego celowo wprowadzono bakterie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* w ilości ok.  $10^5$  j.t.k./ml, umieszcza się w butelce szklanej a następnie ogrzewa się przez 1,7 minut aż do uzyskania zadanej temperatury pożądaney 65°C przy użyciu pola mikrofalowego o charakterystyce 2,45 GHz, 600 W. W czasie ogrzewania stosuje się, działanie magnetronu

w sekwencjach: 3 sekundy włączony – 3 sekundy wyłączony. Próbkę mleka ogrzewa się w tych warunków przez 4 minuty. W ten sposób temperatura próbki mleka nie zmienia się w czasie ogrzewania o więcej niż  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  w stosunku do zadanej temperatury pożądanej  $65^{\circ}\text{C}$ . Po pasteryzacji, próbka natychmiast zostaje ochłodzona do temperatury  $16^{\circ}\text{C}$ . Zastosowanie wymienionych parametrów pasteryzacji pozwala na uzyskanie całkowitej inaktywacji wszystkich wymienionych powyżej drobnoustrojów, co potwierdzono poprzez sprawdzenie obecności bakterii w próbce w znanych warunkach mikrobiologicznych.

### Przykład 3

Próbkę mleka ludzkiego objętości 70 ml umieszcza się w naczyniu wykonanym z polipropylenu po czym próbkę umieszcza się w zamkniętym urządzeniu generującym pole mikrofalowe o charakterystyce 2,45 GHz, 700 W i ogrzewa się przez okres 3 minuty utrzymując zadaną, temperaturę pożądaną ogrzewania próbki mleka  $66^{\circ}\text{C}$  niezmienną w czasie ogrzewania o więcej niż  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Czas uzyskania tej temperatury cieczy wynosi 1,5 minuty. Próbkę mleka ogrzewa się utrzymując stałą zadaną temperaturę z dopuszczalnymi wahaniami temperatury w czasie ogrzewania w zakresie  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  poprzez przerywane w czasie naświetlanie falami mikrofalowymi, co realizuje się poprzez działanie magnetronu w sekwencjach: 4 sekundy włączony – 3 sekundy wyłączony. Po pasteryzacji butelkę zamyka się jałową nakrętką, a następnie próbka natychmiast zostaje ochłodzona do temperatury pokojowej poprzez umieszczenie jej w łaźni wodnej.

Sposób umożliwia ogrzewanie próbki w temperaturze jednorodnej w całej objętości cieczy. Zastosowanie wymienionych parametrów do pasteryzacji pozwala na uzyskanie mleka ludzkiego, w którym stężenie lizozymu spada do poziomu 48% zawartości początkowej, a aktywność tego enzymu do poziomu 84% aktywności początkowej. W tych warunkach stężenie immunoglobuliny IgA pozostaje na poziomie 43% stężenia względem stężenia w mleku nie poddanym pasteryzacji. Laktoferyna zachowuje 60% a lipaza lipoproteinowa około 4% aktywności początkowej. Aktywność enzymów przeciwutleniających została zachowana na poziomie: katalaza CAT 61%, peroksydaza glutationowa GPx 64%, dysmutaza ponadtlenkowa SOD 80%, a zawartość witaminy C pozostała na poziomie 54% względem surowego mleka kobiecego.

Sposób pasteryzacji pozwala na uzyskanie całkowitej inaktywacji populacji naturalnej mikroflory mleka o początkowej liczbie ok.  $10^4$  j.t.k./ml, w tym bakterii mlekowych,

enterokoków, bakterii z grupy coli, gronkowców koagulazoujemnych i koagulazododatnich. Skład i zawartość kwasów tłuszczowych w spasteryzowanym mleku ludzkim nie uległ zmianie w porównaniu do składu i zawartości KT w tym samym mleku nie poddanym obróbce temperaturowej. Zawartość pierwotnych produktów oksydacji lipidów - nadtlenuki i wodoronadtlenki - pozostaje na poziomie analogicznym jak w mleku przed pasteryzacją. Zawartość dialdehydu malonowego MDA, wskaźnika zawartości wtórnych produktów utleniania lipidów, również nie wzrosła. W mleku ludzkim po pasteryzacji nie stwierdza się wzrostu zawartości furozyny.

#### Przykład 4

Próbkę mleka ludzkiego objętości 60 ml umieszcza się w szklanej butelce i ogrzewa się do zadanej temperatury pożądanej 68°C polem mikrofalowym o charakterystyce: 2,45 GHz, 800W. Czas uzyskania zadanej temperatury ogrzewania wynosi 1,9 minuty. Następnie próbkę mleka ogrzewa się przez 5 minut utrzymując w czasie ogrzewania zadana temperaturę ogrzewania rzędu  $68 \pm 1^\circ\text{C}$ , stałą w całej objętości cieczy, generowaną przy użyciu pola mikrofalowego o charakterystyce: 2,45 GHz, 800W. Próbkę mleka ogrzewa się w czasie 5 minut utrzymując stałą temperaturę cieczy, niezmienną w czasie o więcej niż  $\pm 1^\circ\text{C}$  od zadanej temperatury pożądanej 68°C poprzez przerywane w czasie naświetlanie falami mikrofalowymi, co realizuje się stosując działanie magnetronu w sekwencjach: 4 sekundy włączony – 4 sekundy wyłączony. Po pasteryzacji próbka natychmiast zostaje ochłodzona do temperatury około 10°C poprzez umieszczenie w łaźni wodnej z lodem.

Zastosowanie wymienionych parametrów do pasteryzacji pozwala na uzyskanie mleka ludzkiego, w którym stężenie lizozymu spada do poziomu 46% zawartości początkowej, a aktywność tego enzymu do poziomu 72% aktywności początkowej. Aktywność enzymów przeciwutleniających została zachowana na poziomie: katalaza CAT 55%, peroksydaza glutationowa GPx 47%, dysmutaza ponadtlenukowa SOD 79%. Zawartość witaminy C pozostała na poziomie 34% względem surowego mleka kobiecego, przed pasteryzacją a w przypadku immunoglobuliny IgA nastąpił 65% spadek aktywności. Po pasteryzacji w mleku nie stwierdzono aktywnej formy lipazy lipoproteinowej oraz nie stwierdzono wzrostu zawartości furozyny.

dr Justyna Pawłowska

Rzecznik Patentowy  
nr rej. 3433