



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Volkswirtschaftsdepartement EVD
Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP

Monitoring der Milchpasteurisierung durch milcheigene Enzyme am Beispiel der Alkalischen Phosphatase

Charlotte Egger, Thomas Berger

Spiez 7. November 2008



Einleitung

• Erhitzungsindikatoren in Milch

Typ I: Verbindungen in der Milch, die denaturiert bzw. inaktiviert werden, z.B. Peroxidase, Alkalische Phosphatase, β -Lactoglobulin

Typ II: Verbindungen in der Milch, die bei der Hitzebehandlung entstehen, z.B. Lactulose, Furosin

Tab. 8.1 Vergleich der vorgeschlagenen Unterscheidungskriterien thermisch behandelter Milch (Buchheim et al., 1994)

Produkt	Grenze der Hitzebehandlung	EU-Vorschlag (92/46/EEC)	Vorschlag der BAfM ¹⁾
Sterilisierte Milch	Untere Grenze	> 600 mg Lactulose/l	-
	Untere Grenze	< 50 mg β -Lactoglobulin/l	-
	Obere Grenze	-	< 1200 mg Lactulose/l
UHT-Milch	Untere Grenze	> 100 mg Lactulose/l	-
	Obere Grenze	> 50 mg β -Lactoglobulin/l	< 400 mg Lactulose/l
Hoherhitzte Milch	Untere Grenze	Peroxidase negativ	Peroxidase negativ
	Obere Grenze	< 50 mg Lactulose/l	> 2000 mg β -Lactoglobulin/l
	Obere Grenze	> 2000 mg β -Lactoglobulin/l	> 2000 mg β -Lactoglobulin/l
Pasteurisierte Milch	Untere Grenze	Phosphatase negativ	Phosphatase negativ
	Obere Grenze	Peroxidase positiv	Peroxidase positiv
	Obere Grenze	Lactulose nicht nachweisbar	Peroxidase positiv
	Obere Grenze	> 2600 mg β -Lactoglobulin/l	> 3000 mg β -Lactoglobulin/l

¹⁾ BafM: Bundesanstalt für Milchforschung, ab 01.01. 2004 Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL), Standort Kiel.

Analytik von Milch und Milcherzeugnissen,
2006, T. Sienkiewicz/ E. Kirst, Behr's Verlag

