

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-1-105-113>

Поступила 07.02.2024

Поступила после рецензирования 22.03.2024

Принята в печать 26.03.2024

© Мягконос Д. С., Топникова Е. В., Абрамов Д. В., Кашникова О. Г., 2024

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТУРБИДИМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТЕПЛОВОЙ НАГРУЗКИ ПРИ ПАСТЕРИЗАЦИИ МОЛОКА

Мягконос Д. С., Топникова Е. В., Абрамов Д. В., Кашникова О. Г.

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия — Углич, Ярославская область, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

пастеризация,
тепловая обработка,
сывороточные белки,
турбидиметрические
методы

Методы быстрой оценки интенсивности тепловой обработки молока необходимы как в промышленности, так и в исследовательской работе. В связи с этим существует множество способов измерений данного показателя, основанных на различных физических принципах, в том числе турбидиметрические методы. Однако данный метод имеет недостаток: для выполнения анализа требуется длительное время. В связи с этим в работе поставлена цель разработать на базе этого принципа измерений экспресс-метод определения растворимых сывороточных белков, характеризующих тепловой класс молока. Результат достигается за счет применения турбидиметрического метода определения с оптимизированными параметрами подготовки пробы и измерения оптической плотности суспензии белковых агрегатов. Метод реализуется следующим образом. Образец молока смешивается с 0,1 N ацетатным буфером (pH 4,6) в соотношении, позволяющем получить концентрацию растворимых сывороточных белков молока от 0,05% до 0,1%. Рекомендованные коэффициенты разведения: 1:3 для образцов ультрапастеризованного молока и пастеризованного молока с высокой интенсивностью термообработки; 1:7 для образцов пастеризованного молока с низкой интенсивностью термообработки и 1:14 для образцов сырого молока. Раствор фильтруют на мембранном фильтре с размером пор 0,45 мкм. Полученный фильтрат смешивают с 24% ТХУ в соотношении 1:1 для коагуляции растворимых сывороточных белков и формирования белковых агрегатов. После выдерживания в течение 5–10 мин оптическую плотность суспензии белковых агрегатов измеряют при длине волны 650 нм. Содержание водорастворимых сывороточных белков в образце может быть рассчитано по калибровочной зависимости. Разработанный метод позволяет получить результат измерений за меньшее время, чем турбидиметрический метод Harland & Ashworth.

Received 07.02.2024

Accepted in revised 22.03.2024

Accepted for publication 26.03.2024

© Myagkonosov D. S., Topnikova E. V., Abramov D. V., Kashnikova O. G., 2024

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

USE OF TURBIDIMETRY FOR DETERMINATION OF HEAT TREATMENT INTENSITY APPLIED AT PASTEURIZATION OF MILK

Dmitry S. Myagkonosov, Elena V. Topnikova, Dmitry V. Abramov, Olga G. Kashnikova

All-Russian Scientific Research Institute of Butter and Cheesemaking — Uglich, Yaroslavl Region, Russia

KEY WORDS:

pasteurization,
heat treatment,
whey proteins,
turbidimetric methods

ABSTRACT

Express methods for estimating the intensity of heat treatment of milk are necessary in industry and in research work. For this reason, there are many ways to measure this parameter, which are based on different physical principles, including turbidimetric methods. The Harland & Ashworth turbidimetric method has been developed for a long time, however, due to its high reliability and ease of implementation, it is still used in practice. However, this method has a drawback: it takes a long time to perform the analysis. In this regard, the aim of the work is to develop an express method for evaluating the thermal class of milk based on the principle of measuring the concentration of soluble whey proteins. The result is achieved through the use of a turbidimetric measurement method with optimized sample preparation parameters and parameters for measuring the optical density of a suspension of protein aggregates. The method is implemented as follows. The milk sample is mixed with 0.1 N acetate buffer (pH 4.6) in a ratio that allows to obtain a concentration of soluble milk whey proteins from 0.05% to 0.1%. Recommended dilution coefficients: 1:3 for samples of ultra-pasteurized milk and pasteurized milk with high heat treatment intensity; 1:7 for samples of pasteurized milk with low heat treatment intensity and 1:14 for raw milk samples. The solution is filtered on a membrane filter with a pore size of 0.45 microns. The resulting filtrate is mixed with 24% trichloroacetic acid (TCA) in a 1:1 ratio to coagulate soluble whey proteins and form protein aggregates. After holding for 5–10 minutes, the optical density of the suspension of protein aggregates is measured at a wavelength of 650 nm. The content of water-soluble whey proteins in the sample can be calculated according to the calibration curve. The developed method allows to obtain the measurement result in less time than the Harland & Ashworth turbidimetric method.

1. Введение

Процесс производства любой молочной продукции предусматривает обязательный этап термической обработки (пастеризации). Целью термообработки молока является уничтожение патогенной и технически вредной микрофлоры, а также придание молоку требуемых технологических и органолептических свойств [1].

При изготовлении различных молочных продуктов условия термической обработки дифференцированы. Так, при производстве сыров важно, чтобы применяемая термическая обработка не оказывала существенного негативного влияния на динамику свертывания молока молокосвертывающим ферментом. В случае пастеризации

молока при высокой температуре и (или) большой продолжительности наблюдается значительная денатурация сывороточных белков. Денатурированный бета-глобулин формирует агрегаты с каппа-казеином, содержащимся на поверхности казеиновых мицелл, и защищает их от действия молокосвертывающего фермента. Также часть растворимого фосфата кальция утрачивает растворимость, что затрудняет процесс агрегирования мицелл казеина, являющийся начальной стадией формирования молочного сгустка. В результате увеличивается продолжительность свертывания молока, а получаемый сгусток обладает низкой механической прочностью и плохой способностью к синерезису. Следствием низкой механической

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Мягконос Д. С., Топникова Е. В., Абрамов Д. В., Кашникова, О. Г. (2024). Использование турбидиметрии для оценки тепловой нагрузки при пастеризации молока. *Пищевые системы*, 7(1), 105–113. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-1-105-113>

FOR CITATION: Myagkonosov, D. S., Topnikova, E. V., Abramov, D. V., Kashnikova, O. G. (2024). Use of turbidimetry for determination of heat treatment intensity applied at pasteurization of milk. *Food Systems*, 7(1), 105–113. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-1-105-113>

прочности является дробление сгустка при обработке с потерей сухих веществ сгустка в сыворотку, ведущее к снижению выхода сыра. Другим негативным следствием плохого синергизиса является медленное отделение влаги от сгустка при его обработке, что приводит к увеличению длительности обработки сырного сгустка и к получению сыра с высоким содержанием влаги [2].

Температурная обработка молока с высокой интенсивностью целенаправленно используется в производстве отдельных видов продуктов для придания им требуемых физических и технологических свойств. Высокая температура обработки вызывает формирование комплексов сывороточных белков с казеинами (между бета-лактоглобином и каппа-казеином), что используется в промышленности:

- при производстве йогурта, в целях придания продукту большей вязкости [3];
- при производстве мягких сыров и творога в целях повышения выхода продукта для придания продукту более нежной и стабильной консистенции [4].

Оборудование для термической обработки молока снабжено датчиками, контролирующими температуру и продолжительность нагрева. Однако для объективного контроля работы оборудования эффективность тепловой обработки следует оценивать непосредственно на обработанном молоке. Кроме решения этой задачи, приложениями, требующими определения интенсивности термической обработки, являются:

- идентификация и разделение пастеризованного молока и ультрапастеризованного молока. Поскольку при интенсивной тепловой обработке молоко теряет часть полезных веществ (витамины, растворимый кальций и ряд других), важно, чтобы потребитель имел точную информацию о свойствах приобретаемого продукта [5];
- установление наличия примеси в питьевом молоке пастеризованного молока (не проданного в течение срока годности и возвращенного из торговли) [6].
- определение теплового класса сухого молока, что необходимо для уточнения цели его использования. Для производства сыра и творога нужно молоко «низкого» теплового класса, для производства йогуртов, мороженого — молоко «среднего» теплового класса, а для производства выпечки и кондитерских изделий необходимо молоко «высокого» теплового класса [7,8].

Методы контроля тепловой нагрузки основываются на определении содержания в молоке чувствительных к температуре компонентов: ферментов, витаминов, белков, а также выявлении содержания химических веществ, образующихся под действием температуры, например, продуктов реакции Майяра [9].

