Analiza biochemicznych wskaźników obróbki termicznej mleka i produktów mleczarskich

Analysis of biochemical indicators of heat treatment of milk and milk products

Magdalena Świątek

Mariusz Śliwiński

Instytut Innowacji Przemysłu Mleczarskiego Sp. z o.o. w Mrągowie

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było przedstawienie metod oceny skuteczności pasteryzacji mleka i produktów mlecznych. Głównym celem pasteryzacji mleka jest zapewnienie bezpieczeństwa zdrowotnego, poprzez inaktywację drobnoustrojów chorobotwórczych, a także przedłużenie jego trwałości. Agencje regulacyjne na całym świecie podejmują działania w celu zapobiegania i kontroli zanieczyszczenia produktów mlecznych bakteriami chorobotwórczymi. Polegają one na zachowaniu właściwych warunków obróbki termicznej i monitorowaniu skuteczności pasteryzacji poprzez wykonywanie odpowiednich analiz. Mleko zawiera enzymy, które katalizują specyficzne reakcje chemiczne i charakteryzują się różną stabilnością termiczną. Utrata aktywności enzymów w większości przypadków może być wykryta poprzez reakcję barwną. Fosfataza alkaliczna i laktoperoksydaza są ważnymi wskaźnikami obróbki termicznej mleka. Fosfataza alkaliczna jest stabilna w temperaturze nieco wyższej niż wymagana do niszczenia patogenów mleka, dlatego kontrola aktywności tego enzymu jest najważniejszym wskaźnikiem bezpieczeństwa zdrowotnego mleka pasteryzowanego. Mleko pasteryzowane musi wykazywać ujemny wynik testu na obecność ALP. Oznaczanie aktywności laktoperoksydazy, która jest względnie stabilnym enzymem, może być wykorzystywane jako prosty test dla określenia górnej granicy pasteryzacji. Laktoperoksydaza nie ulega inaktywacji podczas normalnej pasteryzacji mleka. Jeśli mleko pasteryzowane wykazuje ujemny wynik testu na obecność laktoperoksydazy, musi być oznakowane jako "pasteryzowane w wysokiej temperaturze". Standardowe metody badania aktywności fosfatazy alkalicznej i laktoperoksydazy bazują na spektrofotometrii i fluorymetrii.

Słowa kluczowe:

fosfataza alkaliczna • laktoperoksydaza • pasteryzacja • mleko

Summary

The aim of this study was to present methods of evaluation of milk and dairy products pasteurization effectiveness. The main objective of milk pasteurization is to provide the health safety through inactivation of pathogenic microorganisms, as well as the extension of its shelf life. Regulatory agencies around the world are taking action to prevent and control pathogenic bacterial contamination of milk products. These actions involve maintaining the proper conditions of heat treatment and monitoring the effectiveness of pasteurization by carrying out appropriate analyses. The milk contains enzymes that catalyze specific chemical reactions and have different thermal stability. The loss of enzymes activity in most cases can be detected by colour reactions. Alkaline phosphatase and lactoperoxidase are important indicators of heat treatment of milk. Since alkaline phosphatase is stable to temperatures slightly higher than those required to inactivate milk pathogens, the control of its activity is the most important indicator of hygienic safety of pasteurized milk. Pasteurized milk must be negative for the ALP test. Determination of lactoperoxidase activity, which is a relatively stable enzyme, can be used as a simple test for the determination of the upper limit of pasteurization. Lactoperoxidase is not inactivated during normal pasteurization of milk. If pasteurized milk is negative for the lactoperoxidase test, it must be labeled as “highly pasteurized". Standard methods of evaluation of the activity of alkaline phosphatase and lactoperoxidase are based on spectrophotometry and fluorimetry.

Key words:

alkaline phosphatase • lactoperoxidase • pasteurization • milk

Wpłynęło: 16–06-2016

Zaakceptowano: 08-07-2016

Opublikowano on-line: 10-07-2016

Adres do korespondencji:

Dr inż. Magdalena Świątek,
Instytut Innowacji Przemysłu Mleczarskiego Sp. z o.o.
ul. Kormoranów 1, 11-700 Mrągowo
e-mail:

Wstęp

Zapewnienie bezpieczeństwa zdrowotnego żywności i jego zagwarantowanie dla konsumenta stało się nadrzędnym celem dla producentów oraz organów kontrolujących żywność. W celu uzyskania wymaganej jakości mikrobiologicznej produktów mlecznych stosuje się najczęściej pasteryzację. Obróbka termiczna jest głównym punktem krytycznym procesu produkcyjnego i jej kontrola wpływa na jakość i bezpieczeństwo konsumpcji produktu finalnego. W normalnych warunkach pasteryzacji (72°C/15 s lub dłuższy czas w niższej temperaturze) fosfataza alkaliczna (ang. alkaline phosphatase) jest nieco bardziej termostabilna w porównaniu do *Mycobacterium tuberculosis*, najbardziej ciepłooopornej, nieprzetrwalnikującej, patogennej bakterii występującej w surowym mleku. Tym samym, brak aktywności ALP wskazuje na właściwie przeprowadzoną pasteryzację. Oznaczanie aktywności ALP jest szybką metodą oceny skuteczności pasteryzacji mleka i produktów mlecznych, jednakże związaną z pewnymi ograniczeniami (enzym reaktywowany oraz pochodzenia mikrobiologicznego), które należy uwzględnić, w celu właściwej interpretacji wyników. Laktoperoksydaza jest względnie stabilnym, endogennym enzymem mleka. Mleko poddane obróbce termicznej HTST (ang. high temperature short time) w warunkach 72°C/15 s musi wykazywać pozytywną reakcję laktoperoksydazy. W związku z tym, za pomocą testu na obecność laktoperoksydazy można rozróżnić pasteryzację metodą HTST od pasteryzacji wysokiej. Do oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej i laktoperoksydazy wykorzystuje się metody spektrofotometryczne i fluorometryczne [6, 9, 10].

Celem niniejszej pracy jest przybliżenie wiedzy dotyczącej enzymów mleka jako wskaźników obróbki termicznej oraz innowacyjnych metod ich oznaczania.

