

JOLANTA GRAŻYNA ROLA, MACIEJ SOSNOWSKI

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego  
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

## ZASTOSOWANIE METODY FLUORYMETRYCZNEJ W OCENIE SKUTECZNOŚCI PASTERYZACJI MLEKA KROWIEGO, KOZIEGO I SERÓW

**Streszczenie.** Oznaczanie aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) wykorzystywane jest do oceny skuteczności pasteryzacji mleka. Przyjętą metodą referencyjną jest metoda fluorymetryczna według PN-EN ISO 11816. Aktywność ALP w próbce jest mierzona przez fluorymetryczny pomiar kinetyki reakcji hydrolizy substratu w obecności ALP z wytworzeniem reszty fosforanowej i silnie fluorescencyjnego produktu. Tematem pracy była walidacja i ocena metody oznaczania aktywności ALP w krowim i kozim mleku pasteryzowanym oraz serze. Określono precyzję metody, oceniając powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną uzyskanych wyników. Sprawność metody potwierdzono również przez udział w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości organizowanych przez CRL Milk and Milk Products, AFSSA – LERQAP i LGC Standards. Ponadto aktywność ALP oznaczono w mleku oraz różnych rodzajach sera pochodzących z handlu detalicznego. Aktywność ALP w badanym mleku mieściła się w zakresie  $< 10\text{--}483$  mU/l, przy czym większość próbek wykazywała aktywność poniżej 250 mU/l. Aktywność ALP w serze wynosiła od  $< 0,5$  do 90,46 mU/g, w większości przypadków nie przekraczając 10 mU/g. Uzyskane wartości precyzji metody spełniają kryteria ustalone przez międzylaboratoryjne badania porównawcze i określone w PN-EN ISO 11816.

**Słowa kluczowe:** fosfataza alkaliczna, skuteczność pasteryzacji, mleko krowie, mleko kozie, ser

### Wstęp

Enzymem o bardzo ważnym dla przemysłu mleczarskiego znaczeniu jest fosfataza alkaliczna (ALP). Jej aktywność świadczy o jakości procesu pasteryzacji mleka, podczas którego zmniejsza się ona ponad 500-krotnie (WILIŃSKA i IN. 2007).

ALP jest glikoproteiną błon komórkowych szeroko rozpowszechnioną w tkankach zwierząt oraz komórkach mikroorganizmów. Fosfataza alkaliczna w mleku została odkryta i scharakteryzowana w 1925 roku przez F. Demuth. Wykazano wówczas,

iz odpowiednia kombinacja czasu i temperatury obróbki mleka, o nieznacznie wyższych parametrach niż dla inaktywacji drobnoustroju *Mycobacterium tuberculosis*, powoduje inaktywację ALP. Badanie enzymatycznej aktywności ALP stało się rutynową kontrolą skuteczności pasteryzacji lub zanieczyszczenia surowym mlekiem gotowego produktu (FOX i KELLY 2006). Zgodnie z obowiązującymi wymaganiami prawnymi aktywność ALP w mleku pasteryzowanym nie powinna być większa niż 350 mU/l (ROZPORZĄDZENIE... 2006). Dla produktów mlecznych decyzyjny limit aktywności ALP nie został jeszcze ustalony. Wstępne badania Francuskiej Agencji ds. Bezpieczeństwa Sanitarnego Żywności (AFSSA) określają go na poziomie 2-11 mU/g produktu w zależności od typu sera. Aktywność enzymu w produkcie na podanym poziomie świadczy o właściwie przeprowadzonym procesie pasteryzacji mleka użytego do produkcji sera (DESBOURDES i IN. 2008). Metody oznaczania aktywności ALP w mleku i produktach mlecznych oparte są na reakcjach kolorymetrycznych używających jako substratu fosforanu fenylu (metoda Kaya i Grahama, metoda Scharera), *p*-nitrofosforanu fenylu (metoda Aschaffenburga i Mullena) oraz monofosforanu fenoloftaleiny (metoda Kleyna). Związki te hydroлизują na fosforan nieorganiczny i odpowiednio fenol, *p*-nitrofenol lub fenoloftaleinę. Aktywność enzymu jest obliczana na podstawie uwalnianego do środowiska reakcji produktu, zabarwiającego roztwór. Fenol, reagując z 2,6-dichlorochinonem chlorimidem (CQC), nadaje barwę niebieską, nitrofenol zabarwia roztwór o odczynie zasadowym na żółto, a fenoloftaleina w środowisku reakcji o pH 10,15 nadaje barwę różową. Alternatywne dla kolorymetrycznych metod są metody instrumentalne, takie jak chemiluminescencyjna, amperometryczna, potencjometryczna czy fluorymetryczna (FOX i KELLY 2006, MARSHALL 1993, SALTER i FITCHEN 2006, YOSHITOMI 2004). Metodą odniesienia jest fluorymetryczny pomiar aktywności ALP (PN-EN ISO 11816 część 1 i 2). Jest to metoda odpowiednia dla pomiaru aktywności ALP w mleku krowim, kozim i owczym, pełnym, częściowo odtłuszczonym i odtłuszczonym, napojach mlecznych i różnego rodzaju serach. Za pomocą tej metody można badać zarówno mleko pasteryzowane, jak i surowe (po uprzednim rozcieńczeniu próbki do aktywności ALP < 2000 mU/l). Metoda jest oparta na reakcji hydrolizy substratu zwanego Fluorophos (fosforan 2'-(2-benzotiazolilo)-6'-hydroksybenzotiazolowy), pod wpływem ALP pochodzącej z próbki, na resztę fosforanową oraz silnie fluorescencyjny produkt. Fluorymetryczny pomiar aktywności ALP wykonywany jest przez 3 min w temperaturze 38°C. Obejmuje on okres wyrównania temperatury substratu i próbki, po którym następują wielokrotne odczyty dla ustalenia szybkości reakcji. Aktywność enzymu jest automatycznie przeliczana i podawana przez aparat w milijednostkach na litr (dla mleka i napojów mlecznych) lub milijednostkach na kilogram (dla serów). Jednostka aktywności ALP jest to ilość enzymu fosfatazy alkalicznej, która katalizuje przekształcenie 1 μmol substratu w czasie 1 min (ROCCO 1990, PN-EN ISO 11816).

