

Визначення активності лужної фосфатази при оцінці безпеки молока за якістю пастеризації



Т. ЄВТУШЕНКО, аспірант

Т. КІШИК, зав.лабораторії

Ю. НОВОЖИЦЬКА, канд. вет наук,

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

В. СУХЕНКО, докт. техн. наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Анотація. У статті наведені дані визначення активності лужної фосфатази при оцінці якості пастеризації, що має істотне значення для контролю якості та безпеки при вживанні молокопродуктів населенням.

Активність лужної фосфатази є «індикатором» ефективності та якості термічної обробки, що відбувається під час виробництва молочних продуктів. Лужна фосфатаза потрапляє в молоко із клітин молочної залози, але може вироблятися і мікрофлорою молока. Вона концентрується на оболонках жирових кульок, чутлива до дії температур, інактивується при температурі 63 °С і витримці протягом 30 хв. при цій самій температурі або при 72–74 °С практично моментально. Висока чутливість фосфатази до нагрівання покладена в основу методики контролю ефективності пастеризації молока. Відомо, що фосфатаза може відновлювати свою активність у молочній сировині після правильно проведеної пастеризації. Тому, у деяких випадках потрібне диференційоване визначення реактивованої та залишкової фосфатази. Контроль активності лужної фосфатази забезпечує відповідність молочної продукції до вимог національних та міжнародних стандартів, удосконаленням системи державного контролю в Україні при виробництві молока та молочних продуктів є використання лише аналітичного методу визначення активності лужної фосфатази в молоці одразу після пастеризації. Проведено оцінку придатності методики визначення активності лужної фосфатази флуориметричним методом у відповідності до міжнародних стандартів.

Ключові слова: молоко, якість пастеризації, активність лужної фосфатази, збіжність, внутрішньо–лабораторна відтворюваність.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ПРИ ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ МОЛОКА ПО КАЧЕСТВУ ПАСТЕРИЗАЦИИ.

Т.В. Евтушенко, Т.Н. Кишик, Ю.Н. Новожицкая.

Аннотация. В статье приведены данные определения активности щелочной фосфатазы при оценке качества пастеризации, что имеет существенное значение для контроля качества и безопасности при употреблении молочных продуктов населением.

Активность щелочной фосфатазы является «индикатором» эффективности и качества термической обработки при производстве молочных продуктов. Щелочная фосфатаза попадает в молоко из клеток молочной железы, но может производиться и микрофлорой молока. Она концентрируется на оболочках жировых шариков, чувствительна к воздействию температур, инактивируется при температуре 63 °С и выдержке в течение 30 мин. при этой же температуре или при 72–74 °С практически моментально. Высокая чувствительность фосфатазы к нагреванию положена в основу методики контроля эффективности пастеризации молока. Известно, что фосфатаза может восстанавливать свою активность в молочном сырье после правильно проведенной пастеризации. Поэтому, в некоторых случаях требуется дифференцированное определе-

ние реактивной и остаточной фосфатазы. Контроль активности щелочной фосфатазы обеспечивает соответствие молочной продукции требованиям национальных и международных стандартов, совершенствованием системы государственного контроля в Украине при производстве молока и молочных продуктов является использование только аналитического метода определения активности щелочной фосфатазы в молоке сразу после пастеризации. Проведена оценка пригодности методики определения активности щелочной фосфатазы флуориметрическим методом в соответствии с международными стандартами.

Ключевые слова: молоко, качество пастеризации, активность щелочной фосфатазы, сходимость, внутрилабораторная воспроизводимость.

Шлях молока до столу споживача – складний, тривалий процес. Від того, наскільки ретельно в цей час будуть дотримуватися всі ветеринарно-санітарні норми, залежить якість кінцевого продукту, а, отже, і здоров'я населення.

Основні зміни в молоці після його отримання відбуваються під дією мікрофлори, що зумовлює його скисання і появу різних вад, небезпечних для здоров'я людини. Дотримання санітарних правил переробки молока значною мірою знижує його бактеріальну забрудненість.