Существенным преимуществом методов оценки тепловой нагрузки, основанных на оценке содержания термолабильных сывороточных белков, является возможность выбора из множества способов измерений, наиболее соответствующего выдвигаемым требованиям к точности, стоимости и длительности выполнения анализа. Для определения содержания белка в молочной сыворотке традиционно используется метод Кьельдаля. Данный метод имеет высокую точность, а результат определения белка не зависит от содержания в молоке жира и иных веществ [10]. При этом метод имеет достаточно высокую трудоемкость, длительное время выполнения анализа и требует использования дорогостоящего оборудования. Для быстрого выявления количества водорастворимых белков в молочной сыворотке могут быть использованы методы, базирующиеся на других физических принципах, такие как:

- спектрофотометрические методы, основанные на способности белков поглощать излучение в ультрафиолетовом [11] и инфракрасном диапазоне [12,13];
- колориметрические методы, реализуемые с применением специфических красителей, образующих окрашенные комплексы с реакционно-способными группами белков [14,15];
- методы иммуноферментного анализа (ИФА), основанные на реакции специфических антител с белками сыворотки [16].

Рассмотренные ускоренные методы имеют различные недостатки. Так, спектрофотометры, работающие в инфракрасном диапазоне, имеют весьма высокую стоимость. Оборудование для измерения колориметрическими методами и методом ИФА имеет меньшую стоимость, но данные методы требуют длительного времени на проведение анализа (до 1 ч), вследствие чего не могут считаться экспресс-методами. К тому же, колориметрические методы чувствительны к наличию в измеряемом образце продуктов реакции Майяра, в результате чего метод Лоури и ВСА-метод (bicinchoninic acid protein assay) дают завышенные результаты по содержанию белка в термически обработанном молоке [17].

К числу методов прямого определения концентрации растворимых сывороточных белков, не требующих предварительного фракционирования, относятся турбидиметрические методы, в основе которых лежит измерение оптической плотности суспензии коагулировавших белков, которая пропорциональна концентрации только белков, но не других компонентов сыворотки. В частности, в турбидиметрическом методе определение индекса водорастворимых сывороточных белков (whey protein nitrogen index — WPNI) [18] (далее — в метод Harland & Ashworth) осуществляется с помощью осаждения казеинов и нерастворимых сывороточных белков в молоке путем его насыщения NaCl, фильтрации с получением экстракта, содержащего водорастворимые белки сыворотки, коагуляции сывороточных белков в полученном экстракте с помощью кислоты при установлении уровня 2,7–3,1 ед. pH. При таком значении pH наступает денатурация всех растворимых белков сыворотки с формированием суспензии, оптическая плотность которой пропорциональна концентрации растворимых белков. Измеренную оптическую плотность пересчитывают в концентрацию белка с помощью калибровочной зависимости. Несмотря на то, что метод Harland & Ashworth был разработан очень давно, данный метод после ряда модификаций, предложенных в более поздних исследованиях [19], используется и в настоящее время как в научных исследованиях [20], так и в промышленности [21].

Турбидиметрический метод оценки содержания сывороточных белков, хотя и обладает меньшей точностью в сравнении с другими вышеперечисленными методами, не требует использования сложного оборудования и позволяет получить результат измерений за короткое время. Недостатками турбидиметрического метода Harland & Ashworth и его модификаций является достаточно большая длительность подготовки образца к измерению (фактически, не менее 45 мин). Целью настоящего исследования является разработка экспресс-метода для определения содержания характеризующих тепловой класс молока растворимых сывороточных белков, основанного на турбидиметрическом принципе, позволяющем получить результат измерений за меньшее время, чем метод Harland & Ashworth.

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

В работе были использованы образцы сырого молока (5 образцов от 4 разных производителей), а также приобретенные в розничной торговле образцы пастеризованного молока (5 образцов от 5 разных производителей) и ультрапастеризованного молока (5 образцов от 5 разных производителей). При обосновании метода подготовки пробы дополнительно применяли молоко, восстановленное из сухого молока в соответствии с ГОСТ 29245–91¹.

2.2. Методы

2.2.1. Методы исследования фракции сывороточных белков молока

Массовую долю азота сывороточных белков определяли расчетным методом как разность между массовой долей азота безказеиновой фракции и небелкового азота молока.

Массовую долю азота безказеиновой фракции молока, получаемую после осаждения казеиновой фракции белка и фракции нерастворимых сывороточных белков раствором уксусной кислоты с последующим центрифугированием и фильтрацией, определяли по ГОСТ 34536–2019².

Массовую долю небелкового азота молока, получаемую после удаления фракции белкового азота в пробе трихлоруксусной кислотой, измеряли по ГОСТ Р 55246–2012³.

Оптическую плотность образцов измеряли в кювете из кварцевого стекла с длиной оптического пути 10 мм на спектрофотометре PB2201 (ЗАО «Спектроскопия, оптика и лазеры — авангардные разработки», Республика Беларусь).

Определение молекулярно-массового распределения растворимых белковых веществ в сыворотке проводили методом гель-фильтрации высокого разрешения с использованием хроматографической системы AKTA Pure 25 (Cytiva, Швеция), оборудованной колонкой Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция). Элюент — водный раствор 0,05 М Na₂HPO₄ + 0,15 М NaCl (pH 6,50), скорость подачи элю-

¹ ГОСТ 29245–91 Консервы молочные. Методы определения физических и органолептических показателей М.: Стандартинформ, 2009. — 5 с.

² ГОСТ 34536–2019 Молоко и молочная продукция. Определение массовой доли сывороточных белков методом Кьельдаля. М.: Стандартинформ, 2019. — 8 с.

³ ГОСТ Р 55246–2012 Молоко и молочные продукты. Определение содержания небелкового азота с применением метода Кьельдаля. М.: Стандартинформ, 2019. — 10 с.

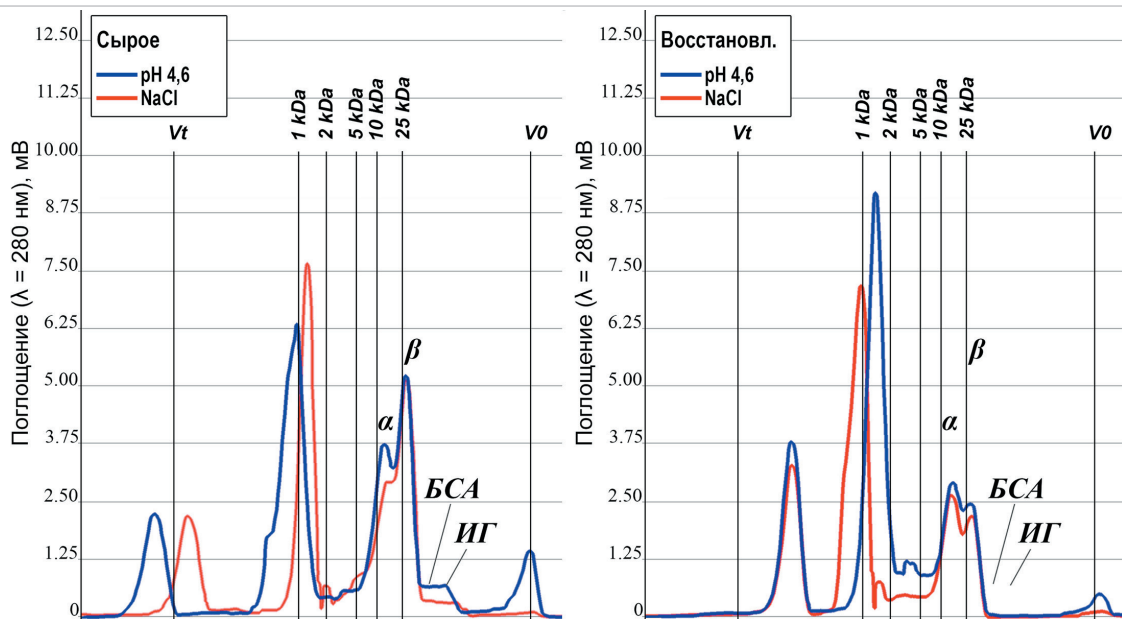


Рисунок 1. Молекулярно-массовое распределение растворимых белковых веществ в экстрактах, полученных из сырого и сухого восстановленного молока после осаждения казеинов и нерастворимых сывороточных белков путем подкисления молока до pH 4,6 и при насыщении молока NaCl. Коэффициент разведения при всех вариантах экстракции равен 1:7. Обозначения: α — альфа-лактоальбумин; β — бета-лактоглобулин; BSA — бычий сывороточный альбумин; ИГ — иммуноглобулины

Figure 1. Molecular weight distribution of soluble protein substances in extracts obtained from raw and dry reconstituted milk after precipitation of caseins and insoluble whey proteins by acidifying milk to a pH of 4.6 and after saturation of milk with NaCl. The dilution coefficient for all extraction options is 1:7. Designations: α — alpha-lactoalbumin; β — beta-lactoglobulin; BSA — bovine serum albumin; Ig — immunoglobulins

ента — 0,5 мл/мин; длина волны детектора — 280 нм. Калибровку колонки проводили по времени выхода белковых веществ с известной молекулярной массой: IgG (180 кДа), альдолаза (158 кДа), BSA (69 кДа), овальбумин (43 кДа), β-Lg (36,0 кДа), α-La (14,4 кДа), цитохром C (12,3 кДа), триптофан (0,204 кДа). Калибровочный график был построен на основе логарифмической регрессионной модели [22]. Экстракты, содержащие сывороточные белки, получали подкислением молока до $4,60 \pm 0,05$ ед. pH с помощью 10%-го раствора уксусной кислоты на магнитной мешалке под pH-метром. Подкисленные образцы пропускали через фильтр из фильтровальной бумаги «тип 102» (стандарт КНР GB/T 1914–2007⁴), а затем через фильтр из нейлона с размером пор 0,45 мкм (Tianjin Jinteng Experiment Equipment Co., Ltd, КНР). Активную кислотность молока и сыворотки определяли на pH-метре pH-150MI (ООО «Измерительная техника», Россия), оснащенном комбинированным pH-электродом FC200B (Hanna Instruments Inc., США).