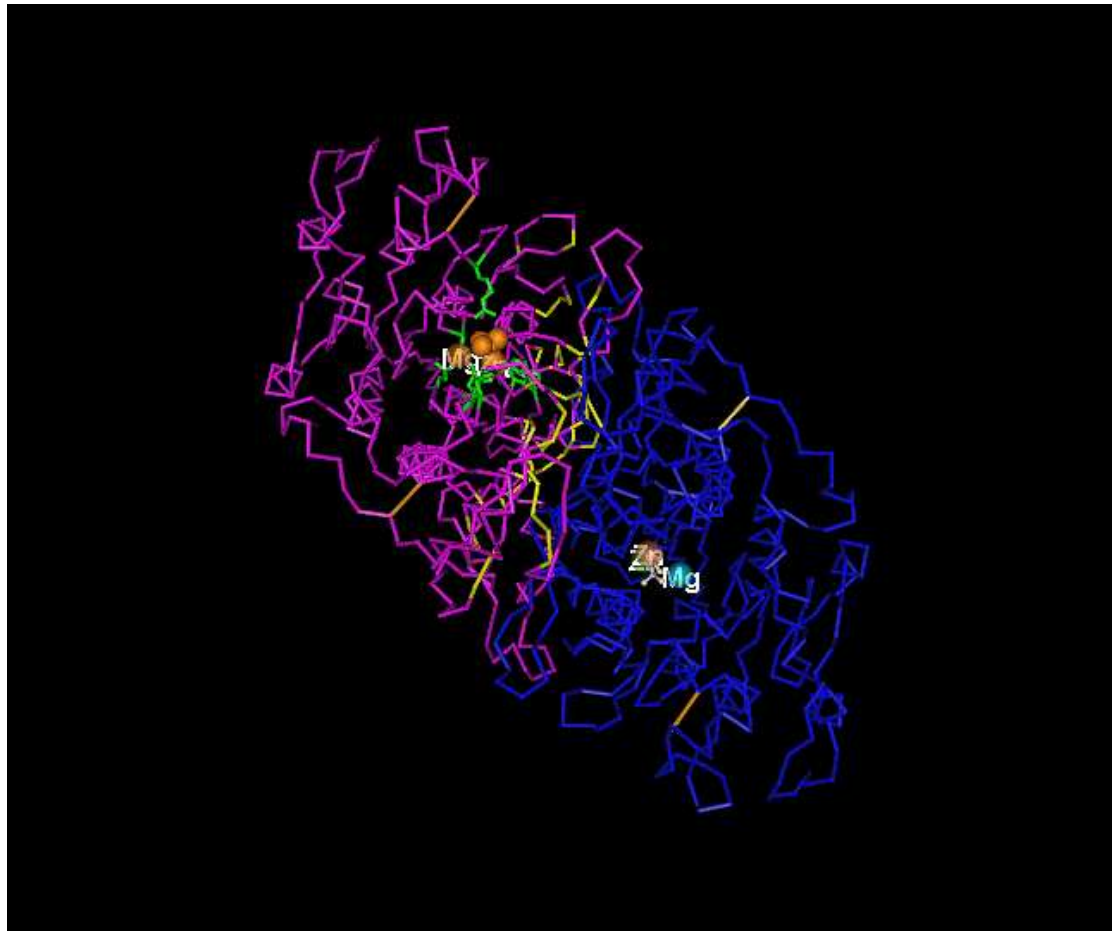


Einleitung

- **Charakteristika der Alkalischen Phosphatase (AP)**
 - AP ist eine unspezifische phospho-monoesterase mit einer Proteingrösse von 524-533 Aminosäuren (UniProtKB/Swiss-Prot **P09487** (PPBT_BOVIN))
 - In den meisten Säugern existieren vier Isoformen von AP: placental, placental-like, intestinal, tissue non-specific (liver, bone, kidney)
 - AP ist mittels Glycan- Phosphoinositol- Anker (GPI-Anker) an die Membran gebunden
 - In Milch befindet sich AP in der Milchfettkugelchen-Membran
 - AP aus *E.coli* hat eine Sequenzhomologie von 25-30 % mit dem Säugerprotein, die Aktiven Zentren sind jedoch konserviert in allen Isoformen der verschiedenen Arten



Enzymstruktur

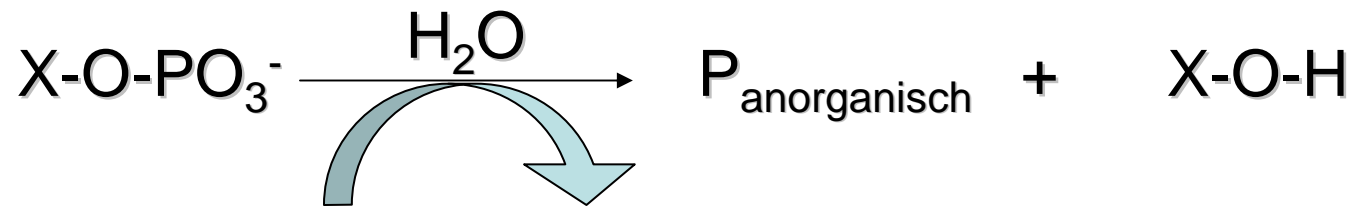


- Homodimer
- Ein Mg^{2+} Ion und zwei Zn^{2+} Ionen sind ans aktive Zentrum gebunden und notwendig für die Enzymaktivität
- Anorganisches Phosphat wird von den zwei Zn^{2+} Ionen und dem Arg166 im aktiven Zentrum festgehalten



Enzymaktivität

- **Bedingungen für eine optimale Enzymaktivität**
 - pH optimum: 10.5
 - optimale Temperatur: 37°C
 - Hitzesensitivität (denaturiert nach 15 s bei 71.7°C)
 - AP katalysiert die Hydrolyse Reaktion via eines phosphorylierten Zwischenprodukts aus welchem dann anorganisches Phosphat und der entsprechende Alkohol entsteht.