Пастеризація – процес нагрівання молока до рівня, близького до точки кипіння. Однак процес закипання при цьому не допускається, оскільки це призведе до зміни властивостей молочного продукту. Основною метою пастеризації є знищення різних мікроорганізмів, які можуть там перебувати та негативно впливати на якість молока. При цьому ступінь цього впливу, як правило, визначається температурою, до якої молоко нагрівають [1, 2].

Активність лужної фосфатази є «індикатором» ефективності та якості термічної обробки, що відбувається під час виробництва молочних продуктів. Контроль активності лужної фосфатази забезпечує відповідність молочної продукції до вимог національних та міжнародних стандартів [3].



Лужна фосфатаза – це фермент, який спонукає гідроліз ефірів фосфорної кислоти, міститься переважно на поверхні жирових кульок та інактивується під дією високих температур. Саме визначення активності лужної фосфатази після проведення пастеризації сирого молока широко використовується в молочній промисловості як підтвердження дотримання температурних та часових вимог до пастеризації [4].

Активність лужної фосфатази (ALP) вимірюється в міліюдиницях активності ферменту на літр зразка (МО/л). Одиниця активності лужної фосфатази – кількість ферменту лужної фосфатази, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за хвилину [1, 2].

Низький вміст активності лужної фосфатази (ALP) в молоці та молочних виробках підтверджує, що продукти були нагріті до необхідної температури, і в них відсутній вміст сирого молока, тобто продукт під час виробництва не був забруднений сиром сировиною (молоком).

Метою роботи було впровадження в роботу нового методу досліджень якості пастеризації молока відповідно до Європейських вимог та оцінка придатності флуориметричного методу в лабораторних умовах.

Дослідження проводили на базі науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ).

Визначення активності лужної фосфатази проводили у контрольних зразках з приписним значенням активності лужної фосфатази 500 МО/л та зразках, які надходили на дослідження від молокопереробних підприємств України. Під час проведення досліджень використовували прилад флуориметр Fluorophos® Test System з фільтрацією і термостатично регульованим тримачем кювети та прямокутною оптичною системою, що допускає збудження при довжині хвилі 440 нм та випускання при довжині хвилі у межах 520–560 нм (США), інкубаційний блок, що підтримує температуру



38±1°C (США), буферний розчин для екстракції Fluorophos® ALP Cheese Extraction Buffer (FLA005), розчин для щоденного контролю приладу Fluorophos® ALP Daily Instrument Control Kit (FLA280), що містить 34,48 – 34,48·10³ мкмоль/л Fluoroyellow®, калібрувальний розчин А, що містить 0 мкмоль/л Fluoroyellow®, калібрувальний розчин В, що містить 17,24·10³ мкмоль/л Fluoroyellow®, калібрувальний розчин С, що містить 34,48·10³ мкмоль/л Fluoroyellow® Fluorophos® ALP Calibrator Set (FLA250), та робочий субстрат Fluorophos® (США).

Під час впровадження методу використовували ISO 11816-1:2013 (IDF 155-1) Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase activity – Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks.

Результати дослідження та їх обговорення.

Активність лужної фосфатази для зразка вимірювали шляхом безперервного флуориметричного прямого кінетичного аналізу. В субстраті нефлуоресцентного ароматичного монофосфатного ефіру, 2'-[2-бензотіазоліл] – 6'-гідроксибензотіазолфосфату, в присутності будь-якої лужної фосфатази, утвореної з дослідного зразка, відбувався гідроліз його фосфатного радикалу, в результаті чого отримували продукт, що мав характеристики інтенсивної флуоресценції. Перед проведенням досліджень готували робочий субстрат шляхом змішування 144 мг порошкового субстрату молекулярною масою 580 г/моль з буферним розчином. Робочий субстрат представляє собою нефлуоресцентний ароматичний монофосфатний ефір 2[2-бензотіазоліл] – 6[1-гідроксибензотіазолфосфату. Буферний розчин субстрату містив буферний розчин діетаноламіну (DEA), с(DEA) = 2,4 моль/л, рН =10,0. Контроль якості субстрату протягом 16 днів був у діапазоні від 747 до 989 Flu, що не перевищувало допустимого діапазону 1200 Flu. Щоденне контролювання флуориметра Fluorophos® та графічне відображення наведено на рис. 1.

