

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-3-481-490>

Поступила 12.08.2024

Поступила после рецензирования 27.09.2024

Принята в печать 30.09.2024

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

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

Обзорная статья

Open access

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ИНТЕНСИВНОСТИ ТЕПЛОВОЙ НАГРУЗКИ ПРИ ПАСТЕРИЗАЦИИ МОЛОКА

Топникова Е. В., Мягконосов Д. С.*, Абрамов Д. В., Кашникова О. Г.

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

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

пастеризация, тепловая обработка, сывороточные белки, реакция Майяра, флюориметрия

Предложен метод определения интенсивности тепловой нагрузки при пастеризации молока основанный на преобразовании содержащихся в молоке продуктов начальной стадии реакции Майяра (лактозилированных аминокислот) в интенсивно окрашенные продукты финальной стадии реакции Майяра (меланоиды). Интенсивность окраски продуктов измеряют колориметрически. Для проведения анализа из молока изготавливают очищенный от свободной лактозы препарат казеина, высушивают его и измельчают до частиц размером 500–800 мкм. Препарат казеина выдерживают при 100 °С в течение 5 ч для формирования меланоидов. Измеряют интенсивность окрашивания препаратов казеина по цветовой шкале CIE $L^* a^* b^*$ и вычисляют критерий общего отличия ΔE по величине цветовых критериев $L^* a^* b^*$ до и после тепловой обработки препаратов казеина. Проведенные исследования образцов пастеризованного молока подтвердили физическую природу окрашивания порошков казеина, состоящую в наличии в них меланоидов, содержание которых было пропорционально интенсивности пастеризации образцов молока.

Received 12.08.2024

Accepted in revised 27.09.2024

Accepted for publication 30.09.2024

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

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

Review article

Open access

COLORIMETRIC METHOD FOR ESTIMATING THE INTENSITY OF HEAT LOAD DURING MILK PASTEURIZATION

Elena V. Topnikova, Dmitry S. Myagkonosov*, 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, Maillard reaction, fluorimetry

ABSTRACT

The authors proposed a method for determining the intensity of heat load during milk pasteurization based on the transformation of the products of the initial stage of the Maillard reaction (lactosylated amino acids) contained in milk into intensely colored products of the final stage of the Maillard reaction (melanoides). The color intensity of products is measured by the colorimetric method. To carry out the analysis, a casein preparation purified from free lactose is made from milk, dried and crushed into particles with a size of 500–800 microns. The casein preparation is kept at 100 °C for 5 hours to form melanoides. The color intensity of casein preparations is measured on the CIE $L^* a^* b^*$ color scale and the criterion of total color difference ΔE is calculated by the value of the $L^* a^* b^*$ color criteria before and after heat treatment of casein preparations. The conducted studies of pasteurized milk samples confirmed the physical nature of the coloration of casein powders, consisting in the presence of melanoides in them, the content of which was proportional to the intensity of pasteurization of milk samples.

1. Введение

В промышленном производстве питьевого молока в основном используются следующие технологии тепловой обработки: высокотемпературная кратковременная пастеризация (72 °С, 30 с — 80 °С, 15 с), ультрапастеризация (135 °С, 10 с — 150 °С, 1 с), стерилизация в таре (110 °С, 20 мин — 125 °С, 3 мин). Учитывая важность сохранения от разрушительного действия температуры веществ молока для повышения его биологической ценности, в производстве питьевого термически обработанного молока в последние годы начала получать распространение технология Extended Shelf Life (ESL). Она предполагает бактофугирование и пастеризацию, микрофильтрацию и пастеризацию, либо одноступенчатую ультравысокотемпературную (УВТ)-обработку (120 °С, 10 сек или 140 °С, 1 сек) в сочетании с асептической упаковкой [1,2].

Тепловая обработка молока, наряду с обеспечением микробиологической безопасности продукта, направлена на увеличение срока хранения, что повышает вероятность его продажи и исключает риск порчи продукта до его потребления покупателем. Это позволяет снизить количество выбрасываемой и теряемой пищи, что является глобальной мировой задачей, выполняемой под эгидой ООН. Поиск способов увеличения срока годности молока, отвечающих требованиям безопасности, привел к постоянному росту производства молока с повышенными сроками годности (стерилизованного, ультрапастеризованного и ESL) начиная с 1960-х годов [3].

Ультравысокотемпературная (УВТ) технология должна совмещать требования максимального снижения бактериальной обсемененности при минимальном разрушении витаминов и других ценных веществ молока. При производстве ультрапастеризованного молока под действием температуры происходят и нежелательные реакции, ведущие к снижению его биологической ценности: денатурация сывороточных белков, лактозилирование белков, ведущее к потере незаменимой аминокислоты лизин, дефосфорилирование, деаминирование, формирование комплексов денатурированных белков в процессе хранения (повышение вязкости продукта), образование не перевариваемой в организме лактулозы, разрушение витаминов (по большей части витамина С и фолиевой кислоты), переход солей молока в нерастворимое состояние [4,5]. Желирование УВТ-молока в процессе хранения связано с полимеризацией казеинов и сывороточных белков в ходе реакции Майяра, а также со снижением поверхностного заряда молекул казеина [6].

Реакция Майяра, проявляющаяся в образовании комплексов между лактозой и аминокислотами аминокислот, начинает протекать при термообработке УВТ-молока и продолжает развиваться в процессе его хранения [7]. Исходя из этого, важно минимизировать реакцию Майяра на стадии производства. Снизить интенсивность тепловой обработки возможно, в т. ч. за счет использования аппаратов с прямым контактным нагревом молока паром. Инновационная технология прямого нагрева паром (Innovative steam injection (ISI)) сочетает более высокую температуру (150–200 °С) при коротком

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Топникова, Е. В., Мягконосов, Д. С., Абрамов, Д. В., Кашникова, О. Г. (2024). Колориметрический метод оценки интенсивности тепловой нагрузки при пастеризации молока. *Пищевые системы*, 7(3), 481–490. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-3-481-490>

FOR CITATION: Topnikova, E. V., Myagkonosov, D. S., Abramov, D. V., Kashnikova, O. G. (2024). Colorimetric method for estimating the intensity of heat load during milk pasteurization. *Food Systems*, 7(3), 481–490. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-3-481-490>

времени воздействия (менее 0,1 секунды) в сравнении с традиционными режимами [8].

Прямой нагрев паром, несмотря на минимизацию разрушения полезных веществ молока, характеризуется более низкой энергетической эффективностью по сравнению с косвенным нагревом. При косвенном нагреве возврат тепловой энергии составляет более 90%, а при прямом нагреве — не более 50%. Поэтому системы УВТ-обработки с теплообменниками, более разрушительно действующие на полезные вещества молока, имеют более широкое применение. Несмотря на меньшую долю рынка, стерилизация в таре (стеклянные бутылки) продолжает использоваться в производстве молока длительного хранения. Это обусловлено, в первую очередь, экономической выгодой: стоимость оборудования для стерилизации ниже, чем для производства ультрапастеризованного молока [3].

Важно контролировать интенсивность тепловой нагрузки при производстве УВТ-молока. Для этого предложено использовать интегрированную оценку температурно-временного воздействия (time temperature integrator (TTI)) [9]. Индикаторы I типа включают компоненты молока, разрушающиеся при температурном воздействии (белки, витамины, ферменты). Индикаторы II типа включают вещества, изначально отсутствующие в молоке и формирующиеся в результате теплового воздействия (продукты реакции Майяра, продукты изомеризации лактозы). Более эффективную оценку интенсивности теплового воздействия на молоко можно получить при комплексном сравнении индикаторов двух типов.

Для контроля тепловой нагрузки при промышленном производстве молока предлагается использовать оценку содержания различных веществ, относящихся к ТП первого и второго типов. Данный подход исследуется различными научными группами. Подробный обзор методов оценки тепловой нагрузки имеется в недавних обзорах [10,11].

Часто исследователи предлагают использовать только 3 показателя тепловой нагрузки, связанные с содержанием химических веществ разной природы: содержание неденатурированных белков сыворотки, фурузина и лактулозы [12,13].

Наиболее универсальным критерием оценки величины тепловой нагрузки можно считать содержание фурузина, который формируется в молоке в широком диапазоне температурного воздействия [14]. Содержание фурузина коррелирует с содержанием лактулозы ($r^2 > 0,99$) [15]. При этом лактулоза отсутствует в пастеризованном молоке [7].

Перспективным направлением является комбинированный спектрофлуориметрический метод, позволяющий одновременно определять содержание как растворимых сывороточных белков (по интенсивности флуоресценции триптофана), так и продуктов реакции Майяра (по интенсивности флуоресценции производных пиррола и имидазола) [16,17,18,19].

По результатам обзора литературы можно сделать вывод, что к настоящему времени разработано и применяется множество методов измерения тепловой нагрузки, основанных на разных критериях оценки. Однако такие методы, как правило, требуют дорогостоящей аппаратуры, высокой квалификации персонала, а также зачастую отличаются длительностью выполнения анализа. Имеется необходимость в быстром и малозатратном методе инструментального контроля интенсивности тепловой нагрузки для пастеризованного, ультрапастеризованного и стерилизованного молока. Ранее авторами был предложен быстрый и простой в реализации турбидиметрический метод для оценки тепловой нагрузки при пастеризации молока [20]. Недостатком указанного метода является его низкая чувствительность применительно к образцам молока с высокой степенью тепловой нагрузки, которые содержат малое количество растворимых сывороточных белков. Метод, основанный на оценке содержания продуктов начальной стадии реакции Майяра, будет лишен этого недостатка и позволит проводить объективную оценку интенсивности тепловой нагрузки для образцов молока в широком диапазоне температур тепловой обработки.