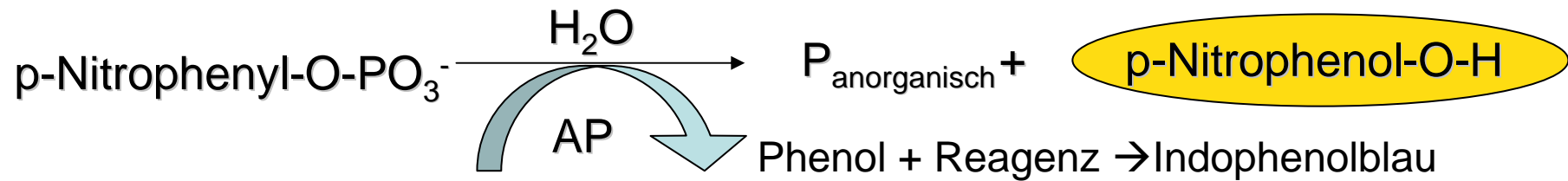


Alkalische Phosphatase



Analytische Methoden

- **Klassische Methode: Phenolfreisetzung**

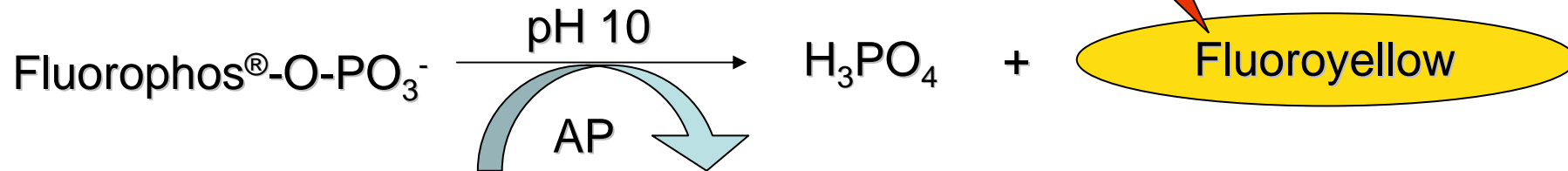


NWG: 4 mg/l Phenol entspricht 0.1% Rohmilch
1 U = 1 mg Phenol



Fluorophos Test

**Aktuell: Gesetzlicher
Grenzwert für Pasteurisierung:**
< 350 mU/L entspricht 0.075%
Rohmilch



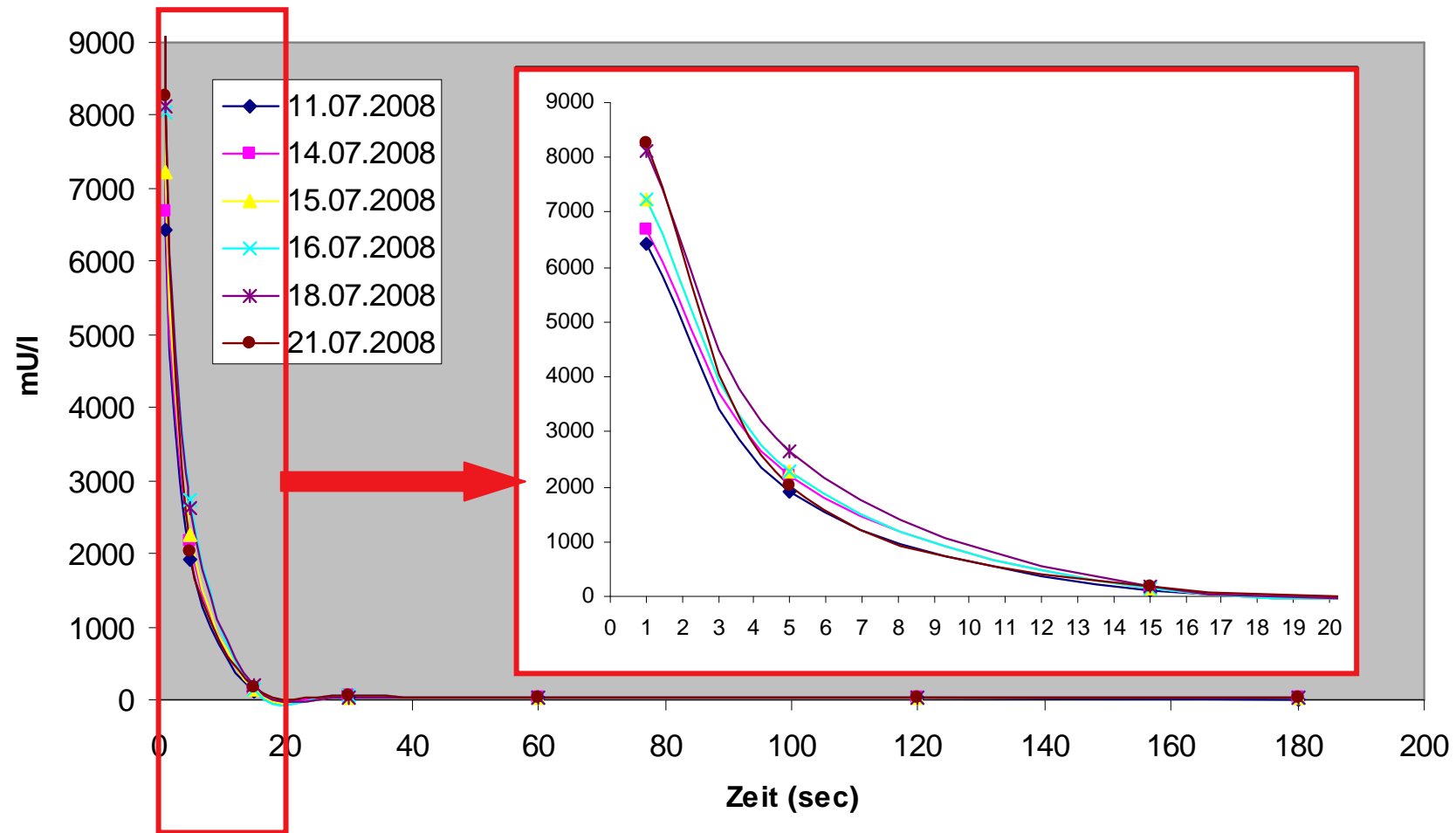
NWG: 20 mU/l

0.1% Rohmilch entspricht 500 mU/l



