

IDF Merkblatt 30/2023

Warum wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase bestimmt?

Die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) dient der Überprüfung des Prozesses der konventionellen Pasteurisierung von (Rinder-)Milchprodukten. Die Pasteurisierung inaktiviert/denaturiert die ALP, die natürlicherweise in Rohmilch vorhanden ist. Der ALP-Test wurde ursprünglich aufgrund der Feststellung eingeführt, dass ALP in Milch eine ähnliche Inaktivierungskinetik aufweist wie die pathogenen Bakterien *Coxiella burnetii* und *M. tuberculosis*. Wenn also ALP bis zu einem gesetzlich festgelegten Wert Niveau inaktiviert ist, dient es als Marker, der anzeigt, dass die Milch angemessen behandelt worden ist. Tabelle 1 zeigt einige Beispiele für die vorgeschriebenen ALP-Werte.

Die Pasteurisierung ist ein thermisches Verfahren, das in der Milchindustrie weit verbreitet ist. Ein Überblick über die wichtigsten technischen, mikrobiologischen und ernährungsphysiologischen Aspekte der Pasteurisierung finden Sie im Bulletin der IDF Nr. 496/2019 (Internationaler Milchwirtschaftsverband, 2019). Die Messung der ALP-Aktivität wird traditionell bei Rindermilch unmittelbar nach der konventionellen Pasteurisierungsbehandlung (72 °C für 15 Sekunden) durchgeführt. In jüngerer Zeit wird die ALP-Prüfung auch für Milchprodukten wie Käse in Betracht gezogen, um den Pasteurisierungsstatus von Milchprodukten präsumtiv zu überprüfen (Egger et al., 2016). Bei dieser Anwendung kann auch mikrobielles ALP vorhanden sein.

Dies kann durch mikrobiologische Verunreinigungen nach der Verarbeitung durch die Aktivität von Starterkulturen usw. entstehen, so dass ein Bedarf an Methoden zur Bestimmung der ALP-Aktivität besteht, die schnell und einfach zu handhaben sind und die mikrobielle ALP von Kuhmilch-ALP unterscheiden können und für eine Vielzahl von Milcherzeugnissen geeignet sind.

Dieses Dokument ist eine Übersetzung des IDF-Factsheets N° 30/2023 vom Verband der deutschen Milchwirtschaft e.V.. Nur die englische Originalversion wurde von der IDF genehmigt.

Tabelle 1: Beispiele für übliche ALP-Aktivitätswerte in pasteurisierter Milch, und Referenzmethode

Country	ALP activity limit	Reference method	Reference
International	10 µg p-nitro-phenol equivalent/ mL	Phenol method	FAO & WHO (2004)
Europe	350 milliunits of enzyme activity per liter (mU/L ¹) in cow's milk	ISO 11816-1 IDF 155-1 (IDF & ISO, 2013) or equivalent	Commission Implementing Regulation (EU) No 2019/6272 ²
	No legal limit has been set for cheeses		
United States	Less than 350 milliunits/L for fluid products and other milk products by approved electronic phosphatase procedures.	M-a-98 Official Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance (PMO) Regulatory Laboratory Tests for Grade "A" Milk and Milk Products and Grade "A" Dairy Farm and Milk Plant Water	U.S. Grade A Pasteurized Milk Ordinance 2019Rev ³ FDA GAMS M-a-98 ⁴
	<ul style="list-style-type: none"> • 20 µg phenol/1 g for brick, semisoft, and semisoft part-skim cheeses; • 16 µg phenol/1 g for Limburger cheese; • 12µg phenol/1 g for all other cheese and related cheese products. 	Phenol equivalent value ⁴	U.S. Food & Drug Administration, 21 Code of Federal Regulations part 133 – Cheeses and related cheese products ⁵
New Zealand	350 mU/L in cow's milk, cream, flavoured milk & cheese	ISO 22160 IDF 209 (IDF & ISO, 2007)	NZ Ministry of Primary Industries - Guidance document: Alkaline phosphatase testing. 7 April 2022

1. One unit of ALP activity is the amount of ALP enzyme that catalyses the transformation of 1 micromole of substrate per minute. To note that there is no harmonised conversion factor between the methods of phenol and enzyme activity, although there is certainly a strong correlation between the two.

2. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) 2074/2005 as regards official controls. OJ L 131, 17.5.2019.