Измерение содержания растворимых белков сыворотки турбидиметрическим методом Harland & Ashworth проводили по прописи фирмы GEA [21].

2.2.2. Микроскопические исследования

Микроскопические исследования суспензий сывороточных белков проводили на микропрепаратах «раздавленная капля» методом световой микроскопии в проходящем свете с применением конденсора темного поля. Фотоснимки были сделаны с помощью цифровой фотокамеры Canon EOS600D. Коррекцию фотографий производили с использованием программного пакета Digital Photo Professional software v. 4.5 (Canon Inc., Япония).

2.2.3. Методы статистического анализа

Математическая обработка данных осуществлялась с применением программного пакета Statsoft Statistica (v. 5.5). Оценку влияния факторов эксперимента на переменные отклика проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа, со сравнением достоверности отличий между уровнями переменной отклика методом парных сравнений Тьюки [23].

3. Результаты и обсуждение

3.1. Обоснование метода подготовки пробы

Экспресс-метод измерений должен обеспечивать быстрое получение результата, а также быть малозатратным по расходу реактивов и иметь малую трудоемкость в исполнении, включая затраты труда на подготовку реактивов и мытье лабораторной посуды. Сократить

продолжительность и трудоемкость анализа можно за счет усовершенствования метода подготовки пробы.

Большая продолжительность времени выполнения анализа по методу Harland & Ashworth связана с длительной процедурой осаждения казеинов и нерастворимых сывороточных белков с помощью насыщения молока NaCl, а также с длительной последующей фильтрацией на фильтре из плотной бумаги. Другим недостатком данного метода является неполное извлечение растворимых сывороточных белков из молока. При осаждении казеинов и нерастворимых сывороточных белков по методу Harland & Ashworth с помощью насыщения молока NaCl получают экстракт, содержащий меньшее количество растворимых сывороточных белков, чем при использовании метода осаждения с помощью внесения кислоты (при pH 4,6) [24]. Это подтверждается результатами хроматографических исследований. Хроматограммы, показывающие содержание растворимых белковых веществ в сыворотке при разных методах экстракции, приведены на Рисунке 1.

В целях повышения эффективности экстракции из молока белков сыворотки и для сокращения времени и трудозатрат при подготовке пробы, был выбран метод, основанный на осаждении казеинов и денатурированных сывороточных белков при pH 4,6, описанный в работе Guan и др. [25]. Согласно указанному методу, молоко смешивается с 0,1 N ацетатным буфером, имеющим pH 4,6 в соотношении 1:7, центрифугируется и фильтруется на фильтре из полимерных материалов с размером пор 0,45 мкм.

Мембранные методы фильтрации при подготовке пробы в настоящее время получили широкое распространение в лабораторной практике. Для мембранной фильтрации может использоваться как вакуумная фильтрация, так и фильтрация под давлением, реализуемая на т. н. «шприц-фильтрах» (Рисунок 2). Последний вариант более удобен, т. к. не требует использования дополнительного оборудования (картриджа для фильтра и вакуумного насоса) и последующей мойки картриджа.

Фильтрация на мембранных фильтрах занимает существенно меньше времени, чем фильтрация на бумажных фильтрах, используемая в методе Harland & Ashworth. В методе Harland & Ashworth при осаждении белков молока насыщением NaCl требуется поддержание температуры 37 °C, что достигается выдерживаем образца в жидкостном термостате. При экстракции растворимых сывороточных белков с помощью ацетатного буфера отсутствует необходимость в нагревании образца (осаждение происходит при комнатной температуре), что упрощает процесс экстракции.

Осаждение в ацетатном буфере в разведении 1:7 дает возможность использования фильтрации на мембранных фильтрах после кратковременного отстаивания образца (~ 5 мин) без необходимости центрифугирования. Для ускорения фильтрации целесообразно

⁴ GB/T 1914–2007. Chemical analytical filter paper. National Standards of People's Republic of China.

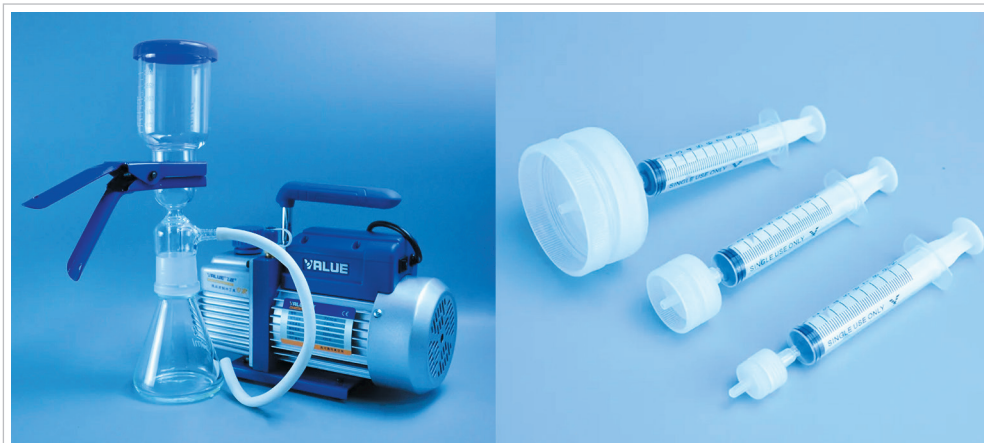


Рисунок 2. Оборудование для фильтрации на полимерных мембранах: слева — фильтрация под действием вакуума; справа — фильтрация под давлением («шприц-фильтр»)
 Figure 2. Filtration equipment on polymer membranes: on the left — vacuum filtration; on the right — pressure filtration (“syringe filter”)

использовать мембранные фильтры с увеличенной площадью поверхности (диаметром 47 мм), что позволяет фильтровать образцы, содержащие большое количество нерастворимых частиц.

3.2. Обоснование режима получения суспензии коагулированных белков

Экстракт, полученный из молока с помощью осаждения ацетатным буфером (рН 4,6), содержит сывороточные белки в растворимой форме. Для проведения измерения турбидиметрическим методом требуется провести дестабилизацию растворимых сывороточных белков с формированием суспензии из агрегатов коагулированных белков. При этом требуется подобрать режимы коагуляции, при которых оптическая плотность суспензии белков будет пропорциональна их концентрации в исследуемом образце. С этой целью авторами предлагается провести дестабилизацию растворимых белков в экстракте под действием трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Коагулирующее действие ТХУ не связано с изменением рН среды, при котором достигается изоэлектрическая точка белка. Под действием ТХУ происходят структурные изменения молекул белка, при которых их вторичная структура утрачивается только частично. В этом состоянии молекулы белков в большей степени способны к связыванию с другими молекулами белков, чем в нативном состоянии или в состоянии с полностью утраченной вторичной структурой. Связывание белков при этом происходит через силы гидрофобного взаимодействия. Низкая концентрация ТХУ (3% и менее) вызывает частичное разворачивание вторичной структуры белка. В таком состоянии молекулы белков формируют агрегаты только после длительной выдержки (часы, сутки). Повышение концентрации ТХУ выше определенной концентрации (индивидуальной для каждого белка) вызывает моментальную преципитацию молекул белка [26,27]. В присутствии 12% ТХУ происходит полная коагуляция всех белков молока. На этом принципе основано определение содержания небелкового азота в молоке, при котором с целью получения безбелкового экстракта используют осаждение белков в 12% растворе ТХУ [28].

