

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA

V NITRE

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

Katedra hygieny a bezpečnosti potravín

Alkalická fosfatáza vo vzťahu ku kontrole pasterizácie mlieka

Autoreferát dizertačnej práce

na udelenie akademického titulu philosophiae doctor

v doktorandskom študijnom programe Technológia potravín,

v študijnom odbore 6.1.13 Spracovanie poľnohospodárskych produktov

Ing. Martin Chovanec

Nitra 2008

Dizertačná práca bola vypracovaná v externej forme doktorandského štúdia na Katedre hygieny a bezpečnosti potravín Fakulty biotechnológie a potravinárstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: Ing. Martin Chovanec
externý doktorand Katedry hygieny a bezpečnosti potravín
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: prof. MVDr. Jozef Sokol, DrSc.
Krajská veterinárna a potravinová správa Trnava

Oponenti: prof. MVDr. Oľga Burdová, CSc.
Ústav hygieny a technológie mlieka
Katedra hygieny a technológie potravín
Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach

doc. Ing. Anna Michalcová, PhD.
Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Ing. Karol Herian, CSc.
emeritný pracovník Výskumného ústavu mliekarenského, a.s. Žilina

Autoreferát bol rozoslaný dňa:

Obhajoba dizertačnej práce sa koná dňa 26. 9. 2008 o 10.30 h pred komisiou pre obhajobu dizertačnej práce študijného programu Technológia potravín, v študijnom odbore 6.1.13 Spracovanie poľnohospodárskych produktov na Fakulte biotechnológie a potravinárstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Miesto konania: Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov
Fakulta biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra.

Predseda spoločnej odborovej komisie

prof. Ing. Zdenka Muchová, CSc.
FBP SPU Nitra

ABSTRAKT

Alkalická fosfatáza (ALP) je enzým prirodzene sa vyskytujúci v mlieku všetkých cicavcov. ALP je inaktivovaná tepelným ošetrením mlieka. Nakoľko ALP je o niečo menej termolabilná ako väčšina patogénnych baktérií a inaktivuje sa tesne pod časovou hranicou teplotných podmienok použitých pri pasterizácii mlieka, sledovanie jej aktivity je ideálnym testovacím parametrom na dôkaz, že mlieko bolo správne pasterizované, nebolo kontaminované surovým mliekom, alebo postvýrobnou bakteriálnou kontamináciou.

V zmysle stanovených cieľov sme zaviedli do praxe a validovali chemiluminiscenčnú metódu na kontrolu dostatočnej pasterizácie kravského, ovčieho a kozieho mlieka. Súčasne sme pozorovali faktory, ktoré môžu ovplyvňovať výsledky analýz realizovaných touto metódou.

Validačné požiadavky (medza detekcie, opakovateľnosť, reprodukovateľnosť), ktoré stanovilo Referenčným laboratóriom pre mlieko a mliečne výrobky AFSSA Paríž, boli splnené. Chemiluminiscenčná metóda vyhovuje účelu použitia. Detekčný limit metódy bol stanovený na 17 mU.l^{-1} , čo zodpovedá prídavku cca 0,001 % nepasterizovaného mlieka do mlieka pasterizovaného. Pre dosiahnutie presných výsledkov odporúčame zostrojenie kalibračnej krivky samostatne pre jednotlivé druhy mlieka.

Pasterizované mlieko s vyšším obsahom tuku (3,5 %) vykazuje vyššiu aktivitu ALP, ako mlieko s nižším obsahom tuku (0,5 %) ($P < 0,01$). Miera tohto vplyvu však závisí od typu zvoleného tepelného ošetrenia.

„Vysoká pasterizácia“ (85 °C) mlieka v porovnaní so „šetrnou pasterizáciou“ (72 – 74 °C) je z pohľadu inaktivácie ALP účinnejšia. Najlepšie výsledky sme zistili u tepelného ošetrenia 85 °C / 5 s a 85 °C / 47 s. Pri tepelnom ošetrení 124°C / 4 s bola zaznamenaná reaktivita ALP. Z analyzovaných 93 vzoriek mlieka, boli 2 vzorky vyhodnotené ako pozitívne ($> 350 \text{ mU.l}^{-1}$). Obe vzorky boli ošetrené „šetrnou pasterizáciou“.

Zistili sme, že aktivitu ALP neovplyvňuje skladovanie mlieka pri -18 °C a pri 5 °C po dobu 8 dní. Naopak, izbová teplota (22 °C) zvyšuje aktivitu ALP (v závislosti od rýchlosti množenia sa mikroorganizmov).

Kľúčové slová: alkalická fosfatáza, pasterizácia mlieka, kontrola mlieka,

ABSTRACT

The alkaline phosphatase (ALP) is an enzyme naturally occurred in milk of all mammals. ALP is inactivated by heat treating of milk. Whereas ALP is less thermolabile than most of pathogenic bacteria and it is inactivated closely under the time limit of thermal conditions which are used for pasteurization of milk, the monitoring of this activity presents an ideal test parameter for a proof that milk was correctly pasteurized and was not contaminated by original milk or a post-production bacterial contamination.

With a view to specified purposes we validated and introduced to practise a chemiluminescent method for control of sufficient pasteurization in connection with milk of cows, sheep and goats. At the same time we observed some factors which could influence the results of analyses realized by this method.

Requirements of validity (limit of detection, repeatability, reproducibility) established by French National Reference Laboratory for milk and dairy products AFSSA, Paris, were executed. The chemiluminescent method accommodated to purpose of using. The limit of detection was determined 17 mU.l^{-1} what presents an addition approximately 0,001 % non-pasteurized milk into pasteurized milk. For an achievement of exact results we recommend a construction of calibration curve separately for special sorts of milk.

Pasteurized milk in high fat content (3,5 %) shows higher ALP activity than milk in lower fat content (0,5 %). The rate of influence depends on type of selected heat treating.

On account of ALP inactivation is „high pasteurization“ (85 °C) more effective than „lower pasteurization“ (72-74 °C). The best results we reached with using heat treating 85 °C/5 s and 85 °C/47 s.