Enzymaktivität

Zeitkinetik der AP Aktivität bei Hitzebehandlung von 72 °C





Hitzeinaktivierung von AP und Bakterien

Fluorometric Analysis of Alkaline Phosphatase Inactivation Correlated to *Salmonella* and *Listeria* Inactivation

KARL F. ECKNER

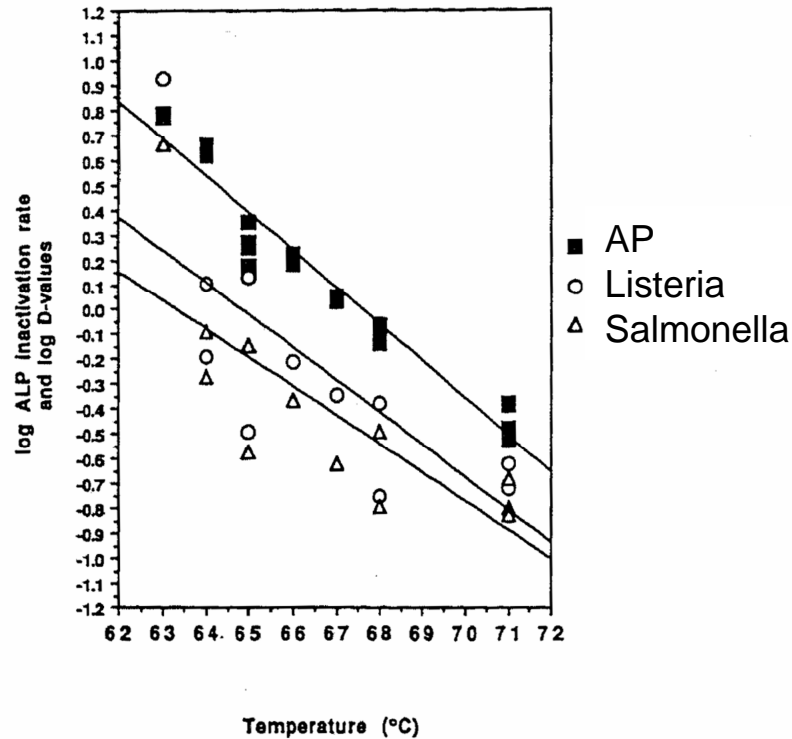


TABLE 3. Recovery of *Salmonella* or *Listeria* for pasteurized milk samples possessing and ALP activity levels <500 mU/L.¹