Основной проблемой, которую необходимо решить исследователю для создания турбидиметрического метода, дающего надежный результат измерений, является установление условий формирования суспензии нерастворимых белков, оптической плотность которой будет пропорциональна содержанию белка в образце [29]. Для уточнения процедуры формирования суспензии нерастворимых белков были проведены исследования по адаптации режимов экстракции сывороточных белков применительно к разрабатываемому турбидиметрическому методу. Согласно методу Guan и др. [25], применяется разведение молока ацетатным буфером в соотношении 1:7. Для установления оптимальной кратности разведения, проводили исследования на экстрактах сывороточных белков, полученных из сырого молока при разведениях 1:7, 1:14 и 1:28 в 0,1 N ацетатном буфере, имеющем рН 4,6. Содержание в полученных экстрактах растворимых сывороточных белков составляло $0,100 \pm 0,013\%$, $0,051 \pm 0,006\%$ и $0,026 \pm 0,003\%$ соответственно (данные приведены в формате «среднее $\pm$ СКО»). Для дестабилизации растворимых белков в целях формирования оптически непрозрачной суспензии экстракты смешивались 1:1 по объему с раствором ТХУ концентрации 24% для достижения содержания ТХУ в смеси, равной 12%. После внесения ТХУ образцы выдерживались при комнатной температуре с периодическим перемешиванием. Динамику изменения оптической плотности белковой суспензии во времени в образцах измеряли при длине волны 650 нм. Эксперимент проводили в пяти повтор-

ностях: 5 образцов молока в 3 разведениях. Оценка степени влияния факторов «Коэффициент разведения» и «Время после внесения ТХУ» на оптическую плотность белковой суспензии в образцах, выполненная методом дисперсионного анализа, представлена в Таблице 1.

Таблица 1. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «Коэффициент разведения» и «Время после внесения ТХУ» на переменную отклика «Оптическая плотность белковой суспензии»

Table 1. The results of the dispersion analysis of the influence of the factors “Dilution coefficient” and “Time after application of TCA” on the response variable “Optical density of the protein suspension”

Фактор	df	SS	MS	F	p
Time	5	0,44325	0,08865	34,02	< 0,000001
Kd	2	0,22167	0,11084	42,54	< 0,000001
Time * Kd	10	0,04539	0,00454	1,74	0,087664
Error	72	0,18759	0,00261		

Примечание: *df* — количество степеней свободы; *SS* — сумма квадратов вариации; *MS* — средняя сумма квадратов; *F* — статистика Фишера; *p* — уровень значимости.

Обозначения факторов: *Kd* — коэффициент разведения в ацетатном буфере (1:7, 1:14 или 1:28); *Time* — время после внесения ТХУ, мин; *Error* — доля вариации переменной отклика, отнесенная к ошибке.

Из результатов дисперсионного анализа, приведенных в Таблице 1, следует, что фактор «Время после внесения ТХУ» оказывает статистически достоверное влияние ($p < 0,001$) на величину оптической плотности суспензии. Фактор «Коэффициент разведения» также оказывает статистически достоверное влияние ($p < 0,001$) на величину оптической плотности суспензии. Динамика изменения оптической плотности суспензий сывороточных белков, полученных из экстрактов в ацетатном буфере с разной степенью разведения, приведена на Рисунке 3.

Данные по динамике изменения оптической плотности суспензии сывороточных белков, коагулированных в 12% ТХУ (Рисунок 3), показывают, что скорость нарастания и конечное достигаемое значение оптической плотности зависят от разведения (т. е. от концентрации белка), а также от продолжительности формирования белковых агрегатов. Начиная с седьмой минуты после начала формирования суспензии оптическая плотность суспензий в разведениях 1:14 и 1:7 не отличается между собой (критерий Тьюки, $p < 0,05$), но отличается от оптической плотности в разведении 1:28 (критерий Тьюки, $p < 0,05$). При разведениях 1:7 и 1:14 (содержание белка $0,100 \pm 0,013\%$ и $0,051 \pm 0,006\%$ соответственно) формирование суспензии завершается через 10 мин. При разведении 1:28 (содержание белка $0,026 \pm 0,003\%$) возрастание оптической плотности продолжается и после 10 мин выдержки после внесения ТХУ.

Полученные зависимости оптической плотности суспензии коагулированных белков от коэффициента разведения и от продолжительности реакции объясняются отличиями в скорости роста белковых агрегатов и в их конечных размерах, наблюдаемых в растворах с разной концентрацией белка. На Рисунке 4 приведены фото микропрепаратов суспензии коагулированных белков в разное время после внесения ТХУ.

На основании результатов изучения микропрепаратов белковых суспензий, приведенных на Рисунке 4, можно сделать следующие выводы. При высокой концентрации белка ($0,100 \pm 0,013\%$ при разведении 1:7 и $0,051 \pm 0,006\%$ при разведении 1:14) коагулированные частицы белка формируют малое количество агрегатов с большой площадью поверхности. При низкой концентрации белка

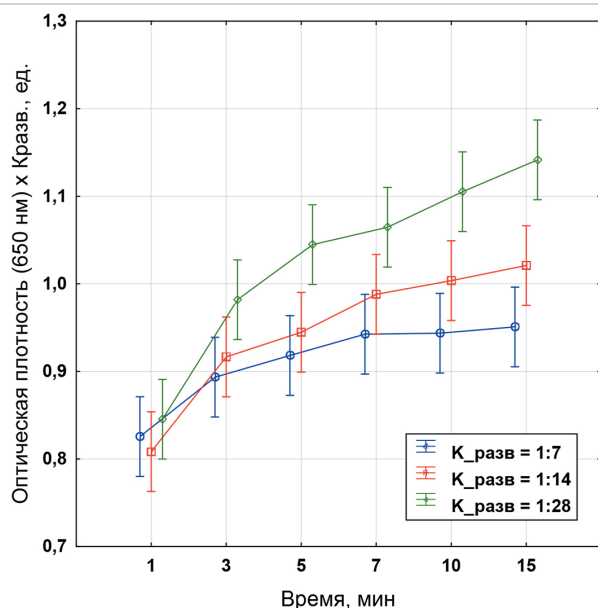


Рисунок 3. Изменение оптической плотности суспензии, состоящей из коагулированных в 12% ТХУ сывороточных белков, в зависимости от коэффициента разведения сыворотки. К_{разв} — коэффициент разведения в ацетатном буфере. Приведены скорректированные значения оптической плотности, умноженные на коэффициент разведения. Планки разброса показывают границы доверительных интервалов для доверительной вероятности P=0,95 (n = 5)

Figure 3. A change in the optical density of a suspension consisting of whey proteins coagulated in 12% TCA, depending on the serum dilution coefficient. K_{разв} is the dilution coefficient in the acetate buffer. The corrected values of the optical density multiplied by the dilution coefficient are given. The scatter bars show the boundaries of the confidence interval with a 95% confidence level (n = 5)