ALP reactivity was observed with using heat treating 124 °C/4 s. Two samples of milk from 93 analyzed samples were evaluated as positive ($>350 \text{ mU.l}^{-1}$) The both samples were treated by “lower pasteurization”.

We found out that storage of milk does not influence ALP activity during 8 days when temperature is -18 °C and 5 °C. On the contrary, indoor temperature (22 °C increases ALP activity (it depends on reproduction rate of microorganisms).

Key words: alkaline phosphatase, pasteurization of milk, control of milk

ÚVOD

Mlieko a mliečne výrobky sú pre svoje zloženie považované za biologicky hodnotnú potravinu. Obsah nutričných zložiek prítomných v týchto produktoch je dobrou živnou pôdou pre rast a rozvoj rozmanitej mikroflóry. Táto mikroflóra v mliečnych produktoch môže mať pre konzumenta pozitívne, ale aj negatívne následky.

Výrobcovia prichádzajú na trh stále s novými a novými výrobkami, ktoré sú v radoch konzumentov obľúbené a žiadané. Z nutričného a dietetického hľadiska majú tieto výrobky nezastupiteľné postavenie najmä vo výžive detí a starších ľudí. Práve nedostatočne vyvinutý, resp. vyčerpaný a oslabený imunitný systém u týchto vekových skupín však často nie je schopný adekvátne a dostatočne primerane reagovať v prípade infekcie spôsobenej patogénnymi a potencióálne patogénnymi mikroorganizmami.

Na zničenie potenciálne prítomných patogénnych mikroorganizmov sa mlieko ošetruje pasterizáciou. Preto je dôležité kontrolovať tento proces. Dôkaz dostatočnej pasterizácie mlieka je založený na princípe zistenia aktivity enzýmu alkalická fosfatáza (ALP), ktorý musí byť pri pasterizačnej teplote inaktivovaný. Nakoľko ALP je o niečo menej termolabilná ako väčšina patogénnych baktérií a inaktivuje sa tesne pod časovou hranicou teplotných podmienok použitých pri pasterizácii mlieka, sledovanie jej aktivity je ideálnym testovacím parametrom na dôkaz, že mlieko bolo správne pasterizované, nebolo kontaminované surovým mliekom, alebo postvýrobnou bakteriálnou kontamináciou.

V nedávnej minulosti (niekde ešte aj v súčasnosti) sa na kontrolu pasterizácie používali metódy, ktoré sú schopné detegovať len 2,5 %, v lepšom prípade 0,1 %, nepasterizovaného mlieka v pasterizovanom (kolorimetrická metóda). Predstavuje to vysokú možnosť prehliadnutia kontaminácie pasterizovaného mlieka patogénnymi mikroorganizmami prostredníctvom nepasterizovaného mlieka. Sprísnením hygienických pravidiel a rozvojom analytickej chémie, môžeme resp. musíme na kontrolu pasterizácie v súčasnosti používať citlivejšie metódy (napr. chemiluminiscenčná a fluorimetrická metóda). Zavádzaním takýchto metód do praxe (orgány úradnej kontroly potravín, výrobcovia potravín) prispieva k produkcii zdravotne neškodných mliečnych produktov.

1 PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Alkalická fosfatáza (ALP) je enzým [EC 3.1.3.1; ortophosphoric monoester phosphohydrolase] prirodzene prítomný v krvi a v mlieku všetkých cicavcov, pričom jej obsah v mlieku jednotlivých živočíšnych druhov je rôzny (Fadiloglu et al., 2004).

ALP je nachádzaná v rozličných množstvách vo väčšine tkanív a sekrétov cicavcov. (Shakeel-ur-Rehman a Farkye, 2002). Hodnoty ALP sa môžu podstatne líšiť medzi druhmi a medzi jednotlivcami rovnakého druhu. Mlieko jednotlivých kráv sa môže líšiť obsahom ALP, čo je ovplyvnené mnohými faktormi ako napríklad štádiom vylučovania mlieka (Andrews, 1992). Mastitídne mlieko vykazuje vyššiu aktivitu ALP (Roseiro – Barbosa, 1995). Vamvakaki et al. (2005) zistil, že v surovom ovčom mlieku je približne 5-krát viac ALP a kozie mlieko obsahuje zhruba len $\frac{1}{5}$ ALP v porovnaní s kravským mliekom.

Aktivita ALP je použitá ako index účinnosti adekvátnej pasterizácie mlieka, pretože ALP je trochu viac rezistentná ako teplota a čas potrebný na inaktiváciu *Mycobacterium tuberculosis*, ktorý bol teplotne najstabilnejší patogén známy v mlieku v časoch zavádzania pasterizácie v mliekarenskom priemysle (Andrews, 1992). V súčasnej epidemiologickej situácii prichádzajú v surovom mlieku do úvahy nasledovné choroboplodné a toxínogénne mikroorganizmy (v abecednom poradí): *Campylobacter sp.*, *Coxiella bruneti*, patogénne Enterobacteriaceae – *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Yersinia enterocolitica*, enteropatogénne *Eschericia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. V poslednom čase sa vyskytuje otázka významu *M. avium ssp. paratuberculosis* ako zvieracieho patogéna aj z hľadiska možného nebezpečenstva pre zdravie konzumentov pasterizovaného mlieka (Görner a Valík, 2004). *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* je pravdepodobne jeden z najkontroverznejších zoonotických patogénov bovinného pôvodu (Tremblay, 2004). Považuje sa za potenciálny etiologický agens Crohnovej choroby (chronickej ochorenia črevného aparátu) u ľudí (Chamberlin et al., 2001; Hermon-Taylor et al., 2000). Ak je *MAP* prítomný v surovom mlieku a nie je efektívne inaktivovaný pasterizáciou, je možné, že baktéria môže existovať v ďalších produktoch ako sú napr. syry (Donaghy, Totton, Rowe, 2004).