Celem badań była rewalidacja i ocena metody oznaczania aktywności ALP w krowim i kozim mleku pasteryzowanym oraz w produktach mlecznych w celu wdrożenia jej do zakresu badań laboratorium. Określono precyzję metody, oceniając powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną. Cechy charakterystyczne metody oraz biegłość laboratorium określono również poprzez udział w międzylaboratoryjnych badaniach porównawczych. Ponadto monitorowano aktywność ALP w próbkach mleka oraz serów pochodzących ze sprzedaży detalicznej.

## Material i metody

### Material

Do badań walidacyjnych metody oznaczania aktywności ALP w mleku użyto dwóch rodzajów mleka pasteryzowanego: krowiego i koziego. Do badań walidacyjnych metody oznaczania aktywności ALP w serze użyto sera gouda. Sprawność metody potwierdzono również poprzez udział w międzylaboratoryjnych badaniach porównawczych organizowanych przez CRL Milk and Milk Products, AFSSA – LERQAP i LGC Standards. Dodatkowo badaniu poddano 37 próbek mleka, w tym: 20 próbek mleka pasteryzowanego krowiego o zawartości tłuszczu 3,2%, 8 próbek mleka pasteryzowanego krowiego o zawartości tłuszczu 2%, 8 próbek mleka krowiego po obróbce UHT oraz jedną próbkę mleka pasteryzowanego koziego pełnego. Analizie poddano także 15 próbek serów, w tym: 8 próbek sera twardego, 4 próbki sera miękkiego pleśniowego, 2 próbki sera twarogowego oraz jedną próbkę sera koziego. Do rozcieńczenia próbek sera użyto mleka pasteryzowanego (mleko krowie o zawartości tłuszczu 3,2%, mleko kozie pełne). Probki serów oraz mleka pasteryzowanego pochodziły ze sprzedaży detalicznej, natomiast mleko surowe, do fortyfikacji próbek walidacyjnych, pochodziło z ferm mlecznych.

### Odczynniki

- *Substrat Fluorophos* – niefluorescencyjny aromatyczny ester fosforanu 2'-(2-benzotiazolilo)-6'-hydroksybenzotiazolowego (Fluorophos).
- *Roztwór buforowy do substratu* – buforowy roztwór dietanoloaminy (DEA) do rozpuszczenia sproszkowanego substratu c(DEA) – 2,4 mol/l, o pH 10,0.
- *Roztwory robocze kalibracyjne, żółcień fluorescencyjna* – 2'-(2-benzotiazolilo)-6'-hydroksybenzotiazol w buforze DEA:
  - *roztwór kalibracyjny A*, zawierający 0  $\mu\text{mol/l}$  żółcień fluorescencyjnej,
  - *roztwór kalibracyjny B*, zawierający  $17,24 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol/l}$  żółcień fluorescencyjnej,
  - *roztwór kalibracyjny C*, zawierający  $34,48 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol/l}$  żółcień fluorescencyjnej.
- *Roztwór do codziennej kontroli aparatu* zawierający  $34,48 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol/l}$  żółcień fluorescencyjnej.
- *Roztwory kontrolne* – pozytywny, negatywny i PhosphaCheck-N.

### Aparatura

- *Fluorymetr z filtrami*, z termostaticznie utrzymywanym statywem kuwety w temperaturze  $38 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- *Blok termostatowy* odpowiedni do umieszczenia kuwet, utrzymujący temperaturę  $38 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- *Waga analityczna*.
- *Homogenizator Ultraturrax*.
- *Kuwety*, jednorazowe ze szkła niewykazującego fluorescencji o średnicy 12 mm i długości 75 mm.