Возможным вариантом реализации такого быстрого и малозатратного метода оценки интенсивности тепловой нагрузки является применение подхода, основанного на преобразовании лактозилированных аминокислот в окрашенные продукты поздней стадии реакции Майяра (меланоиды), интенсивность окрашивания которых будет пропорциональна их содержанию в продукте. По интенсивности окрашивания можно будет судить об интенсивности тепловой обработки молока. Этот подход может стать альтернативой традиционной практикующему методу перевода продуктов ранней стадии реакции Майяра посредством кислотного гидролиза в фурузин с последующим анализом методом высокоэффективной

жидкостной хроматографии [21,22], либо методом капиллярного электрофореза [23,24].

Оценка интенсивности реакции Майяра по интенсивности окрашивания образцов была проведена в работе Gómez-Narváez et al. [25]. В работе оценивали содержание фурузина, гидроксиметилфурурола и интенсивность окрашивания образцов при нагревании лиофильно высушенных порошков сыворотки (~11% белка, ~78% лактозы) при температуре 60, 75 и 90 °C и при продолжительности от 2 до 40 мин. Было установлено, что интенсивность окрашивания образцов, определяемая по цветовой шкале CIE L* a* b*, была пропорциональна температуре и продолжительности теплового воздействия и резко возрастала при повышении температуры от 75 до 90 °C. Более высокая концентрация в образцах продуктов начальной и промежуточной стадии реакции Майяра, таких как фурузин и гидроксиметилфурурол, приводила к более высокому выходу окрашенных компонентов. Показатели окрашивания L* a* b* слабо коррелировали с содержанием продукта начальной стадии реакции Майяра — фурузина ($r < 0,65$) — и при этом сильно коррелировали с содержанием гидроксиметилфурурола — продукта промежуточной стадии реакции Майяра ($r > 0,80$).

Результаты, полученные в работе Gómez-Narváez et al. [25], были основаны на системах, содержащих лактозу. В связи с этим в процессе тепловой обработки образцов происходили как реакции формирования продуктов начальной стадии реакции Майяра за счет реакции аминокислот с аминокислотами с лактозой, так и реакции, ведущие к преобразованию лактозилированных аминокислот в окрашенные продукты поздней стадии реакции Майяра. Тепловая обработка извлеченных из молока белков после предварительной их очистки от свободной лактозы позволит провести реакцию формирования меланоидов только из содержащихся в молоке лактозилированных белков, которая будет пропорциональна интенсивности тепловой нагрузки при пастеризации молока. Такой подход находит подтверждение в работах Rizzi [26], Burton [27], van Boekel [28] и ряда других исследователей, указывающих на пропорциональную зависимость между количественным содержанием продуктов начальной стадии реакции Майяра (лактозилированных аминокислот) и образующихся из них на финальной стадии реакции Майяра меланоидов.

На основании этого была выдвинута гипотеза о том, что оценку содержания продуктов начальной стадии реакции Майяра в молоке можно провести через их перевод из изначально бесцветного состояния в форму продуктов финальной стадии реакции Майяра, имеющих интенсивную окраску, которую можно измерить с помощью специальных приборов (колориметров).

Предлагаемый колориметрический метод оценки тепловой нагрузки может быть использован в целях:

- объективного контроля тепловой нагрузки на молоко при работе оборудования, что необходимо для контроля и наладки технологического процесса производства в целях поддержания качества выпускаемой продукции [2,29];
- идентификации и разделения 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 [30];
- определения наличия примеси в питьевом молоке повторно пастеризованного молока («сверхпастеризация» — признак возврата из торговли и повторной пастеризации) [31].

Целью настоящего исследования является разработка простого колориметрического метода для определения интенсивности тепловой обработки молока. Метод основан на оценке содержания продуктов ранней стадии реакции Майяра и не требует сложного дорогостоящего оборудования.

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

В работе были использованы образцы сырого молока (3 образца от одного поставщика-производителя — ООО «АгриВолга» (Ярославская область, Угличский район, д. Бурмасово)), а также приобретенные в розничной торговле образцы пастеризованного молока (6 образцов от 5 разных производителей) и ультрапастеризованного молока (15 образцов от 9 разных производителей).

Для анализов использовали хинин безводный (Sigma-Aldrich, Швейцария). Прочие использованные реактивы имели квалификацию «хч».

2.2. Методы

2.2.1. Методы исследования фракции сывороточных белков молока

Массовую долю сывороточных белков молока, получаемую после осаждения казеиновой фракции молока раствором уксусной кислоты и отделения осадженного казеина с помощью фильтрации, определяли методом Кьельдаля по ГОСТ 34536-2019¹.

Содержание сывороточных белков в пробе для измерения флуоресценции проводили спектрофотометрическим методом по величине поглощения на длине волны 280 нм [32]. Оптическую плотность образцов измеряли в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 10 мм на спектрофотометре PB2201 (ЗАО «Спектроскопия, оптика и лазеры — авангардные разработки», Республика Беларусь). Содержание сывороточных белков рассчитывали по методу Mahmoud et al [33] с помощью построенной калибровочной зависимости между величиной оптической плотности и содержанием сывороточных белков молока, определенным по ГОСТ 34536-2019.

2.2.2. Методы исследования флуоресценции

Измерение флуоресценции проводили в экстрактах сывороточных белков. Для приготовления экстракта молоко смешивали в соотношении 1:10 с 0,1 N ацетатным буфером, имеющим pH 4,6. Смесь выдерживали для формирования хлопьев в течение 10–15 мин, после чего фильтровали на фильтровальной бумаге «тип 102» (стандарт КНР GB/T 1914-2007²), а затем на фильтре из нейлона с размером пор 0,45 мкм (Tianjin Jinteng Experiment Equipment Co., Ltd, КНР). Приготовление пробы для измерения флуоресценции и измерение флуоресценции проводили по методу Morales et al. [34]: фильтрат из сыворотки разводили деионизированной водой в соотношении 1:10 в целях получения оптически прозрачного образца. Измерения проводились при длине волны возбуждающего излучения (excitation wavelength) 347 нм и при длине волны испускаемого флуоресцентного излучения (emission wavelength) 415 нм при размере спектральной щели 2 нм. Для получения сравнимого результата измерений, не зависящего от марки используемого спектрофлуориметра, величину флуоресценции на приборе стандартизировали с помощью раствора хирина сульфата концентрации 0,2 мг/дм³ [35]. Измерения проводили на спектрофлуориметре SFR100 (BAIRD-ATOMIC, Великобритания) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 10 мм. Результат рассчитывали как среднее по трем последовательным результатам измерений.

2.2.3. Методы исследования окрашивания

Измерение интенсивности окрашивания препаратов казеина проводили в цветовом пространстве CIE $L^* a^* b^*$ [36] при помощи колориметра модели NR20XE (SHENZHEN THREEEN TECHNOLOGY CO., LTD, Китай) с оптической геометрией сенсора 45°/0° (где 45° — угол осветителя относительно образца; 0° — угол сенсора относительно образца), апертурой измерения 20 мм и стандартом освещения D65 («искусственный солнечный свет»). Для измерения окрашивания порошок препарата казеина помещали в измерительную приставку из комплекта для измерителя белизны WSB-1 (JVLAB, Китай), имеющую геометрию кюветы для образца: диаметр 21 мм, глубина 4 мм. Порошок выравнивали при помощи шпателя.

Величину общего цветового отличия ΔE рассчитывали по формуле [37]:

$$\Delta E = \sqrt{(L_1^* - L_0^*)^2 + (a_1^* - a_0^*)^2 + (b_1^* - b_0^*)^2} \quad (1),$$

где L^* — интенсивность светлого тона;

a^* — интенсивность красного тона окрашивания;

b^* — интенсивность желтого тона окрашивания.

Нижними индексами «1», отмечены показатели образцов препаратов казеина после тепловой обработки, индексами «0» — показатели образца сравнения.

2.2.4. Микроскопические исследования

Микроскопические исследования препаратов казеина проводили методом световой микроскопии в отраженном свете. Фотоснимки были сделаны на цифровую фотокамеру Canon EOS600D. Коррекцию фотографий производили с помощью программного пакета Digital Photo Professional software v.4.5 (Canon Inc., Япония).

2.2.5. Процесс тепловой обработки молока

Тепловую обработку молока, в соответствии с планом эксперимента, проводили следующим образом. Сырое молоко обезжиривали на сепараторе-сливкоотделителе для получения обезжиренного

молока с массовой долей жира около 0,05%. Полученное молоко подвергали термической обработке при режиме, определенных планом эксперимента. Молоко в количестве 100 см³ помещали в конические колбы номинальным объемом 100 см³ и нагревали на кипящей водяной бане до требуемой температуры. После установления температуры колбы переносили на водяную баню UT-4300 («ПромЭкоЛаб», Россия) и выдерживали необходимое время при температуре пастеризации. После завершения пастеризации молоко быстро охлаждали на водяной бане со льдом до температуры около 40 °С. Температуру образцов в процессе термообработки контролировали при помощи цифрового термометра Hanna CheckTemp HI 98501 (Hanna Instruments Inc., США).