Organism	Pasteurization temperature (°C)	Inoculation level (mean)	Isolation (4 trials)
<i>Salmonella</i>	63	1 x 10 ⁶ CFU	+
<i>Salmonella</i>	65	1 x 10 ⁶ CFU	+
<i>Salmonella</i>	67	1 x 10 ⁶ CFU	-
<i>Salmonella</i>	71	1 x 10 ⁶ CFU	+
<i>Listeria</i>	63	1 x 10 ⁶ CFU	-
<i>Listeria</i>	65	1 x 10 ⁶ CFU	+
<i>Listeria</i>	67	1 x 10 ⁶ CFU	+
<i>Listeria</i>	71	1 x 10 ⁶ CFU	-
<i>Salmonella</i>	63	1 x 10 ⁴ CFU	-
<i>Salmonella</i>	65	1 x 10 ⁴ CFU	-
<i>Salmonella</i>	67	1 x 10 ⁴ CFU	-
<i>Salmonella</i>	71	1 x 10 ⁴ CFU	-
<i>Listeria</i>	63	1 x 10 ⁴ CFU	-
<i>Listeria</i>	65	1 x 10 ⁴ CFU	-
<i>Listeria</i>	67	1 x 10 ⁴ CFU	-
<i>Listeria</i>	71	1 x 10 ⁴ CFU	-

¹500 mU/L is equal to AOAC pasteurization requirements of <1.0 µg phenol/ml/15 min.

➔ **AP ist hitzeresistenter als *S. Senftenberg* und *L. monocytogenes***



Inaktivierung und Denaturierung von AP

Journal of Dairy Research (2007) **74** 296–301.

Inactivation-denaturation kinetics of bovine milk alkaline phosphatase during mild heating as determined by using a monoclonal antibody-based immunoassay

Didier Leveux*, Nathalie Geneix and Annie Leveux

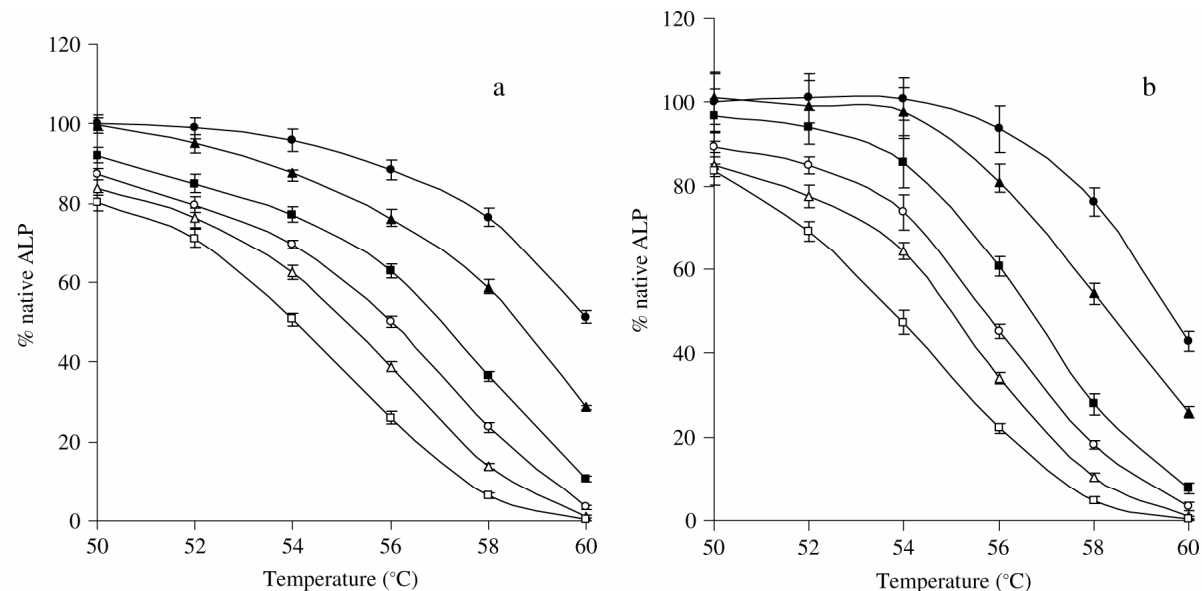


Fig. 1. Thermal denaturation of ALP in the range 50–60 °C after heating for 5 min (closed circles), 10 min (closed triangles), 20 min (closed squares), 30 min (open circles), 45 min (open triangles) or 120 min (open squares). Residual native ALP was determined by immunoassay (a) and colorimetric assay (b). Results are expressed as mean and standard deviation ($n=3$) of percent of initial concentration.