- *Pipeta automatyczna* o pojemności 2,0 ml i 0,075 ml.
- *Mieszadło typu Vortex*.
- *Łaźnia wodna* odpowiednia do utrzymania temperatury  $63\pm 1^{\circ}\text{C}$  oraz  $95\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### Weryfikacja sprawności aparatu i testy kontrolne

Sprawdzenie jakości obejmuje:

- Codzienny test A/D (analogowo/cyfrowy) stosowany do sprawdzenia właściwego funkcjonowania aparatu poprzez pomiar dokładności konwersji A/D i monitorowanie dryfowania w czasie.
- Codzienny test kontrolny aparatu z użyciem roztworu do codziennej kontroli aparatu, w celu monitorowania ewentualnego dryfowania elektronicznego lub optycznego fluorymetru.
- Testy kontrolne odnoszące się do próbek do badań i aparatu:
  - *negatywny test kontrolny* w analizie każdego zestawu próbek do badań; wartość odczytu aparatu powinna być mniejsza niż 10 mU/l, co wskazuje na brak aktywności fluorescencyjnej,
  - *pozytywny test kontrolny* w analizie każdego zestawu próbek do badań; wartość odczytu aparatu powinna wynosić  $500\pm 75$  mU/l,
  - *test PhosphaCheck-N* – wartość odczytu aparatu powinna wynosić poniżej 40 mU/l.

### Przygotowanie próbek

Próbki mleka do badań walidacyjnych przygotowano z mleka pasteryzowanego po dodatkowej obróbce w łaźni wodnej w temperaturze  $95^{\circ}\text{C}$  przez 5 min. Otrzymane mleko o aktywności ALP  $< 10$  mU/l fortyfikowano mlekiem surowym do uzyskania poziomów aktywności ALP: 40, 100 i 350 mU/l w przypadku mleka krowiego oraz 20, 40, 100, 350, 500 mU/l w przypadku mleka koziego.

Próbki sera do badań walidacyjnych przygotowano zgodnie z normą PN-EN ISO 11816-2. Odważono 0,5 g sera i rozcieńczono w 10 ml mleka pozbawionego ALP (przez ogrzewanie w temperaturze  $95^{\circ}\text{C}$  przez 5 min), homogenizowano w homogenizatorze trzpieniowym typu Ultraturrax. Tak przygotowaną próbkę fortyfikowano mlekiem surowym do ustalenia czterech poziomów aktywności ALP: 2, 270, 900 oraz 2500 mU/g.

Próbki mleka do międzylaboratoryjnych badań biegłości zostały dostarczone do laboratorium przez organizatora badań. Poziomy aktywności ALP w dostarczonych próbkach były zróżnicowane i nieznanie analitykom. Postępowano z nimi zgodnie z zaleceniami organizatora.

### Oznaczanie aktywności ALP w próbkach

Próbki badano, używając aparatu Fluorophos FLM 200 (Advanced Instruments Inc.). Użyto kanałów skalibrowanych odpowiednio dla mleka krowiego pasteryzowanego o zawartości tłuszczu 3,2%, 2%, mleka koziego pasteryzowanego pełnego oraz sera.

Odmierzono 0,075 ml próbki analitycznej i dodano do kuwety zawierającej 2 ml substratu Fluorophos inkubowanego przez 10 min w temperaturze 38°C. Zawartość wymieszano z użyciem mieszadła typu Vortex. Wyniki zostały automatycznie obliczone i podane przez aparat.

Aktywność ALP w próbkach walidacyjnych każdego rodzaju produktu na każdym poziomie była badana równolegle przez trzech analityków w sześciu powtórzeniach. Próbki do międzylaboratoryjnych badań biegłości były badane zgodnie z zaleceniami organizatora badań. Monitorowane w kierunku aktywności ALP próbki produktów mlecznych z handlu detalicznego były badane przez jednego analityka w dwóch powtórzeniach.

### Interpretacja wyników

Precyzja metody została określona w badaniach walidacyjnych własnych na podstawie wyznaczonych wartości powtarzalności i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej oraz odchylenia standardowego, a także współczynnika zmienności dla powtarzalności i odtwarzalności. Wartości powtarzalności i odtwarzalności porównano z wartościami określonymi przez międzylaboratoryjne badania i zawartymi w normie PN-EN ISO 11816 (części 1 i 2).

Wyniki badania próbek pochodzących z handlu detalicznego odniesiono do limitu decyzyjnego aktywności ALP w mleku i produktach mlecznych.

Raporty międzylaboratoryjnych badań porównawczych dostarczone przez organizatora zawierały cechy charakterystyczne metody (powtarzalność, odtwarzalność, odchylenie standardowe) wyznaczone na podstawie porównań międzylaboratoryjnych, a także ocenę biegłości laboratorium lub poszczególnych analityków na podstawie wskaźnika z-score ( $0 < |z| \leq 2$  – wynik zadowalający,  $2 < |z| \leq 3$  – wynik wątpliwy,  $|z| > 3$  – wynik niezadowalający).

### Wyniki

Wartości powtarzalności i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej na każdym z ustalonych poziomów aktywności ALP, zarówno w przypadku mleka krowiego, koziego, jak i serów, mieściły się w granicach wyznaczonych na podstawie międzylaboratoryjnych badań zawartych w normie PN-EN ISO 11816 (części 1 i 2). Wartości powtarzalności i odtwarzalności uzyskane w badaniach walidacyjnych w porównaniu z wartościami zawartymi w normie dla mleka krowiego zestawiono w tabeli 1, dla mleka koziego – w tabeli 2, dla serów – w tabeli 3. Wartości powtarzalności zależały od rodzaju mleka, zawartości tłuszczu oraz poziomu aktywności ALP i mieściły się w przedziale 5,45-45,85 mU/l w przypadku mleka i 0,37-213,19 mU/g w przypadku sera. Wartości odtwarzalności wynosiły dla mleka: 6,97-49,37 mU/l, dla sera: 0,48-342,28 mU/g.