Viacerí vedci zistili (Stabel et al., 1997; Kaswani a Frank, 1998), že komerčná HTST pasterizácia inaktivuje *MAP*. Iné výskumy ukazujúce prítomnosť *MAP* vo vzorkách predávaného pasterizovaného mlieka vedú k záverom, že *MAP* prežíva komerčnú pasterizáciu mlieka (Grant

et al., 2002; Sung a Collins, 1998). Tieto výskumy nie sú nezvratným dôkazom, že mikroorganizmus prežíva ak je vystavený špecifickému tepelnému spracovaniu pri teplote 71,7 °C za 15 s. Chyby v komerčnej pasterizácii sa môžu vyskytnúť vďaka neadekvátnemu času podržania mlieka vo výdržníkoch, štrbinám vo ventiloch a vo výmeníkoch tepla a v nesprávnom fungovaní zariadenia (Rampling, 1998). Zostáva kontroverzné, či *MAP* prežíva komerčnú pasterizáciu (Gao et al., 2002).

Pôsobenie tepla na ALP počas pasterizácie spôsobí, že ALP sa rozvinie, inaktivuje sa. Inaktivovaná ALP je neúčinná, pretože proteín v tomto stave nie je schopný hydrolyzy žiadneho známeho substrátu. Iba neporušená ALP môže hydrolyzovať orto-fosforový ester z fenolového a iného substrátu.

Meranie reziduálnej ALP aktivity je jednoducho meraním množstva ALP, ktoré ešte nepodľahlo rozpleteniu (inaktivácii). Reziduálna aktivita ALP taktiež odráža, či nejaké surové mlieko nepreniklo do produktu. Úplné množstvo ALP v surovom nezahriatom mlieku sa rôzni vďaka množstvu faktorov (Kepplinger, 2006).

Pri meraní ALP v pasterizovanom mlieku, počiatočné pozitívne výsledky ešte nemusia znamenať nedostatočnú pasterizáciu. Falošne pozitívne výsledky môžu byť zapríčinené z viacerých dôvodov (Kepplinger, 2006). Prítomnosti iónov Mg, Mn, Zn môže fosfatázu po tepelnej inaktivácii reaktivovať a to hlavne vtedy, keď nedošlo k denaturácii rozpustných bielkovín. Reaktiváciu však inhibuje prítomnosť ťažkých kovov, napr. Cd, Hg (Vega-Warner et al., 1999), Cu a Ni. K inhibícii reaktivácie však prichádza tiež za neprítomnosti Mg a Ca (Kepplinger, 2006).

Reaktivita ALP bola študovaná kvôli zisteniu, že UHT ošetrené (ultra-high temperature) mlieko je fosfatázovo negatívne ihneď po tepelnom ošetrení, ale odštátím sa stáva fosfatázovo pozitívne (Pellegrino, Resmini a Luf, 1995). Všeobecne, reaktivita ALP vzrastá so zvyšovaním pasterizačnej teploty a skracovaním jej výdrže (Vega-Warner et al., 1999).

Mikroorganizmy prítomné v mliečnych produktoch po pasterizácii môžu produkovať termolabilné mikrobiálne fosfatázy (typ I), alebo termostabilné mikrobiálne fosfatázy (typ II). Typ I sa rozpletá (rozvinie) a inaktivuje, ak je vystavený pasterizačnej teplote a typ II nie. Typ II odoláva pasterizačnému rozpletaniu a inaktivovaniu (Kepplinger 2006).

Mliečne produkty s vyšším obsahom tuku, ktoré podľahli vysoko-teplotnej krátkodobej pasterizácii (HTST) často vykazujú reaktivitu. Bolo dokázané, že ALP vo všetkých mliekach je

nájdená voľná v roztoku pevne prichytená k membráne mliečnych tukových guľôčok. Predpokladá sa, že ALP, keď je tesne prichytená k membráne, je jednoducho viac chránená od úplného rozpletenia v porovnaní s ALP voľnou v roztoku. Hoci obe, voľná i viazaná ALP je neaktívna pôsobením tepla úplne nezvratné rozpletenie sa môže udiť len pri voľnej ALP v roztoku (Keplinger 2006).

Podľa Nariadenie komisie (ES) č. 1662/2006 sa pasterizácia dosiahne ošetrením, ktoré zahŕňa:

- i) vysokú teplotu na krátky čas (najmenej 72 °C na 15 sekúnd);
- ii) nízku teplotu na dlhý čas (najmenej 63 °C na 30 minút); alebo
- iii) akúkoľvek inú kombináciu podmienok času/teploty s cieľom dosiahnuť rovnocenný účinok, tak aby výrobky vykazovali tam, kde to pripadá do úvahy, negatívnu reakciu na alkalický fosfatázový test bezprostredne po takomto ošetrení.

Stanovenie aktivity alkalického fosfatázy podľa Nariadenia komisie (ES) č. 1664/2006

1. Pri stanovovaní aktivity alkalického fosfatázy je nutné uplatňovať normu ISO 11816-1 ako referenčnú metódu.
2. Aktivita alkalického fosfatázy je vyjadrená v milijednotkách aktivity enzýmov v prepočte na jeden liter ($\text{mU}\cdot\text{l}^{-1}$). Jednotka aktivity alkalického fosfatázy je množstvo enzýmu alkalického fosfatázy, ktoré katalyzuje premenu 1 mikromolu substrátu za jednu minútu.
3. Výsledok testu alkalického fosfatázy sa považuje za negatívny, ak aktivita kravského mlieka neprevyšuje $350 \text{ mU}\cdot\text{l}^{-1}$.
4. Využitie alternatívnych analytických metód je prípustné, len ak sú takéto metódy validované referenčnou metódou uvedenou v bode 1 v súlade s medzinárodnými uznávanými protokolmi.

2 CIEĽ PRÁCE

Vzhľadom na sprísnenie hygienických limitov kladených na výrobcov potravín a prenesenie zodpovednosti za vyrobený produkt na výrobcov, je nutné vylepšovať a nachádzať nové kontrolné mechanizmy technologických procesov výroby potravín.