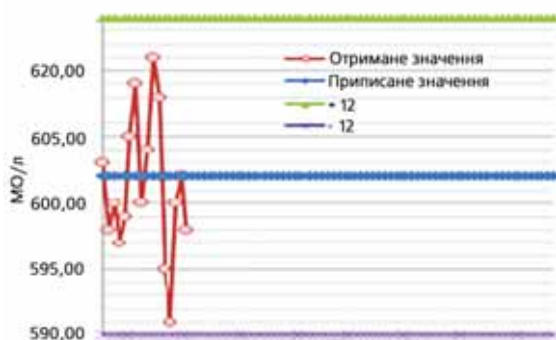


Рис. 1. Графічне відображення щоденного контролю флуориметра Fluorophos®

Щоденне контролювання приладу Fluorophos® проводили відповідно до інструкції з експлуатації та встановили, що в різні дні параметри були в діапазоні від 586 до 611 Flu, що є в допустимих межах.

Щоденний тест D/A флуориметра Fluorophos® та графічне відображення наведено на Рис. 2.

Перед виконанням тестування зразків проводили щоденну перевірку аналого-цифрового перетворення у відповідності до інструкції з експлуатації та встановили, що в різні дні параметри були в діапазоні від 300 до 304 Flu при допустимих 302±4 Flu.

Також виконували позитивний, негативний та нормальний контроль за допомогою Phospha Check® ALP Pasteurization Control Set (FLA260).

Встановлено, що тест контролю пастеризації PhosphaCheck® ALP Pasteurization Control Set (FLA260) залишається стабільним протягом 18 місяців від дати виготовлення за умови, що він зберігається в невідкритій упаковці та не у відновленому вигляді за температури від +2°C до +8°C. Після відкриття засіб контролю залишається стабільними протягом трьох днів, якщо зберігається за температури від +2°C до +8°C. Після калібрування каналу виконували аналіз трьох контрольних розчинів, а саме негативного, позитивного та PhosphaCheck-NTM шляхом додавання 75 мкл кожного контрольного розчину в 2 мл попередньо підігрітого субстрату.



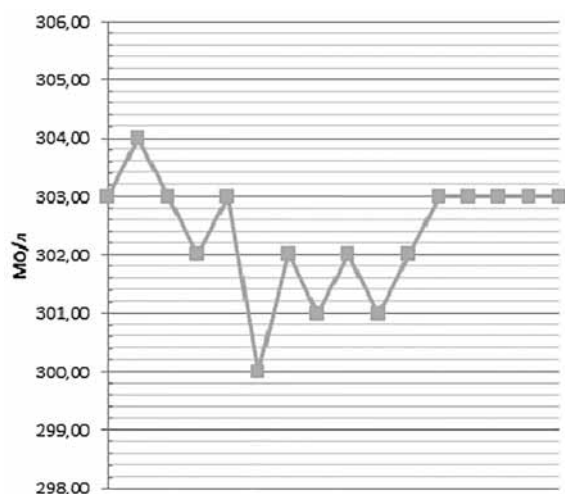
Щоденний контроль (602±12), Flu

1 день	603	9 день	604
2 день	598	10 день	611
3 день	586	11 день	608
4 день	597	12 день	595
5 день	599	13 день	591
6 день	605	14 день	587
7 день	609	15 день	602
8 день	600	16 день	598

Показники негативного контролю повинні бути менше 10 МО/л, при застосуванні PhosphaCheck–NTM – в межах від 10 МО/л до 40 МО/л, а при позитивному контролі величина показників повинна становити 500 ± 100 МО/л. Одержані дані наведено в табл.1.

Результати оцінювання придатності методу при дослідженні активності лужної фосфатази у незбираному молоці наведені в табл. 3.