Współczynnik zmienności dla powtarzalności w przypadku mleka mieścił się w granicach 1,63-8,51%, w przypadku serów w granicach: 3,24-5,95%, natomiast współczynnik zmienności dla odtwarzalności wynosił od 2,46 do 18,22% dla mleka i od 4,26 do 7,74% dla sera. Wartości odchyleń standardowych i współczynników zmienności powtarzalności i odtwarzalności dla mleka krowiego i koziego zestawiono w tabeli 4, natomiast dla serów – w tabeli 5.

Tabela 1. Wartości powtarzalności i odtwarzalności otrzymane w badaniach w porównaniu z wartościami z normy PN-EN ISO 11816-1 dla mleka krowiego

Table 1. The values of repeatability and reproducibility obtained in the study, with reference to the values from standard PN-EN ISO 11816-1 for cow milk

	Poziom aktywności ALP (mU/l)					
	40		100		350	
	wartość otrzymana	norma	wartość otrzymana	norma	wartość otrzymana	norma
Mleko krowie 3,2% tłuszczu						
Powtarzalność	12,49	21,50	13,69	22,10	23,00	89,60
Odtwarzalność	30,23	31,80	14,77	51,00	25,78	136,40
Mleko krowie 2% tłuszczu						
Powtarzalność	5,67	21,50	11,34	22,10	45,85	89,60
Odtwarzalność	8,40	31,80	11,47	51,00	49,37	136,40

Tabela 2. Wartości powtarzalności i odtwarzalności otrzymane w badaniach w porównaniu z wartościami z normy PN-EN ISO 11816-1 dla mleka koziego

Table 2. The values of repeatability and reproducibility obtained in the study, with reference to the values from standard PN-EN ISO 11816-1 for goat milk

	Poziom aktywności ALP (mU/l)									
	20		40		100		350		500	
	wartość otrzymana	norma	wartość otrzymana	norma	wartość otrzymana	norma	wartość otrzymana	norma	wartość otrzymana	norma
Powtarzalność	5,45	8,63	6,46	7,98	16,64	26,20	26,63	42,83	24,30	28,56
Odtwarzalność	6,97	10,96	8,38	20,55	18,68	28,71	49,24	127,9	45,85	87,51

Tabela 3. Wartości powtarzalności i odtwarzalności otrzymane w badaniach w porównaniu z wartościami z normy PN-EN ISO 11816-2 dla sera

Table 3. The values of repeatability and reproducibility obtained in the study, with reference to the values from standard PN-EN ISO 11816-2 for cheese

	Poziom aktywności ALP (mU/g)							
	2		270		900		2500	
	wartość otrzymana	norma	wartość otrzymana	norma	wartość otrzymana	norma	wartość otrzymana	norma
Powtarzalność	0,37	2	26,20	60	80,82	155	213,19	520
Odtwarzalność	0,48	2	32,78	75	108,60	500	342,28	980

Tabela 4. Wartości odchylenia standardowego (Sd) i współczynnika zmienności (CV) powtarzalności i odtwarzalności na poszczególnych poziomach aktywności ALP w mleku

Table 4. The values of standard deviation (Sd) and coefficient of variation (CV) of repeatability and reproducibility at each level of ALP activity in milk

	Poziom aktywności ALP (mU/l)									
	20	40	100	350	500	20	40	100	350	500
	Powtarzalność					Odtwarzalność				
Mleko krowie 3,2% tłuszczu										
Sd	–	4,46	4,89	8,22	–	–	10,80	5,27	9,21	–
CV (%)	–	7,52	4,84	2,19	–	–	18,22	5,21	2,46	–
Mleko krowie 2% tłuszczu										
Sd	–	2,03	4,05	16,38	–	–	3,00	4,10	17,63	–
CV (%)	–	5,18	4,46	4,83	–	–	7,64	4,52	5,21	–
Mleko kozie										
Sd	1,95	2,31	5,94	9,51	8,68	2,49	2,99	6,67	17,58	16,37
CV (%)	8,51	5,83	5,75	2,59	1,63	10,88	7,55	6,45	4,79	3,08

Tabela 5. Wartości odchylenia standardowego (Sd) i współczynnika zmienności (CV) powtarzalności i odtwarzalności na poszczególnych poziomach aktywności ALP w serze

Table 5. The values of standard deviation (Sd) and coefficient of variation (CV) of repeatability and reproducibility at each level of ALP activity in cheese

	Poziom aktywności / ALP (mU/g)			
	2	270	900	2500
Powtarzalność				
Sd	0,13	9,36	28,86	76,14
CV (%)	5,95	3,40	3,24	3,30
Odtwarzalność				
Sd	0,17	11,71	38,79	122,24
CV (%)	7,74	4,26	4,35	5,29