V tomto zmysle sme pre kontrolu pasterizácie mlieka stanovili nasledovné ciele dizertačnej práce:

1. Validácia chemiluminiscenčnej metódy na stanovenie aktivity alkalického fosfatázy (ALP) v kravskom, ovčom a kozom mlieku.
2. Pozorovanie faktorov ovplyvňujúcich aktivitu alkalického fosfatázy (ALP) v mlieku (tepelné ošetrenie, tukovosť, podmienky skladovania).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Všeobecný popis experimentov a materiálu

Experimenty boli realizované v akreditovanom detašovanom laboratóriu v Nitre Štátneho veterinárneho a potravinového ústavu Bratislava.

Vzorky mlieka boli odobraté, v závislosti od experimentu, od prvovýrobcov mlieka (surové kravské mlieko, ovčie a kozie mlieko), od spracovateľov mlieka (pasterizované plnotučné, polotučné a nízkoťučné kravské mlieko) a z obchodnej siete (konzumne kravské mlieko). Odber vzoriek bol realizovaný podľa STN EN ISO 707 (2001).

Vyhodnotenie experimentov bolo prostredníctvom opisných matematicko-štatistických charakteristík, grafickým znázornením a matematicko-štatistickými analýzami (podľa zvoleného experimentu). Bližšia charakteristika vzoriek a metodiky je uvádzaná pri jednotlivých experimentoch.

Na dosiahnutie vytýčených cieľov boli zostavené nasledovné experimenty:

Cieľ 1: Validácia chemiluminiscenčnej metódy na stanovenie aktivity alkalického fosfatázy (ALP) v kravskom, ovčom a kozom mlieku.

Experiment 1: Kalibračné krivky

Experiment 2: Detekčný limit metódy (LOD)

Experiment 3: Opakovateľnosť metódy

Experiment 4: Medzilaboratórna reprodukovateľnosť metódy

Experiment 5: Porovnanie chemiluminiscenčnej a fluorimetrickej metódy na stanovenie aktivity ALP v mlieku.

Cieľ 2: Pozorovanie faktorov ovplyvňujúcich aktivitu alkalickéj fosfatázy (ALP) v mlieku (tepelné ošetrenie, tukovosť, podmienky skladovania).

Experiment 6: Vplyv obsahu tuku v pasterizovanom mlieku na aktivitu ALP.

Experiment 7: Vplyv rôznych tepelných ošetrení na aktivitu ALP

Experiment 8: Vplyv doby uchovávanía vzoriek pasterizovaného mlieka za rôznych teplotných podmienok na celkový počet mikroorganizmov (CPM) a aktivitu ALP.

3.2 Stanovenie aktivity ALP chemiluminiscenčnou metódou (PasLite™ ALP test Charm 6600)

Fosfatáza je prirodzený mliečny enzým, ktorý je inaktivovaný konvenčnou pasterizáciou. PasLite zmeria fosfatázu v mliečnych produktoch s detekčným limitom 20 mU.l^{-1} pri tepelnom ošetrení vzorky mlieka $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 sekúnd (HTST).

Charm II systém v spolupráci so softvérom C2Soft poskytuje výsledky v mU.l^{-1} (milijednotiek na liter mlieka). Jednotka aktivity ALP je množstvo enzýmu ALP, ktoré katalyzuje premenu jedného μmolu substrátu za minútu v jednom litri vzorky.

Princíp metódy

Aktivita alkalickéj fosfatázy je meraná na základe fotoaktívácie hydrolyzovaného produktu - nasleduje prístrojové meranie fotoaktívácie. V prítomnosti alkalickéj fosfatázy, stabilný aromatický dioxetan-fosfátový substrát je hydrolyzovaný pri $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ za tvorby fotoaktívneho (chemiluminiscenčného) produktu. Hydrolytická reakcia je zastavená po inkubácii (3 minúty). Takto vytvorená hodnota chemiluminiscencie produktu je meraná a transformovaná analyzátorom na enzýmové jednotky (U).

Kalibrácia

Do každej z troch skúmaviek vložíme jednu kalibračnú tabletu, pridáme $100 \mu\text{l}$ vody a premiešame. Postupujeme nasledovne:

- nízka kalibrácia: jedna tableta pozitívneho štandardu v 20 ml negatívnej kontroly (44 mU.l^{-1})

- stredná kalibrácia: jedna tableta pozitívneho štandardu v 5 ml negatívnej kontroly
(175 mU.l⁻¹)
- vysoká kalibrácia: jedna tableta pozitívneho štandardu v 2,5 ml negatívnej kontroly
(350 mU.l⁻¹)

Skúmavky energicky premiešať 10 sekúnd. Schladíme na 10 minút. Pred každým použitím pretrepať. Každá kalibračná koncentrácia bude testovaná v trojiciach použitím 100 µl z pripravených kalibračných štandardov. Meranie sa musí uskutočniť do 3 minút od inkubácie, preto každá kalibračná koncentrácia bude meraná jednotlivo.

Meranie sa prevádza na analyzátore CHARM 6600.

Softvér C2Soft vypočíta z troch meraní pre každú kalibračnú úroveň priemernú hodnotu a vytvorí kalibračnú krivku.

Postup skúšky

Pred testovaním vzoriek určíme kalibračnú krivku a/alebo kontrolný bod (kontrolný bod je delítkom medzi negatívnym a podozrivo pozitívnym výsledkom):

- 1) do každej testovacej skúmavky pridáme 100 µl činidla AP,
- 2) pipetou pridáme do každej testovacej skúmavky 100 µl vzorky mlieka, potrepeme kyvadlovým pohybom,
- 3) vložíme do inkubátora na teplotu 35 ±1 °C na tri minúty,
- 4) v priebehu 10 sekúnd od ukončenia inkubácie pridáme do každej skúmavky 1 ml zastavujúceho roztoku izbovej teploty. Skúmavky vyberieme z inkubátora a potrepeme po dobu 10 sekúnd,
- 5) skúmavky vložíme do analyzátora 6600. Všetky skúmavky musia byť analyzované do 3 minút od pridania zastavujúceho roztoku.