Контроль збіжності (Sr) проводився шляхом порівняння різниці результатів двох паралельних визначень



Щоденний тест D/A (302 ± 4), Flu			
1 день	303	9 день	302
2 день	304	10 день	301
3 день	303	11 день	302
4 день	302	12 день	303
5 день	303	13 день	303
6 день	300	14 день	303
7 день	302	15 день	303
8 день	301	16 день	303

Рис. 2. Графічне відображення щоденного тесту D/A флуориметра Fluorophos®

Контроль якості випробувань проводили шляхом використання негативного, нормального та позитивного контролю протягом 16 днів із різною кількістю досліджуваних зразків. Всього було досліджено 26 зразків, з них в 13 зразках результат <10 МО/л, в інших 13 зразках в діапазоні від 18,8 до 168,7 МО/л. Такі дані свідчать про те, що пастеризація для даних зразків здійснювалась у відповідності до встановлених параметрів, зазначених в Регламенті (ЄС) № 853/2004 від 29 квітня 2004 року, та не перевищує допустимий рівень 350 МО/л [1–3, 5].

при виконанні дослідження позитивного зразка з нормативом контролю збіжності $\leq 20\%$ [6–8]. Умови збіж-

Порівнюючи існуючий якісний метод дослідження та флуориметричний метод, можна сказати, що якісний метод не має відповідної чутливості та відповідно не можливо ідентифікувати походження даного показника.

Дані результатів наведено в табл. 2.

Дані, наведені в табл.2, свідчать про те, що при допустимому рівні активності лужної фосфатази 350 МО/л кількісним методом при чутливості 10 МО/л було виявлено перевищення активності лужної фосфатази у зразку №1– 537 МО/л, зразку № 2 – 423 МО/л, зразку № 3 – 370 МО/л, що не було виявлено існуючим якісним методом.

Таблиця 1

Контроль якості проведених випробувань

Негативний контроль (менше 10 МО/л)	Нормальний контроль (менше 40 МО/л)	Позитивний контроль (500 ± 100 МО/л)	Період/ номер дослідної проби	Отримане значення, МО/л
<10	38,2	465,7	1 день/1	<10
<10	38,2	465,7	1 день/2	26,7
<10	38,2	465,7	1 день/3	<10
<10	38,2	465,7	1 день/4	168,7
<10	38,2	536,5	2 день/1	40
<10	38,2	536,5	2 день/2	<10
<10	38,2	536,5	2 день/3	132,9
<10	38,2	584,3	3 день/1	<10
<10	38,2	571,3	4 день/1	<10
<10	<10	405,9	5 день/1	<10
<10	20,7	416,0	6 день/1	<10
<10	<10	474,7	7 день/1	<10
<10	21,6	510,3	8 день/1	<10
<10	21,6	510,3	8 день/2	57,9
<10	21,6	510,3	8 день/3	72,6
<10	21,6	510,3	8 день/4	<10
<10	20,5	514,3	9 день/1	57,9
<10	20,5	514,3	9 день/2	18,8
<10	20,5	514,3	9 день/3	111,7
<10	15,1	498,3	10 день/1	<10
<10	18,4	516,0	11 день/1	29,0
<10	23,6	522,5	12 день/1	45,5
<10	16,3	490,8	13 день/1	70,3
<10	22,2	505,7	14 день/1	<10
<10	17,4	531,2	15 день/1	<10
<10	21,5	520,6	16 день/1	35,4

ності передбачали виконання дослідження одного і того ж зразка за одних і тих самих умов, одним аналітиком, на одному приладі. Одержані результати збіжності (Sr), наведені в табл. 3, дорівнюють 7,53%, що відповідає встановленим вимогам.

Контроль внутрішньо-лабораторної відтворюваності (SR) проводили при впровадженні змін до даної методики стосовно пробопідготовки. Зразки аналізували, використовуючи різні партії реактивів, різний час проведення аналізу, залучаючи різних аналітиків. Норматив контролю відтворюваності $\leq 20\%$ [6–8]. Отримані результати збіжності (SR), наведені в табл. 3, становлять 8,42%, що відповідає чинним вимогам.