3. US Pasteurized Milk Ordinance 2019 REV.

4. M-a-98 https://gams.fda.gov/active/M-a-98_Revision1_FINAL.pdf

5. Protocol: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-27-screening-method-phosphatase-cheese>

Grenzen der Prüfung der ALP-Aktivität

Obwohl der ALP-Test als die geeignetste Methode zur Überprüfung der konventionellen Pasteurisierung von Kuhmilch angesehen wird, gibt es mehrere Faktoren, die seine Anwendbarkeit in der Praxis beeinträchtigen.

- Milch von verschiedenen Tierarten enthält unterschiedliche ALP-Werte mit unterschiedlichen Aktivitäten und unterschiedlicher Anfälligkeit gegenüber Wärmebehandlung. Dies sollte bei der Festlegung der Kriterien für die ALP-Analyse berücksichtigt werden, da der Test hauptsächlich mit Produkten aus Rindermilch validiert und getestet wurde. In der Regel weist rohe Kuhmilch eine etwa fünfmal höhere ALP-Aktivität auf als Ziegenmilch und etwa dreimal niedriger als bei Schafsmilch (Klotz et al., 2008). Dies variiert auch je nach Rasse innerhalb der Arten und individuellen Faktoren (Raynal-Ljutovac et al., 2007). Da die Pasteurisierung zu einer zehnfachen Verringerung des ursprünglichen Gehalts führt, variiert der Restgehalt nach der Pasteurisierung mit dem Ausgangswert in der Rohmilch. Daher ist eine unterschiedliche Interpretation je nach Herkunft der Milch erforderlich. Für Erzeugnisse von Schafen und Ziegen wurden gesetzlich keine Grenzwerte festgelegt. Im Bericht der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) wird eine ALP-Aktivität unter einem Grenzwert von 300 mU/L bzw. 500 mU/L für pasteurisierte Ziegen- und Schafsmilch (EFSA et al., 2021) fixiert. Sie empfehlen jedoch, weitere Daten zu sammeln. Bei Pferdemiche erlaubt die derzeitige Testempfindlichkeit die Verwendung von ALP-Tests nicht, da die endogene ALP-Aktivität sehr gering ist. Kamelmilch enthält ebenfalls niedrige Werte und ein hitzestabiles ALP, so dass ALP-Tests als Mittel zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Pasteurisierung auch für diese Tierarten nicht geeignet ist (Malissiova et al., 2022).

- Der Fettgehalt der Milch, der durch die Jahreszeit und das Laktationsstadium beeinflusst wird, wirkt sich auf die ALP-Aktivität aus. ALP wird leicht von den Fettkügelchen absorbiert, so dass eine Erhöhung des Fettgehalts zu einer erhöhten ALP-Aktivität führt (Painter & Bradley, 1997). Die typischen Konzentrationen von endogenen ALP bei Kuhmilch sind 400 µg/ml für Magermilch; 800 µg/ml für Vollmilch und 3500 µg/ml für 40 % Rahm (FAO & WHO, 2004). Daher könnte der Einfluss von Zusammensetzungsfaktoren bei den künftigen Grenzwerten berücksichtigt werden.

- Mikroorganismen, die Milcherzeugnissen absichtlich zugesetzt werden, können mikrobielles ALP produzieren, das Tests für Rest-ALP stören können. Um gültige Ergebnisse zu erhalten, sollte der Test

daher unmittelbar nach der Wärmebehandlung durchgeführt werden. Im Falle eines positiven Ergebnisses nach dem ALP-Test empfiehlt die American Public Health Association die Wiederholung des Pasteurisierungsprozesses, um zwischen mikrobiellem und bovinem ALP zu unterscheiden. Wenn sich die Aktivität nach der erneuten Pasteurisierung nicht deutlich verringert, ist die ursprüngliche ALP-Aktivität auf das Vorhandensein von bakteriellem ALP zurückzuführen. Einige Bakterien können jedoch sowohl hitzelabiles als auch hitzestabiles ALP produzieren (Murthy & Kaylor, 2020). Daher kann die Unterscheidung zwischen bovinem und mikrobiellem ALP in einigen Fällen problematisch sein.

- ALP kann in vielen Milchprodukten (Sahne, Käse usw.) im Laufe der Zeit reaktiviert werden (FAO & WHO, 2004). Über eine Reaktivierung wurde in H-Milch und fettreichen Produkten berichtet. Um valide Ergebnisse zu erhalten, sollte der Test daher unmittelbar nach der Wärmebehandlung durchgeführt werden.

Es gibt einige alternative Messungen, um die Pasteurisierung zu überprüfen. Um mehr darüber zu erfahren, werden die Leser auf den umfassenden Bericht der EFSA verwiesen (EFSA et al., 2021). Es ist wichtig, darauf hinzuweisen, dass die Verwendung von alternativen Analysemethoden akzeptabel ist, wenn sie gegenüber der Referenzmethode in international anerkannten Protokollen und Regeln der guten Laborpraxis validiert werden.