Interpretácia výsledkov

- vzorka s nameranou hodnotou $\geq 350 \text{ mU.l}^{-1}$ = podozrivo pozitívna vzorka (ďalej sa postupuje podľa bodu „Potvrdenie pozitivity“)
- vzorka s nameranou hodnotou $> 100 \text{ mU.l}^{-1}$ môže znamenať potenciálny problém v procese pasterizácie
- vzorka s nameranou hodnotou $< 44 \text{ mU.l}^{-1}$ = negatívna vzorka

3.3 Stanovenie aktivity ALP fluorimetrickou metódou (Fluorophos[®] ALP Test System)

Stanovenie aktivity ALP fluorimetrickou metódou sa realizovalo podľa STN EN ISO 11816-1: 1997 „Mlieko a mliečne výrobky. Stanovenie aktivity alkalického fosfatázy fluorimetrickou metódou. Časť 1: Mlieko a nápoje na báze mlieka“.

3.4 Stanovenie celkového počtu mikroorganizmov (CPM)

CPM boli stanovené podľa STN EN ISO 4833: 2003 „Stanovenie celkového počtu mikroorganizmov - Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30°C“.

3.5 Validácia chemiluminiscenčnej metódy na stanovenie aktivity ALP v mlieku

Požiadavky k validácii chemiluminiscenčnej metódy boli určené Referenčným laboratóriom pre mlieko a mliečne výrobky AFSSA Paríž.

Experiment 1: Kalibračné krivky

Kalibračné krivky boli vytvorené pre nízkotučné, polotučné, plnotučné kravské a pre ovčie a kozie mlieko použitím nasledovných kalibračných koncentrácií aktivity ALP:

- nízka kalibračná koncentrácia (44 mU.ml⁻¹):

jedna tableta pozitívneho štandardu v 20 ml negatívnej kontroly

- stredná kalibračná koncentrácia (175 mU.ml⁻¹):

jedna tableta pozitívneho štandardu v 5 ml negatívnej kontroly

- vysoká kalibračná koncentrácia (350 mU.ml⁻¹):

jedna tableta pozitívneho štandardu v 2,5 ml negatívnej kontroly

Príprava negatívnej kontroly: mlieko pasterizované pri 95 °C po dobu 1 minúty.

Experiment 2: Detekčný limit metódy (LOD)

Na stanovenie medze detekcie sme použili nasledovný postup:

1. príprava negatívnej kontroly - pasterizované mlieko pri 95 °C / 1 min
2. priemerná hodnota aktivity ALP v negatívnej kontrole = „šum“;
3. výpočet LOD: 3 x „šum“;

Experiment 3: Opakovateľnosť metódy

Opakovateľnosť (zhodnosť v podmienkach opakovateľnosti) sa charakterizuje variačným koeficientom opakovateľnosti CV_r , ktorý sa počíta zo smerodajnej odchýlky (SD) a aritmetického priemeru (\bar{x}) série meraní v podmienkach opakovateľnosti. Vypočítaný CV_r sa hodnotí podľa vopred určenej požiadavky.

Pre každý druh mlieka (plnotučné, polotučné a nízkoťučné kravské mlieko, ovčie a kozie mlieko) bolo vykonaných šesť meraní jednej vzorky, na každej koncentračnej hladine aktivity ALP (20, 44, 100, 350, 500 $mU.l^{-1}$). Z nameraných hodnôt boli vypočítané variačné koeficienty, ktoré sa porovnali s požadovanými hodnotami určenými Referenčným laboratóriom pre mlieko a mliečne výrobky AFSSA Paríž.

Experiment 4: Medzilaboratórna reprodukovateľnosť metódy

Na stanovenie medzilaboratórnej reprodukovateľnosti sa porovnali výsledky merania aktivity ALP získané z troch rôznych laboratórií, meraním rovnakých vzoriek za použitia rovnakej metódy merania (chemiluminiscenčná metóda PasLite™ ALP test Charm 6600). Rozdielnosť nameraných hodnôt totožných vzoriek v troch laboratóriách vyjadrená variačným koeficientom reprodukovateľnosti (CV_R) bola porovnaná s danými požiadavkami.

Experiment 5: Porovnanie chemiluminiscenčnej a fluorimetrickej metódy na stanovenie aktivity ALP

V experimente 5 boli zistené a porovnané hodnoty aktivity ALP namerané chemiluminiscenčnou metódou (PasLite™ ALP test Charm 6600) a fluorimetrickou metódou (Fluorophos® ALP Test System) v rovnakých vzorkách. Vzorky boli analyzované oboma metódami pre koncentračnú hladinu aktivity ALP: 20, 50, 100, 350 a 500 $mU.l^{-1}$.

3.6 Pozorovanie faktorov ovplyvňujúcich aktivitu alkalickéj fosfatázy (ALP) v mlieku (tepelné ošetrenie, tukovosť, podmienky skladovania)

Experiment 6: Vplyv obsahu tuku v pasterizovanom mlieku na aktivitu ALP

Na zistenie ako vplýva obsah tuku v mlieku na aktivitu ALP sme analyzovali vzorky kravského mlieka s 3,5 %, 1,5 % a 0,5 % obsahom tuku. Na stanovenie aktivity ALP sme použili chemiluminiscenčnú metódu PasLite™ ALP test Charm 6600.

Vzorky mlieka boli pasterizované na doskovom pastéri za nasledovných podmienok: A : 72°C po dobu 47 s; B : 74°C po dobu 20 s; C : 85°C po dobu 5 s; D : 85°C po dobu 47 s.

Na zistenie vzťahu medzi obsahom tuku v pasterizovanom mlieku a aktivitou ALP boli získané údaje štatisticky spracované dvojfaktorovou ANOVA analýzou.

Experiment 7: Vplyv rôznych tepelných ošetrení na aktivitu ALP

Vzorky surového kravského mlieka boli tepelne ošetrené na doskovom pastéri s nasledovnými kombináciami teploty a času:

A : 72°C po dobu 47 sekúnd	}	„šetrná pasterizácia“
B : 74°C po dobu 20 sekúnd		
C : 85°C po dobu 5 sekúnd	}	„vysoká pasterizácia“
D : 85°C po dobu 47 sekúnd		
E : 124°C po dobu 4 sekundy		

Na stanovenie aktivity ALP vo vzorkách bola použitá chemiluminiscenčná metóda PasLite™ ALP test Charm 6600.