Enzymy naturalnie występujące w mleku

Do roku 1970 zidentyfikowano wiele rodzimych enzymów mleka. W mleku krowim występuje naturalnie około 70 enzymów. Rodzime (endogenne) enzymy są to składniki mleka pochodzące z czterech głównych źródeł: osocza krwi, w wyniku uszkodzenia błon komórkowych gruczołu sutkowego; cytoplazmy komórek wydzielniczych, z których część jest czasami uwięziona wewnątrz kuleczek tłuszczowych przez błonę otaczającą kuleczkę tłuszczową (ang. milk fat globule membrane, MFGM), podczas wydzielania z komórki; błony otaczającej kuleczkę tłuszczową (MFGM), której zewnętrzna warstwa wywodzi się z błony apikalnej komórki wydzielniczej, która z kolei wywodzi się z błon Golgiego, jest to prawdopodobnie źródło większości enzymów mleka; komórek somatycznych (leukocytów), które dostają się do gruczołu mlekowego z krwi, w celu zwalczenia infekcji bakteryjnej (mastitis), a następnie przechodzą do mleka. Tak więc, większość enzymów jest wprowadzanych do mleka w wyniku specyficznego mechanizmu, dzięki któremu składniki mleka, w szczególności kuleczki tłuszczowe, są wydalane z komórek wydzielniczych. Mleko nie zawiera substratów dla wielu enzymów rodzimych. Ponadto część enzymów mleka pozostaje nieaktywnych, z uwagi na nieodpowiednie warunki środowiska, jak np. pH [3, 4].

Wiele rodzimych enzymów mleka jest ważnych technologicznie. Lipaza, proteinaza, fosfataza kwaśna oraz oksydaza ksantynowa wpływają na pogorszenie jakości mleka, natomiast laktoperoksydaza, lizozym, oksydaza sulfhydrylowa i dysmutaza ponadtlenkowa oddziaływują korzystnie na jego trwałość. Termostabilność fosfatazy alkalicznej, γ-glutamylotranspeptydazy i laktoperoksydazy czyni je wskaźnikami obróbki termicznej mleka. Wzrost stężenia fosfatazy kwaśnej, katalazy i β-N-acetyloglukozaminidazy może świadczyć o stanie zapalnym gruczołu mlekowego (*mastitis*). Większość rodzimych enzymów mleka nie wykazuje korzystnego wpływu na cechy organoleptyczne i wartość odżywczą mleka, a zatem ich inaktywacja cieplna jest jednym z celów wielu procesów technologicznych. Od ponad 100 lat uwaga naukowców skupiona jest na rodzimych enzymach mleka, głównie ze względu na ich wpływ na jakość mleka i produktów mleczarskich, a także ich przydatność jako wskaźników obróbki termicznej mleka [3].

Fosfataza alkaliczna i laktoperoksydaza stanowią dwa ważne wskaźniki monitorowania obróbki cieplnej mleka. Fosfataza alkaliczna jest stabilna w temperaturze nieco wyższej niż wymagana do inaktywacji patogenów mleka, dlatego kontrola aktywności tego enzymu jest najważniejszym wskaźnikiem dla oceny bezpieczeństwa zdrowotnego mleka pasteryzowanego. Oznaczanie aktywności laktoperoksydazy, która jest względnie stabilnym endogennym enzymem, może być wykorzystane jako prosty test dla określenia górnej granicy pasteryzacji i rozróżnienia mleka pasteryzowanego od mleka pasteryzowanego w wysokiej temperaturze [9].

Fosfataza alkaliczna

Charakterystyka enzymu

Mleko zawiera kilka fosfataz, wśród których największe znaczenie technologiczne mają fosfataza kwaśna i alkaliczna. Fosfataza alkaliczna (ALP, E.C. 3.1.3.1) jest glikoproteiną związana z błoną, która jest szeroko rozpowszechniona w tkankach zwierząt oraz w mikroorganizmach. Istnieją cztery główne rodzaje ALP występującej u ssaków: jelitowa, łożyskowa, zarodkowa i tkankowo nieswoista. Komórki jelita i łożyska są szczególnie bogatym źródłem ALP. Fosfataza alkaliczna katalizuje hydrolizę monoestrów kwasu fosforowego do fosforanu i odpowiedniego alkoholu (w środowisku o pH alkalicznym) [5].

Obecność fosfatazy alkalicznej w mleku odkrył w 1925 roku F. Demuth. Wykazano, że jest to rodzimy enzym mleka, a także stwierdzono, że odpowiednia kombinacja czasu i temperatury obróbki mleka, o nieznacznie wyższych parametrach niż dla inaktywacji *Mycobacterium tuberculosis,* powoduje inaktywację ALP.

ALP występuje naturalnie we wszystkich rodzajach surowego mleka. Mleko kozie charakteryzuje się mniejszą aktywnością ALP w porównaniu do mleka krowiego, natomiast aktywność enzymu w mleku owczym jest kilkukrotnie wyższa niż w mleku krowim. ALP w około 30-40% jest związana z MFGM, a pozostała część jest rozproszona w fazie beztłuszczowej mleka i prawdopodobnie związana z lipoproteinami. Poziom ALP w mleku jest zależny od zawartości tłuszczu w mleku, a także od rasy, okresu laktacji, zdrowia i wieku zwierzęcia [11].

ALP pochodząca z mleka krowiego ma masę cząsteczkową 187 kDa i składa się z dwóch identycznych podjednostek. Optymalne warunki dla aktywności enzymu to: pH 9,7 – 10,1, temperatura 37°C. Cząsteczka enzymu zawiera cztery atomy Zn, które wpływają na jego aktywność. ALP jest aktywowana przez jony Mg^{2+}, a hamujące działanie w stosunku do enzymu wykazują metale chelatujące (apoenzym może być reaktywowany przez dodanie jednego z szeregu metali) oraz fosforany nieorganiczne. Obecność jonów metali odgrywa istotną rolę w zdolności ALP do odzyskania aktywności enzymatycznej po inaktywacji cieplnej [10].

Mleko poddane obróbce termicznej w temperaturze 63-65°C przez 30-32 minuty lub 72-75°C przez 15-30 sekund powinno być produktem bezpiecznym dla zdrowia konsumenta. Wskaźnikiem właściwie przeprowadzonej pasteryzacji jest redukcja aktywności fosfatazy alkalicznej do minimum. Inaktywacja ALP wskazuje, że podczas obróbki termicznej zostały zniszczone patogeny zdolne do namnażania się w mleku. Mechanizm inaktywacji ALP początkowo był uważany za prostą, nieodwracalną przemianę aktywnej formy enzymu w postać nieaktywną. Później wykazano, że reakcja ta może przebiegać dwuetapowo – odwracalna denaturacja enzymu, a następnie nieodwracalna przemiana w formę nieaktywną. Aktywność ALP w surowym mleku krowim wynosi od ok. 300000 do 1000000 mU/l (1 U - ilość enzymu fosfatazy alkalicznej, która katalizuje przekształcenie 1 μmola substratu w czasie 1 minuty). Po pasteryzacji aktywność ALP zmniejsza się około 500-krotnie i spada do poziomu poniżej 350 mU/l. ALP aktywna w mleku po obróbce cieplnej jest określana jako fosfataza resztkowa [6, 14].

