

How to prove the efficacy of milk and dairy products pasteurization?

Rola J.G., Sosnowski M., Osek J., Department of Hygiene of Food of Animal Origin, National Veterinary Research Institute, Pulawy

The purpose of this paper was to present current methods of evaluation of milk and dairy products pasteurization. Due to the health safety of consumers, in order to eliminate the microorganisms, particularly pathogenic ones, from the final product, different methods of food preservation are applied. The main process for dairy products is the heat treatment. Determination of alkaline phosphatase (ALP) is used to assess the completeness of pasteurization or to detect raw milk if added to pasteurized products. ALP is an enzyme naturally present in milk and it is inactivated during heat treatment. Legislation of the European Union adapted the level of 350 mU·l⁻¹ of ALP activity as safe for consumption of cow milk and milk-based drinks. For cheese tentative limits made of pasteurized milk ranged from 2 to 10 mU·g⁻¹. The methods of determination of ALP in dairy products are based on colorimetric assays, but there are also chemiluminescence, amperometric or fluorimetric instrumental methods. Officially approved is the fluorimetric method (ISO 11816). It is applicable for measurement of ALP activity in milk, milk-based drinks and cheeses. The advanced fluorophos assay is based on the fluorimetric substrate called fluorophos which is converted to a highly fluorescent product in the presence of ALP. Stringent controlling of the conditions of heat treatment, as the major step in milk production, through determination of alkaline phosphatase activity in the final product, guarantees its quality and safety for consumers.

Keywords: alkaline phosphatase, pasteurization conditions, milk.

Ze względu na bezpieczeństwo zdrowotne konsumentów, w celu wyeliminowania z gotowego produktu drobnoustrojów, zwłaszcza patogennych, stosuje się różne metody, z których główną w odniesieniu do produktów mlecznych jest pasteryzacja.

Termin „pasteryzacja” przywodzi na myśl Ludwika Pasteura, który już w XIX w. odkrył wpływ obróbki termicznej żywności na jej trwałość (1). Potwierdzeniem prawidłowości przeprowadzonego procesu pasteryzacji mleka jest oznaczenie w gotowym produkcie aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP). ALP jest enzymem naturalnie występującym w mleku i inaktywowanym pod wpływem temperatury.

Wymagania prawne obowiązujące od 2006 r. w Unii Europejskiej, w tym w Polsce, ustalają limit aktywności ALP w mleku pasteryzowanym krowim na poziomie 350 mU·l⁻¹ (2, 3).

Jak wykazać skuteczność pasteryzacji mleka i produktów mlecznych?

Jolanta G. Rola, Maciej Sosnowski, Jacek Osek

z Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Enzymy mleka

Na początku XX w. wzrosło zainteresowanie badaniem jakości mleka oraz identyfikowaniem swoistych enzymów, mających wpływ na jego jakość. Odkryto wówczas ponad 70 białek enzymatycznych, z których około 20 scharakteryzowano jako ważne z technologicznego punktu widzenia. Stwierdzono, iż obecność N-acetyloglukozoaminidazy czy fosfatazy kwasnej może świadczyć o stanach zapalnych gruczołu mlekowego. Dostrzeżono aktywność antybakteryjną niektórych enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej, oksydazy sulfhydrylowej oraz lizozymu. Dzięki swoim właściwościom (wytwarzanie aktywnego tlenu, zdolność hydrolizy wiązań β-1,4-glikozydowych występujących w ścianach komórek bakteryjnych) wpływają one na trwałość mleka. Wykazano aktywność lipazy przejawiającą się szybkim jełczeniem produktu. Stwierdzono wrażliwość fosfatazy alkalicznej, gamma-glutamylotransferazy i laktoperoksydazy na wysoką temperaturę, co czyni je dobrymi wskaźnikami efektywności oraz właściwych warunków obróbki cieplnej mleka i produktów mlecznych (4, 5). Ich termoporność jest bowiem wyższa niż termoporność większości nieprzetwarzających drobnoustrojów mleka (6).