Zistené hodnôt aktivity ALP (v rámci každej skupiny tepelného zásahu A - E) boli porovnané prostredníctvom základných matematicko - štatistické ukazovateľov (priemer, smerodajná odchýlka, variačný koeficient), znázornené graficky a vyhodnotené ANOVA analýzou s interakciou.

Experiment 8: Vplyv doby uchovávania vzorky pasterizovaného mlieka za rôznych teplotných podmienok na celkový počet mikroorganizmov (CPM) a aktivitu ALP

Vzorky mlieka odobraté z obchodnej siete ošetrené „vysokou pasterizáciou“ boli skladované 8 dní za nasledovných podmienok:

- vzorky A: obal uzavretý, teplota 5° C
- vzorky B: obal uzavretý, teplota 22° C
- vzorky C: obal otvorený, teplota 5° C
- vzorky D: teplota -18° C

Počas doby skladovania boli v 24-hodinových intervaloch súbežne stanovovaná aktivita ALP a celkový počet mikroorganizmov. Z výsledkov sme zistili priebeh pozorovaných parametrov počas doby skladovania vzorky a koreláciu medzi aktivitou ALP a CPM.

4 VÝSLEDKY A ZÁVERY

Zameranie dizertačnej práce vychádza z potreby efektívnej kontroly mlieka z pohľadu jeho dostatočnej pasterizácie. Práca sa zaoberá metódou kontroly dostatočnej pasterizácie mlieka, možnosťou jej zavedenia do praxe a validáciou. Ďalej pojednáva o niektorých faktoroch, ktoré môžu výsledky analýz, získaných touto metódou, ovplyvniť.

K inaktivácii ALP dochádza pasterizáciou mlieka. Dôkaz dostatočnej pasterizácie mlieka je založený na princípe zistenia aktivity enzýmu alkalická fosfatáza (ALP), ktorý musí byť pri pasterizačnej teplote inaktivovaný. Nakoľko ALP je o niečo menej termolabilná ako väčšina patogénnych baktérií a inaktivuje sa tesne pod časovou hranicou teplotných podmienok použitých pri pasterizácii mlieka, sledovanie jej aktivity je ideálnym testovacím parametrom na dôkaz, že mlieko bolo správne pasterizované, nebolo kontaminované surovým mliekom, alebo postvýrobnou bakteriálnou kontamináciou.

V prvej časti práce sme zaviedli a validovali chemiluminiscenčnú metódu na kontrolu ALP pre plnotučné, polotučné, nízkotučné kravské mlieko, ako aj pre ovčie a kozie mlieko. Validačné požiadavky (detekčný limit, opakovateľnosť, reprodukovateľnosť), ktoré boli

stanovené Referenčným laboratóriom pre mlieko a mliečne výrobky AFSSA Paríž, boli splnené. Môžeme konštatovať, že testovaná metóda vyhovuje účelu použitia.

Z výsledkov prvej časti práce ďalej vyplýva:

- Detekčný limit metódy je 17 mU.l^{-1} , čo znamená, že metódou je možné zistiť približne 0,001 % nepasterizovaného mlieka v mlieku pasterizovanom (na porovnanie - kolorimetrická metóda cca 0,1 %).
- Citlivosť chemiluminiscenčnej metódy (PasLite™ ALP test - Charm 6600) pre kravské, kozie aj ovčie mlieko je takmer rovnaká. Pre dosiahnutie presnejších výsledkov odporúčame zostrojenie kalibračnej krivky samostatne pre jednotlivé druhy mlieka. V prípade plnotučného a polotučného mlieka je citlivosť metódy takmer zhodná, avšak v prípade odtučneného mlieka citlivosť testu výrazne stúpa. Preto je nevyhnutná kalibrácia zvlášť na plnotučné, polotučné a hlavne na nízkotučné mlieko.
- Chemiluminiscenčná metóda (PasLite™ ALP test - Charm 6600) je, z pohľadu zisťovaných výsledkov meraní, porovnateľná s referenčnou fluorimetrickou metódou (Fluorophos® ALP Test System) na koncentračných hladinách 20, 50 a 100 mU.l^{-1} . Extrémne rozdiely vo výsledkoch meraní sme zistili nad koncentračnou hladinou 350 mU.l^{-1} . Porovnanie oboch metód odporúčame zopakovať, pretože legislatívny limit dostatočnej pasterizácie je práve 350 mU.l^{-1} .

V druhej časti práce sme sa zamerali na pozorovanie niektorých faktorov, ktoré môžu ovplyvňovať aktivitu ALP. Z výsledkov získaných na základe troch experimentov môžeme konštatovať:

- Pasterizované mlieko s vyšším obsahom tuku (3,5 %) vykazuje vyššiu aktivitu ALP, ako mlieko s nižším obsahom tuku (0,5 %) ($P < 0,01$). Miera tohto vplyvu však závisí od typu zvoleného tepelného ošetrenia. Napríklad u tepelného ošetrenia $74 \text{ }^\circ\text{C} / 20 \text{ s}$ sa tento vplyv prejavil len minimálne.
- „Vysoká pasterizácia“ mlieka (v našom prípade C: $85 \text{ }^\circ\text{C} / 5 \text{ s}$, D: $85 \text{ }^\circ\text{C} / 47 \text{ s}$ a E: $124^\circ\text{C} / 4 \text{ s}$) v porovnaní so „šetrnou pasterizáciou“ (v našom prípade A: $72 \text{ }^\circ\text{C} / 47 \text{ s}$, B: $74 \text{ }^\circ\text{C} / 20 \text{ s}$) je z pohľadu inaktivácie ALP účinnejšia, pričom najlepšie výsledky sme zistili pri tepelnom ošetrení C: $85 \text{ }^\circ\text{C} / 5 \text{ s}$ a D: $85 \text{ }^\circ\text{C} / 47 \text{ s}$. Pri tepelnom ošetrení E: $124^\circ\text{C} / 4 \text{ s}$ bola zistená reaktivovaná ALP.