Fosfataza alkaliczna pochodzenia mikrobiologicznego

Mimo właściwie przeprowadzonej pasteryzacji mleka możliwe jest wykrycie aktywności fosfatazy innej niż resztkowa. Świadczy to o obecności fosfatazy syntetyzowanej przez niektóre bakterie lub enzymu reaktywowanego. Mikroorganizmy wytwarzające fosfatazę alkaliczną w mleku zostały scharakteryzowane jako drobnoustroje Gram-ujemne, należące do rodzajów *Sphingomonas, Sphingobacterium, Brevundimonas, Chryseobacterium, Burkholderia* i innych. Enzym pochodzenia mikrobiologicznego (ang. heat resistant microbial phosphatase - HRMP) jest bardziej oporny na działanie wysokiej temperatury w porównaniu do endogennego enzymu mleka. Enzym wytwarzany przez drobnoustroje ulega inaktywacji po zastosowaniu obróbki termicznej w temperaturze powyżej 75–80°C przez 15 minut. Aby stwierdzić obecność fosfatazy pochodzenia mikrobiologicznego próbkę mleka poddaje się obróbce termicznej w temperaturze 95°C w czasie 2 minut lub 63°C w czasie 30 minut i ponownie poddaje analizie. W tych warunkach enzym naturalnie występujący w mleku ulega inaktywacji. Jeśli w tak przygotowanej próbce stwierdzi się aktywność ALP, to świadczy o obecności ciepłoopornej fosfatazy pochodzenia mikrobiologicznego [1, 14].

Fosfataza alkaliczna reaktywowana

Wiele badań poświęcono zjawisku określanemu jako reaktywacja (renaturacja) fosfatazy. Już w połowie XX wieku zaobserwowano, że mleko po obróbce UHT było pozbawione fosfatazy bezpośrednio po wyprodukowaniu, ale podczas przechowywania następował wzrost aktywności ALP, przy czym nie było to związane z obecnością fosfatazy mikrobiologicznej. Wykazano, że w mleku po obróbce HTST nie zachodzi proces reaktywacji fosfatazy alkalicznej. Homogenizacja produktów przed obróbką cieplną i obróbka HTST mleka po obróbce UHT zazwyczaj zapobiegają reaktywacji enzymu. Renaturacja enzymu może zachodzić w mleku poddanym obróbce termicznej w temperaturze co najmniej 84°C. Temperatura przechowywania optymalna dla procesu reaktywacji enzymu to 30°C. W tych warunkach renaturacja enzymu jest wykrywana już po 6 godzinach i może być kontynuowana przez okres do 7 dni. Przeprowadzono badania w celu wyjaśnienia mechanizmu reaktywacji enzymu i stwierdzono, że reaktywacji najprawdopodobniej ulega enzym związany z błoną. Wykazano, że obecność jonów Mg^{2+} i Zn^{2+} silnie sprzyja renaturacji enzymu, powodując zmiany konformacyjne w zdenaturowanym białku, podczas gdy jony Co^{2+}, Cu^{2+}, Sn^{2+} oraz EDTA mogą hamować reaktywację ALP. Grupy sulfhydrylowe (SH) wydają się być niezbędne dla renaturacji enzymu. Dlatego też proces ten jest obserwowany w mleku UHT, natomiast nie występuje w mleku po obróbce termicznej HTST. Uważa się, że grupy SH pochodzące od zdenaturowanych białek serwatkowych chelatują metale ciężkie, które w przeciwnym razie wiążą grupy SH enzymu, uniemożliwiając renaturację. W celu weryfikacji czy aktywność ALP wynika z obecności enzymu reaktywowanego mleko zostaje podzielone na dwie próbki, po czym do jednej dodaje się roztwór octanu magnezu. Obie próbki inkubuje się w temperaturze 34°C przez 60 minut i po 6-krotnym rozcieńczeniu poddaje oznaczeniu aktywności ALP. Jeżeli aktywność ALP w próbce z dodatkiem octanu magnezu jest wyższa niż w próbce „zerowej" (bez dodatku octanu magnezu), stwierdza się obecność ALP reaktywowanej [5, 10, 14].

Fosfataza alkaliczna w serach

Jakość sera zależy od mleka użytego do jego produkcji. Proteoliza jest głównym czynnikiem przyczyniającym się

do kształtowania się smaku i tekstury sera podczas dojrzewania. Większość krótkołańcuchowych peptydów w serach pochodzi z hydrolizy kazeiny, a część z nich ulega defosforylacji. W serach produkowanych z mleka pasteryzowanego, endogenna fosfataza kwaśna i bakteryjna fosfataza są prawdopodobnie odpowiedzialne za defosforylację peptydów. Natomiast w serach wytwarzanych z mleka surowego (np. parmezan, grana), endogenna fosfataza alkaliczna mleka odgrywa największą rolę w procesie defosforylacji peptydów. Sery produkowane z mleka surowego szybciej dojrzewają i charakteryzują się ciekawszymi cechami smakowymi, z uwagi na obecność rodzimych enzymów oraz naturalnej mikroflory mleka [5, 14].

Pod względem bezpieczeństwa konsumentów wskazane jest stosowanie do produkcji serów mleka pasteryzowanego. Badanie aktywności ALP w serach ma na celu sprawdzenie czy mleko użyte do ich produkcji było właściwie pasteryzowane. Aktywność ALP w serach z mleka pasteryzowanego wynosi około 1–3 mU/g, a w wyprodukowanych z mleka surowego 1900–2200 mU/g. W serach pleśniowych może być obecna fosfataza alkaliczna pochodząca z użytych kultur starterowych grzybów pleśniowych, dlatego też mogą one wykazywać wyższą aktywność ALP [13, 14].