Na podstawie wyników międzylaboratoryjnych badań porównawczych dla krajowych laboratoriów referencyjnych, organizowanych przez CRL Milk and Milk Products, AFSSA – LERQAP, oceniono biegłość tych laboratoriów, ponadto wyznaczono parametry precyzji metody. Uzyskane wyniki wskazują na poprawę powtarzalności i odtwarzalności wyników w stosunku do zawartych w normie PN-EN ISO 11816. Parametry te wraz z wartościami z-score dla laboratorium Zakładu Higieny Żywności

Tabela 6. Wyniki badań biegłości dla laboratorium w odniesieniu do parametrów precyzji metody; organizator: CRL Milk and Milk Products, AFSSA – LERQAP;  $S_r$  – odchylenie standardowe powtarzalności,  $r$  – powtarzalność,  $S_R$  – odchylenie standardowe odtwarzalności,  $R$  – odtwarzalność (BOITELLE i NICOLAS 2008)

Table 6. Results of proficiency testing of laboratory with reference to the precision parameters of method, organized by CRL Milk and Milk Products, AFSSA – LERQAP;  $S_r$  – standard deviation of repeatability,  $r$  – repeatability,  $S_R$  – standard deviation of reproducibility,  $R$  – reproducibility (BOITELLE and NICOLAS 2008)

Rodzaj mleka	Poziom aktywności ALP (mU/l)	Wartość przypisana (mU/l)	Wyniki laboratorium (mU/l)		z-score		$S_r$ (mU/l)	$r$ (mU/l)	$S_R$ (mU/l)	$R$ (mU/l)
			powtórzenie 1	powtórzenie 2	powtórzenie 1	powtórzenie 2				
Mleko krowie pełne	20	23,66	26,7	29,0	1,1	2,0	3,14	8,88	3,50	9,91
	40	39,17	47,3	37,2	1,7	-0,4	3,97	11,22	5,59	15,81
	100	121,04	117,7	132,4	-0,7	2,5	5,95	16,84	6,23	17,63
	350	347,63	355,3	341,1	0,3	-0,3	11,30	31,98	24,56	69,50
	500	485,25	477,6	494,2	-0,2	0,3	13,07	37,00	35,37	100,9
Mleko krowie częściowo odtuszczone	20	26,85	33,1	30,8	1,3	0,8	2,20	6,22	5,02	14,19
	40	40,46	37,7	48,7	-0,5	1,6	5,51	15,59	6,52	18,44
	100	124,87	134,7	116,8	1,2	-1,0	6,41	18,14	9,37	26,53
	350	346,53	361,8	372,8	0,6	1,0	10,53	29,79	27,61	78,13
	500	482,51	485,4	494,2	0,1	0,4	16,07	45,48	30,47	86,23
Mleko krowie odtuszczone	20	31,25	34,0	17,0	0,3	-1,6	5,94	16,82	9,76	27,63
	40	42,78	42,3	51,0	-0,1	1,2	3,95	11,18	7,52	21,28
	100	96,11	99,8	99,8	0,6	0,6	4,09	11,56	6,89	19,49
	350	343,34	341,1	370,5	-0,1	0,9	8,90	25,20	30,34	85,87
	500	450,32	463,8	476,7	0,5	1,0	6,98	19,75	26,52	75,04

Pochodzenia Zwierzęcego PIWet – PIB zestawiono w tabeli 6. Wyniki badań biegłości organizowanych przez LGC Standards dla poszczególnych analityków laboratorium wraz z wyznaczonym z-score oraz odchyleniem standardowym względem wyników wszystkich uczestników badań przedstawiono w tabeli 7. Każdy z analityków w każdej rundzie badań biegłości otrzymał z-score zadowalające, co świadczy o właściwej jakości badań oraz potwierdza dużą precyzję metody (LGC STANDARDS... 2008 a, b, 2009).

Aktywność ALP w 96,55% próbek mleka pasteryzowanego z handlu detalicznego mieściła się w granicach limitu decyzyjnego (350 mU/l). W jednej próbce aktywność ALP przekroczyła ten limit i wynosiła 483 mU/l. W badaniach mleka UHT trzy z ośmiu badanych próbek wykazały aktywność ALP powyżej 350 mU/l, w tym przypadku jednak dużą aktywność ALP można tłumaczyć obecnością fosfatazy reaktywowanej (FOX i KELLY 2006). Wartości aktywności ALP w badanych próbkach mleka pochodzących z handlu detalicznego przedstawiono na rysunku 1.