Fosfataza alkaliczna

Z technologicznego punktu widzenia ALP jest dla przemysłu mleczarskiego najważniejszym enzymem występującym w mleku. W biologicznym aspekcie ALP jest glikoproteiną, będącą składnikiem błon komórkowych, szeroko rozpowszechnioną w tkankach zwierząt oraz mikroorganizmów. Wyróżniono cztery podstawowe rodzaje fosfatazy alkalicznej występującej u ssaków: jelitowa, łożyskowa, zarodkowa (komórek macierzystych) oraz tkankowo nieswoista. Najbogatszym źródłem tego enzymu są komórki jelita oraz łożyska. Fosfatazy łożyskowa i komórek macierzystych różnią się tylko siedmioma spośród 484 aminokwasów. Nieznaczne różnice występują także pomiędzy fosfatazą alkaliczną wyizolowaną z kości, nerek, wątroby i innych tkanek, w tym także gruczołu mlekowego, co jest związane z różnym

stopniem glikozylacji białek. ALP występuje w postaci dwóch homologicznych izomerów o masie ~85 kDa, zawiera 4 atomy Zn, które wpływają na aktywność enzymu, jest aktywowana przez jony Mg²⁺. Hamujące działanie w stosunku do ALP wykazują metale chelatujące oraz nieorganiczne fosforany (4).

W mleku fosfataza alkaliczna została po raz pierwszy odkryta w 1925 r. przez F. Demuth. Wykazano wówczas, iż odpowiednia kombinacja czasu i temperatury obróbki mleka, tylko o nieznacznie wyższych parametrach niż używana dla zabicia *Mycobacterium tuberculosis*, wpływa na inaktywację ALP. Naturalny poziom aktywności ALP jest najniższy w mleku kozim, najwyższy zaś w owczym. Aktywność enzymu zależna jest od zawartości tłuszczu w mleku, rasy hodowlanej bydła oraz rodzaju stosowanej paszy. Surowe mleko krowie wykazuje około dziesięciokrotnie wyższą aktywność ALP niż mleko kozie, wynosi ona od ok. 300 000 do 1 000 000 mU·l⁻¹. Aktywność ALP świadczy o jakości procesu pasteryzacji mleka, podczas którego spada ona do poziomu poniżej 350 mU·l⁻¹. Fosfataza obecna w mleku po obróbce cieplnej określana jest jako fosfataza resztkowa. Badanie aktywności enzymatycznej ALP stało się rutynową kontrolą skuteczności pasteryzacji. Określa się ją jako ilość enzymu znajdującą się w gramie próbki, która katalizuje przekształcenie 1 μmola substratu w ciągu jednej minuty (4, 5, 6, 7, 8, 9). ALP w ok. 30–40% skoncentrowana jest w fazie lipidowej mleka. Pozostała jej część jest związana z lipoproteinami w fazie beztuszczowej (4, 8).

Oprócz naturalnie występującej w mleku fosfatazy alkalicznej, istnieje możliwość pojawienia się w nim fosfatazy syntetyzowanej przez niektóre bakterie. Taka postać enzymu (heat resistant microbial phosphatase – HRMP) jest bardziej oporna na działanie wysokiej temperatury w stosunku do enzymu pochodzącego z gruczołu zwierzęcia, inaktywacji ulega bowiem dopiero powyżej 75–80°C w czasie 15 minut. Bakterie, które wytwarzają fosfatazę alkaliczną w mleku, zidentyfikowano jako drobnoustroje Gram-ujemne, wykazujące obfity wzrost w temperaturze 6°C i znacznie słabszy w 37°C, należące do rodzajów *Sphingomonas*, *Sphingobacterium*,

Brevundimonas, *Chryseobacterium*, *Burkholderia* i innych (23).

Obróbka cieplna mleka a inaktywacja fosfatazy alkalicznej

Obróbka cieplna mleka w temperaturze 63–65°C przez 30–32 minuty lub 72–75°C przez 15–30 sekund powinna być wystarczająca do otrzymania produktu bezpiecznego dla zdrowia konsumenta. Wskaźnikiem skuteczności przeprowadzonego procesu termicznego jest redukcja aktywności ALP do minimum. Początkowo jej mechanizm był uważany za prostą, nieodwracalną przemianę z aktywnej postaci enzymu w formę nieaktywną. Obecnie wiadomo, że reakcja inaktywacji fosfatazy może przebiegać w dwóch etapach: odwracalnej denaturacji enzymu, a następnie nieodwracalnej przemiany w formę nieaktywną (6).