Metody oznaczania aktywności ALP

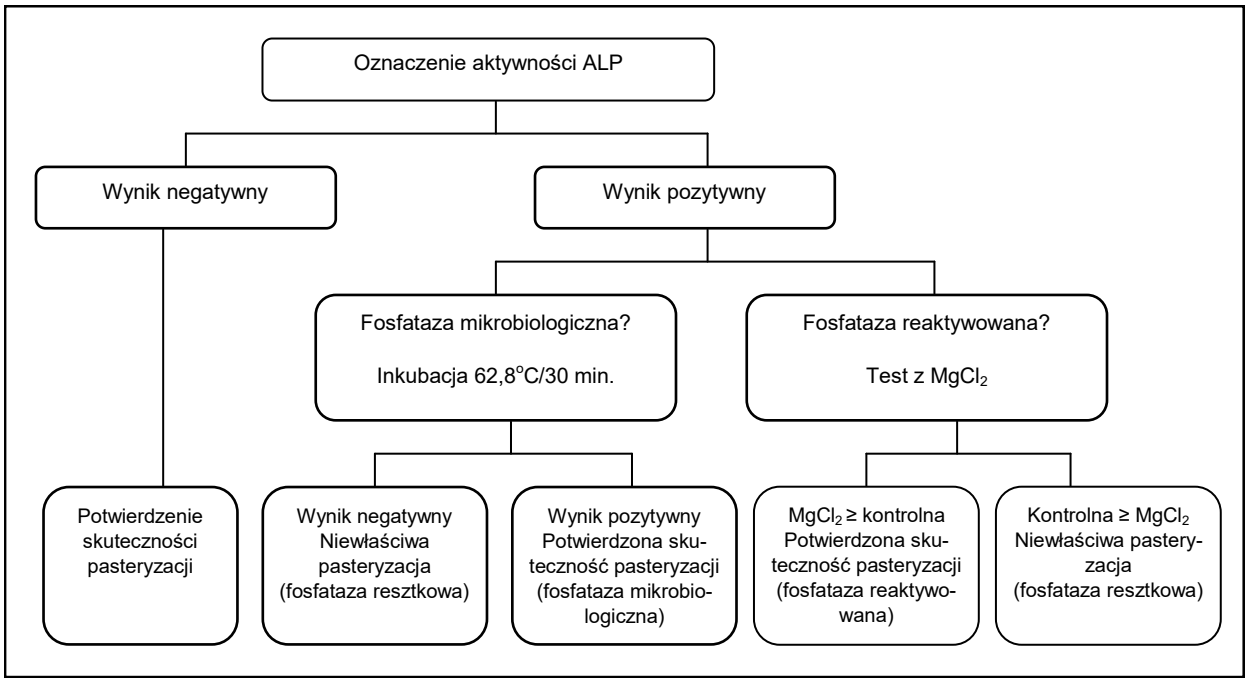
Obecność aktywnej endogennej ALP w mleku pasteryzowanym świadczy o niewłaściwie przeprowadzonej pasteryzacji lub zanieczyszczeniu mlekiem surowym w ilości co najmniej 0,1%. Ogólna procedura stosowana w ocenie skuteczności pasteryzacji poprzez badanie aktywności ALP została przedstawiona na rysunku 1. W przypadku uzyskania wyniku pozytywnego, konieczne są dalsze badania w celu zapewnienia, że aktywność fosfatazy nie wynika z obecności termostabilnej fosfatazy mikrobiologicznej lub fosfatazy reaktywowanej. Do metod oznaczania aktywności ALP zaliczamy metody kolorymetryczne, chemiluminescencyjne, fluorymetryczne, immunochemiczne oraz elektrochemiczne (amperometryczne oraz potencjometryczne). Wybrane metody kolorymetryczne, fluorymetryczne i chemiluminescencyjne zostały uznane za potwierdzone metody weryfikacji pasteryzacji w przemyśle mleczarskim [10, 11, 12].

Metody kolorymetryczne

Pierwsze metody oznaczania aktywności ALP oparte były na wykorzystaniu reakcji, podczas których wytwarzane są produkty barwne. Większość współczesnych testów kolorymetrycznych bazuje na pierwszej metodzie oznaczania aktywności ALP opracowanej przez Kay`a i Graham`a (1933 r.). Zasada metody polega na uwalnianiu się fenolu z fosforanu fenylu pod wpływem ALP. Fenol reaguje następnie z 2,6-dichlorochinonem chloroimidu (CQC) nadając barwę niebieską [5].

Metoda według Scharer`a (1938 r.) jest modyfikacją procedury opracowanej przez Kay`a i Graham`a, ale umożliwia skrócenie czasu analizy (ok. 75 min.). Fenol uwolniony podczas reakcji hydrolizy fosforanu fenylu reaguje z 2,6-dibromochinonem chloroimidu (BQC) nadając barwę niebieską [5].

Sanders i Sager opracowali metodę oznaczania aktywności ALP (1946 r.) w mleku i serach, bazując na metodzie według Scharer`a.



Rys. 1. Ogólna zasada określania skuteczności pasteryzacji produktów mleczarskich poprzez analizę aktywności fosfatazy alkalicznej [10]

Fig. 1. The general principle of determining the effectiveness of pasteurization of milk products by analysis of alkaline phosphatase [10]

Decyzja Komisji z dnia 14 lutego 1991 r. ustanawiająca niektóre metody analizy i badania surowego mleka oraz mleka poddanego obróbce termicznej (91/180/EWG) zatwierdziła tą metodę do oznaczania aktywności ALP. Aktywność fosfatazy wyrażona jest jako ilość fenolu w mikrogramach, który zostaje uwolniony zgodnie z warunkami wymienionymi w procedurze przez 1 ml mleka pasteryzowanego. Za wynik negatywny przyjmuje się każde mleko, którego aktywność fosfatazy wynosi mniej niż 4 µg/ml [5, 26].

Metoda kolorymetryczna z fosforanem fenylu i produktem reakcji 2,6-dibromochinonem chloroimidu (BQC) została również zatwierdzona przez ISO i IDF: Norma Międzynarodowa ISO 3356:2009 | IDF 63:2009 - *Milk — Determination of alkaline phosphatase*. Aktywność ALP jest wyrażana jako ilość fenolu uwolnionego przez próbkę w trakcie oznaczania. Metoda znajduje zastosowanie do oznaczania aktywności ALP nie mniejszej niż 1 µg fenolu w mililitrze. Norma jest przeznaczona do oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej w mleku, mleku w proszku, maślance, maślance w proszku, serwatce oraz serwatce w proszku [16].