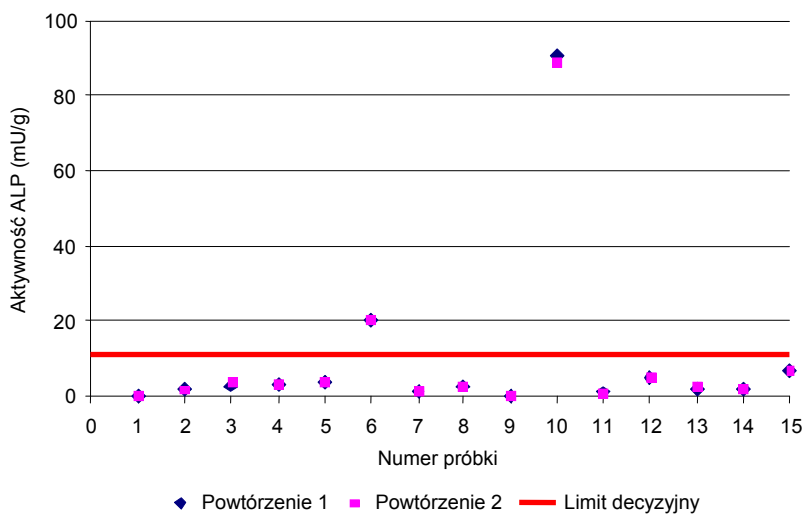


Tabela 7. Wyniki badań biegłości w latach 2008-2009, organizator LGC (LGC STANDARDS... 2008 a, b, 2009)

Table 7. Results of proficiency testing in 2008-2009, organised by LGC (LGC STANDARDS... 2008 a, b, 2009)

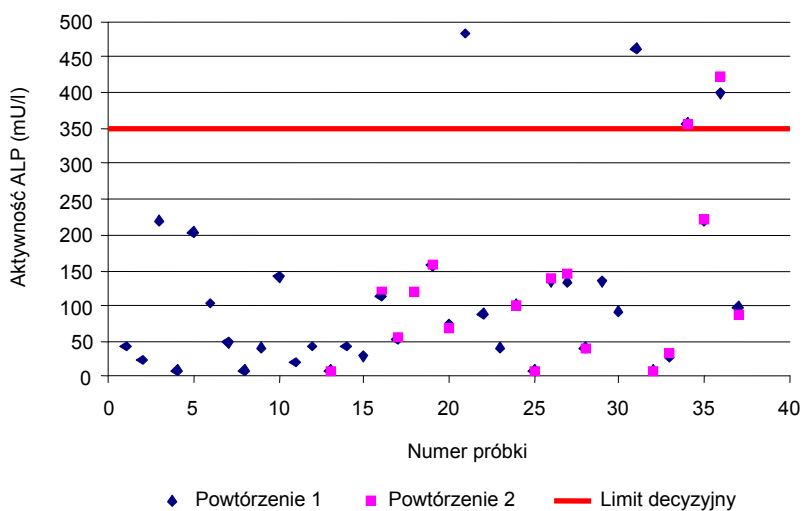
Runda badań biegłości	Wartość przypisana (mU/l)	Wynik uzyskany przez poszczególnych analityków (mU/l)	z-score dla poszczególnych analityków	Odchylenie standardowe (mU/l)
Kwiecień 2008	122,0	128,7	0,45	23,36
		123,7	0,11	
		120,0	-0,13	
	236,0	246,9	0,45	
		234,0	-0,08	
Październik 2008	61,1	228,0	-0,33	12,31
		69,4	1,12	
		61,1	0,00	
	225,7	61,1	0,00	
		240,4	0,54	
		227,6	0,07	
		246,9	0,78	
Kwiecień 2009	297,2	320,9	0,66	37,82
		312,6	0,43	
		318,6	0,60	
	147,1	158,6	0,65	
		148,0	0,05	
		158,6	0,65	

Producenci wszystkich badanych serów deklarowali stosowanie do produkcji wyłącznie mleka pasteryzowanego. Aktywność ALP siedmiu z ośmiu badanych próbek sera twardego mieściła się we wstępnym limicie decyzyjnym i wynosiła od < 0,5 do 3,52 mU/g. Jedna próbka charakteryzowała się większą niż limit decyzyjny aktywnością ALP (19,9 mU/g). Wśród badanych próbek serów miękkich pleśniowych trzy (sery brie) miały aktywność ALP mieszczącą się w przedziale < 0,5-4,66 mU/g, jednakże aktywność ALP jednej próbki (ser camembert) w znacznym stopniu przewyższyła limit decyzyjny oraz aktywność w pozostałych próbkach badanych serów (88-90 mU/g). Wstępny limit dla serów twarogowych nie został jeszcze ustalony, aktywność w badanych próbkach sera twarogowego mieściła się w przedziale 1,41-2,18 mU/g. Badana próbka sera koziego charakteryzowała się aktywnością ALP na poziomie 6,8-6,9 mU/g. Wartości aktywności ALP w badanych próbkach serów pochodzących z handlu detalicznego przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 1. Aktywność ALP w serze, próbki: 1-8 – sery twarde, 9-12 – sery miękkie, 13-14 – sery twarogowe, 15 – ser kozie

Fig. 1. ALP activity in cheese, samples: 1-8 – hard cheeses, 9-12 – soft cheeses, 13-14 – cottage cheeses, 15 – goat cheese



Rys. 2. Aktywność ALP w mleku, próbki: 1-20 – mleko krowie pasteryzowane 3,2% tłuszczu, 21-28 – mleko krowie pasteryzowane 2% tłuszczu, 29-36 – mleko krowie UHT, 37 – mleko kozie pasteryzowane

Fig. 2. ALP activity in milk, samples: 1-20 – pasteurised cow milk 3,2% of fat, 21-28 – pasteurised cow milk 2% of fat, 29-36 – cow milk UHT, 37 – pasteurised goat milk