Po właściwie przeprowadzonym procesie pasteryzacji istnieje możliwość wykrycia obecności fosfatazy innej niż resztkowa, jest to wówczas enzym pochodzenia mikrobiologicznego lub reaktywowany. W celu oznaczenia obecności fosfatazy pochodzenia mikrobiologicznego należy zastosować ogrzewanie próbki mleka w temperaturze 95°C w czasie 2 minut lub 63°C w czasie 30 minut, a więc w warunkach, w których normalnie występujący w mleku enzym ulega inaktywacji, i ponownie poddać analizie. Oznaczona aktywność ALP w tak przygotowanej próbce świadczy o aktywności ALP pochodzenia mikrobiologicznego. Fosfataza reaktywowana obecna może być jedynie w mleku poddanym obróbce UHT. Mleko bezpośrednio po procesie pozbawione jest fosfatazy, lecz w miarę upływu czasu, podczas przechowywania w temperaturze pokojowej, obserwuje się wzrost aktywności ALP, wynikający z reaktywacji enzymu. Wykazano, że pojawiająca się fosfataza reaktywowana nie jest związana z obecnością mikroorganizmów (4). Aktywność reaktywowanej ALP można zweryfikować, badając specjalnie przygotowaną próbkę (uzyskaną przez dodanie octanu magnezu do uprzednio podgrzanego w 95°C mleka, następnie inkubowaną przez 1 godz. w 34°C i rozcieńczoną w stosunku 1:6) w rutynowy sposób. Jeżeli aktywność ALP w tej próbce jest wyższa niż w próbce zerowej, stwierdza się obecność ALP reaktywowanej (10). Homogenizacja produktu przed obróbką termiczną oraz obróbka w wysokiej temperaturze w krótkim czasie – HTST (high temperature short time) po obróbce UHT zmniejsza stopień reaktywacji enzymu (4).

Fosfataza alkaliczna w serach

Jakość sera zależy od mleka, z którego został on wytworzony i chociaż pod

względem bezpieczeństwa konsumentów wskazane jest stosowanie do produkcji serów mleka pasteryzowanego, niektóre sery z mleka surowego szybciej dojrzewają i wykazują silniejszy smak. Proces obróbki termicznej inaktywuje bowiem wiele enzymów termolabilnych, w tym także fosfatazę, oraz mikroflorę naturalną mleka podnoszącą walory produktów mlecznych (11, 12, 13, 14). Badaniem aktywności ALP w serach sprawdza się czy mleko użyte podczas produkcji było właściwie pasteryzowane. Sery z mleka pasteryzowanego wykazują aktywność ALP na poziomie ok. 1–3 mU·g⁻¹, podczas gdy wyprodukowane z mleka surowego 1900–2200 mU·g⁻¹. Sery pleśniowe mogą wykazywać wyższą aktywność fosfatazy alkalicznej spowodowaną obecnością ALP pochodzenia mikrobiologicznego użytych kultur starterowych grzybów pleśniowych (9).