2.2.6. Приготовление очищенных от лактозы препаратов казеина

Из термически обработанных образцов молока готовили очищенные от лактозы препараты казеина. Для этого сначала выделяли казеин из молока: 40 см³ молока переносили в центрифужную пробирку объемом 50 см³, добавляли 4 см³ 10%-й уксусной кислоты, перемешивали и центрифугировали при 6 000 g в течение 5 мин. Надосады сливали, а казеиновый осадок промывали деионизированной водой. Для этого в стакан с осадком доливали воду, доводя массу содержимого центрифужной пробирки до 45,0±0,1 г. Содержимое пробирки гомогенизировали на диспергаторе ULTRA-TURRAX T 18 digital (IKA, Германия) при 15 000 об/мин в течение 0,5–1 мин. Массу стакана с содержимым доводили до 45,0±0,1 г и центрифугировали при 6 000 g в течение 5 мин. Надосады отбрасывали. Проводили три цикла промывания. Получали очищенный от свободной лактозы казеиновый стусок. Необходимое количество циклов промывания было установлено на предыдущей серии экспериментов (данные не приведены).

Промытый казеиновый стусок высушивали в сушильном шкафу под током воздуха при температуре 40 °С в течение 2 ч. Высушенный казеин размалывали на ручной мельнице R3 Coffee Grinder (MHW-3BOMBER, Китай) с установленным зазором жерновов ~0,8 мм. Полученный порошок казеина просеивали через сито с размером пор 850 мкм, а просеянный порошок — через сито с размером пор 300 мкм. Фракцию размером менее 300 мкм отбрасывали.

2.2.7. Процесс тепловой обработки препаратов казеина и измерение окрашивания

Для компенсации влияния конструкции нагревательных шкафов на интенсивность нагревания образцов и их окрашивания, каждый образец препарата казеина разделяли на две части. Тепловую обработку препаратов казеина проводили с выдерживанием в шкафах двух разных марок: СНОЛ-3,5.3,5.3,5/3,5-И5М (НПФ Термикс, Россия) и ГП-20-Ох ПЗ (Касимовский приборный завод, Россия). Величину общего цветового отличия ΔE рассчитывали как среднее значение уровней цветового отличия (ΔE) образцов, термически обработанных в двух разных шкафах.

2.2.8. Методы статистического анализа

Исследование было проведено по плану полного факторного эксперимента: в качестве влияющих факторов были взяты две непрерывных переменных «Температура» и «Продолжительность нагревания», значения которых варьировали на трех уровнях.

План эксперимента приведен в Таблице 1.

Таблица 1. План эксперимента

Table 1. Experimental design

Температура, °С	Продолжительность нагревания, мин
75	0,5
	5,5
	10,5
85	0,5
	5,5
	10,5
95	0,5
	5,5
	10,5

Выбор диапазонов температурно-временного воздействия был сделан исходя из применяемых в промышленности режимов тепловой обработки молока. В частности, режим 75 °С 0,5 мин используется при производстве питьевого пастеризованного молока, режим 85 °С 5 мин при — на стадии тепловой обработки, проводимой при производстве сухого цельного молока, 95 °С 10 мин — при тепловой обработке молока, предназначенного для изготовления йогурта [3].

¹ ГОСТ 34536-2019 Молоко и молочная продукция. Определение массовой доли сывороточных белков методом Кьельдаля. М.: Стандартинформ, 2019. — 8 с.

² GB/T 1914-2007. Chemical analytical filter paper. National Standards of People's Republic of China.

Эксперимент был выполнен в трех повторностях. Математическая обработка данных осуществлялась с применением программных пакетов Microsoft Excel и Statsoft Statistica (v. 5.5). Оценку влияния факторов «Температура» и «Продолжительность нагревания» на переменные отклика проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Оценку отличия по окрашиванию между вариантами препаратов казеина проводили методом однофакторного дисперсионного анализа методом парных сравнений Тьюки. Достоверность отличий сравниваемых вариантов принималась при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Тепловая обработка молока

Динамика изменения температуры образцов молока при нагревании и охлаждении приведена на Рисунке 1. Образцы молока были подвергнуты тепловой обработке в соответствии с планом эксперимента (Таблица 1). Температура образцов на этапе выдержки в водяной бане варьировала в диапазоне не более $\pm 0,7^\circ\text{C}$ от номинальной температуры, предусмотренной планом эксперимента. Динамика нагревания и охлаждения образцов зависела от целевой температуры пастеризации. В частности, температура 75°C достигалась за время не более 3 мин, температура 85°C — за время $< 4,5$ мин, температура 95°C — за время < 7 мин (Рисунок 1 А). Продолжительность охлаждения образцов варьировала в меньшей степени (Рисунок 1 Б).

3.2. Микроскопические исследования препаратов казеина

Однородность образцов по размерам частиц является необходимым условием получения сравнимых результатов при оценке цветового тона и интенсивности окрашивания образцов, имеющих форму порошка [37,38]. Однородность состава препарата казеина контролировали с помощью микроскопа. Фото внешнего вида частиц препаратов казеина, полученное под микроскопом, представлено на Рисунке 2.

Полученные порошки препаратов казеина имели однородную структуру. Размер основной доли частиц находился в диапазоне от 500 до 800 мкм. Таким образом, требование по однородности структуры порошкообразных материалов, необходимых для получения сравнимых результатов при их колориметрическом анализе, было достигнуто.

3.3. Тепловая обработка препаратов казеина

Для преобразования содержащихся в составе препаратов казеина лактозилированных групп аминокислот, являющихся продуктом начальной стадии реакции Майяра в меланоиды, являющиеся продуктами финальной стадии реакции Майяра, препараты казеина подвергали нагреванию до температуры 100, 125 или 150°C , с последующим выдерживанием в нагретом состоянии.

В процессе экспериментов была проведена оценка влияния температуры 100, 125 и 150°C на динамику изменения окрашивания

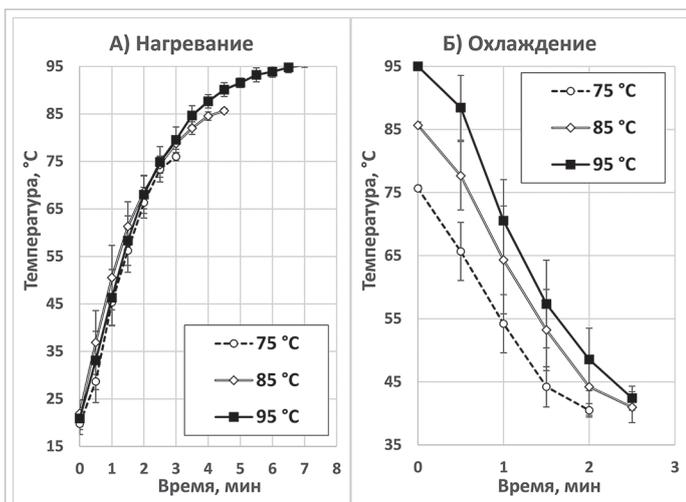


Рисунок 1. Динамика изменения температуры при нагревании образцов до достижения температуры пастеризации и охлаждении образцов. Данные представлены в формате «среднее \pm стандартное отклонение» ($n = 3$)

Figure 1. Dynamics of the change in temperature upon heating the samples to the pasteurization temperature and cooling the samples. Data are presented as mean \pm standard deviation ($n = 3$)

препаратов казеина, оцениваемому по критерию ΔE (общее цветовое отличие). При расчете ΔE , в качестве образца сравнения использовался тот же самый препарат казеина не подвергнутый тепловой обработке. Динамика изменения окрашивания образцов, выдерживаемых при разных температурах в течение 5 ч, представлена на Рисунке 3.

Режимы, с выдерживанием при 125°C и 150°C были отклонены, т. к. при таких температурах происходило изменение окрашивания (побурение) препаратов казеина, полученных из сырого молока. Поскольку казеин из сырого молока не содержит в себе аминокислот с лактозилированными группами, то его побурение не может происходить вследствие реакции Майяра. Причиной побурения, вероятно, является процесс окисления кислородом (обугливание). По этой причине для инициации реакции Майяра была выбрана температура 100°C , при которой изменения окрашивания препарата казеина из сырого молока после 1 ч выдержки не происходит (статистически достоверные отличия по уровню ΔE между разными временными точками отсутствуют на уровне значимости $p < 0,05$). Незначительное изменение окрашивания препаратов казеина после 1 ч выдержки при 100°C связано с выпариванием остаточной влаги из образца.

Для препарата казеина, полученного из ультрапастеризованного молока, окрашивание стабилизируется к 4 ч. Отсутствует статистически достоверное отличие по величине ΔE образцов казеина после 4 и 5 ч выдержки при 100°C (тест Тьюки, $p < 0,05$). Для получения надежного результата формирования окрашивания при 100°C была выбрана продолжительность тепловой обработки образцов, равная 5 ч.