- Predlžovanie tepelného ošetrenia 85 °C nad 5 sekúnd, je z pohľadu inaktivácie ALP neefektívne, pretože výsledky aktivity ALP u tepelného ošetrenia 85 °C / 47 s a tepelného ošetrenia 85 °C / 5 s sú takmer zhodné.
- Zistili sme vzťah medzi aktivitou ALP a celkovým počtom mikroorganizmov (CPM) v mlieku. Vzrastajúcim obsahom CPM sa zvyšuje aj aktivita ALP v mlieku ($P < 0,05$). Koreláciu možno slovne hodnotiť ako pozitívnu a stredne silnú (Kendallov tau-b = 0,33). Tento vzťah je spôsobený mikrobiálnou ALP v mlieku.
- Z analyzovaných 93 vzoriek mlieka boli 2 vzorky vyhodnotené ako pozitívne ($> 350 \text{ mU.l}^{-1}$). Obe vzorky boli ošetrené „šetrnou pasterizáciou“.
- Keďže aktivita ALP v mlieku cca 12 hodín po pasterizácii je nízka (blízka k detekčnému limitu) a po ôsmich dňoch skladovania pri 5 °C takmer nezmenená znamená to, že je možné zisťovať aktivitu ALP (pre kontrolu vykonania dostatočnej pasterizácie) aj v priebehu doby spotreby mlieka (3 – 8 dní). Avšak pri porušení chladiaceho reťazca pri skladovaní mlieka sa aktivita ALP môže rýchlo zvýšiť (v závislosti od rýchlosti rozmnoženia mikroorganizmov). Uvedené skutočnosti by mohli byť využité orgánmi úradnej kontroly potravín napr. so zámerom, použiť chemiluminiscenčnú metódu na dôkaz porušenia chladiaceho reťazca pri skladovaní mlieka a mliečnych výrobkov. Pre realizáciu navrhovaného zámeru, je však nutné špecifikovať metodické postupy a podmienky analýz.

Zavádzanie citlivejších skúšobných metód do praxe a hľadanie nových spôsobov kontroly produktov počas výroby, ale aj v distribučnej a obchodnej sieti má veľký význam pre spotrebiteľa. Spotrebiteľ chce mať istotu, že výrobok ktorý skonzumuje mu nespôsobí zdravotné ťažkosti.

5 NÁVRHY NA VYUŽITIE POZNATKOV

Ciele práce boli zamerané pre využitie výsledkov vo výrobnej a laboratórnej praxi, pre orgány úradnej kontroly potravín a vednú oblasť technológia potravín.

Zistené poznatky z experimentov, ako aj teoretické poznatky, budú môcť byť využiteľné hlavne v laboratórnej praxi skúšobných a firemných laboratórií. Vzhľadom na zvýšenie hygienického štandardu a prenesenie zodpovednosti za vyrobený produkt na výrobcov, by mali

mat' výrobcovia väčší záujem kontrolovať svoje výrobné procesy. Využívať pri tom čo najcitlivejšie metódy, aby mali istotu, že ich vyrobený produkt je zdravotne neškodný. Metódy použité v práci (chemiluminiscenčná a fluorimetrická) na kontrolu dostatočnej pasterizácie mlieka využitím aktivity alkalickéj fosfatázy (ALP), sú považované za vysoko citlivé, čo sa nám potvrdilo aj v našich experimentoch. Metódami je vhodné kontrolovať proces pasterizácie mlieka a na základe výsledkov zhodnotiť činnosť pastéra. V rámci systému HACCP (prípadne ISO 22000, BRC a IFS štandardov a i.) kde je jednou z požiadaviek - validácia technologických procesov, sú spomínané metódy vhodným nástrojom na validáciu pasterizačného procesu spracovania mlieka.

Ďalším návrhom pre spracovateľov mlieka je zaviesť si do praxe vzorkovací plán, pričom mlieko bude odoberané ihneď po pasterizácii, schladené na čo najnižšiu teplotu a skladované primerane dlhú dobu. Takéto vzorky poslúžia ako dôkaz vykonanej dostatočnej pasterizácie v prípadných sporoch s odberateľom, či zákazníkom.

Na jednej strane si môžu výrobcovia kontrolovať pasterizačný proces spracovanie mlieka sami, a na strane druhej môžu byť ich výrobky kontrolované, v rámci úradnej kontroly, orgánmi úradnej kontroly potravín, za využitia dostatočne citlivých metód.

Aplikácia spomínaných metód na kontrolu dostatočnej pasterizácie mlieka do praxe, vyžaduje oboznámiť sa aj s faktormi, ktoré môžu zisťované výsledky ovplyvniť. Niektoré spomínané faktory boli testované v predkladanej práci a ich zhodnotenie môže byť nápomocné pri využívaní takýchto a podobných metód, fungujúcich na princípe zisťovania aktivity ALP, v praxi.

Realitou je neprípustné zaobchádzanie s mliečnymi výrobkami u výrobcu, distribútora a v obchodnej sieti napr. porušením chladiaceho reťazca, vystavovaním produktu vyšším teplotám, porušením obalu výrobku apod. Nasimulovali sme niektoré spomínané podmienky v laboratóriu s cieľom zistiť ako sa tieto faktory prejavujú na aktivite ALP a celkovom počte mikroorganizmov (CPM). Zistené výsledky môžu poskytnúť minimálne informáciu o tom, ako sa pozorované parametre menia, resp. nemenia v mliečnom produkte, keď sú vystavené rôznym vplyvom.

Využívaním spomínaných metód orgánmi úradnej kontroly a spracovateľmi mlieka na kontrolu dostatočnej pasterizácie mlieka a mliečnych výrobkov, prispeje k produkcii zdravotne neškodných produktov a tým k väčšej ochrane konzumenta.

Výsledky práce sú samozrejme prínosom aj pre vednú oblasť technológia potravín, kde môžu byť využité ako podklad pre ďalšie skúmanie vzťahov a súvislostí pri kontrole pasterizácie mlieka metódami fungujúcimi na princípe zaznamenávania aktivity enzýmu alkalického fosfatázy (ALP), ktorý je indikátorom dostatočnej pasterizácie mlieka. Predkladaná práca ponúka možnosti ďalšieho riešenia problému v rámci bakalárskych a diplomových prác. Získané výsledky je možné využiť vo výučbe predmetov Hygiena potravín, Mliekarstvo a pod.