Metody sprawdzania skuteczności pasteryzacji

Metody sprawdzania skuteczności pasteryzacji mleka i produktów mlecznych oparte są na oznaczaniu aktywności ALP. Większość laboratoriów wykonuje badania z zastosowaniem reakcji kolorymetrycznych, używając jako substratu organicznych związków fosforanowych. W metodzie Kaya i Grahama oraz metodzie Scharrera substratem reakcji jest fenylofosforan, w metodzie Aschaffenburga i Mullera – *p*-nitrofosforan fenylu, a w metodzie Kleyna – monofosforan fenoloftaleiny. Związki te hydrolizują na fosforan nieorganiczny i odpowiednio fenol, *p*-nitrofenol lub fenoloftaleinę. Aktywność enzymu obliczana jest na podstawie uwalnianego do środowiska reakcji produktu, zabarwiającego roztwór. Fenol, reagując z 2,6-dichlorochinonem chloroimidu (CQC), nadaje barwę niebieską, nitrofenol zabarwia roztwór o odczynie alkalicznym na żółto, a fenoloftaleina – na różowo (14, 15). Obok klasycznych metod kolorymetrycznych stosowane są także analizy instrumentalne, związane z pomiarem emisji promieniowania, takie jak chemiluminescencyjna czy fluorymetryczna, testy oparte na reakcjach elektrochemicznych – amperometryczne, potencjometryczne, a także szybkie testy paskowe.

W metodzie chemiluminescencyjnej energia wzbudzona w wyniku rozpadu słabego wiązania produktu powoduje przejście w stan wzbudzenia produktu pośredniego i powrót do stanu podstawowego z uwolnieniem energii świetlnej jako sygnału wyjściowego aparatu mierzonego za pomocą lumenometru (16). Amperometryczna metoda oznaczania ALP jest oparta na voltamperometrii cyklicznej. Pod wpływem ALP fosforan *p*-hydroksyfenolu

ulega defosforylacji do hydrochinonu, który jest najpierw utleniany do chinonu na powierzchni elektrody, a następnie regenerowany przez oksydazę glukozową w obecności glukozy. Sygnał uzyskuje się poprzez monitorowanie prądu przy stałej wartości potencjału. W metodach elektrochemicznych mogą być stosowane również inne nieelektroaktywne substraty, takie jak *p*-aminofenol, które dają elektroaktywne produkty po enzymatycznej defosforylacji (17, 18).

Szybkie testy paskowe oparte są na klasycznej metodzie kolorymetrycznej według Aschaffenburga i Mullera. Zasada oznaczania aktywności ALP polega na uwalnianiu w obecności ALP z unieruchomionego na pasku substratu nitrofenolu, który nadaje barwę żółtą paska. Mimo krótkiego czasu analizy, niskich kosztów i dość długiej trwałości pasków, testy te nie pozwalają na ilościowe oznaczenie enzymu (19).

Metodą odniesienia w oznaczaniu obecności fosfatazy alkalicznej jest fluorymetryczny pomiar aktywności ALP zgodny z PN-EN ISO 11816 części 1 i 2. Jest ona odpowiednia dla badania ALP w mleku krowim, kozim i owczym, pełnym, częściowo odtłuszczonym i odtłuszczonym, napojach mlecznych oraz różnego rodzaju serach. Przy użyciu tej metody można badać zarówno mleko pasteryzowane, jak i surowe (po uprzednim rozcieńczeniu próbki do aktywności ALP < 2000 mU·l⁻¹). Zasada metody oparta jest 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 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. Okres ten obejmuje wyrównanie temperatury substratu i próbki, po którym następują wielokrotne odczyty dla ustalenia szybkości reakcji. Aktywność enzymu przeliczana jest automatycznie i podawana przez aparat w mU·l⁻¹ dla mleka i napojów mlecznych lub mU·kg⁻¹ dla serów (7, 20).

Obróbka cieplna mleka a wymagania prawne

Wymogi dotyczące obróbki cieplnej mleka surowego, siary, przetworów mlecznych lub produktów na bazie siary dla przedsiębiorstw sektora spożywczego uregulowane są prawnie. Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 określa warunki procesu pasteryzacji produktów mlecznych jako obróbkę w wysokiej temperaturze w krótkim przedziale czasowym, co najmniej