Кожного разу виконували експерименти повернення (дослідження позитивного зразка з приписаним значенням). Ступені повернення склали від 98,5 до 101,0% та знаходилися в межах допустимого значення 95 до 110% [6–8].

Висновки і перспективи. Адапована нами методика дає змогу виявляти активність лужної фосфатази на межі чутливості 10 МО/л. Методика пройшла успішну апробацію під час проведення лабораторних досліджень на виконання Директиви Ради 2074/2005/ЄС та акредитована Національним агентством з акредитації України.

На основі експериментальних даних встановлено високі метрологічні характеристики, а саме: збіжність (Sr) від 7,53%, внутрішньолабораторна відтворюваність (SR) від 8,42% при нормативі контролю $\leq 20\%$, процент повернення 98,5–101,0 % при нормативі контролю від 95 до 110%.

Наведені нами результати доводять, що дослідження на активність лужної фосфатази флуориметрич-



ним методом з використанням контрольних позитивних зразків є ефективним.

На молокопереробних підприємствах необхідно використовувати системи контролю якості та безпеки, гармонізовані з міжнародними вимогами державного контролю ЄС, що забезпечить високоякісну молочну продукцію для споживачів.

DETERMINATION OF ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY AT THE EVALUATION OF MILK SAFETY ON PASTERIZATION QUALITY.

T.V. Yevtushenko, TN. Kishik, Yu.N. Novozhytska

Summary. The article gives data on the determination of alkaline phosphatase activity in assessing the quality of pasteurization. This investigation is of great importance for quality control and safety at using dairy products by the population.

The activity of alkaline phosphatase is an "indicator" of the effectiveness and quality of heat treatment in the production of dairy products. Alkaline phosphatase enters the milk from the cells of the breast, but can also be produced by the microflora of milk. It concentrates on the membranes of fat glob-

Таблиця 2

Порівняльні дослідження позитивного зразку пастеризованого молока якісним та флуориметричним методом

Назва показника	Межа чутливості флуориметричного методу, МО/л	Допустимий рівень, МО/л	№ зразку	Метод дослідження	
				якісний	кількісний за допомогою приладу
Активність лужної фосфатази	10 МО/л	350МО/л	1	не виявлено	537 МО/л
			2	не виявлено	423 МО/л
			3	не виявлено	370 МО/л

Таблиця 3

Основні результати оцінювання придатності методу при дослідженні активності лужної фосфатази в цільному молоці

№ п/п	Назва показника	Межа кількісного виявлення, МО/л	Внутрішньо-лабораторна відтворюваність (SR), %	Збіжність (Sr), %	Розширена невизначенність (U _{розш.}), %
1	Активність лужної фосфатази	10 МО/л	8,42	7,53	15,06

ules, is sensitive to the effects of temperatures, inactivated at 63 °C and held for 30 minutes at the same temperature or at 72-74°C almost instantaneously. The high sensitivity of phosphatase to heating is the basis of the technique for controlling the efficiency of milk pasteurization. It is known that phosphatase can restore its activity in dairy raw materials after properly pasteurized. Therefore, in some cases, a differentiated definition of reactive and residual phosphatase is required. Controlling the activity of alkaline phosphatase ensures the compliance of dairy products with the requirements of national and international standards, and the improvement of the state control system in Ukraine in the production of milk and dairy products is the use of an analytical method for determining the activity of alkaline phosphatase in milk immediately after pasteurization. The suitability of the procedure for determining alkaline phosphatase activity by fluorimetric method was assessed in accordance with international standards.

Key words: milk, pasteurization quality, alkaline phosphatase activity, convergence, intra-laboratory reproducibility.