## Dyskusja

Metoda fluorymetryczna oznaczania aktywności ALP w mleku krowim, kozim, owczym oraz napojach na bazie mleka została zwalidowana, a następnie opublikowana jako procedura znormalizowana w 2006 roku. Międzylaboratoryjne badania porównawcze, na których podstawie wyznaczono parametry precyzji metody, odbyły się w 2004 roku. Wzięło w nich udział 13 laboratoriów z 7 krajów. Wyznaczone cechy charakterystyczne metody (powtarzalność, odtwarzalność, względne odchylenie standardowe) przedstawiono w części 1 normy PN-EN ISO 11816. Parametry precyzji uzyskane w badaniach rewalidacyjnych w warunkach laboratorium Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet – PIB mieszczą się w granicach zawartych w normie PN-EN ISO 11816.

W ramach potwierdzenia precyzji metody i biegłości krajowych laboratoriów referencyjnych w latach 2005-2006 laboratorium CRL Milk and Milk Products, AFSSA – LERQAP przeprowadziło międzylaboratoryjne badania porównawcze dla 14 europejskich laboratoriów. Wartości parametrów precyzji metody były mniejsze niż ustalone rok wcześniej, co świadczy o właściwym wdrożeniu metody i poprawie jakości analiz prowadzonych przez laboratoria (BOITELLE i NICOLAS 2007).

W 2007 roku przeprowadzono międzylaboratoryjne badania porównawcze, ponownie sprawdzając kompetencje krajowych laboratoriów referencyjnych w oznaczaniu aktywności ALP w mleku krowim zgodnie z normą PN-EN ISO 11816. Uczestnikami badań było 19 europejskich laboratoriów, w tym także laboratorium Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet – PIB. Na podstawie wyników ustalono bardzo dużą precyzję metody, lepszą niż uzyskana w poprzednich badaniach porównawczych (BOITELLE i NICOLAS 2008). Wartości powtarzalności, odtwarzalności, odchylenia standardowego oraz wyniki własne badań porównawczych wraz z wyznaczoną wartością z-score zestawiono w tabeli 6.

W celu sterowania jakością badań oraz potwierdzenia kompetencji i biegłości laboratorium i poszczególnych analityków, laboratorium Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet – PIB od 2008 roku bierze udział w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości organizowanych przez LGC Standards (wyniki zestawiono w tabeli 7). Wartości odchylenia standardowych wyników wszystkich uczestników badań biegłości (334 analityków z 63 laboratoriów w 2009 roku) podczas każdej z trzech rund w większości przypadków mieściły się w granicach odchylenia standardowych ustalonych przez międzylaboratoryjne badania porównawcze laboratoriów referencyjnych (BOITELLE i NICOLAS 2008). Również w 83% przypadków odchylenia standardowe badań własnych walidacyjnych były mniejsze niż odchylenia uzyskane podczas międzylaboratoryjnych badań porównawczych.

Fluorymetryczna metoda oznaczania aktywności ALP w serach według PN-EN ISO 11816-2 również została zwalidowana i znormalizowana, jednakże jest na etapie wdrażania w laboratoriach. Wartości powtarzalności i odtwarzalności, podobnie jak w przypadku mleka i napojów na bazie mleka, wyznaczono poprzez badania międzylaboratoryjne i zawarto w części 2 normy PN-EN ISO 11816. Parametry precyzji metody oznaczania aktywności ALP w serze uzyskane w badaniach własnych walidacyjnych były lepsze aniżeli otrzymane w badaniach międzylaboratoryjnych.

Prowadzone są badania mające na celu określenie limitu decyzyjnego aktywności ALP w serach. Wyniki tych prac zaprezentowano podczas spotkania europejskich laboratoriów referencyjnych – „11. Workshop Wspólnotowego Laboratorium Referencyjne-

go ds. Mleka i Produktów Mlecznych” (CRL Milk and Milk Products). Badania wykonane we Włoszech określają aktywność ALP w serach twardych średnio na poziomie 4 mU/g, w serach półtwardych – na poziomie 0,8 mU/g, w serach topionych – na poziomie 0,6-0,9 mU/g (PELLEGRINO i ROSI 2008). DESBOURDES i IN. (2008) określili średnią aktywność ALP w serach miękkich z mleka pasteryzowanego na poziomie 2,88 mU/g, w serach twardych – do 11 mU/g. Sery z mleka termizowanego oraz poddanego mikrofiltracji wykazywały większą aktywność ALP (83-930 mU/g). Badania własne dotyczące aktywności ALP w polskich serach wykazały, iż w większości mieszczą się one w ustalonych wstępnie przez AFSSA limitach decyzyjnych.

## Wnioski

Wyniki badań walidacyjnych metody fluorymetrycznej oznaczania aktywności ALP w mleku i serach oraz satysfakcjonujące wyniki międzylaboratoryjnych badań porównawczych świadczą o właściwej biegłości laboratorium i bardzo dużej precyzji metody.

Porównanie wyników badań próbek pochodzących z handlu detalicznego z limitami decyzyjnymi aktywności ALP wskazują, że jedynie w pojedynczych próbkach limity te zostały przekroczone. Przyczyną mogła być ALP pochodzenia mikrobiologicznego, obecność fosfatasy reaktywowanej albo niewłaściwie przeprowadzony proces pasteryzacji.