72°C przez 15 sekund, lub niskiej temperaturze w długim przedziale czasowym, co najmniej 63°C przez 30 minut (21). Inna kombinacja warunków czasowych i termicznych jest dozwolona pod warunkiem, że bezpośrednio po takiej obróbce produkty będą wykazywały ujemną reakcję w badaniu na obecność fosfatazy alkalicznej. Warunki obróbki poprzez ultrawysoką temperaturę (UHT) określone są jako ciągle przepływ ciepła o temperaturze min. 135°C w krótkim przedziale czasowym, tak aby w produkcji poddanych takiej obróbce i przechowywanym w zamkniętym aseptycznym pojemniku w temperaturze otoczenia nie występowały zdolne do przeżycia mikroorganizmy lub przetrwalniki zdolne do wzrostu. Obróbka UHT musi zagwarantować stabilność mikrobiologiczną produktu po inkubacji przez 15 dni w temperaturze 30°C w zamkniętych pojemnikach lub przez 7 dni w 55°C. Rozporządzenie 1664/2006 ustanawia jako metodę odniesienia sprawdzania skuteczności pasteryzacji mleka fluorometryczny pomiar aktywności ALP zgodny z PN-EN ISO 11816. Metody alternatywne mogą być stosowane jedynie w przypadku gdy są potwierdzone metodą referencyjną (2, 3, 21).

Zgodnie z wymaganiami aktywność ALP w mleku pasteryzowanym krowim nie powinna być wyższa niż 350 mU·l⁻¹ (2). Dla mleka pochodzącego od innych gatunków zwierząt oraz produktów mlecznych decyzyjny limit aktywności ALP nie został jeszcze ustalony. Wstępne badania Laboratorium Referencyjnego Unii Europejskiej dla Mleka i Produktów Mlecznych (EU-RL) nad aktywnością ALP w serach określają go na poziomie 2–10 mU·g⁻¹ produktu w zależności od typu sera. Prowadzone są również badania dążące do ustalenia decyzyjnego limitu aktywności ALP dla mleka koziego i owczego.

Na mocy rozporządzenia 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 (22). Krajowe Laboratorium Referencyjne, zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi, jest organizatorem badań porównawczych m.in. w kierunku oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej. Badanie takie, dotyczące obecności ALP w mleku pasteryzowanym, zostało włączone w 2011 r. do programu „Międzylaboratoryjnych badań biegłości w zakresie oznaczania w mleku surowym ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby komórek

somatycznych, punktu zamarzania i wykrywania substancji przeciwbakteryjnych oraz oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej (ocena skuteczności pasteryzacji)”. W ramach działalności referencyjnej laboratorium prowadzi też regularne badania monitoringowe aktywności ALP w mleku i produktach mlecznych. Oferuje ponadto szkolenia i pomoc merytoryczną oraz praktyczną we wdrożeniu metody odniesienia oznaczania ALP.

Jako laboratorium referencyjne Zakład uczestniczy i legitymuje się zadowalającymi wynikami w badaniach biegłości organizowanych przez EU-RL oraz inne laboratoria zapewniające tego typu badania. Uczestniczy ponadto w procedurach mających na celu ustalenie parametrów precyzyjny metody w odniesieniu do różnych produktów mlecznych oraz bezpiecznych limitów aktywności ALP w produktach innych niż mleko krowie.

Bezpieczeństwo zdrowotne żywności jako trend XXI wieku w przemyśle spożywczym oraz jego zagwarantowanie dla konsumenta stało się priorytetem również dla organów kontrolujących żywność. Wymagania prawne nakładają na producentów żywności obowiązek kontroli parametrów i warunków produkcji w celu uzyskania wysokiej jakości produktu. Produkt wysokiej jakości musi być wytworzony jedynie z surowca wysokiej jakości. Należy jednak pamiętać, że nawet najwyższej jakości surowiec nie zapewni wysokiej jakości produktu, jeżeli nie będzie on przetwarzany w odpowiednich, monitorowanych warunkach. W odniesieniu do przemysłu mleczarskiego kontrola warunków obróbki termicznej, jako głównego punktu krytycznego w produkcji, właśnie przez badanie aktywności fosfatazy alkalicznej w produkcie finalnym, z pewnością wpływa na jakość i bezpieczeństwo jego konsumpcji (24).