3.4. Исследование показателей пастеризованного молока

Изготовленные согласно плану эксперимента (Таблица 1) образцы пастеризованного молока были исследованы на содержание растворимых сывороточных белков, на величину флуоресценции продуктов промежуточной стадии реакции Майяра и на интенсивность окрашивания препаратов казеина, выделенных из этих образцов молока.

Для формирования окрашивания препараты казеина были выдержаны в сушильном шкафу в течение 5 ч при 100°C в соответствии с процедурой, описанной в разделе 2.2.7. Внешний вид препаратов казеина, полученных из образцов пастеризованного молока до и после выдержки при 100°C представлен на Рисунке 4.

Для установления влияния факторов эксперимента на переменные отклика, являющиеся индикаторами тепловой нагрузки (содержание растворимых сывороточных белков, содержание флуоресцирующих продуктов промежуточной стадии реакции Майяра, интенсивность окрашивания препаратов казеина), был проведен дисперсионный анализ данных. Результаты дисперсионного анализа представлены в Таблице 2.

Графики, визуализирующие влияние факторов эксперимента на переменные отклика, представлены на Рисунке 5.

Прямая (линейная) зависимость индикатора тепловой нагрузки от температуры и продолжительности теплового воздействия свидетельствует о точной оценке интенсивности термообработки, даваемой данным индикатором. Наличие квадратичной (нелинейной) зависимости указывает на искаженную связь между характеристикой уровня тепловой нагрузки, даваемой данным индикатором, и реальным уровнем тепловой нагрузки. На основании результатов дисперсионного анализа, приведенных в Таблице 2, можно сделать выводы о точности исследованных индикаторов тепловой нагрузки.

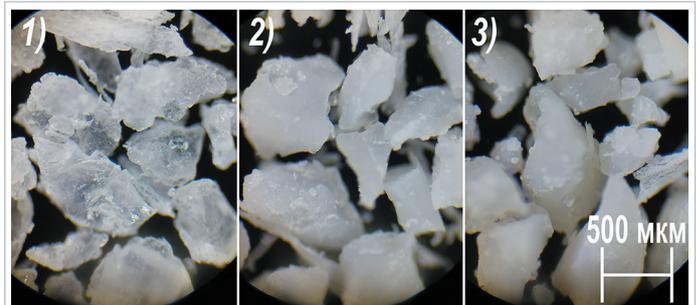


Рисунок 2. Внешний вид частиц в препаратах казеина, полученных: 1) из сырого обезжиренного молока; 2) из пастеризованного молока; 3) из ультрапастеризованного молока

Figure 2. Appearance of particles in the casein preparations obtained: 1) from raw nonfat milk; 2) from pasteurized milk; 3) from ultrapasteurized milk

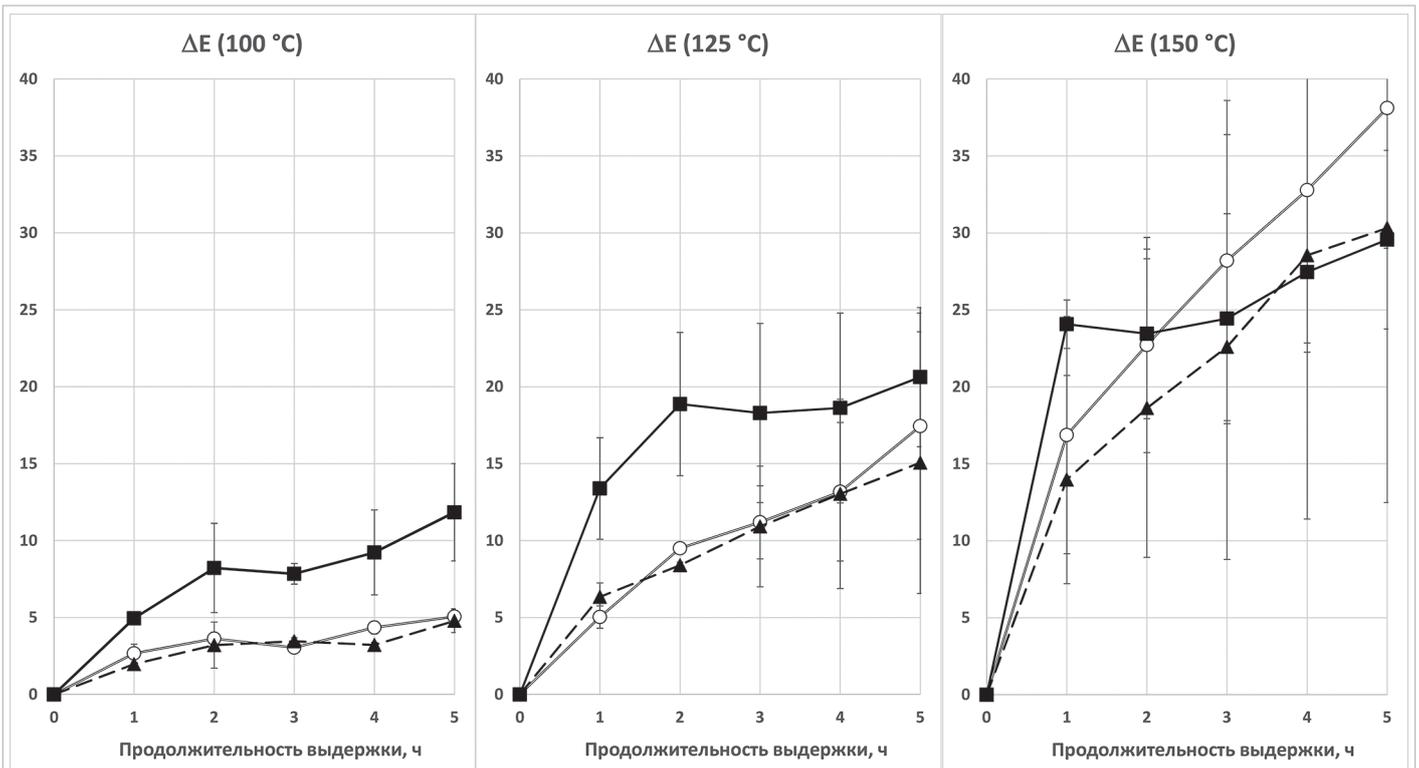


Рисунок 3. Динамика изменения окрашивания препаратов казеина, полученных из сырого (○), пастеризованного (▲) и ультрапастеризованного молока (■), оцениваемая по критерию ΔE (общее цветовое отличие). Данные представлены в формате «среднее ± стандартное отклонение» (n = 3)
 Figure 3. Dynamics of the change in coloration of the casein preparations obtained from raw (○), pasteurized (▲) and ultrapasteurized (■) milk assessed by the criterion ΔE (total color difference). Data are presented as mean ± standard deviation (n = 3)

Для всех переменных отклика, используемых в качестве индикаторов тепловой нагрузки, отмечается сильное статистически достоверное ($p < 0,001$) влияние линейных эффектов факторов «Температура» (Temperature (L)) и «Время» (Time (L)). Оценка силы влияния факторов по сумме квадратов отклонений показывает, что фактор «Температура» (Temperature (L)) влияет на переменные отклика сильнее, чем фактор «Время» (Time (L)). Это означает, что все три индикатора тепловой нагрузки чувствительнее реагируют на изменение температуры, чем на продолжительность нагревания.

Статистически значимый линейный эффект фактора «Время» (Time (L)) означает, что содержание продукта реакции изменяется со временем. Статистически значимый линейный эффект фактора «Температура» (Temperature (L)) указывает на то, что температура статистически достоверно влияет на скорость реакции.

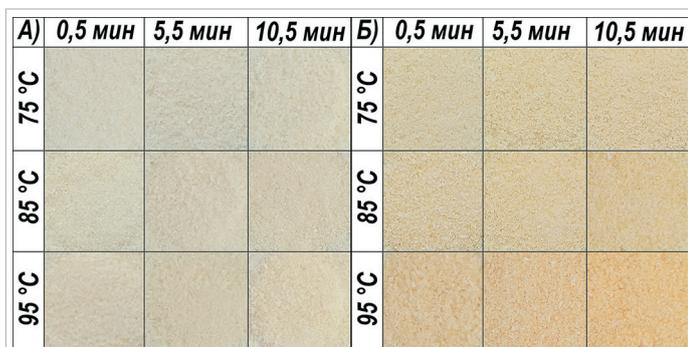


Рисунок 4. Внешний вид препаратов казеина, полученных из образцов пастеризованного молока: А) исходный вид; Б) вид после тепловой обработки при 100 °C в течение 5 ч. Группировка образцов: в строках — по температуре пастеризации молока, в столбцах — по продолжительности пастеризации молока
 Figure 4. Appearance of the casein preparations obtained from the samples of pasteurized milk: А) initial appearance; Б) appearance after thermal treatment at 100 °C for 5 hours. Grouping of the samples: in rows — by temperature of milk pasteurization, in columns — by time of milk pasteurization

Статистически значимый квадратичный эффект фактора «Время» (Time (Q)) означает, что содержание продукта реакции изменяется со временем с ускорением или с замедлением. Отсутствие влияния фактора Time (Q) на переменные отклика, установленное в результате дисперсионного анализа, указывает, что при постоянной температуре уровни рассматриваемых индикаторов тепловой нагрузки изменяются линейно от времени без ускорения или замедления.