W teście według Aschaffenburg`a i Mullen`a (1949 r.) p-nitrofosforan fenylu pod wpływem ALP ulega hydrolizie do fosforanu nieorganicznego i p-nitrofenolu. Nitrofenol zabarwia roztwór o odczynie alkalicznym na żółto. Metoda ta charakteryzuje się nieco większą czułością i krótszym czasem analizy w porównaniu od metody według Kay`a i Graham`a. Aktywność fosfatazy równa lub mniejsza od 10 µg p-nitrofenolu/ml mleka świadczy o skutecznej pasteryzacji [1, 5].

Metoda kolorymetryczna z p-nitrofosforanem fenylu została zatwierdzona przez ISO i IDF: Specyfikacja Techniczna ISO/TS 6090:2004 | IDF/RM 82:2004 - *Milk and dried milk, buttermilk and buttermilk powder, whey and whey powder — Detection of phosphatase activity*. Specyfikacja określa sposób badania przesiewowego dla wykrywania aktywności fosfatazy mleka krowiego, mleka w proszku, maślanki, maślanki w proszku, serwatki, serwatki w proszku. Specyfikacja obejmuje dwie procedury. Procedura A przeznaczona jest szczególnie dla mleka (nie obejmuje etapu klarowania próbki) i umożliwia wykrycie 0,5% (ułamek masowy) mleka surowego w mleku pasteryzowanym. Procedura B obejmuje etap klarowania próbki i umożliwia wykrycie 0,2% (ułamek masowy) surowego produktu odtworzonego w pasteryzowanym produkcie odtworzonym. Aktywność fosfatazy wyrażona jest jako wynik ujemny lub dodatni [17].

W metodzie według Kleyn`a (1978 r.) monofosforan fenoloftaleiny pod wpływem ALP ulega hydrolizie do fosforanu i fenoloftaleiny. Aktywność enzymu obliczana jest na podstawie uwalnianej do środowiska reakcji fenoloftaleiny, zabarwiającej roztwór o odczynie alkalicznym na różowo [14].

Metody chemiluminescencyjne

Metody chemiluminescencyjne oparte są na defosforylacji substratu dioksoetanofosforanowego pod wpływem ALP, z wytworzeniem fotoaktywnego (chemiluminescencyjnego) produktu. Ilość wytworzonego chemiluminescencyjnego produktu jest mierzona i przekształcana na jednostki enzymu z użyciem luminometru. Metoda chemiluminescencyjna została sprawdzona i zatwierdzona przez ISO i IDF: Norma Międzynarodowa ISO 22160:2007 | IDF 209:2007 - *Milk and milk-based drinks —Determination of alkaline phosphatase activity — Enzymatic photo-activated system (EPAS) method*; Polska Norma PN-EN ISO 22160:2009 – *Mleko i napoje na bazie mleka - Oznaczanie aktywności fosfatazy alkalicznej - Metoda enzymatyczno – fotoaktywacyjna (EPAS)*. Norma jest przeznaczona do oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej w pasteryzowanym mleku pełnym, mleku odtłuszczonym i częściowo odtłuszczonym, śmietance i mleku smakowym. Metoda ta może być stosowana do mleka i napojów na bazie mleka pochodzącego od krów, owiec, bawolic i kóz, a także do jakiejkolwiek płynnej próbki, jeżeli zostanie rozcieńczona w taki sposób, aby po rozcieńczeniu aktywność ALP wynosiła mniej niż 7000 milijednostek na litr. Aktywność ALP jest wyrażona w milijednostkach aktywności enzymu na litr (mU/l). Jednostka aktywności U, jest to ilość enzymu fosfatazy alkalicznej, która katalizuje przekształcenie 1 µmola stabilnego aromatycznego substratu w ciągu 1 minuty [18].

Metody immunochemiczne

Metody immunoenzymatyczne oznaczania aktywności ALP polegają na zastosowaniu testów ELISA. Wykorzystuje się przeciwciała specyficzne dla fosfatazy alkalicznej mleka, dzięki którym można odróżnić endogenną ALP mleka od enzymu bakteryjnego, stosując kompetycyjny test ELISA. Jednakże oznaczanie ALP przy użyciu metod ELISA opracowano jak dotąd w stosunkowo prostych układach modelowych i nie zostały jeszcze potwierdzone dla produktów spożywczych. Rozwój metod immunochemicznych mógłby potencjalnie zmniejszyć poziom błędów wynikających z obecnych trudności w odróżnianiu resztkowej ALP mleka od enzymu reaktywowanego i pochodzenia mikrobiologicznego [10].

Metody elektrochemiczne

Metody amperometryczne oparte są na woltamperometrii cyklicznej. Fosforan *p*-hydroksyfenolu pod wpływem ALP ulega hydrolizie do fosforanu i hydrochinonu. Hydrochinon jest następnie utleniany do chinonu na powierzchni elektrody, po czym ponownie redukowany do hydrochinonu przez oksydazę glukozową w obecności glukozy. Sygnał jest uzyskiwany poprzez monitorowanie prądu przy stałej wartości potencjału. W metodach elektrochemicznych mogą być również stosowane inne nieelektroaktywne substraty (np. *p*-aminofenol), z których powstają elektroaktywne produkty w wyniku enzymatycznej defosforylacji [14].

Inna metoda elektrochemiczna oznaczania aktywności ALP polega na zastosowaniu sprzężonego biosensora tyrozynazy. W obecności ALP z fosforanu fenylu zostaje uwolniony fenol, który następnie ulega utlenieniu do chinonu przez tyrozynazę unieruchomioną w kompozytowej elektrodzie grafitowo-teflonowej. Chinon redukuje się do katecholu na powierzchni elektrody, co powoduje wzrost natężenia prądu, który jest mierzony amperometrycznie. Katechol jest ponownie utleniany do chinonu przez tyrozynazę, tworząc cykl redoks, dzięki czemu uzyskuje się wzmocnienie sygnału elektrochemicznego i wykrywanie ALP z dużą czułością [5].

Metody fluorymetryczne

Metody analityczne oparte na właściwościach fluorescencyjnych niektórych związków są często stosowane w dziedzinie nauk chemicznych i biologicznych, zwłaszcza w testach enzymatycznych, gdzie wymagana jest wysoka czułość metody. Metody fluorymetryczne oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej polegają na uwalnianiu wysoce fluorescencyjnego produktu pod wpływem ALP. W 1965 r. opublikowano jedną z pierwszych metod fluorymetrycznego oznaczania aktywności ALP w mleku [10].