Piśmiennictwo

1. Boruch M., Król B.: *Procesy technologii żywności*. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej. 1993, s. 37-41.
2. 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.
3. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2074/2005 z dnia 5 grudnia 2005 r. ustanawiające środki wykonawcze w odniesieniu do niektórych produktów objętych rozporządzeniem (WE) nr 853/2004 i do organizacji urzędowych kontroli na mocy rozporządzeń (WE) nr 854/2004 oraz (WE) nr 882/2004, ustanawiające odstępstwa od rozporządzenia (WE) nr 852/2004 i zmieniające rozporządzenia (WE) nr 853/2004 oraz (WE) nr 854/2004.
4. Fox P. F., Kelly A. L.: Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects-Part 2. *Int. Dairy J.* 2006, **16**, 517-532.
5. Lorenzen P.C., Martin D., Clawin-Radecker I., Barth K., Knappstein K.: Activities of alkaline phosphatase, γ-glutamyltransferase and lactoperoxidase, in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. *Small Rum. Res.* 2010, **89**, 18-23.

6. Wilińska A., Bryjak J., Illeova V., Polakovic M.: Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. *Int. Dairy J.* 2007, **17**, 579-586.
7. PN-EN ISO 11816 Mleko i przetwory mleczne. Oznaczenie aktywności fosfatazy alkalicznej Część 1: Metoda fluorometryczna dla mleka i napojów na bazie mleka. Część 2: Metoda fluorometryczna dla serów.
8. Raynal-Ljutovac K., Par Y.W., Gaucheron F., Bouhallab S.: Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Rum. Res.* 2007, **68**, 207-220.
9. Rola J.G., Sosnowski M., Determination of alkaline phosphatase activity in milk and milk products by fluorimetric method. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2010, **54**, 537-542.
10. Advanced Instruments, Fluorophos Test System. Model FLM 200. Instrukcja obsługi. 2002.
11. Ardo Y., Lindblad O., Qvist K.B.: Study of methods to routinely monitor heat load to cheese milk. *Int. Dairy J.* 1999, **9**, 547-552.
12. Rosenthal I., Bernstein S., Rosen B.: Alkaline phosphatase activity in *Penicillium roqueforti* and in blue-veined cheeses. *J. Dairy Sci.* 1996, **76**, 16-19.
13. Shakeel-Ur-Rehman, Farkye N.Y., Yim B.: A preliminary study of alkaline phosphatase in cheese ripening. *Int. Dairy J.* 2006, **16**, 697-700.
14. Yoshitomi K.: Alkaline phosphatase activity in cheeses measured by fluorometry. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2004, **39**, 349-353.
15. Marshall R. T.: Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association. USA, 1993, 431-431.
16. Kricka L.J.: Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin. Chem.* 1991, **37**, 1472-1481.
17. Ciana L.D., Bernacca G., Bordin F., Fenu S., Garetto F.: Highly sensitive amperometric measurement of alkaline phosphatase activity with glucose oxidase application. *J. Electroanal. Chem.*, 1995, **382**, 129-135.
18. Serra B., Morales M.D., Reviejo A.J., Hall E.H., Pingarron J.M.: Rapid and highly sensitive electrochemical determination of alkaline phosphatase using a composite tyrosinase biosensor. *Anal. Biochem.* 2005, **336**, 289-294.
19. Sandeep K.S., Neeta S., Ashok K.: Dry-reagent strips for testing milk pasteurization. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 2003, **36**, 567-571.
20. Rocco R.M.: Fluorimetric determination of alkaline phosphatase in fluid dairy products: Collaborative study. *Assoc. Off. Anal. Chem.* 1990, **73**, 842-849.
21. Rozporządzenie (WE) Nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiającym szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego.
22. Rozporządzenie ministra rolnictwa i rozwoju wsi z dnia 18 kwietnia 2012 r. w sprawie krajowych laboratoriów referencyjnych. DzU z 2012 poz. 480.
23. Bruce J., Drysdale E., Barclay I.: Testing for alkaline phosphatase in pasteurized milk. *VAM Bulletin.* 2002, **26**, 4-9.
24. Jurczak M. E.: *Mleko. Produkcja badanie przerób*. Wydawnictwo SGGW. 2003, s. 165–169.

Dr Jolanta G. Rola, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Aleja Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: jolarola@piwet.pulawy.pl