➔ AP Denaturierung erfolgt bei gleicher Temperatur wie Inaktivierung



Reaktivierung von AP & Bakterielle AP

Beobachtungen:

UHT Milch welche sofort nach der Erhitzung AP negativ ist, wird nach längerer Lagerung (6-7 Tage) bei 30°C wieder positiv
Hauptsächlich in Produkten mit hohem Fettgehalt.



Kann ein Indiz für reaktivierte AP sein, Gründe dafür sind noch nicht ganz klar

Pasteurisierte Milch, welche auch bei einer korrekten Pasteurisierung AP positiv ist.



Kann von bakterieller AP herrühren



Rechtliche Bedeutung der AP

- EG-Hygienerecht, **VO 853/2004**
„Pasteurisierung ... so dass die Erzeugnisse auf einen gegebenenfalls unmittelbar **nach der Behandlung** durchgeführten **Alkalinphosphatetest negativ** reagieren.“
- **VO 1664/2006**, Bestimmung der alkalischen **Phosphataseaktivität**
 1. Referenzverfahren → ISO 11816-1
 2. Aktivität der alkalischen Phosphatase → mU/l
 3. Test **negativ** → **≤ 350 mU/l** (in der Kuhmilch)
 4. alternativer Analyseverfahren sind annehmbar, wenn gegen Referenzverfahren validiert



Rechtliche Bedeutung der AP

- **DG SANCO bestimmt die Referenzlaboratorien** → Community Reference Laboratory Milk and Milk Products ist die AFSSA Maisons-Alfort
- **Mitgliedsland bestimmt Nationales Referenzlabor** → MQV, Art. 11¹: Bund unterhält ein nationales Referenzlaboratorium an der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP
- **revidierte HyV 01. Januar 09**
Pasteurisation: **zur Bestimmung** der Aktivität der Phosphatase **ist die ISO/DIN-Norm 11816-1** als Referenzverfahren heranzuziehen...“



Milch anderer Tierarten

- Neben Kuhmilch wird auch Milch anderer Spezies auf den Markt gebracht, bzw. laufen Anträge dazu. Die **Limite von 350 mU/L ist aber nicht überall anwendbar.**
- Die **AP scheint je nach Spezies und Rasse unterschiedlich zu sein** (mit Auswirkung auf die Hitzestabilität) und zum Teil durch die Milchmatrix (meist Fettgehalt) geschützt zu werden. (div. Autoren, 2004..2008)
- **Kuh:** roh ca. 800'000 mU // **past. < 350 mU/L**
- **Ziege:** roh 19'000..2'100'000 mU // past. **25..2110 mU/L**. Limite ist bis auf verschiedene Rassen aus Griechenland, Zypern und Rumänien anwendbar.





Milch anderer Tierarten

- **Schaf:** roh 40'000..4'500'000 mU // past. 200..**4'400 mU/L**
Limite ist in den meisten Fällen nicht anwendbar.

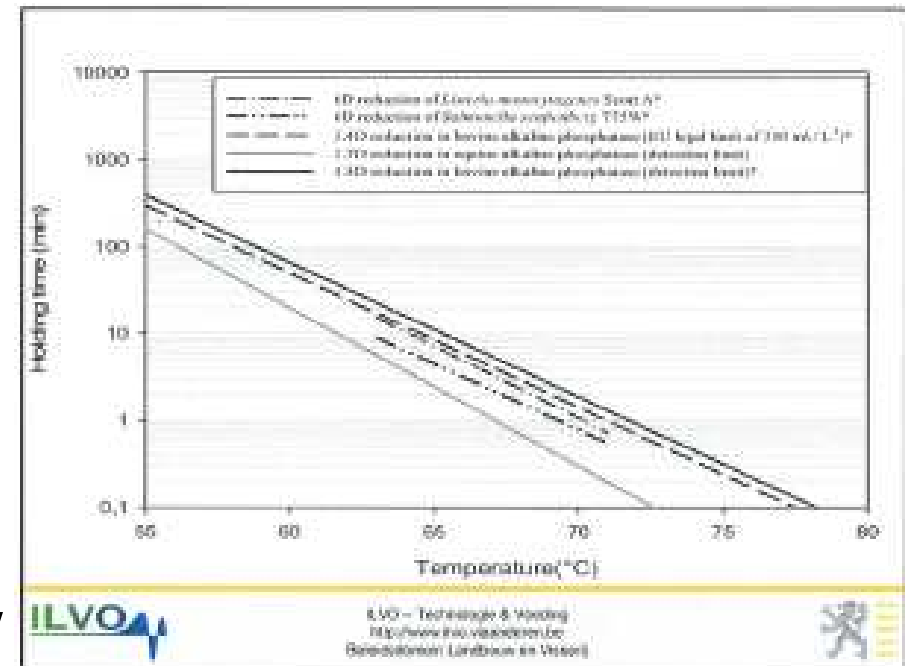
(de Block, ILVO, 2008)

- **Stute:** roh 2'200 mU/L, D- und Z-Werte berechnet. AP ist kein brauchbares Kriterium.