Metodą odniesienia pomiaru aktywności ALP jest metoda fluorymetryczna: PN-EN ISO 11816-1:2014-02 - *Mleko i przetwory mleczne - Oznaczanie aktywności fosfatazy alkalicznej - Część 1: Metoda fluorymetryczna dla mleka i napojów na bazie mleka* oraz PN-EN ISO 11816-2:2005 - *Mleko i przetwory mleczne - Oznaczanie aktywności fosfatazy alkalicznej - Część 2: Metoda fluorometryczna dla serów*. Jako metody odniesienia (*ang. reference methods*) określa się metody analiz uznane przez ekspertów na arenie międzynarodowej lub w drodze porozumienia między stronami, stosowane są np. w przepisach prawa. Część 1 normy przeznaczona jest do oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej w mleku surowym, poddanym obróbce cieplnej mleku pełnym, częściowo odtłuszczonym, odtłuszczonym i smakowym. Metoda ta jest również odpowiednia dla mleka i napojów na bazie mleka krowiego, owczego, koziego i mleka w proszku po odtworzeniu. Część 2 normy jest przeznaczona do badania aktywności ALP w serach. Metoda stosowana jest również do serów miękkich i półtwardych w celu odróżnienia serów z mleka surowego od serów z mleka pasteryzowanego, pod warunkiem, że pleśń znajduje się tylko na powierzchni, a nie w wewnętrznej części sera. Procedura ta może być również użyta do sprawdzania właściwej pasteryzacji sera lub surowca. Pod wpływem ALP pochodzącej z próbki substrat zwany Fluorophos® (fosforan 2'-(2-benzotiazolilo)-6'-hydroksybenzotiazolowy) ulega hydrolizie na resztę fosforanową oraz silnie fluorescencyjny produkt (Fluoroyellow®). Fluorymetryczny pomiar aktywności ALP wykonywany jest z użyciem fluorymetru wyposażonego w układ wzbudzający promieniowanie o długości fali 440 nm i układ pomiaru emisji promieniowania o długości fali 560 nm, w temperaturze 38°C i w czasie 3 minut. Obejmuje on okres wyrównania temperatury substratu i próbki (1 min.), po którym następują wielokrotne odczyty dla ustalenia szybkości reakcji. Aktywność enzymu jest automatycznie przeliczana i podawana przez aparat w: mU/l - dla mleka i napojów mlecznych, mU/kg - dla serów. Jednostka aktywności ALP (U), jest to ilość enzymu fosfatazy alkalicznej, która katalizuje przekształcenie 1 µmola substratu w czasie 1 minuty. Aparat może mierzyć aktywność do 7000 mU/l. Jeżeli aktywność jest wyższa, próbkę rozcieńcza się mlekiem pozbawionym fosfatazy alkalicznej. Wynik testu poniżej 350 mU/l jest uważany jako negatywny. W takim przypadku nie są wymagane żadne dalsze działania, ponieważ negatywny wynik wskazuje prawidłową i kompletną pasteryzację. Wynik analizy powyżej 350 mU/l jest uważany za pozytywny i należy wykonać testy potwierdzające w celu określenia, czy oznaczona aktywność ALP wynika z obecności fosfatazy alkalicznej resztkowej, mikrobiologicznej czy reaktywowanej. Każdy rodzaj badanego produktu wymaga sporządzenia krzywej kalibracji, a parametry kalibracji są przechowywane w oddzielnych "kanałach" pamięci urządzenia. Metoda fluorymetryczna charakteryzuje się większą dokładnością, powtarzalnością, a także łatwością i szybkością wykonania w porównaniu do metod kolorymetrycznych. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że metoda fluorymetryczna pozwala na wykrycie zanieczyszczenia produktu surowym mlekiem w ilości 0,003-0,006% (aktywność ALP około 25-50 mU/l), podczas gdy metody kolorymetryczne - 0,1-0,5% [10, 15, 19, 20, 27].

Laktoperoksydaza

Charakterystyka enzymu

Laktoperoksydaza (LPO) (EC 1.11.1.7) jest oksydoreduktazą o masie cząsteczkowej 77,5 kDa, składającą się z dwóch identycznych podjednostek. LPO jest glikoproteiną zawierającą w cząsteczce żelazo. Enzym ten katalizuje utlenianie różnych związków (donorów atomów wodoru) w obecności nadtlenków (np. nadtlenku wodoru, wodoronadtlenków). Laktoperoksydaza występuje w mleku ssaków, wykryto ją także w ślinie i łzach. Obecność laktoperoksydazy w mleku krowim odkrył w 1881 r. C. Arnold. LPO występuje w ilości około 0,5% białek serwatkowych mleka (ok. 30 mg/l). Jest jednym z najbardziej termostabilnych enzymów mleka. LPO jest stosunkowo stabilna podczas obróbki termicznej do 75°C, a powyżej tej temperatury następuje istotne obniżenie jej aktywności. Enzym ulega inaktywacji po ogrzewaniu w temperaturze 73°C przez 10 minut lub 80°C przez 20 sekund. Oznaczenie aktywności LPO jest stosowane do monitorowania obróbki termicznej mleka powyżej 72°C w czasie 15 s oraz rozróżniania pomiędzy obróbką termiczną HTST i pasteryzacją wysoką mleka (> 20 s w temperaturze 80°C) [2, 6, 8].

Laktoperoksydaza może być wykorzystywana do konserwacji świeżego mleka przechowywanego w temperaturze pokojowej, w krajach, w których nie zawsze jest możliwość chłodzenia mleka po udoju (np. Indie, kraje Afryki). LPO katalizuje reakcję utleniania anionu tiocyjanianu

(SCN^-) w obecności nadtlenku wodoru, prowadząc do powstania nietrwałego reaktywnego związku, hypotiocyjanianu ($OSCN^-$), który wykazuje działanie przeciwbakteryjne (m.in. blokowanie szlaku glikolitycznego). Działanie systemu laktoperoksydazy jest zależne od trzech składników: enzymu, tiocyjanianu i nadtlenku wodoru. Mleko jest bogate w laktoperoksydazę i enzym nie jest czynnikiem ograniczającym. Poziom tiocyjanianu w mleku jest zmienny (0,02-0,25 mM), ponieważ pochodzi on głównie z hydrolizy glukozynolanów i glikozydów obecnych w paszy. Nadtlenek wodoru nie występuje naturalnie w świeżym, nieskażonym mleku od zdrowych krów. Ilość nadtlenku wodoru potrzebna do uaktywnienia przeciwbakteryjnego działania laktoperoksydazy jest niska. Nadtlenek wodoru dodaje się do mleka w postaci rozcieńczonego roztworu lub wytwarza się go enzymatycznie (np. oksydaza glukozowa). W 1991 roku Komisja Codex Alimentarius uznała stosowanie systemu laktoperoksydazy w krajach, gdzie uwarunkowania ekonomiczne, techniczne i praktyczne uniemożliwiają chłodzenie mleka surowego po udoju [3, 8, 28].