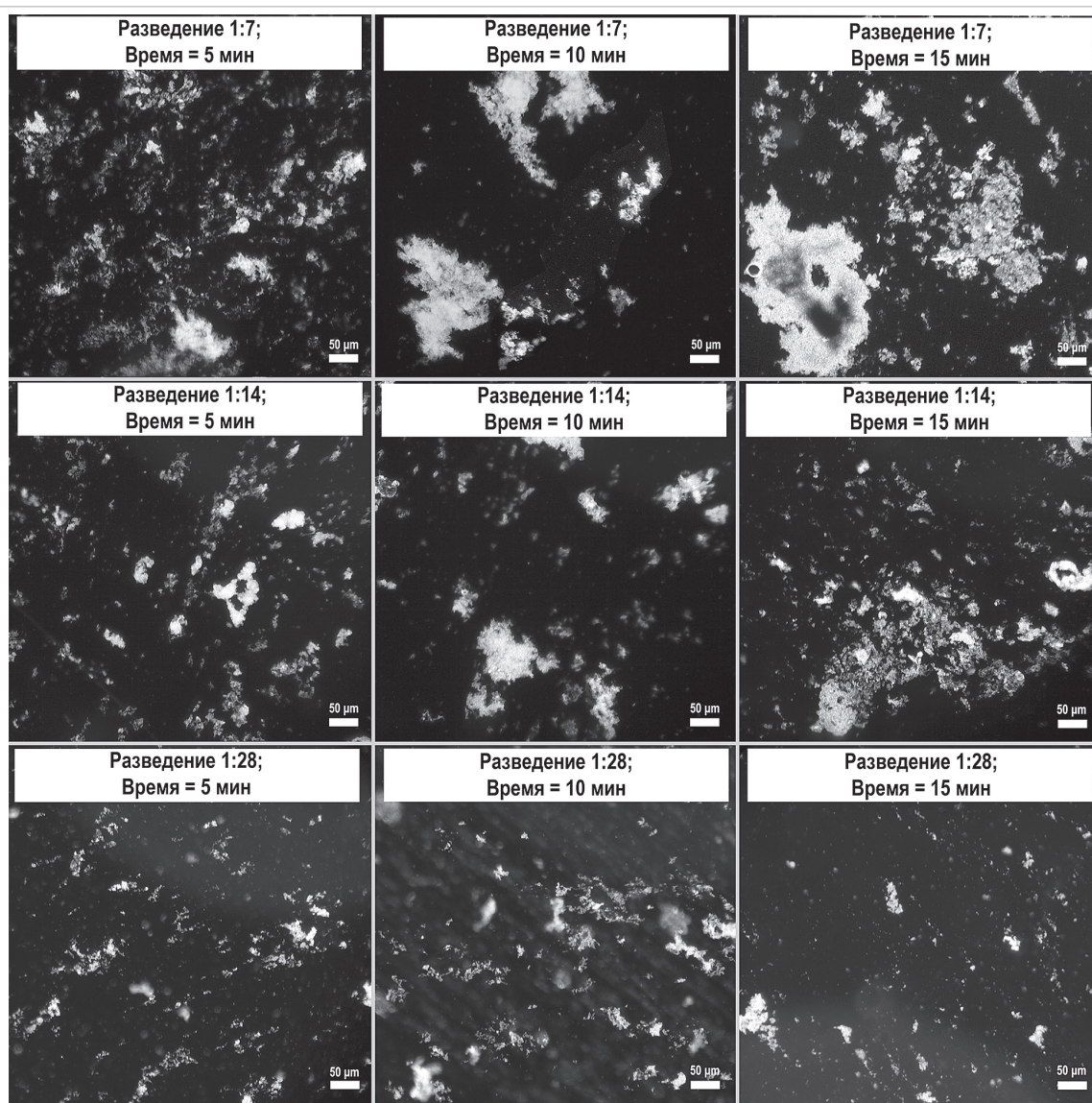


Рисунок 4. Динамика изменения формы агрегатов сывороточных белков, коагулированных в 12% ТХУ, в растворах с разной концентрацией белка. Обозначения: «Разведение» — степень разведения молока в ацетатном буфере; «Время» — время после внесения ТХУ. Длина мерного отрезка равна 50 мкм

Figure 4. Dynamics of changes in the shape of aggregates of whey proteins coagulated in 12% TCA in solutions with different protein concentrations. Designations: "Dilution" — the degree of dilution of milk in an acetate buffer; "Time" — the time after application of TCA. The length of the measuring segment is 50 microns

(0,026±0,003% при разведении 1:28) формируется большое количество агрегатов с малой площадью поверхности. Суспензия, состоящая из большого количества мелких частиц, имеет большую суммарную площадь перекрытия светового потока, и поглощает его сильнее, чем суспензия, состоящая из меньшего количества крупных частиц. Этим можно объяснить тот факт, что после пересчета оптической плотности с учетом коэффициента разведения, в образцах с высокой степенью разведения, которые состоят из мелких частиц, получается большее значение оптической плотности, чем в образцах с меньшей степенью разведения, которые состоят из более крупных частиц (см. Рисунок 3).

Полученные результаты согласуются с литературными данными. Согласно классической теории светорассеяния, оптическая плотность суспензии пропорциональна концентрации частиц суспензии. Процесс формирования суспензии делится на несколько фаз. В начальной фазе (лаг-фаза) начинается объединение молекул в агрегаты, но размеры агрегатов столь малы, что изменения оптической плотности не происходит. Далее в фазе роста происходит увеличение размеров агрегатов, сопровождающееся увеличением оптической плотности. Завершающей является фаза «плато», когда белковые молекулы практически полностью переходят в состав агрегатов, оптическая плотность суспензии достигает максимума и далее не повышается. Максимальная достигаемая величина оптической плотности зависит от количества и морфологии агрегатов [30]. При значительном изменении концентрации белка в среде изменяется динамика флокуляции и морфология агрегатов [31,32]. При низком содержании белка динамика флокуляции замедляется, момент достижения максимальной оптической плотности суспензии переносится на более позднее время, размеры агрегатов уменьшаются [33,34].

В разрабатываемом турбидиметрическом методе измерения концентрации растворимых сывороточных белков в молоке пропорциональность между концентрацией белка и оптической плотностью белков суспензии денатурированных белков может быть достигнута за счет формирования белковых агрегатов с единообразной морфологией и путем полного включения денатурированных белковых молекул в состав этих агрегатов. Оба условия могут быть выполнены при условии достижения оптимальной концентрации сывороточных белков в экстракте.

Степень перехода денатурированных белковых молекул в состав агрегатов можно оценить по динамике изменения оптической плотности суспензии сывороточных белков, осажденных в 12% ТХУ. Завершение процесса означает полное включение денатурированных белковых молекул в состав агрегатов. При использовании разведений, эквивалентных разведениям от 1:7 до 1:14 сырого молока в ацетатном буфере, процесс нарастания оптической плотности завершается через 10 мин (Рисунок 3). Содержание белка при разведениях молока от 1:7 до 1:14 составляет от 0,05 до 0,1%. Данный диапазон концентраций белков следует считать оптимальным. С учетом того, что при концентрации белка 0,1% происходит формирование крупных хлопьев, быстро выпадающих в осадок, следует использовать разведения, дающие концентрации белка менее 0,1%, но не ниже 0,05%.

Еще одним аргументом в пользу выбора концентрации белка в указанном диапазоне является необходимость обеспечить продолжительность анализа, выполняемого с помощью разрабатываемого турбидиметрического метода, не превышающую продолжительность анализа существующими методами. Продолжительность выдержки для формирования суспензии из коагулированных белков при использовании турбидиметрического метода Harland & Ashworth и его модификаций [21,29] составляет 5–10 мин. Поэтому для обеспечения продолжительности выдержки после внесения ТХУ не более 10 мин следует применять разведения, позволяющие получить концентрацию растворимого белка в экстракте от 0,05 до 0,1% (Рисунок 3).

Образцы термически обработанного молока содержат меньшее количество растворимых сывороточных белков, чем сырое молоко. Также, концентрация растворимых сывороточных белков в молоке зависит от интенсивности тепловой обработки. На Рисунке 5 показано молекулярно-массовое распределение белковых веществ в сывороточной фазе типичных образцов молока с разной интенсивностью тепловой обработки.

Как следует из данных, приведенных на Рисунке 5, содержание растворимых сывороточных белков в образцах молока с разной интенсивностью термической обработки существенно отличается. Для достижения одинакового содержания белка в разведении, при котором достигается одинаковая динамика формирования оптической плотности в суспензии коагулированных сывороточных белков и одинаковая морфология белковых агрегатов, следует применять разные коэффициенты разведений для образцов молока с разной интенсивностью пастеризации.

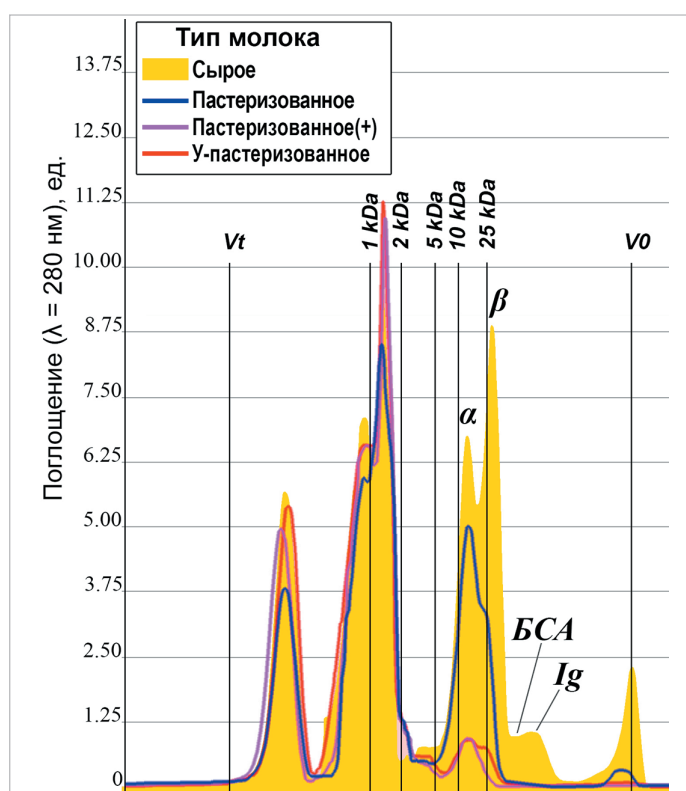


Рисунок 5. Молекулярно-массовое распределение фракции сывороточных белков в образцах молока с разной интенсивностью пастеризации. Обозначения: «Сырое» — сырое молоко, не подвергнутое термической обработке; «Пастеризованное» — пастеризованное молоко с низкой интенсивностью термообработки; «Пастеризованное (+)» — пастеризованное молоко с высокой интенсивностью термообработки; «У-пастеризованное» — ультрапастеризованное молоко; α — альфа-лактоальбумин; β — бета-лактоглобулин; BSA — бычий сывороточный альбумин; Ig — иммуноглобулины