Література

1. ISO 11816-1:2013 (IDF 155-1). Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase activity – Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks.
2. COMMISSION REGULATION (EC) № 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) № 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organization of official controls under Regulation (EC) № 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) № 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) № 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) № 853/2004 and (EC) № 854/2004.
3. Методичні рекомендації з визначення активності лужної фосфатази в молоці та молочних продуктах за допомогою флуориметра "Fluorophos" та оцінка придатності методу / [Ю.М. Новожицька, Т.В. Євтушенко, Т.М. Кішик та ін.]. – К., ДНДІЛДВСЕ, 2015. – 33 с.
4. Якубчак О.М. Ветеринарно-санітарна експертиза з основами технології і стандартизації продуктів тваринництва [Текст] / В.І. Хоменко, С.Д. Мельничук та ін. – К.: «Біопром», 2005. – 800 с.
5. Спосіб визначення активності лужної фосфатази в молоці та молочних продуктах флуориметричним методом. Деклара-



ційний патент України на корисні моделі МПК G01N33/04 та G01N21/64 [Текст] / Новожицька Ю.М., Євтушенко Т.В., Кішик Т.М. та ін. – № 105435; заявл. 08.07.2015; опубл. 25.03.2016, Бюл №6.

6. Настанова з оцінювання невизначеності вимірювання результатів кількісних випробувань. Технічний звіт EUROLAB №1/2006// Пер. з англ. Київ, Евралаб-Україна, 2008.
7. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Result, European Commission, Brussels.
8. ДСТУ ГОСТ ИСО 5725-2:2005 Точність (правильність і прецизійність) методів та результатів вимірювання. Частина 2. Основний метод визначення повторюваності і відтворюваності стандартного методу вимірювання [Текст]. – Введ. 2006-07-1. – К.: ДП «УкрНДНЦ», 2006. – 59 с.

References

1. ISO 11816-1:2013 (IDF 155-1). Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase activity – Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks.
2. COMMISSION REGULATION (EC) № 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) № 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organization of official controls under Regulation (EC) № 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) № 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) № 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) № 853/2004 and (EC) № 854/2004.
3. **Novozhytska, Iu.M., Yevtushenko, T.V., Kishyk, T.M.** та ін. (2015) Metodychni rekomendatsii z vyznachennia aktyvnosti luzhnoi fosfatazy v molotsi ta molochnykh produktakh za dopomohoiu fluorymetra "Fluorophos" ta otsinka prydatnosti metodu [Methodical recommendations for the determination of activity of alkaline phosphatase in milk and dairy products using Fluorophos fluorimeter and assessment of the suitability of the method]. Kyiv, Ukraine, 33.
4. **Yakubchak, O.M.** ed. (2005). Veterynarno-sanitarna ekspertyza z osnovamy tekhnolohii i standartyzatsii produktiv tvarynytstva [Veterinary and sanitary expertise on the basis of technology and standardization of livestock products]. Kyiv: "Bioprom", 800.
5. **Novozhytska, Iu.M., Yevtushenko, T.V., Kishyk, T.M.** ed. (2016). Method of determining the activity of alkaline phosphatase in milk and dairy products by fluorimetric method. Patent of Ukraine for useful model. G01N21/64. № 105435; declared 08.07.2015; published 25.03.2016, №6.
6. Nastanova z otsiniuvannia nevyznachenosti vymiriuvannia rezultativ kilkisnykh vyprobuvan. Tekhnichnyi zvit EUROLAB №1/2006 [A guide for estimating the uncertainty of measuring the results of quantitative tests. EUROLAB Technical Report 1/2006] (2008). Kyiv: Evrolab-Ukraine.
7. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Result, European Commission, Brussels.
8. DSTU HOST YSO 5725-2:2005 Tochnist (pravylnist i pretsyziinist) metodiv ta rezultativ vymiriuvannia. Chastyna 2. Osnovnyi metod vyznachennia povtoriuvanosti i vidtvoriuvanosti standartnoho metodu vymiriuvannia [DSTU GOST ISO 5725-2: 2005 Accuracy (correctness and accuracy) of measurement methods and results. Part 2. The basic method for determining the repeatability and reproducibility of the standard measurement method]. Kyiv, "UkrNDNTS", Publ. 2006, 59 p.