Metody oznaczania aktywności LPO

Metody oznaczania aktywności laktoperoksydazy wykorzystują różne związki jako donory elektronów, m.in. pirogalol, gwajakol, p-fenylenodiamina, ABTS (kwas 2,2`-azyno-*bis*(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)). Związki te po utlenieniu absorbują światło w zakresie widzialnym i są oznaczane spektrofotometrycznie. Złożony przebieg reakcji peroksydacji wymaga starannie zaprojektowanych i ściśle kontrolowanych warunków doświadczalnych, w celu otrzymania liniowej zależności szybkości początkowej reakcji od stężenia enzymu. W badaniach kinetyki reakcji katalizowanych przez laktoperoksydazę wykazano, że enzym jest powierzchniowo czynny. Przy niskim stężeniu enzymu następuje znaczne zmniejszenie jego aktywności w fazie płynnej z powodu adsorpcji enzymu na powierzchni naczynia, czemu można zapobiegać poprzez dodatek żelatyny [7, 8].

Próba Storcha jest metodą jakościową wykrywania obecności laktoperoksydazy w mleku, opracowaną w 1898 r. Polega na dodaniu do próbki mleka nadtlenku wodoru i p-fenylenodiaminy i obserwowaniu powstałego zabarwienia. W obecności laktoperoksydazy p-fenylenodiamina ulega utlenieniu do indofenolu o barwie niebieskiej, a intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do stężenia enzymu. Metoda ta jest wykorzystywana do identyfikacji obróbki termicznej mleka w temperaturze ≥ 76°C przez 15 sekund. Barwa niebieska świadczy o obecności aktywnej laktoperoksydazy (obróbka w temperaturze < 76°C przez 15 sekund), a brak zabarwienia wskazuje na inaktywację laktoperoksydazy (obróbka termiczna ≥ 76°C przez 15 sekund) [4, 7, 8]. Decyzja Komisji z dnia 14 lutego 1991 r. ustanawiająca niektóre metody analizy i badania surowego mleka oraz mleka poddanego obróbce termicznej (91/180/EWG) zatwierdziła metodę kolorymetryczną z p-fenylenodiaminą do oznaczania obecności lub nieobecności enzymu peroksydazy w mleku, jako kontroli pasteryzacji. Jeśli mleko jest właściwie pasteryzowane, to w ciągu 30 sekund od dodania odczynników (p-fenylenodiaminy oraz nadtlenku wodoru) i wymieszania pojawi się niebieskie zabarwienie (pozytywna reakcja na peroksydazę) [26].

Metodą odniesienia oznaczania aktywności laktoperoksydazy jest metoda fotometryczna z ABTS (kwas 2,2`-azyno-*bis*(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)), określona w Specyfikacji technicznej PKN-ISO/TS 17193 – *Mleko – Oznaczanie aktywności laktoperoksydazy – Metoda fotometryczna*. Procedura jest przeznaczona do oznaczania aktywności LPO w mleku, w ilości powyżej 50 U/l. Jednostka aktywności laktoperoksydazy (U), jest to ilość enzymu katalizująca przekształcenie 1 μmola substratu w ciągu 1 minuty. W obecności laktoperoksydazy pochodzącej z próbki oraz nadtlenku wodoru, ABTS jest katalitycznie przekształcany do chromogennego rodnika kationu ($ABTS^{\bullet+}$), przy pH 6,0 i w temperaturze 25°C. Ilość uwolnionego $ABTS^{\bullet+}$ w ciągu minuty jest proporcjonalna do aktywności laktoperoksydazy i jest mierzona fotometrycznie przy długości fali 420 nm [21].

Wymagania prawne obróbki cieplnej mleka i produktów mleczarskich

Wymogi dotyczące obróbki cieplnej mleka surowego, siary, przetworów mlecznych lub produktów na bazie siary dla przedsiębiorstw sektora spożywczego są prawnie uregulowane. Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 określa, że pasteryzację przeprowadza się za pomocą obróbki polegającej na stosowaniu:

- wysokiej temperatury w krótkim przedziale czasowym (co najmniej 72°C przez 15 sekund),

- niskiej temperatury w długim przedziale czasowym (co najmniej 63°C przez 30 minut),

- lub innej kombinacji warunków czasowych i termicznych w celu uzyskania równoważnego rezultatu,

tak aby bezpośrednio po takiej obróbce produkty wykazywały ujemną reakcję w badaniu na obecność fosfatazy alkalicznej [22]. Wynik badania fosfatazy alkalicznej uważa się za negatywny, jeżeli zmierzona aktywność w mleku krowim jest nie wyższa niż 350 mU/l. Przy określaniu aktywności fosfatazy alkalicznej jako metodę referencyjną ustalono normę PN-EN ISO 11816 - *Mleko i przetwory mleczne - Oznaczanie aktywności fosfatazy alkalicznej - Część 1: Metoda fluorymetryczna dla mleka i napojów na bazie mleka*. Stosowanie alternatywnych metod analitycznych jest dopuszczalne, jeśli metody te zostały potwierdzone metodą referencyjną, zgodnie z protokołami o zasięgu międzynarodowym [25].Rozporządzenie ministra rolnictwa i rozwoju wsi z dn. 18 sierpnia 2004 r. określa, że mleko pasteryzowane musi wykazywać negatywną reakcję na badanie fosfatazy oraz pozytywną reakcję na badanie peroksydazy.

Jednakże dopuszcza się wytwarzanie mleka pasteryzowanego, które wykazuje negatywną reakcję na badanie peroksydazy, pod warunkiem, że mleko to jest etykietowane jako „pasteryzowane w wysokiej temperaturze" [23].

Zgodnie z Rozporządzeniem ministra rolnictwa i rozwoju wsi z dnia 15 marca 2013 r. zmieniającym rozporządzenie w sprawie znakowania środków spożywczych, w oznakowaniu mleka spożywczego, w przypadku którego zastosowano obróbkę cieplną – pasteryzację zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz występuje dodatnia reakcja w badaniu na obecność laktoperoksydazy, oprócz nazwy zgodnej z Rozporządzeniem Rady (WE) nr 1234/2007 można stosować określenie „świeże" [24].

