



Reziduální aktivita alkalické fosfatázy v tepelně ošetřeném buvolím mléce

Navrátilová, P., Králová, M., Bartáková, K., Bursová, Š.



Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Česká republika

SOUHRN

V mlékárenském průmyslu je stanovení aktivity alkalické fosfatázy (ALP) významným kritériem účinnosti pasterace. U tepelně ošetřeného kravského mléka je za negativní výsledek považována hodnota aktivity ALP ≤ 350 mU/l. Pro mléka jiných druhů není stanovena evropskou legislativou limitní hodnota aktivity ALP v tepelně ošetřeném mléce. Cílem pilotní studie bylo stanovení reziduální aktivity ALP v pasterovaném buvolím mléce. Bazénové vzorky (n=13) buvolího mléka byly tepelně ošetřeny dlouhodobou nízkou pasterací 63 °C/30 min., šetrnou pasterací 72 °C/15 s a vysokou pasterací 85 °C/5 s. Pro stanovení aktivity ALP byla použita fluorometrická metoda - Fluorophos ALP Test System. Nejvyšší průměrná hodnota aktivity ALP byla stanovena v mléce po pasteraci 63 °C 30 min. (41,06 $\pm$ 24,95 mU/l). Po ošetření teplotou 72 °C 15 s byla aktivita ALP 26,01 $\pm$ 23,15 mU/l a nejnižší aktivita byla po vysoké pasteraci 15,11 $\pm$ 8,09 mU/l.

ÚVOD

Alkalická fosfatáza (ALP) je nativní enzym [EC 3.1.3.1.; *orthophosphoric monoester phosphohydrolase*] přítomný v mléce všech savců, jeho obsah v mléce se u jednotlivých živočišných druhů liší. ALP je membránový enzym, glykoprotein obsahující v molekule kyselinu sialovou. ALP nacházející se v mléce má původ v epitelu mléčné žlázy, v krvi a v somatických buňkách, jejím dalším zdrojem jsou mikroorganismy nacházející se v mléce. Kromě živočišného druhu ovlivňují koncentraci enzymu v mléce i další faktory: plemeno, individualita zvířete, mléčná užitkovost, sezóna, stádium laktace a zdravotní stav mléčné žlázy. Aktivita ALP je vysoká v mlezivu, po porodu dochází k poklesu aktivity, během 1-2 týdnů dosahuje minima a následně zůstává konstantní po dobu 25 týdnů (Fox and McSweeney, 1998). Aktivita ALP se zvyšuje v mastitidním mléce (Patil et al., 2015).

Zavedení pasterace mléka bylo jedním z nejvýznamnějších technologických opatření k omezení přenosu infekčních onemocnění potravinami. Na začátku 20. století byly minimální režimy pasterace nastaveny takovým způsobem, aby došlo k devitalizaci *Mycobacterium tuberculosis* a *Coxiella burnetii* (Plocková a Horáčková, 2019). Bylo zjištěno, že ALP je více rezistentní vůči teplotě a času pasterace než *Mycobacterium tuberculosis*. Proto bylo stanovení aktivity ALP v tepelně ošetřeném mléce zavedeno jako důležité kritérium účinnosti pasterace (Hilal, 2018). Nařízení EP a Rady č. 1662/2006 stanoví, že pokud syrové mléko prochází tepelným ošetřením, provozovatelé potravinářských podniků musí zajistit, aby toto ošetření splňovalo požadavky stanovené v Nařízení (ES) č. 852/2004. Pasterace se dosahuje ošetřením: vysokou teplotou po krátkou dobu (nejméně 72 °C po dobu 15 sekund), nízkou teplotou po dlouhou dobu (nejméně 63 °C po dobu 30 minut) nebo jakoukoli jinou kombinací času a teploty vedoucí k rovnocennému účinku tak, aby výrobky bezprostředně po tomto ošetření vykazovaly negativní reakci při testu na alkalickou fosfatázu v případech, kdy je test použitelný. Za negativní výsledek u kravského mléka je považována hodnota aktivity ALP ≤ 350 mU/l při stanovení referenční metodou dle ISO 11816-1 (Nařízení Komise (ES) č. 1664/2006). Pro mléka jiných druhů není stanovena legislativou limitní hodnota aktivity ALP v tepelně ošetřeném mléce. Cílem pilotní studie bylo stanovení reziduální aktivity ALP v tepelně ošetřeném buvolím mléce.

MATERIÁL A METODIKA

Odběr vzorků



Vzorky mléka byly získány na dvou farmách (farmy A, B) v České republice zaměřených na chov Středomořských buvolů. Mléko bylo po dojení zchlazeno a uchováváno při teplotě 4-6 °C

Vzorky



Ve studii byly využity bazénové (směsné) vzorky buvolího syrového mléka. Vzorky byly odebírány 1x měsíčně, byly přepravovány a uchovávány do vyšetření v laboratoři při teplotě 4-6 °C.

Tepelné ošetření vzorků

- dlouhodobou nízkou pasterací 63 °C/30 min.
- šetrnou pasterací 72 °C/15 s
- vysokou pasterací 85 °C/5 s.
- Po pasteraci byly vzorky zchlazeny na teplotu 20-25 °C.

Vzorky mléka byly v laboratoři tepelně ošetřeny pasterací.