Riešená problematika zahŕňa v sebe aj ďalšie čiastkové problémy, ktoré neboli v práci riešené. Na základe získaných poznatkov odporúčame v práci ďalej pokračovať, a to tak z pohľadu praktického využitia nových poznatkov, pre kontrolu pasterizácie ako aj pre získanie nových teoretických poznatkov, ktoré neboli doteraz vyriešené.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. ANDREWS, A. T., 1992. Phosphatases in milk. In: Fox, P.F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry- I. Proteins*. Elsevier Applied Science LTD, Exxex, pp. 322-331.
2. CHAMBERLIN, W. et al. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. In: *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 15, 2001, p. 337-346.
3. DONAGHY, J. A. – TOTTON, N. L. – ROWE, M. T. 2004. Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of Cheddar cheese. In: *Applied and Environmental Microbiology*, Aug. 2004, 4899 – 4905.
4. FADILOGLU S. et al. 2004. Inactivation of Alkaline Phosphatase in Milk. In: *Food Technol. Biotechnol.*, Vol. 42, No.1, 2004, p. 27-32.
5. GAO, A. et al. 2002. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. In: *J Dairy Sci.*, 85, 2002 p. 3198 – 3205.
6. GÖRNER, F. – VALÍK, Ľ. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava : Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
7. GRANT, I. R. et al. 2002. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2002, p. 602 – 607.
8. HERMON-TAYLOR, J. et al. 2000. Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: *Can. J. Gastroenterol.*, 14, 2000, p. 521-539.
9. KEPPLINGER, J. M. 2006. Milk alkaline phosphatase. In: *Bezpečnosť a kontrola potravín 2. diel*: Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie, Nitra : SPU, 2006, s. 252 – 255. ISBN 80-8069-682-9.
10. KESWANI, J. – FRANK, J. F. 1998. Thermal inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. In: *J. Food Prot.*, 61, 1998, p. 974 – 978.
11. NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 1662/2006 zo 6. novembra 2006, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu.
12. NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 1664/2006 zo 6. novembra 2006, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie (ES) č. 2074/2005, pokiaľ ide o vykonávacie opatrenia pre určité produkty živočíšneho pôvodu určené na ľudskú spotrebu, a zrušujú určité vykonávacie opatrenia.

13. PELLEGRINO, L. – RESMINI, P. – LUF, W., 1995. Assessment (indices) of heat treatment of milk. In: *Fox, P.F. (Ed.), Heat-Induced changes in milk*, second e. IDF, Brussels, pp. 409-453, International Dairy Federation Special Issue 9501.
14. RAMPLING, A., 1998. The microbiology of milk and milk products. In: Collier, L., Balows, A., Sussman, M. (Eds.), *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th edn. Balows, a. Duerden, B.I. (Eds.). *Systematic Bacteriology*, vol. 2. Edward Arnold, London, pp. 367-393.
15. ROSEIRO DE BIVAR, M. L. – BARBOSA, M., 1995. Phosphatase activity levels in pasteurized goat's milk. In: *J. Soc. Dairy Technol*, 48, 1995, p. 9-12.
16. SHAKEEL-UR REHMAN – FARKYE, N.Y. 2002. Phosphatases. In: *Enzymes indigenous to milk*, California. Elsevier Science Ltd, Copyright 2002, p. 934 – 938.
17. STABEL, J. R. et al. 1997. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: Are current pasteurization conditions effective? In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1997, p. 7975 – 4977.
18. SUNG, N. – COLLINS, M. T. 1998. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1998, p. 999 – 1005.
19. TREMBLAY, R. 2004. Emerging threats for public health associated with dairy cattle. 23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canada, July 11-16, 2004.
20. VAMVAKAKI, A.-N. – ZOIDOU, E. – MOATSOU, G. et al., 2005. Residual alkaline phosphatase activity after heat treatment of ovine and caprine milk. In: *Small Ruminant Research*, 2005. [cit. 2006-03-05]. Dostupné na internete: www.elsevier.com/locate/smallrumres.
21. VEGA-WARNER, A. V. et al. 1999. Milk alkaline phosphatase, purification and production of polyclonal antibodies. In: *Journal of food science*, 64, 1999, p. 601 -650.

7 PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S RIEŠENOU PROBLEMATIKOU

1. CHOVANEC, M. - GOLIAN, J. – ŠKARBOVÁ, B. 2008. Stanovenie aktivity alkalickej fosfatázy (ALP) v bryndzi. In: *Bezpečnosť a kontrola potravín: Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie*, 2. - 3. apríla 2008, Nitra : SPU, s. 247 – 249. ISBN 978-80-552-0028-6.
2. ŠKARBOVÁ, B.- GOLIAN, J.- CHOVANEC, M.- VÁCZIOVÁ, Z. 2008. Sledovanie aktivity alkalickej fosfatázy vo vzťahu k technológii spracovania mlieka. In: Zborník prednášok a posterov „Hygiena Alimentorum XXVIII“ Bezpečnosť a kvalita mlieka a mliečnych výrobkov, 2.-4. mája 2007, s. 208-211, ISBN 978-80-8077-055-6.
3. ŠKARBOVÁ, B. - GOLIAN, J. - CHOVANEC, M. – VÁCZIOVÁ, Z. 2007. Sledovanie aktivity alkalickej fosfatázy v mlieku vo vzťahu k tepelnému ošetrovaniu. In: *Bezpečnosť a kontrola potravín: Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie*, 28. – 29. marca 2007, Nitra : SPU, s. 301 -306. ISBN 978-80-8069-861-4.
4. ŠKARBOVÁ, B. - CHOVANEC, M. - GOLIAN, J. 2006. Stanovenie aktivity alkalickej fosfatázy v tepelne ošetrovanom kravskom, kozom a ovčom mlieku In: *Bezpečnosť a kontrola potravín: Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie*, 5. – 6. apríla 2006, Nitra : SPU, s. 264 - 268. ISBN 80-8069-682-9.