- **Esel:** roh ca. 17'000 mU //
past. ca. **250 mU/L**.

- **Kamel:** roh 14'014..16'665 mU //
past. **900..7'355 mU/L**.

Erhitzung ist auch Massnahme gegen MKS-Übertragung.





Milch anderer Tierarten und Humanmilch

Spezies	Esel	Dromedar	Stute	Mensch	Kuh	Ziege	Büffel	Schaf	Rentier
Wasser [%]		87..91		88	87	87	83	82	67
Fett [%]	0.6	2.0	1.3	3.5..4.0	3.4..4.5	4.1	7.4	6.2..7.1	18
Protein [%]	1.6	3.0	2.1	1.0..1.5	3.4..3.5	3.4..3.8	3.8	5.2..5.8	11
davon [% Prot.] Molkenprotein Casein NPN x 6.38	48		38.8 50 11.2	53.5 26.1..28 20.4	17.5 77.2..78 5.2				
Lactose [%]	6.7	4.0	6.3	4.8..7.0	4.6..4.8	4.4..4.6	4.8	4.2..4.6	1.5
Mineralstoffe [%]	0.3		0.4	0.2..0.8	0.8	1.9		0.9	
AP roh [mU/l]	16'580	14'014..16'665	2'200		800'000	19'000.. 2'100'000		40'000.. 4'500'000	
AP past [mU/l]	220	900..7'355			< 350	25..2110		200..4'400	
AP in wässriger Phase [%]		91..96	90..95		70				
Besondere Eigenschaften	- Säuglinge mit Kuhmilchunverträglichkeit	- Keine β -Ig - Wenig Lp - Andere β -caseine - Viel α -la - Viel Lactoferrin - Keine NPN - Keine Allergien	Heilanpreisungen						



Käse

- **Anderen Aktivitäten je nach Extraktionsverfahren:** „Käse-Puffer“ ist der Extraktion mit UHT-Milch vorzuziehen.
- Unterschied zwischen Käse aus past. und roher Milch lässt sich bei kleinleibigen Käsen sehr gut zeigen, **bei grossleibigen ist die Hitzebelastung im Zentrum zu gross** (OK nur in Randzone).
- Daten aus FR und IT Käsen zeigen z.T. klare Unterschiede

Frischkäse pasteurisierte Milch	0..3	mU/g
Weichkäse pasteurisierte Milch	1..6	mU/g
Weichkäse μ -filtrierte Milch	555..1542	mU/g
Weichkäse thermisierte Milch	83..1704	mU/g
Halbhartkäse pasteurisierte Milch	< 1	mU/g
Hartkäse pasteurisierte Milch	1..11	mU/g
Hartkäse Rohmilch [1 cm ab Rand]	200..2'200	mU/g

(Desbourdes et al, AFSSA; Pellegrino, Univ. Milano, 2008)



Käse

Aktivitäten während des Herstellungsprozesses (Pellegrino, Univ. Milano, 2008)

Käsetyp Prozessschritt [AP in mU/kg]	Casera POD [Past. 74°C/20s]	Crotto [Past. 4°C/20s]	Holland-Typ [Past. ?°C/s]	Mozarella	Provola [Past. 74°C/20s]	Provolone mild [Past. 74°C/20s]	Provolone rezent [therm.68°C/?s]
Kessimilch	188	261	267		253	236	187'800
n. Kulturenzusatz	571	598					
Bruch	1200	1250	710				
gesäuerter Bruch					538	556	267'640
filatiert [60..70°C]					331	414	2660
Frischkäse					288	313	692
n. Pressen	950	850					
n. Salzbad	540	519					
gereifter Käse	(865)	(588)	345	311..382 [1..2 w]		188 [30 d]	538 [3 m]