Vergleich der aktuellen standardisierten Methoden

Die IDF entwickelt gemeinsam mit der ISO-Normen für die Analyse und Probenahme von Milch und Milcherzeugnissen, einschließlich der Bestimmung der ALP-Aktivität. Die folgende Tabelle zeigt die bestehenden IDF/ISO-genormten Methoden. Sie vergleicht die Methoden, um die Entscheidungsfindung für ihre Auswahl und Anwendung zu erleichtern. Alle diese Methoden beruhen auf chemischen Reaktionen mit spezifischen Substraten, können aber unterschiedliche Bestimmungsprinzipien haben. Die Anerkennung durch die Behörden sowie die Verfügbarkeit von Geräten und die technische Unterstützung der Methode können bei der Entscheidung, welche Methode geeignet ist, eine Rolle spielen. Es ist wichtig zu beachten, dass es in der Literatur weitere nicht standardisierte Methoden gibt (Shaban et al., 2022).

Tabelle 2: Vergleich von Standardmethoden zur Bestimmung von ALP-Aktivität

Reference	Method principle	Sample scope	Detection limit	Unit definition	RSD _r (%)	Limitations	Other features (including substrate and product, wavelength)
ISO/TS 4985 IDF/RM 255 (IDF & ISO, 2023)	Fluorimetry	Dairy products (fluid and solid)	0.006% pasteurised cow's milk	U = $\mu\text{mol}/\text{min}$	4.1	<ul style="list-style-type: none"> Not tested in products from different species. 	<ul style="list-style-type: none"> Assay in a 96-microwell plate. Substrate: 4-methyl-umbelliferone-phosphate, Product: 4-methyl-umbelliferone. Ex 365 nm/Em 450 nm.
ISO 11816-2 IDF 155-2 (IDF & ISO, 2016)	Fluorimetry	Cheese (soft, semi-hard and hard cheeses), provided that any mold is only on the surface and not in the inner part.	0.006% pasteurised cow's milk 5 mU/Kg	U = $\mu\text{mol}/\text{min}$	4.3	<ul style="list-style-type: none"> Does not specify if the method is applicable to cheese from other species different from cow. Proprietary method. Specific sample treatment for hard/ soft cheeses. 	<ul style="list-style-type: none"> Fluorogenic Substrate: monophosphoric ester Fluorophos[®], Product: Fluoroyellow[®]. Ex 440 nm/Em 520 - 560 nm.
ISO 11816-1 IDF 155-1 (IDF & ISO, 2013)	Fluorimetry	Liquid dairy products from cow, sheep, and goat. Raw and heat-treated whole milk, semi-skimmed milk and flavoured milks. Milk powder after reconstitution.	0.006% pasteurised cow's milk 15 mU/L	U = $\mu\text{mol}/\text{min}$	4.4	<ul style="list-style-type: none"> Proprietary method. 	<ul style="list-style-type: none"> Fluorogenic Substrate: monophosphoric ester Fluorophos[®], Product: Fluoroyellow[®]. Ex 440 nm/Em 520 - 560 nm.
ISO 3356 IDF 63 (IDF & ISO, 2009)	Colorimetry	Milk, milk powder, buttermilk and buttermilk powder, whey and whey powder.	0.1 - 0.2% pasteurised cow's milk	1 μg phenol/mL	NR	<ul style="list-style-type: none"> Does not specify if the method is applicable to samples different from cow's milk. Low sensitive method. Possible interferences in coloured dairy products. 	<ul style="list-style-type: none"> A result of $\geq 2.5 \mu\text{g}$ of phenol indicates a milk that has not been properly pasteurized. Substrate: phenol, Product: dibromindophenol. Measurement at 610nm
ISO 22160 IDF 209 (IDF & ISO, 2007)	Chemiluminescence	Milk and milk-based drinks from cow, goat, buffalo and sheep. This includes whole, skimmed and flavoured milk. Also, 20% fat cream.	0.005 - 0.2% pasteurised cow's milk 15 mU/L	U = $\mu\text{mol}/\text{min}$	7.5	<ul style="list-style-type: none"> Low-sensitive method. Proprietary method. 	<ul style="list-style-type: none"> No requirement of sample preparation Chemiluminescent Substrate: 3-(2'-spiroadamantanane)-4-methoxy-4(3"-phosphate phenyl)-1,2 dioxetane disodium salt (Charm reagent AP[®]), Product: adamantly1,2-dioxetan Measurement at 540 nm