Таблица 2. Средняя сумма квадратов отклонений, уровень статистической достоверности и коэффициенты детерминации модели ANOVA для переменных отклика
 Table 2. Mean sum of squared deviations, level of statistical significance and coefficients of determination of the ANOVA model for response variables

Фактор	df	WSWP, %	AMP	ΔE
Temperature (L)	1	0,237979 (***)	0,0001761 (***)	262,2813 (***)
Temperature(Q)	1	0,008561 (**)	0,0000022 (*)	0,7656 (-)
Time (L)	1	0,026026 (***)	0,0000414 (***)	49,1371 (***)
Time (Q)	1	0,000983 (-)	0,0000003 (-)	0,0587 (-)
Temperature (L) × Time (L)	1	0,001553 (-)	0,0000055 (**)	9,3987 (*)
Error	21	0,000749	0,0000005	1,4245
R ²		0,95	0,96	0,91

Примечание:
 df — количество степеней свободы;
 WSWP (water soluble whey protein) — массовая доля сывороточных белков молока, %;
 AMP (advanced stage Maillard products) — содержание флуоресцирующих продуктов промежуточной стадии реакции Майяра, мг хинина сульфата/г белка;
 ΔE — интенсивность окрашивания препаратов казеина (при расчете ΔE, в качестве образца сравнения использовался тот же самый препарат казеина не подвергнутый тепловой обработке).
 Обозначения факторов: Temperature — температура; Time — продолжительность термообработки. (L) — оценка линейного эффекта фактора; (Q) — оценка квадратичного эффекта фактора.
 Eго — доля вариации переменной отклика, отнесенная к ошибке;
 R² — коэффициент детерминации для модели ANOVA.
 Уровень статистической значимости оценки влияния фактора (в скобках): «-» — статистически не достоверно ($p > 0,05$); «*» — $p < 0,05$; «**» — $p < 0,01$; «***» — $p < 0,001$.

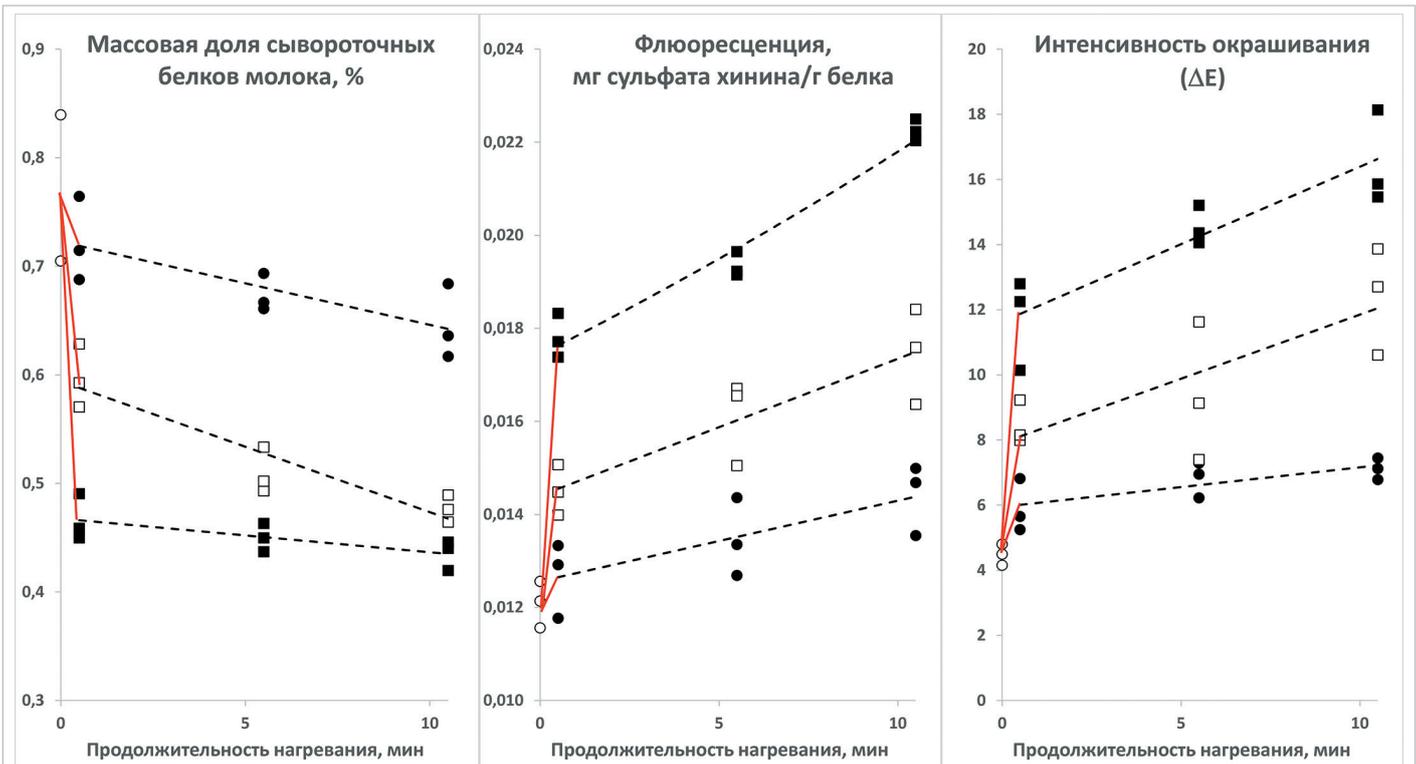


Рисунок 5. Влияние продолжительности тепловой обработки молока при температуре 75 °С (●), 85 °С (□) и 95 °С (■) на содержание растворимых белков сыворотки, флюоресценцию продуктов промежуточной стадии реакции Майяра и интенсивность окрашивания препаратов казеина. Красными линиями показано изменение уровней показателей от их начальных значений (○) в сыром молоке

Figure 5. Effect of time of milk heat treatment at a temperature of 75 °C (●), 85 °C (□) and 95 °C (■) on the content of soluble whey proteins, fluorescence of products of the advanced stage of the Maillard reaction and color intensity of the casein preparations. The red lines show the change in the levels of indicators relative to their initial values (○) in raw milk

На Рисунке 5 видно, что в исследованном диапазоне продолжительности нагревания от 0,5 до 10,5 мин при постоянной температуре наблюдается линейная зависимость уровней переменных отклика от времени. При разных температурах скорость изменения уровней переменных отклика отличается.

Статистически значимое влияние квадратичного эффекта фактора «Температура» (Temperature (Q)) на переменную отклика означает, что при изменении температуры происходит изменение скорости реакции, связанной с данной переменной отклика (ускорение или замедление). Наличие или отсутствие статистически значимого влияния Temperature (Q) на индикаторы тепловой нагрузки связано со спецификой химических реакций, происходящих в молоке при нагревании.

Процесс денатурации сывороточных белков имеет форму реакции первого порядка [39] и описывается формулой

$$C = C_0 \cdot e^{-Kt}, \tag{2}$$

где C_0 — начальная концентрация субстрата;

K — константа скорости реакции;

C — концентрация субстрата через время t .

В начале процесса нагревания денатурация сывороточных белков происходит с наибольшей скоростью. С течением времени скорость процесса денатурации снижается по причине исчерпания субстрата. С повышением температуры константа скорости реакции увеличивается и скорость денатурации сывороточных белков возрастает (Рисунок 5).

При температурах 85 °С и 95 °С большая часть растворимых белков денатурирует к моменту достижения целевой температуры пастеризации. На Рисунке 5 видно, что в исследованном диапазоне продолжительности нагревания от 0,5 до 10,5 мин при температуре 95 °С отмечается более медленная, чем при 75 °С и 85 °С, скорость денатурации белков. Это связано с практически полной денатурацией термолабильных сывороточных белков к моменту выдержки 0,5 мин при 95 °С. Сохраняющаяся в молоке термостабильная фракция альфа-лактоальбумина очень медленно денатурирует при данной температуре [40]. Статистически значимое влияние фактора Temperature (Q) на содержание растворимых сывороточных белков ($p < 0,01$) означает, что в исследованном диапазоне продолжитель-

ности нагревания от 0,5 до 10,5 мин при повышении температуры от 75 °С до 95 °С замедление скорости реакции денатурации сывороточных белков статистически достоверно.

Начальный этап реакции Майяра, в ходе которого формируются лактозилированные группы аминокислот, является реакцией нулевого порядка [39], описываемой формулой

$$C = Kt + C_0, \tag{3}$$

где C_0 — начальная концентрация продукта реакции ($C_0 = 0$);

K — константа скорости реакции;

C — концентрация продукта реакции через время t .

При постоянной температуре накопление продуктов реакции линейно зависит от времени. Нулевая кинетика течения реакции возможна, если концентрация субстрата существенно превышает количество формирующихся продуктов реакции [41]. Это условие выполняется при температурно-временных режимах пастеризации молока, когда только малая часть от реакционно-способных групп аминокислот подвергается лактозилированию.