Decyzyjny limit aktywności ALP dla mleka pochodzącego od innych gatunków zwierząt oraz produktów mlecznych nie został jeszcze ustalony. Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej dla Mleka i Produktów Mlecznych (EU-RL) przeprowadziło wstępne badania nad aktywnością ALP w serach i ustaliło go na poziomie 2-10 mU/g produktu, w zależności od typu sera. Aktywność enzymu na podanym poziomie świadczy o właściwie przeprowadzonym procesie pasteryzacji mleka użytego do produkcji sera. Prowadzone są również badania zmierzające do określenia decyzyjnego limitu aktywności ALP dla mleka koziego i owczego [14].

Zgodnie z rozporządzeniem ministra rolnictwa i rozwoju wsi z 18 kwietnia 2012 r. w sprawie krajowych laboratoriów referencyjnych Krajowym Laboratorium Referencyjnym właściwym dla higieny mleka surowego oraz badań nad obróbką cieplną mleka i produktów mleczarskich, w tym fosfatazą alkaliczną, jest Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach [14].

Większość produktów spożywczych poddawana jest obróbce termicznej w celu zapewnienia bezpieczeństwa higienicznego oraz przedłużenia trwałości. Parametry obróbki cieplnej są tak zaprojektowane, aby zapewnić wyeliminowanie mikroorganizmów chorobotwórczych przy jednoczesnej minimalizacji zmian chemicznych, fizycznych i organoleptycznych. W odniesieniu do mleka i produktów mleczarskich najczęściej stosowaną obróbką termiczną jest pasteryzacja. Pasteryzacja jest punktem krytycznym produkcji i kontrola jej warunków jest niezbędna w celu zapewnienia wysokiej jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego produktów. Enzymy naturalnie występujące w mleku charakteryzują się różną stabilnością termiczną. Termostabilność fosfatazy alkalicznej i laktoperoksydazy czyni je ważnymi wskaźnikami obróbki termicznej mleka i produktów mleczarskich [9].

Literatura:

1. Bruce J., Drysdale E., Barclay I., Testing for alkaline phosphatase in pasterised milk. VAM Bulletin, Issue 26, Spring 2002, s. 4-9,
2. Dumitraşcu L., Nicoleta Stănciuc N., Stanciu S., Râpeanu G., Thermal inactivation of lactoperoxidase in goat, sheep and bovine milk – A comparative kinetic and thermodynamic study. Journal of Food Engineering 113, 2012, s. 47-52,
3. Fox P.F., Significance of indigenous enzymes in milk and dairy products, w: Handbook of Food Enzymology, red. Whitaker J.R., Voragen A.G.J., Wong D.W.S., 2003, s. 255-277,
4. Fox P.F., Kelly A.L., Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects - Part 1. International Dairy Journal 16, 2006, s. 500-516,
5. Fox P.F., Kelly A.L., Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects - Part 2. International Dairy Journal 16, 2006, s. 517-532,
6. Hammershøj M., Hougaard A.B., Vestergaard J.S., Poulsen O., Ipsen R.H., Instant infusion pasteurisation of bovine milk. II. Effects on indigenous milk enzymes activity and whey protein denaturation. International Journal of Dairy Technology Vol. 63, No. 2, May 2010, s. 197-208,
7. Kumar R., Bhatia K.L., Standardization of method for lactoperoxidase assay in milk. Le Lait 79 (2), 1999, s. 269-274,
8. Machado M.A., Enzyme Activity in Bovine Milk. 1. Lactoferrin. 2. Lactoperoxidase. Review of latest developments. Part I. Report EUR 16088 EN, 1994,
9. Mallik J., Prajapati J.P., Patel H.G., Heat Load indicators and their Significance in Milk Processing. National Seminar on "Indian Dairy Industry - Opportunities and Challenges", 2015, s. 125-129,
10. Rankin S.A., Christiansen A., Lee W., Banavara D.S., Lopez-Hernandez A., Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. Journal of Dairy Science Vol. 93 No. 12, 2010, s. 5538-5551,
11. Raynal-Ljutovac K., Park Y.W., Gaucheron F., Bouhallab S., Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. Small Ruminant Research 68, 2007, s. 207–220,
12. Rola J.G., Sosnowski M., Zastosowanie metody fluorymetrycznej w ocenie skuteczności pasteryzacji mleka krowiego, koziego i serów. Nauka Przyroda Technologie, Tom 3, Zeszyt 4, 2009, s. 1-13,
13. Rola J.G., Sosnowski M., Determination of alkaline phosphataseactivity in milk and milk products by fluorimetric method. Bull. Vet. Inst. Pulawy 54, 2010, s. 537-542,
14. Rola J.G., Sosnowski M., Osek J., Jak wykazać skuteczność pasteryzacji mleka i produktów mlecznych? Życie Weterynaryjne 87 (12), 2012, s. 1032-1034,
15. Śliwiński M., Polak-Śliwińska M., Normy Międzynarodowe ISO/IDF w analizie mleka i produktów mleczarskich, Przegląd Mleczarski 2, 2016, s. 26-29,
16. ISO 3356:2009 | IDF 63:2009,
17. ISO/TS 6090:2004 | IDF/RM 82:2004,
18. PN-EN ISO 22160:2009,
19. PN-EN ISO 11816-1:2014-02,
20. PN-EN ISO 11816-2:2005,
21. PKN-ISO/TS 17193:2016-02,

22. Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego, (Dz.U. L 139 z 30.4.2004, s. 55),

23. Rozporządzenie ministra rolnictwa i rozwoju wsi z dnia 18 sierpnia 2004 r. w sprawie wymagań weterynaryjnych dla mleka oraz produktów mlecznych, Dziennik Ustaw Nr 188, Poz. 1946,

24. Rozporządzenie ministra rolnictwa i rozwoju wsi z dnia 15 marca 2013 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie znakowania środków spożywczych, Dziennik Ustaw, Poz. 414,

25. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1664/2006 z dnia 6 listopada 2006 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2074/2005 w odniesieniu do środków wykonawczych, dotyczące niektórych produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi i uchylające niektóre środki wykonawcze,

26. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. Decyzja Komisji z dnia 14 lutego 1991 r. ustanawiająca niektóre metody analizy i badania surowego mleka oraz mleka poddanego obróbce termicznej (91/180/EWG),

27. Fluorophos® ALP Test System Model FLM200 User's Guide, Advanced Instruments,

28. The Lactoperoxidase system - IDF Factsheet –January 2013.