Figure 5. Molecular weight distribution of the whey protein fraction in milk samples with different pasteurization intensity. Designations: "Raw" — raw milk, not subjected to heat treatment; "Pasteurized" — pasteurized milk with low intensity of heat treatment; "Pasteurized (+)" — pasteurized milk with high intensity of heat treatment; "U-pasteurized" — ultra-pasteurized milk. α — alpha-lactalbumin; β — beta-lactoglobulin; BSA — bovine serum albumin; Ig — immunoglobulins

Подобный подход был использован Kuramoto и др. [29], которые в результате работы по повышению воспроизводимости турбидиметрического метода Harland & Ashworth установили, что в зависимости от концентрации белка в образце, в результате коагуляции происходило формирование суспензий с разной структурой. В области высоких концентраций белка наблюдалось формирование крупных хлопьев, быстро выпадающих в осадок, что не позволяло получить стабильную суспензию, сохраняющую свою структуру во время проведения измерений. В области низких концентраций белка изменение концентрации белка практически не приводило к изменению оптической плотности суспензии. Для получения суспензии сывороточных белков, отвечающей требованиям стабильности и линейной зависимости оптической плотности от концентрации, Kuramoto и др. [29] адаптировали разведения образцов в зависимости от содержания в них белка. Для повышения чувствительности метода, было рекомендовано проводить растворение экстрактов сывороточных белков по объему, раствором NaCl в соотношениях 1 + 20 для молока низкого температурного класса и 2 + 10 для молока высокого температурного класса.

Исходя из этого, на следующем этапе исследований был проведен подбор коэффициента разведения ацетатным буфером для образцов молока с разной интенсивностью температурной обработки (сырое, пастеризованное и ультрапастеризованное) с учетом фактического содержания водорастворимых сывороточных белков в образце.

Содержание водорастворимых сывороточных белков в исследованных образцах молока разного типа, с разной интенсивностью термической обработки, а также значения коэффициента разведения, необходимого для получения концентрации белка в образцах на уровне ~ 0,05%, приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Содержание растворимого сывороточного белка в образцах молока с разной интенсивностью термической обработки и при различных разведениях

Table 2. The content of soluble whey protein in milk samples with different intensity of heat treatment and dilutions

Тип молока	Содержание белка (без разведения), %	Коэффициент разведения	Концентрация белка при разведении, %
Сырое (n = 5)	0,64±0,08	1:14	0,05±0,01
Пастеризованное (n = 3)	0,37±0,03	1:7	0,05±0,004
Ультрапастеризованное (n = 7)	0,19±0,04	1:3	0,06±0,01

Примечание: образцы пастеризованного молока с высокой интенсивностью термообработки, имеющие содержание растворимых сывороточных белков менее 0,3%, были исключены из группы «Пастеризованное молоко» и включены в группу «Ультрапастеризованное молоко». n — количество образцов в группе.

Данные приведены в форме «среднее значение ± стандартное отклонение».

Разведение молока в ацетатном буфере с коэффициентом 1:7, согласно методу, описанному Guan et al [25], обеспечивает установление кислотности смеси на уровне 4,6 ед. pH, что гарантирует полное осаждение казеинов и денатурированных сывороточных белков и получение экстракта, содержащего только растворимые сывороточные белки. Такой же эффект достигается и при разведении 1:14. При разведении молока ацетатным буфером в соотношении 1:3 получают кислотность разведения на уровне 4,7±0,04 ед. pH (среднее значение ± стандартное отклонение). Такой уровень pH потенциально может привести к неполному осаждению казеинов и денатурированных сывороточных белков с переходом их в состав экстракта, что может исказить результаты измерения содержания растворимых сывороточных белков турбидиметрическим методом.

Было проведено сравнение эффективности экстракции сывороточных белков при разведениях молока ацетатным буфером в соотношении 1:7 и 1:3. Оценка эффективности экстракции производилась путем сравнения содержания белковых веществ в экстрактах, которое определяли спектрофотометрическим методом, по величине поглощения на длине волны 280 нм [35]. Исследование проводилось на трех образцах термически обработанного молока с разным содержанием растворимых сывороточных белков. Процедура экстракции сывороточных белков из каждого образца молока с оценкой концентрации белковых веществ в экстракте была выполнена в трех повторностях. Оценка влияния факторов «Образец молока» и «Коэффициент разведения» на концентрацию белковых веществ в экстрактах была проведена методом дисперсионного анализа. Результаты дисперсионного анализа представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «Образец молока» и «Коэффициент разведения» на переменную отклика «Концентрация белковых веществ в экстракте»

Table 3. The results of the dispersion analysis of the influence of the factors "Milk sample" and "Dilution coefficient" on the response variable "Protein content in the extract"

Фактор	df	SS	MS	F	p
Milk	2	1,867	0,934	113,9	< 0,000001
Kd	1	0,016	0,016	1,9	0,193955
Milk * Kd	2	0,041	0,020	2,5	0,124678
Error	12	0,098	0,008		

Примечание: df — количество степеней свободы; SS — сумма квадратов вариации; MS — средняя сумма квадратов; F — статистика Фишера; p — уровень значимости.

Обозначения факторов: Milk — образец молока; Kd — коэффициент разведения в ацетатном буфере (1:3 или 1:7).

Error — доля вариации переменной отклика, отнесенная к ошибке.

Результаты дисперсионного анализа, приведенные в Таблице 3, показывают, что имеет место статистически достоверное влияние фактора «Образец молока» ($p < 0,001$) на концентрацию белковых веществ в экстракте. Отсутствует статистически достоверное влияние фактора «Коэффициент разведения» ($p > 0,1$) на концентрацию белковых веществ в экстракте. Это означает, что содержание белковых веществ в экстракте зависит только от содержания белка в образце молока, но не зависит от используемого коэффициента разведения молока в ацетатном буфере (1:3 или 1:7). Визуализация результатов дисперсионного анализа представлена на Рисунке 6.

На основании полученных данных, для реализации турбидиметрического метода с осаждением белков в 12% ТХУ при получении

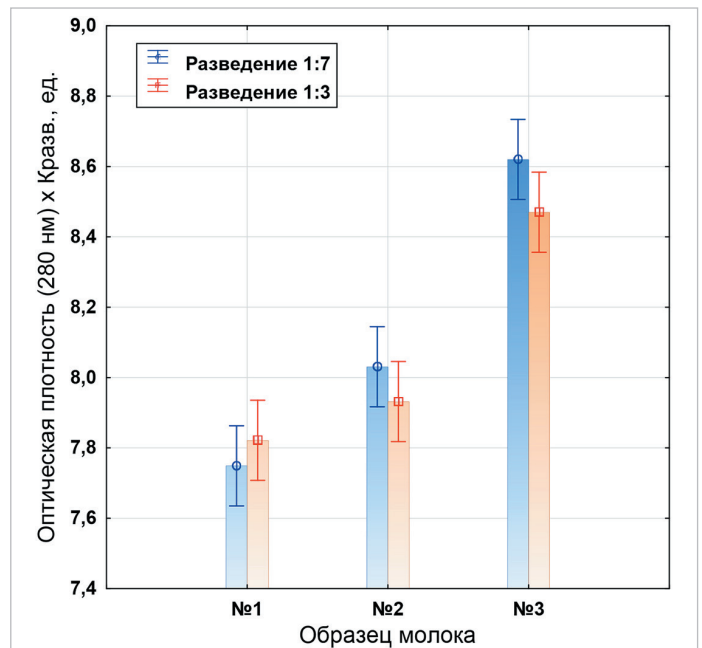


Рисунок 6. Зависимость оптической плотности экстрактов сывороточных белков на длине волны 280 нм, полученных при разной степени разведения молока в ацетатном буфере.

$K_{\text{разв}}$ — коэффициент разведения в ацетатном буфере.

Приведены скорректированные значения оптической плотности, умноженные на коэффициент разведения.