Лактозилированные аминокислоты служат прекурсорами для флюоресцирующих продуктов реакции Майяра, образующихся на следующих стадиях этой реакции. Скорость накопления флюоресцирующих продуктов реакции Майяра лимитируется скоростью накопления этих прекурсоров. Из-за ограниченного содержания субстрата для реакции формирование флюоресцирующих веществ подчиняется закону реакции первого порядка [41].

При повышении температуры повышается содержание прекурсоров (лактозилированные группы аминокислот) и скорость их преобразования во флюоресцирующие продукты следующей стадии реакции Майяра. Из графиков, представленных на Рисунке 5, видно, что при повышении температуры нагревания от 75 °С до 95 °С происходит увеличение скорости накопления флюоресцирующих продуктов реакции Майяра. Статистическая достоверность влияния фактора Temperature (Q) на содержание флюоресцирующих продуктов реакции Майяра дает подтверждение того, что увеличение скорости реакции при повышении температуры статистически достоверно ($p < 0,05$).

Результаты дисперсионного анализа (Таблица 2) показывают, что для переменной отклика «Содержание флюоресцирующих продуктов Майяра» квадратичный эффект фактора «Время» (Time (Q))

статистически не достоверен. Т. е. отсутствует нелинейная зависимость в изменении содержания флюоресцирующих продуктов от времени и ход реакции подчинялся закону не первого, а нулевого порядка. Это объясняется следующим.

В работе Birlouez-Aragon et al [16] была установлена эмпирическая регрессионная зависимость ($r^2 = 0,985$) между продолжительностью нагревания раствора, содержащего прекурсоры реакции Майяра (бета-лактоглобулин и лактозу), и накоплением в растворе флюоресцирующих продуктов реакции Майяра, которая соответствовала закону реакции первого порядка. Однако данный результат был получен при температуре 103 °С и при продолжительности нагревания более 4 мин. До 4 мин кинетика реакции не отличалась от линейной [16]. При менее интенсивном тепловом воздействии, которое было исследовано в рамках настоящей работы (от 75 °С до 95 °С), накопление флюоресцирующих продуктов реакции Майяра происходит линейно от времени (Рисунок 5).

Статистическая значимость эффекта парного взаимодействия факторов «Температура» и «Время» (Temperature (L) × Time (L)) указывает на повышение выхода продукта реакции за счет взаимно усиливающего друг друга действия данных факторов. Выход продукта реакции, увеличивающийся при повышении температуры, дополнительно увеличивается при повышении продолжительности тепловой обработки. Подобная зависимость, установленная по результатам дисперсионного анализа для факторов «Концентрация флюоресцирующих продуктов реакции Майяра» и «Интенсивность окрашивания препаратов казеина», видна на графике, отражающем изменение уровней данных факторов от температуры и времени (Рисунок 5).

Из результатов дисперсионного анализа следует, что в исследованном диапазоне температурно-временного воздействия интенсивность окрашивания препаратов казеина (ΔE) является наиболее точным индикатором тепловой нагрузки. Это связано с линейной зависимостью данного индикатора от температуры и продолжительности пастеризации молока. Следовательно, изменение уровней ΔE подчиняется кинетике реакции нулевого порядка, которая типична для реакции формирования продуктов начальной стадии реакции Майяра. Подтверждение того, что интенсивность окрашивания препаратов казеина связана с содержанием в них продуктов

начальной реакции Майяра, можно найти при анализе графиков, отражающих взаимную зависимость исследованных индикаторов тепловой нагрузки (Рисунок 6).

Из графиков, приведенных на Рисунках 6А и 6Б, видно, что существует достаточно устойчивая связь между содержанием растворимых сывороточных белков и содержанием флюоресцирующих продуктов промежуточной стадии реакции Майяра ($r^2 > 0,74$), а также интенсивностью окрашивания препаратов казеина ($r^2 > 0,77$). При этом, в области низкого содержания белка, характерного для образцов молока, пастеризованного при 95 °С, связь между содержанием растворимых сывороточных белков и двумя другими индикаторами тепловой нагрузки пропадает. Причина такой зависимости содержания продуктов реакции Майяра и интенсивности окрашивания препаратов казеина от концентрации белка связана с тем, что содержание продуктов реакции Майяра зависит от температуры линейно, а содержание белка характеризуется нелинейной зависимостью (Рисунок 5). Искаженная зависимость содержания растворимых сывороточных белков от температуры и продолжительности нагревания является недостатком данного индикатора для оценки тепловой нагрузки.

Из данных, приведенных на Рисунке 6В, видно, что имеет место сильная корреляционная связь между содержанием в молоке флюоресцирующих продуктов промежуточной стадии реакции Майяра и интенсивностью окрашивания препаратов казеина, выделенных из этого образца молока ($r^2 > 0,91$). Это совпадает с результатами исследований Leclère и Birlouez-Aragon, в процессе которых была установлена линейная корреляционная зависимость между содержанием фуозина и флюоресценцией продуктов промежуточной стадии реакции Майяра ($r^2 > 0,96$) [17,42].

Сильная корреляция индикатора «Интенсивность окрашивания препаратов казеина» (ΔE) с содержанием флюоресцирующих продуктов промежуточной стадии реакции Майяра, указывает, что ΔE по физической природе связано с реакцией Майяра. Линейная кинетика изменения ΔE от времени при постоянной температуре, которая типична для реакции формирования продуктов начальной стадии реакции Майяра, свидетельствует, что по физической природе ΔE связано с продуктами начальной стадии реакции Майяра. Это позволяет сделать вывод, что интенсивность окрашивания препаратов

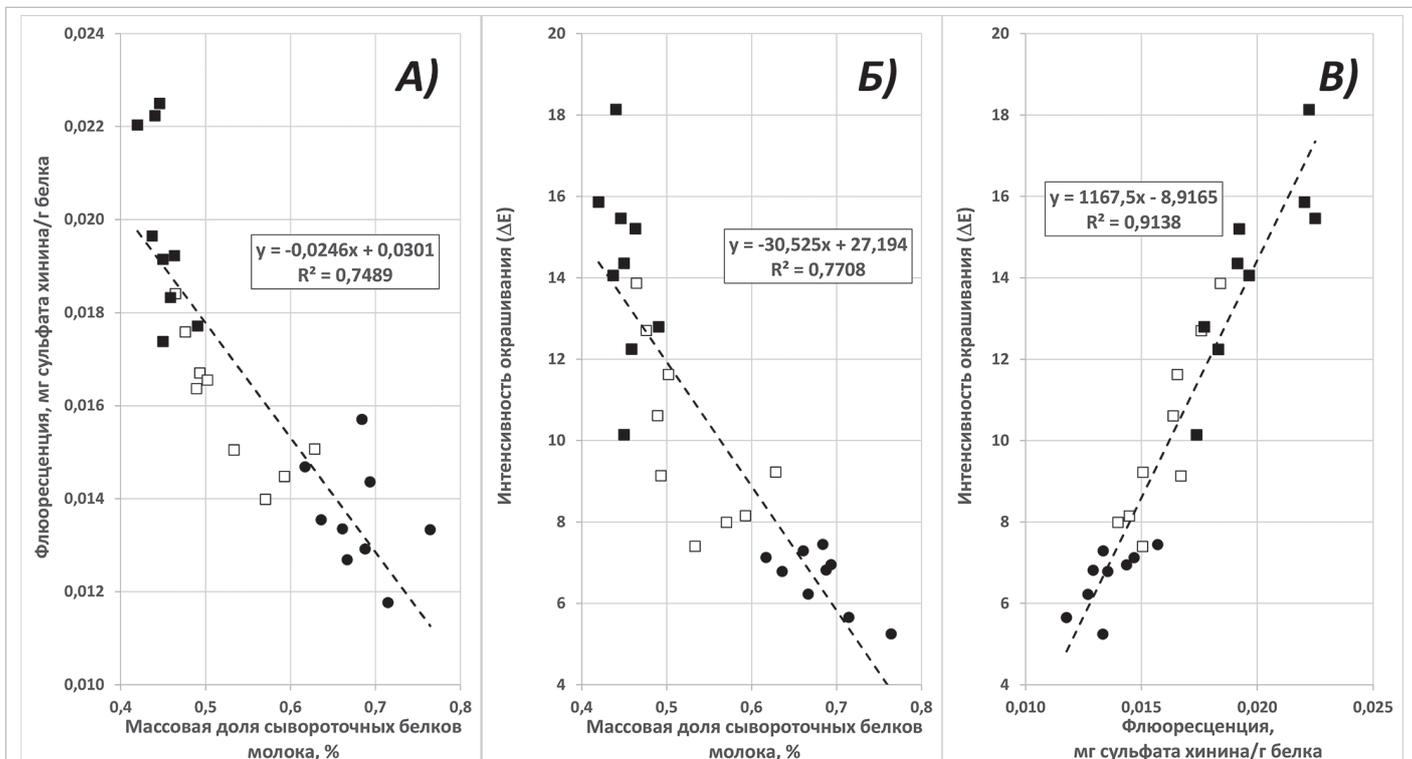
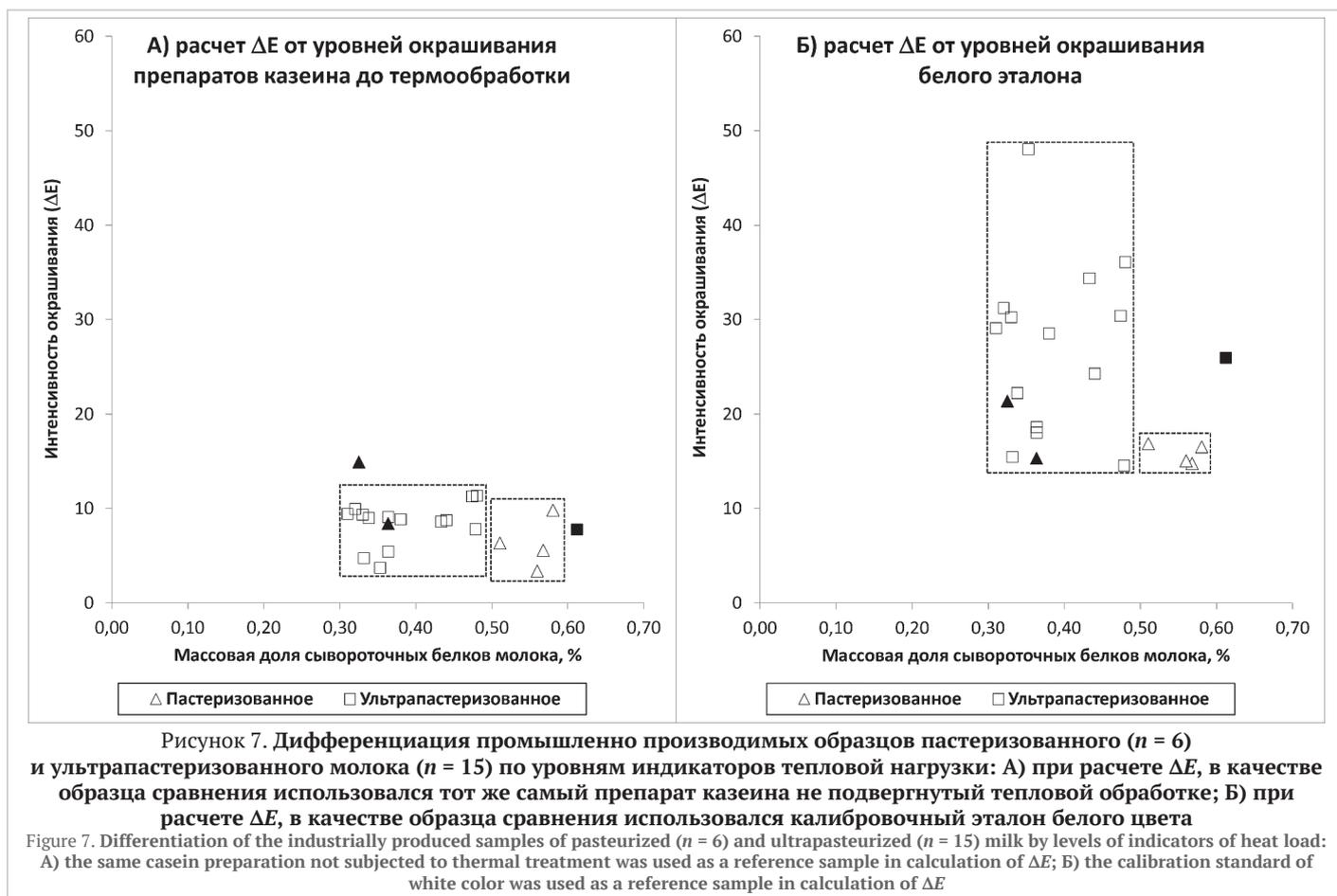