ALP: alkaline phosphatase; Ex: Excitation; Em: Emission; RSD_r: relative standard deviation of reproducibility; NR: not reported

Quellen:

- EFSA, Clawin-Rädecker, I., De Block, J., Egger, L., Willis, C., Da Silva Felicio, 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*, 19(4), e06576-e06576. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6576>
- Egger, L., Nicolas, M., & Pellegrino, L. (2016). Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk pasteurization. *Lwt - Food Science and Technology*, 65, 963-968. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.09.033>
- FAO & WHO. (2004). *Code of hygienic practice for milk and milk products*. (CAC/RCP 57-2004). https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/CXP_057e.pdf
- International Dairy Federation. (2019). *The technology of pasteurisation and its effect on the microbiological and nutritional aspects of milk*. (Bulletin of the IDF 496/2019) <https://shop.fil-idf.org/products/bulletin-of-the-idf-n-496-2019-the-technology-of-pasteurisation-and-its-effect-on-the-microbiological-and-nutritional-aspects-of-milk#:~:text=1>
- International Dairy Federation & International Organization for Standardization. (2007). *Milk and milk-based drinks - Determination of alkaline phosphatase activity - Enzymatic photo-activated system (EPAS) method*. (ISO 22160 | IDF 209). <https://shop.fil-idf.org/products/milk-and-milk-based-drinks-determination-of-alkaline-phosphatase-activity-enzymatic-photo-activated-system-epas-method>
- International Dairy Federation & International Organization for Standardization. (2009). *Milk - Determination of alkaline phosphatase* (ISO 3356 | IDF 63). <https://shop.fil-idf.org/products/milk-determination-of-alkaline-phosphatase>
- International Dairy Federation & International Organization for Standardization. (2013). *Milk and milk products - Determination of alkaline phosphatase activity - Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks* (ISO 11816-1 | IDF 155-1). <https://shop.fil-idf.org/products/milk-and-milk-products-determination-of-alkaline-phosphatase-activity-part-1-fluorimetric-method-for-milk-and-milk-based-drinks>
- International Dairy Federation & International Organization for Standardization. (2016). *Milk and milk products - Determination of alkaline phosphatase activity - Part 2: Fluorometric method for cheese* (ISO 11816-2 | IDF 155-2). <https://shop.fil-idf.org/products/milk-and-milk-products-determination-of-alkaline-phosphatase-activity-part-2-fluorometric-method-for-cheese>
- International Dairy Federation & International Organization for Standardization. (2023). *Milk and milk products — Determination of alkaline phosphatase activity — Fluorimetric microplate method* (ISO/TS 4985 | IDF/RM 255). <https://shop.fil-idf.org/collections/publications/products/iso-ts-4985-idf-rm-255-2023-milk-and-milk-products-determination-of-alkaline-phosphatase-activity-fluorimetric-microplate-method>

- Klotz, V., Hill, A., Warriner, K., Griffiths, M., & Odumeru, J. (2008). Assessment of the colorimetric and fluorometric assays for alkaline phosphatase activity in cow's, goat's, and sheep's milk. *Journal of food protection*, 71(9), 1884-1888. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.9.1884>
- Malissiova, E., Fotiadou, S., Tzereme, A., Cheimona, D., Soultani, G., Maisoglou, I., & Manouras, A. (2022). Alkaline Phosphatase (ALP) in Non-Cow Milk and Dairy Products: A Review of Current Evidence and Future Trends. *Ruminants 2022, Vol. 2, Pages 435-447*, 2(4), 435-447. <https://doi.org/10.3390/RUMINANTS2040030>
- Murthy, G. K., & Kaylor, L. O. (2020). Evaluation of APHA and AOACII Methods for Phosphatase in Butter and Differentiation of Milk and Microbial Phosphatases by Agarose-Gel Electrophoresis *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 73(5), 681-687. <https://doi.org/10.1093/jaoac/73.5.681>
- Painter, C. J., & Bradley, R. L. (1997). Residual Alkaline Phosphatase Activity in Milks Subjected to Various Time-Temperature Treatments. *Journal of food protection*, 60(5), 525-530. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.5.525>
- Raynal-Ljutovac, K., Park, Y. W., Gaucheron, F., & Bouhallab, S. (2007). Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(11-2), 207-220. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.006>
- Shaban, S. M., Byeok Jo, S., Hafez, E., Ho Cho, J., & Kim, D. H. (2022). A comprehensive overview on alkaline phosphatase targeting and reporting assays. *Coordination Chemistry Reviews*, 465, 214567-214567. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2022.214567>