Плankи разброса показывают границы доверительных интервалов для доверительной вероятности $P=0,95$ ($n=3$)

Figure 6. Dependence of the optical density of whey protein extracts at a wavelength of 280 nm obtained with different degrees of dilution of milk in an acetate buffer. $K_{\text{разв}}$ is the dilution coefficient in the acetate buffer. The corrected values of the optical density multiplied by the dilution coefficient are given. The scatter bars show the boundaries of the confidence interval with a 95% confidence level ($n=3$)

экстракта сывороточных белков из молока с помощью ацетатного буфера следует использовать следующие разведения:

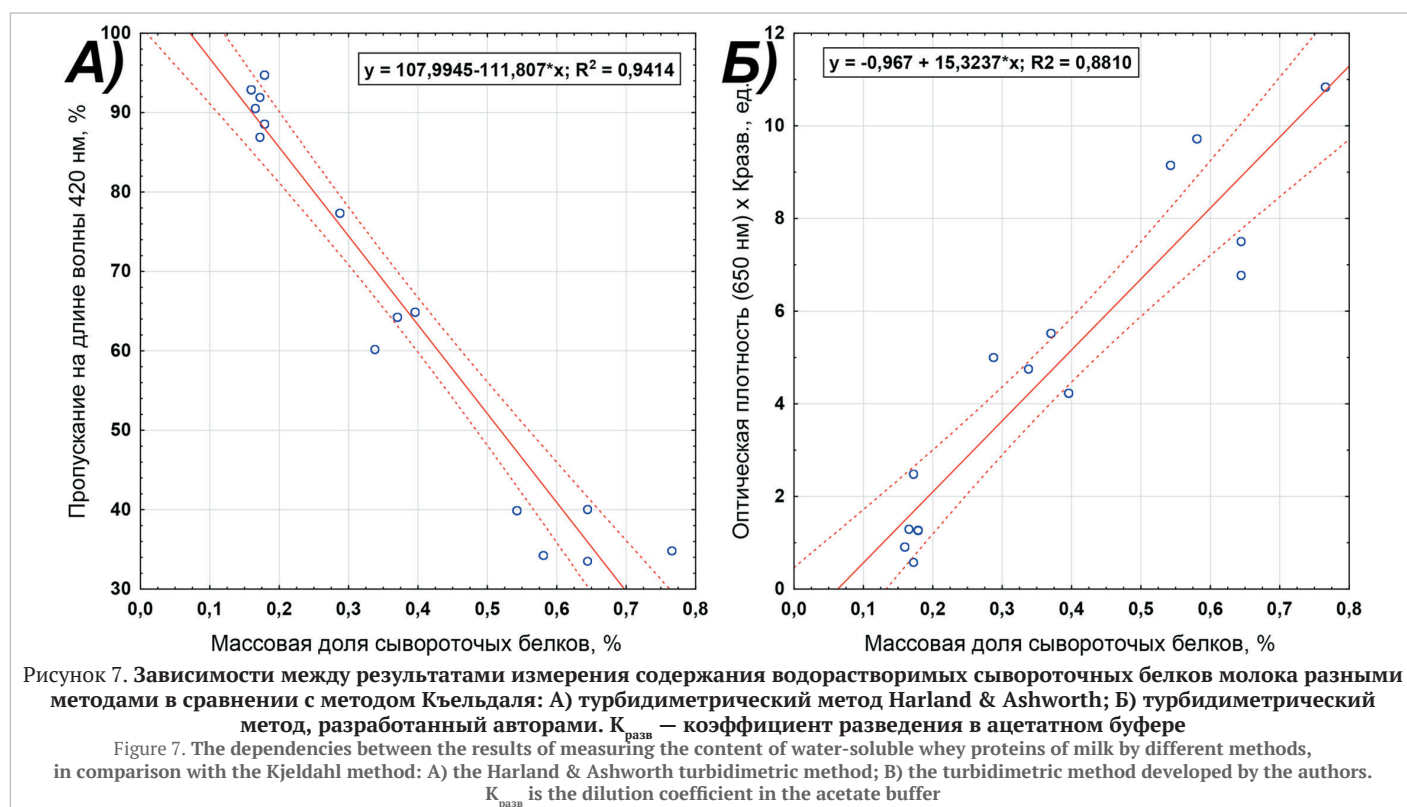
- 1:3 для образцов ультрапастеризованного молока и пастеризованного молока с высокой интенсивностью термообработки, имеющих содержание растворимых сывороточных белков менее 0,3%;
- 1:7 для образцов пастеризованного молока с низкой интенсивностью термообработки, имеющих содержание растворимых сывороточных белков от 0,3% до 0,5%;
- 1:14 для образцов сырого молока, имеющих содержание растворимых сывороточных белков свыше 0,5%.

3.3. Исследование молока с разной интенсивностью тепловой обработки разработанным турбидиметрическим методом

Результаты измерения содержания растворимых сывороточных белков в образцах сырого и термически обработанного молока с помощью турбидиметрического метода Harland & Ashworth по прописи GEA [21] и с помощью турбидиметрического метода, предлагаемого авторами, представлены на Рисунке 7.

Из результатов, представленных на Рисунке 7, можно сделать следующие выводы. Предлагаемый авторами вариант реализации турбидиметрического метода имеет несколько большую погрешность в сравнении с турбидиметрическим методом Harland & Ashworth, о чем говорит меньший коэффициент детерминации регрессионной зависимости ($R^2=0,94$ для метода Harland & Ashworth и $R^2=0,88$ для разработанного метода). При этом точности разработанного метода достаточно для использования его в качестве экспресс-метода контроля в молочной промышленности в заявленных целях: определение интенсивности пастеризации питьевого молока и выявление теплового класса сухого молока. Разработанный турбидиметрический метод имеет следующие преимущества в сравнении с описанным выше турбидиметрическим методом Harland & Ashworth:

- более полное извлечение растворимых сывороточных белков из молока;
- малая продолжительность анализа (не более 15 мин);
- отсутствие потерь влаги из образца при фильтрации;
- меньшее количество лабораторной посуды и оборудования.



Недостатком турбидиметрического метода Harland & Ashworth и его модификаций также является необходимость использования дорогостоящих моделей спектрофотометров, имеющих возможность измерения в режиме «пропускание». Для разработанного турбидиметрического метода применяются более бюджетные модели спектрофотометров или фотоколориметров, способные измерять оптическую плотность только в режиме поглощения.

4. Заключение

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

- в молочной промышленности существует необходимость в наличии метода, позволяющего быстро оценить интенсивность тепловой нагрузки в исследуемом образце молока. В этих целях предложено множество методов измерений, основанных на различных физических принципах;
- недостатками предложенных методов являются или длительное время анализа, или высокая стоимость измерительной аппаратуры. Именно по этой причине метод Harland & Ashworth с модификациями до сих пор востребован как в промышленности, так и в научных исследованиях. Его недостатком является большая длительность анализа (до 45 мин).

На основании проведенных исследований авторами предложен вариант турбидиметрического метода измерения концентрации сывороточных белков, в рамках которого для получения из молока экстракта сывороточных белков осуществляется кислотное осаждение (при pH 4,6) казеинов и денатурированных сывороточных белков с последующей фильтрацией на мембранных фильтрах. В ходе данного процесса получают экстракт, содержащий растворимые сывороточные белки, после чего проводится смешивание указанного экстракта с ТХУ с целью получения конечной концентрации равной

12%. Затем формируется суспензия из денатурированных белков, оптическая плотность которой пропорциональна содержанию растворимых сывороточных белков в экстракте.

Главным вопросом, требующим решения при создании надежного экспрессного турбидиметрического метода, является определение условий формирования суспензии нерастворимых белков, при которых оптическая плотность суспензии будет пропорциональна содержанию белка в образце. Установлено, что такая пропорциональность может быть достигнута при содержании растворимых сывороточных белков в диапазоне от 0,05% до 0,1%. При этом, после денатурации сывороточных белков под действием 12% ТХУ, формирование агрегатов белков завершается через 10 мин после внесения ТХУ. За это время достигается практически полное включение белковых молекул в состав агрегатов.

Для обеспечения содержания в получаемом из молока экстракте растворимых сывороточных белков в диапазоне от 0,05% до 0,1% обосновано использование разных разведений молока ацетатным буфером: 1:3 для образцов ультрапастеризованного молока и пастеризованного молока с высокой интенсивностью термообработки; 1:7 для образцов пастеризованного с низкой интенсивностью термообработки; 1:14 для образцов сырого молока.

Разработанный вариант реализации турбидиметрического метода имеет несколько большую погрешность в сравнении с турбидиметрическим методом Harland & Ashworth. Однако точность предлагаемого турбидиметрического метода достаточна для использования его в целях определения интенсивности пастеризации питьевого молока и оценки теплового класса сухого молока.

Предложенный вариант реализации турбидиметрического метода, в сравнении с методом Harland & Ashworth, обладает большей скоростью выполнения анализа, меньшей трудозатратностью и не требует применения дорогостоящих моделей спектрофотометров, имеющих возможность измерения в режиме «пропускание».