Рисунок 6. Взаимная зависимость показателей тепловой нагрузки, оказываемой на молоко при пастеризации: А) флюоресценции продуктов реакции Майяра от содержания растворимых белков сыворотки; Б) интенсивности окрашивания препаратов казеина от содержания растворимых белков сыворотки; В) интенсивности окрашивания препаратов казеина от флюоресценции продуктов реакции Майяра. Точки данных имеют разные обозначения в зависимости от температуры пастеризации молока: 75 °С (●), 85 °С (□) и 95 °С (■)

Figure 6. Mutual dependence of indicators of heat load exerted on milk during pasteurization: А) fluorescence of the Maillard reaction products on the content of soluble whey proteins; Б) color intensity of the casein preparations on the content of soluble whey proteins; В) intensity of the casein preparations on the fluorescence of the Maillard reaction products. Points of data have different denotations depending on a temperature of milk pasteurization: 75 °С (●), 85 °С (□) and 95 °С (■)



казеина после термообработки (ΔE) пропорциональна содержанию в них продуктов начальной стадии реакции Майяра (лактозилированных аминокислот), которые являются прекурсорами меланоидов.

Следовательно, разработанный колориметрический метод позволяет проводить оценку интенсивности тепловой обработки молока по содержанию в нем продуктов ранней стадии реакции Майяра и получать результаты, сравнимые с получаемыми при оценке интенсивности тепловой обработки молока по содержанию в нем фуросина.

3.5. Адаптация колориметрического метода для оценки тепловой нагрузки в промышленно производимых образцах пастеризованного и ультрапастеризованного молока

Разработанный метод оценки интенсивности тепловой нагрузки при обработке молока был испытан на коммерческих образцах пастеризованного (6 образцов) и ультрапастеризованного молока (15 образцов). В исследованных образцах молока была измерена интенсивность окрашивания препаратов казеина, а также измерено содержание растворимых сывороточных белков.

В результате проведенных исследований было установлено, что требуется адаптация разработанного колориметрического метода для оценки тепловой нагрузки в промышленно производимых образцах пастеризованного и ультрапастеризованного молока. При производстве ультрапастеризованного и, отчасти, пастеризованного молока, реакция Майяра доходит до стадии формирования меланоидов [39]. Препараты казеина, выделенные из таких образцов молока, имеют выраженную бурю окраску. Расчет интенсивности окрашивания (ΔE) от уровней окрашивания частиц казеина с выраженным изначальным окрашиванием, приводит к получению заниженной величины ΔE, т. е. заниженного результата оценки интенсивности тепловой нагрузки. Чтобы учесть компоненту потемнения, вносимую меланоидами, формирующимися на стадии производства, следует в качестве уровня образца сравнения для расчета ΔE по формуле (1), брать уровни L_0^* , a_0^* , b_0^* эталона белого цвета, используемого для калибровки колориметра, как это сделано в работе Naghani-Naghghi et al. [43]. Применительно к оборудованию, использованному в настоящей работе, эти уровни составляли: $L_0^* = 96,54$, $a_0^* = -0,26$, $b_0^* = 0,41$.

Результаты оценки тепловой нагрузки в промышленно производимых образцах пастеризованного и ультрапастеризованного молока при разных способах расчета ΔE, представлены на Рисунке 7.

Из данных, приведенных на Рисунке 7, видно, что использование двух критериев оценки интенсивности тепловой нагрузки — по содержанию растворимых сывороточных белков и по интенсивности окрашивания препаратов казеина, позволяет достаточно надежно разделить пастеризованное и ультрапастеризованное молоко. При расчете ΔE от уровней эталона белого цвета, улучшается дифференциация образцов молока по интенсивности тепловой нагрузки. Происходит статистически достоверное разделение на группы пастеризованного ($\Delta E = 15,80 \pm 1,05$) и ультрапастеризованного ($\Delta E = 27,16 \pm 8,85$) молока (тест Тьюки, $p < 0,05$).

В результате исследований было установлено, что некоторые из исследованных образцов молока, маркированных как «пастеризованное», фактически характеризуются по содержанию растворимых сывороточных белков и продуктов ранней стадии реакции Майяра как «ультрапастеризованное» молоко. Один из образцов молока, маркированный как «ультрапастеризованное», можно было отнести к группе «пастеризованное» молоко. На графике, нетипичные образцы отмечены заполненными заливкой маркерами (▲) и (■). Типичные образцы помечены «пустыми» маркерами (Δ) и (□). Наличие таких образцов связано с тем, что при производстве питьевого термически обработанного молока выдвигаются требования только к остаточной микробиологической обсемененности. Требования к содержанию других веществ, связанных с тепловым воздействием не молоко, не выдвигаются.

Нетипичный образец ультрапастеризованного молока, выделенный специальным маркером, можно отнести к группе молока с не используемой в настоящее время в России маркировкой: «молоко с увеличенным сроком годности» (Extended Shelf Life (ESL) Milk) [3]. Это свидетельствует о внедрении в отечественной молочной промышленности современных технологий, позволяющих производить молоко с длительным сроком годности, имеющее при этом высокую биологическую ценность.

4. Заключение

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

- имеется необходимость в быстром и малозатратном методе инструментального контроля интенсивности тепловой нагрузки для пастеризованного, ультрапастеризованного и стерилизованного

молока, основанном на оценке содержания продуктов начальной стадии реакции Майяра, являющихся объективным критерием оценки в широком диапазоне температур тепловой обработки. Разработано и применяется на практике множество методов, основанных на данном критерии оценки, однако все эти методы требуют использования дорогостоящей аппаратуры и участия высококвалифицированного персонала, а также часто требуют длительного времени выполнения анализа.