## Literatura

- BOITELLE A.C., NICOLAS M., 2007. Report on inter-laboratory proficiency testing on alkaline phosphatase activity December 2005 – January 2006. Amended version. European Union Community Reference Laboratory for Milk and Milk Products, Maison-Alfort.
- BOITELLE A.C., NICOLAS M., 2008. Inter-laboratory proficiency testing on alkaline phosphatase activity in cow milk (November 2007). Report – 30/09/2008. European Union Community Reference Laboratory for Milk and Milk Products, Maison-Alfort.
- DESBOURDES C., NICOLAS M., BOITELLE A.C., 2008. Phosphatase activity in cheese. W: AFSSA, CRL Milk and Milk Products. 11th Workshop of the EU CRL for Milk and Milk Products, 9-10 October 2008, Vienna.
- FOX P.F., KELLY A.L., 2006. Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects – part 2. *Int. Dairy J.* 16: 517-532.
- LGC STANDARDS proficiency testing – quality in dairy chemistry scheme. Report 144, April 2008. 2008 a. LGC Standards Proficiency Testing, Lancashire.
- LGC STANDARDS proficiency testing – quality in dairy chemistry scheme. Report 150, October 2008. 2008 b. LGC Standards Proficiency Testing, Lancashire.
- LGC STANDARDS proficiency testing – quality in dairy chemistry scheme. Report 156, April 2009. 2009. LGC Standards Proficiency Testing, Lancashire.
- MARSHALL R.T., 1993. Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association, Washington: 413-431.
- PELLEGRINO L., ROSI V., 2008. Alkaline phosphatase: legal limits for cheese. Study on Italian cheeses. W: AFSSA, CRL Milk and Milk Products. 11th Workshop of the EU CRL for Milk and Milk Products, 9-10 October 2008, Vienna.
- PN-EN ISO 11816-1 Mleko i przetwory mleczne. Oznaczanie aktywności fosfatasy alkalicznej. Część 1: Metoda fluorymetryczna dla mleka i napojów na bazie mleka. 2007.
- PN-EN ISO 11816-2 Mleko i przetwory mleczne. Oznaczanie aktywności fosfatasy alkalicznej. Część 2: Metoda fluorymetryczna dla serów. 2005.

Rola J.G., Sosnowski M., 2009. Zastosowanie metody fluorymetrycznej w ocenie skuteczności pasteryzacji mleka krowiego, koziego i serów. *Nauka Przyr. Technol.* 3, 4, #132.

---

- ROCCO R.M., 1990. Fluorimetric determination of alkaline phosphatase in fluid dairy products: collaborative study. *Assoc. Off. Anal. Chem.* 73, 6: 842-849.
- 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. 2006. *Dz.Urz. UE L* 320/13.
- SALTER R.S., FITCHEN J., 2006. Evaluation of chemiluminescence method for measuring alkaline phosphatase activity in whole milk of multiple species and bovine dairy drinks: interlaboratory study. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem. Int.* 89, 4: 1061-1070.
- WILIŃSKA A., BRYJAK J., ILLEOVA V., POLAKOVIC M., 2007. Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. *Int. Dairy J.* 17: 579-586.
- YOSHITOMI K., 2004. Alkaline phosphatase activity in cheeses measured by fluorometry. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39: 349-353.

#### APPLICATION OF FLUORIMETRIC METHOD IN EVALUATION OF COMPLETENESS OF PASTEURISATION OF COW MILK, GOAT MILK AND CHEESES

**Summary.** Determination of alkaline phosphatase (ALP) is used to assess the completeness of pasteurisation. Official reference method for the measurement of ALP is the fluorimetric method according to PN-EN ISO 11816. ALP activity is measured by fluorimetric estimation of kinetics of hydrolysis reaction of the substrate which, when acted upon ALP, is converted to a highly fluorescent product. The aim of this study was revalidation of the assay used for determination of ALP activity in cow milk, goat milk and cheese. The precision of the method was determined by assignment of repeatability and reproducibility. Moreover, the ALP activity in milk and cheeses from retail outlets was monitored. ALP activity in milk ranged from < 10 to 483 mU/l, most of samples had ALP activity below 250 mU/l. ALP activity in cheese ranged from < 0.5 to 90.46 mU/g, most of samples had ALP activity below 10 mU/g. Values of the precision of the method fitted the criteria established for interlaboratory comparisons which are included in standard PN-EN ISO 11816.

**Key words:** alkaline phosphatase, completeness of pasteurisation, cow milk, goat milk, cheese

*Adres do korespondencji – Corresponding address:*

*Jolanta Grażyna Rola, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, Poland, e-mail: jolarola@piwet.pulawy.pl*

*Zaakceptowano do druku – Accepted for print:*  
7.10.2009

*Do cytowania – For citation:*

*Rola J.G., Sosnowski M., 2009. Zastosowanie metody fluorymetrycznej w ocenie skuteczności pasteryzacji mleka krowiego, koziego i serów. *Nauka Przyr. Technol.* 3, 4, #132.*