REFERENCES

1. Mandal, R., Bag, S. K., Singh, A. P. (2019). Thermal Processing of Milk. Chapter in a book: Recent Technologies in Dairy Science. Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi, India, 2019.
2. Akkerman, M. (2014). The effect of heating processes on milk whey protein denaturation and rennet coagulation properties. Master Thesis. Department of Food Science, Aarhus University. Retrieved from http://www.library.au.dk/fil-eadmin/www.bibliotek.au.dk/fagsider/jordbrug/Specialer/Marije_-master_thesis.pdf Accessed December 11, 2023.
3. Mahomud, S., Katsuno, N., Nishizu, T. (2017). Role of whey protein-casein complexes on yoghurt texture. *Reviews in Agricultural Science*, 5, 1–12. <https://doi.org/10.7831/ras.5.1>
4. Guinee, T. P. (2021). Effect of high-temperature treatment of milk and whey protein denaturation on the properties of rennet-curd cheese: A review. *International Dairy Journal*, 121, Article 105095. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105095>
5. Barraquio, V. L. (2014). Which milk is fresh? *International Journal of Dairy Processing and Research*, 1(2), 1–6. <https://doi.org/10.19070/2379-1578-140002>
6. Cattaneo, S., Masotti, F., Pellegrino, L. (2008). Effects of overprocessing on heat damage of UHT milk. *European Food Research and Technology*, 226, 1099–1106. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0637-5>
7. International Dairy Federation. (2022). Heat treatment of milk (Bulletin of the IDF n° 516/2022). <https://doi.org/10.56169/XMDR7579>

8. U. S. Dairy Export Council. (2018). Reference Manual for U. S. Milk Powders and Microfiltered Ingredients. Retrieved from https://www.thinkusadairy.org/assets/documents/Customer%20Site/C3-Using%20Dairy/C3.7-Resources%20and%20Insights/02-Product%20Resources/USD5163-US-Milk-Powders_LIVE_Web.pdf Accessed December 20, 2023.
9. van den Oever, S. P., Mayer, H. K. (2021). Analytical assessment of the intensity of heat treatment of milk and dairy products. *International Dairy Journal*, 121, Article 105097. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105097>
10. Chang, S., Zhang, Y. (2017) Protein Analysis. Chapter in book: Food Analysis. Springer International Publishing. 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_18
11. Miralles, B., Bartolomé, B., Amigo, L., Ramos, M. (2000). Comparison of three methods to determine the whey protein to total protein ratio in milk. *Journal of Dairy Science*, 83, 2759–2765. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75171-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75171-X)
12. Melfsen, A., Hartung, E., Haeussermann, A. (2012). Accuracy of milk composition analysis with near infrared spectroscopy in diffuse reflection mode. *Biosystems Engineering*, 112(3), 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.04.003>
13. Etzion, Y., Linker, R., Cogan, U., Shmulevich, I. (2004). Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 87(9), 2779–2788. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73405-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73405-0)
14. Filgueiras, M. F., Borges, E. M. (2022). Quick and cheap colorimetric quantification of proteins using 96-well-plate images. *Journal of Chemical Education*, 99(4), 1778–1787. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00756>
15. Assink Junior, E. J., de Jesus, P. C., Borges, E. M. (2023). Ehey protein analysis using the lowry assay and 96-well-plate digital images acquired using smartphones. *Journal of Chemical Education*, 100(6), 2329–2338. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.2c00830>
16. Jeanson, S., Dupont, D., Grattard, N., Rolet-Répécaud, O. (1999). Characterization of the heat treatment undergone by milk using two inhibition ELISAs for quantification of native and heat denatured α -lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2249–2254. <https://doi.org/10.1021/jf9809232>
17. Lu, Y., Fu, T.-J. (2020). Performance of commercial colorimetric assays for quantitation of total soluble protein in thermally treated milk samples. *Food Analytical Methods*, 13, 1337–1345. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01748-w>
18. Harland, H. A., Ashworth, U. S. (1947). A rapid method for estimation of whey proteins as an indication of baking quality of nonfat dry-milk solids. *Food Research*, 12(3), 247–251. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1947.tb16416.x>
19. Patel, H. A., Anema, S. G., Holroyd, S. E., Singh, H., Creamer, L. K. (2007). Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low-, medium- and high-heat skim milk powders. *Le Lait*, 87(4–5), 251–268. <http://doi.org/10.1051/laite:2007027>
20. Zhao, Z., Corredig, M., Gaygadzhiev, Z. (2019). Short communication: Determination of the whey protein index in milk protein concentrates. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 7760–7764. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16547>
21. GEA Niro analytical methods. (2009). Whey Protein Nitrogen Index. GEA Niro Method No. A 21 a. Retrieved from <https://www.yumpu.com/en/document/read/6894617/whey-protein-nitrogen-index-wpn-gea-niro> Accessed December 20, 2023.
22. Visser, S., Slangen, C. J., Robben, A. J. P. M. (1992). Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 599(1–2), 205–209. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85474-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85474-8)
23. Montgomery, D. C. (2013). Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, United States, 2013.
24. Mahmoud, R., Brown, R. J., Ernstrom, C. A. (1990). Factors affecting measurement of undenatured whey protein nitrogen in dried whey by a modified Harland-Ashworth test. *Journal of Dairy Science*, 73(7), 1694–1699. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78845-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78845-5)
25. Guan, R.-F., Liu, D.-H., Ye, X.-Q., Yang, K. (2005). Use of fluorometry for determination of skim milk powder adulteration in fresh milk. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 6(11), 1101–1106. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B1101>
26. Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J. J., Kumar, T. K. S. (2009). Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein Science*, 18(5), 980–993. <https://doi.org/10.1002/pro.108>
27. Sivaraman, T., Kumar, T. K. S., Jayaraman, G., Yu, C. (1997). The Mechanism of 2,2,2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation. *Journal of Protein Chemistry*, 16(4), 291–297. <https://doi.org/10.1023/A:1026357009886>
28. Lynch, J. M., Barbano D. M., Fleming J. R. (1998). Indirect and direct determination of the casein content of milk by kjeldahl nitrogen analysis: Collaborative study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 81(4), 763–774. <https://doi.org/10.1093/jaoac/81.4.763>
29. Kuramoto, S., Jenness, R., Coulter, S. T., Choi, R. P. (1959). Standardization of the Harland-Ashworth test for whey protein nitrogen. *Journal of Dairy Science*, 42(1), 28–38. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(59\)90520-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(59)90520-X)
30. Silver, F. H., Birk, D. E. (1983). Kinetic analysis of collagen fibrillogenesis: I. Use of turbidity-time data. *Collagen and Related Research*, 3, 393–405. [https://doi.org/10.1016/S0174-173X\(83\)80020-X](https://doi.org/10.1016/S0174-173X(83)80020-X)
31. Mehalebi, S., Nicolai, T., Durand, D. (2008). Light scattering study of heat-denatured globular protein aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(2), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.04.002>
32. Xiao, F., Huang, J.-C. H., Zhang, B.-J., Cui, C.-w. (2009). Effects of low temperature on coagulation kinetics and floc surface morphology using alum. *Desalination*, 237(1–3), 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.12.033>
33. Pearce, K. N., Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716–723. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>
34. Berlin, A. A., Kislenco, V. N., Moldovanov, M. A. (1992). Mathematical model of suspension flocculation kinetics. *Colloid and Polymer Science*, 270, 1042–1045. <https://doi.org/10.1007/BF00655974>
35. Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of protein. Chapter in a book: Methods in Enzymology. V. 182. Guide to Protein Purification. Academic Press, Inc. 1990. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Мягконосов Дмитрий Сергеевич — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, руководитель направления исследований по прикладной биохимии и энзимологии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоседеления и сыродоления 152613, Ярославская область, Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-915-973-63-13 E-mail: d.myagkonosov@fnpcs.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4443-7573 * автор для контактов Топникова Елена Васильевна — доктор технических наук, заместитель директора по научной работе, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоседеления и сыродоления 152613, Ярославская обл., Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-910-666-93-93 E-mail: topnikova.l@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0225-6870 Абрамов Дмитрий Васильевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель направления биохимических исследований по сыродолению и маслоседелению, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоседеления и сыродоления 152613, Ярославская область, Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-910-970-42-97 E-mail: d.abramov@fnpcs.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8326-1932 Кашникова Ольга Геннадьевна — младший научный сотрудник, отдел физической химии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоседеления и сыродоления 152613, Ярославская обл., Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-962-200-14-15 E-mail: o.kashnikova@fnpcs.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7557-835	Dmitry S. Myagkonosov, Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher, Head of Research Department in Applied Biochemistry and Enzymology, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-915-973-63-13 E-mail: d.myagkonosov@fnpcs.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4443-7573 * corresponding author Elena V. Topnikova, Doctor of Technical Sciences, Deputy Director for Research, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, 152613, Yaroslavl Region, Uglich, Russia Tel.: +7-910-666-93-93 E-mail: topnikova.l@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0225-6870 Dmitry V. Abramov, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Head of Biochemical Research in Cheesemaking and Buttermaking, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-910-970-42-97 E-mail: d.abramov@fnpcs.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8326-1932 Olga G. Kashnikova, Junior researcher, Department of Physical Chemistry, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-962-200-14-15 E-mail: o.kashnikova@fnpcs.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7557-6835
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.