Stanovení aktivity ALP



Pro stanovení reziduální aktivity ALP byla použita fluorometrická metoda – Fluorophos® testovací systém a přístroj Fluorophos (Advanced Instruments, INC., USA).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Hodnoty reziduální aktivity ALP v pasterovaném buvolím mléce ukazuje tabulka č. 1. Nejnižší hodnota byla naměřena v mléce ošetřeném vysokou pasterací, nejvyšší po ošetření dlouhodobou nízkou pasterací. Statistická analýza prokázala statisticky vysoce významně ($P < 0,01$) vyšší průměrné hodnoty ALP po pasteraci při 63 °C oproti hodnotám po pasteraci při 72 i 85 °C. Mezi hodnotami aktivity ALP po pasteraci při 72 °C a 85 °C nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($P > 0,05$). Studie zaměřené na stanovení aktivity ALP v tepelně ošetřeném buvolím mléce nejsou příliš četné. Autoři Tsiamita et al. (2022) publikovali výsledky studie, zaměřené na stanovení aktivity ALP v nebovinných druzích mlék. Po tepelném ošetření analyzovali dva soubory vzorků buvolího mléka (vzorky původem z Řecka a Kypru) fluorometrickou metodou. Po pasteraci (63 °C/30 min.) byla průměrná hodnota aktivity ALP ve vzorcích 54,95 a 37,25 mU/l, po tepelném ošetření šetrnou pasterací (72 °C/15 s) 46,2 a 209,6 mU/l. Další studie uskutečněná v Itálii uvádí, že u buvolího mléka ošetřeného pasterací 63 °C/30 min. byla u 23 % vzorků hodnota aktivity ALP < 100 mU/l, u 50,8 % vzorků v rozmezí 100-200 mU/l, u 20,9 % vzorků 201-300 mU/l, u 4,5 % vzorků 301-400 mU/l a pouze u 0,7 % vzorků byla hodnota v rozmezí 401-500 mU/l (EFSA, 2021). Dle našich výsledků byla hodnota aktivity ALP po pasteraci 63 °C/30 min. u 92 % vzorků < 100 mU/l. EFSA (2021) ve zprávě uvádí průměrnou hodnotu aktivity ALP v pasterovaném buvolím mléce získanou ze souboru výsledků analýz z pěti států po vyšetření vzorků s využitím ISO referenční metody (fluorometrická metoda) 29,9 mU/l. Na základě stanovených hodnot aktivity ALP po tepelném ošetření (63 °C, 30 min.) EFSA (2021) v publikované zprávě doporučila pro buvolí mléko hodnotu aktivity ALP v pasterovaném mléce ≤ 380 mU/l.

Tabulka 1: Reziduální aktivita ALP (mU/l) v tepelně ošetřeném buvolím mléce

	Pasterace (teplota/čas)		
	63 °C/30 min.	72 °C/15 s	85 °C/5 s
x	41,06 ^A	26,01 ^B	15,11 ^B
SD	24,95	23,15	8,09
min	17,05	5,00	5,00
max	103,35	87,40	30,45

x-aritmetický průměr; SD- směrodatná odchylka; A, B – rozdílná písmena u průměrných hodnot značí statistickou významnost rozdílů na hladině významnosti $P < 0,01$.

ZÁVĚR

U všech vzorků byla hodnota reziduální aktivity ALP po pasteraci nižší, než doporučená hodnota dle EFSA – 380 mU/l, naměřené hodnoty aktivity ALP byly v rozmezí 5-103,35 mU/l. Při stanovení aktivity ALP v tepelně ošetřeném mléce je nutné vzít v úvahu, že interpretaci výsledků testů ALP mohou ovlivnit různé faktory např. reaktivace ALP po tepelném ošetření, interference mikrobiální ALP, původní hladina ALP v mléce, obsah tuku v mléce.

LITERATURA

- EFSA (European Food Safety Authority); Clawin-Rěadecker, I., De Block, J., Egger, L., Willis, C., Da Silva, F. M.T., Messens, W. 2021. The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurisation of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products. *EFSA Journal*, vol. 19, 73 pp.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Blackie Academic & Professional, p. 443-447.
- Hilal, A. P. 2018. Validation of milk product pasteurization by alkaline phosphatase activity. *Concepts of Dairy & Veterinary Sciences*, vol. 1, pp. 78-89.
- Lombardi, P., Avallone, L., d'Angelo, A., Mor, T., Bogin, E. 2000. Buffalo-milk enzyme levels, their sensitivity to heat inactivation, and their possible use as markers for pasteurization. *Journal of Food Protection*. vol. 63, pp. 970-3.
- Nařízení Komise (ES) č. 1664/2006 ze dne 6. listopadu 2006, kterým se mění nařízení (ES) č. 2074/2005, pokud jde o prováděcí opatření pro některé produkty živočišného původu určené k lidské spotřebě, a zrušují některá prováděcí opatření. *Úř. věst. L 320*, 18.11.2006, s. 13–45.
- Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006 ze dne 6. listopadu 2006, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. *Úř. věst. L 320*, 18.11.2006, s. 1–10.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin. *Úř. věst. L 139*, 30.4.2004, s. 1-54.
- Patil, MP, Nagvekar, AS, Ingole, SD, Bharucha, SV, Palve, VT. 2015. Somatic cell count and alkaline phosphatase activity in milk for evaluation of mastitis in buffalo, *Veterinary World*, vol. 8, pp. 363-366.
- Shakeel-Ur-Rehman, Farkye, N.Y. Phosphatases. In: Fuquay, J.W. et al. *Encyclopedia of dairy sciences*. London: Academic press, 2nd Edition, 2011, vol. 3, p. 314-318.
- Tsiamita, A., Valiakos, G., Natsaridis, N., Fotiadou, S., Manouras, A., Malissiova, E. 2022. Preliminary results on the comparative evaluation of alkaline phosphatase commercial tests efficiency in non-cow milk pasteurization. *BioTech*, vol. 11, p. 39.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla finančně podpořena projektem Interní tvůrčí agentury VETUNI č. 2025ITA21.