На основании теоретических изысканий авторами был предложен подход к выявлению продуктов начальной стадии реакции Майяра (лактозилированные аминокислоты). Суть подхода заключается в переводе этих бесцветных продуктов в интенсивно окрашенные продукты финальной стадии реакции Майяра (меланоиды), которые можно измерить с помощью специальных приборов.

В результате проведенных исследований были установлены режимы выполнения анализа:

- приготовление препарата казеина из молока, очищенного от лактозы, включает осаждение казеина добавлением 10% уксусной кислоты, трехкратное промывание осадка казеина деионизированной водой, высушивание очищенного казеина и его измельчение на частицы размером 500–800 мкм;
- тепловая обработка препаратов казеина при 100 °С в течение 5 часов. Такой режим позволяет добиться появления бурого окра-

шивания в препаратах, полученных из молока, подвергнутого тепловой обработке и содержащих продукты ранней стадии реакции Майяра. При этом температура и продолжительность обработки достаточна, чтобы избежать изменения окраски препаратов казеина вследствие окисления кислородом воздуха;

- оценка интенсивности окрашивания препаратов казеина, заключающаяся в измерении уровней их окрашивания по цветовой шкале CIE $L^* a^* b^*$, и вычисление критерия общего цветового отличия ΔE по уровням цветовых критериев L^* , a^* , b^* до и после тепловой обработки препаратов казеина.

Исследования, проведенные на модельных образцах обезжиренного пастеризованного молока, подтвердили физическую природу окрашивания препаратов казеина, обусловленную наличием в них меланоидов, формирующихся при контролируемом нагревании из лактозилированных аминокислот. Их содержание пропорционально тепловой нагрузке при пастеризации молока.

Были проведены испытания разработанного колориметрического метода на промышленного производимых образцах пастеризованного и ультрапастеризованного молока. После адаптации разработанного колориметрического метода по специфическим особенностям промышленно производимого термически обработанного молока, удалось дифференцировать образцы пастеризованного и ультрапастеризованного молока, характеризующиеся разной степенью тепловой нагрузки при их производстве.

REFERENCES

1. Lorenzen, P. C., Clawin-Räadecker, I., Einhoff, K., Hammer, P., Hartmann, R., Hoffmann, W. et al. (2011). A survey of the quality of extended shelf life (ESL) milk in relation to HTST and UHT milk. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 166–178. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00656.x>
2. Deeth, H. (2017). Optimum thermal processing for Extended Shelf-Life (ESL) milk. *Foods*, 6(11), Article 102. <https://doi.org/10.3390/foods6110102>
3. IDF (2022). Heat treatment of milk. Bulletin of the IDF No. 516/2022. Retrieved from <https://shop.fil-idf.org/products/bulletin-of-the-idf-n-515-2022-heat-treatment-of-milk> Accessed December 01, 2023
4. Elliott, A. J., Datta, N., Amenu, B., Deeth, H. C. (2005). Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milk. *Journal of Dairy Research*, 72(4), 442–446. <https://doi.org/10.1017/S002202990500138X>
5. Hinrichs, J., Atamer, Z. (2011). Sterilisation of milk and other products. Chapter in a book: *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* Academic Press, 2011. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00218-1>
6. Raynes, J. K., Vincent, D., Zawadzki, J. L., Savin, K., Mertens, D., Logan, A. et al. (2018). Investigation of age gelation in UHT milk. *Beverages*, 4(4), Article 95. <https://doi.org/10.3390/beverages4040095>
7. Deeth, H. C., Datta, N. (2011). Ultra-High Temperature Treatment (UHT): Heating Systems. Chapter in a book: *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. Academic Press, 2011. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00216-8>
8. van Asselt, A. J., Sweere, A. P. J., Rollema, H. S., de Jong, P. (2008). Extreme high-temperature treatment of milk with respect to plasmin inactivation. *International Dairy Journal*, 18(5), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.019>
9. Claeys, W. L., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E. (2002). Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. *Trends in Food Science and Technology*, 13(9–10), 293–311. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00164-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00164-4)
10. 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>
11. Ritota, M., Di Costanzo, M., Mattered, M., Manzi, P. (2017). New trends for the evaluation of heat treatments of milk. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, Article 1864832. <https://doi.org/10.1155/2017/1864832>
12. Sakkas, L., Moutafi, A., Moschopoulou, E., Moatsou, G. (2014). Assessment of heat treatment of various types of milk. *Food Chemistry*, 159, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.020>
13. Mayer, H. K., Raba, B., Meier, J., Schmid, A. (2010). RP-HPLC analysis of furosine and acid-soluble beta-lactoglobulin to assess the heat load of extended shelf-life milk samples in Austria. *Dairy Science and Technology*, 90(4), 413–428. <https://doi.org/10.1051/dst/2009058>
14. Lan, X. Y., Wang, J. Q., Bu, D. P., Shen, J. S., Zheng, N., Sun, P. (2010). Effects of heating temperatures and addition of reconstituted milk on the heat indicators in milk. *Journal of Food Science*, 75(8), C653–C658. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01802.x>
15. Resmini, P., Pellegino, L., Cattaneo, S. (2003). Furosine and other heat-treatment indicators for detecting fraud in milk and milk products. *Italian Journal of Food Science*, 4(15), 473–484.
16. Birlouez-Aragon, I., Nicolas, M., Metais, A., Marchond, N., Grenier, J., Calvo, D. (1998). A rapid fluorimetric method to estimate the heat treatment of liquid milk. *International Dairy Journal*, 8(9), 771–777. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00119-8)
17. Birlouez-Aragon, I., Sabat, P., Gouti, N. (2002). A new method for discriminating milk heat treatment. *International Dairy Journal*, 12(1), 59–67. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00131-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00131-5)
18. Guan, R., Liu, D., Ye, X., 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>
19. Schamberger, G. P., Labuza, T. P. (2006). Evaluation of front-face fluorescence for assessing thermal processing of milk. *Journal of Food Science*, 71(2), C69–C74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08884.x>
20. 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>
21. Serrano, M. A., Castillo, G., Muñoz, M. M., Hernández, A. (2002). Influence of hydrolysis, purification, and calibration method on furosine determination using ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 40(2), 87–91. <https://doi.org/10.1093/chromsci/40.2.87>
22. Tokuşoğlu, Ö., Akalin, A. S., Unal, K. (2006). Rapid high performance liquid chromatographic detection of furosine (epsilon-N-2-furoylmethyl-L-lysine) in yogurt and cheese marketed in Turkey. *Journal of Food Quality*, 29(1), 38–46. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2006.00054.x>
23. Vallejo-Córdoba, B., Mazonra-Manzano, M.A., González-Córdova, A.F. (2004). New capillary electrophoresis method for the determination of furosine in dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5787–5790. <https://doi.org/10.1021/jf049850e>
24. Bignardi, C., Cavazza, A., Corradini, C. (2012). Determination of furosine in food products by capillary zone electrophoresis tandem mass spectrometry. *Electrophoresis*, 33(15), 2382–2389. <https://doi.org/10.1002/elps.201100582>
25. Gómez-Narváez, F., Pérez-Martínez, L., J. Contreras-Calderón, J. (2019). Usefulness of some Maillard reaction indicators for monitoring the heat damage of whey powder under conditions applicable to spray drying. *International Dairy Journal*, 99, Article 104553. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104553>
26. Rizzi, G. P. (1997) Chemical structure of colored Maillard reaction products. *Food Reviews International*, 13(1), 1–28. <http://doi.org/10.1080/87559129709541096>
27. Burton, H. (1994). Chemical and physical changes in milk at high temperatures. Chapter in a book: *Ultra-high-temperature processing of milk and milk products*. Springer, Boston, MA, 1994. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2157-0_3
28. Van Boekel M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*, 62(4), 403–414. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00075-2)
29. Poltronieri, P., Rossi, F. (2017). Stabilization of milk quality by heat treatments. Chapter in a book: *Microbiology in Dairy Processing: Challenges and Opportunities*. 2018. John Wiley and Sons Ltd and the Institute of Food Technologists, 2018. <https://doi.org/10.1002/9781119115007.ch4>
30. Barraquío, V. L. (2014). Which milk is fresh? *International Journal of Dairy Science and Processing*, 1(201), 1–6. <https://doi.org/10.19070/2379-1578-140002>
31. Cattaneo, S., Masotti, F., Pellegrino, L. (2008). Effects of overprocessing on heat damage of UHT milk. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1099–1106. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0637-5>
32. Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of protein. Chapter in a book: *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1990. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P)
33. 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)
34. Morales, F. J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S. (1996). Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chemistry*, 57(3), 423–428. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00245-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00245-6)
35. Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2018). *Molecular Luminescence Spectrometry*. Chapter in a book: *Principles of Instrumental Analysis*. Seventh Edition. Cengage Learning, Boston, 2018.
36. Dufossé, L., Galaup, P. (2010). Color. Chapter in a book: *Handbook of Dairy Foods Analysis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2010. <https://doi.org/10.1201/9781420046328>

37. Wrolstad, R. E., Smith, D. E. (2017). Color Analysis. Chapter in a book: Food Analysis. Food Science Text Series. Springer, Cham, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_31
38. Švec, I., Hrušková, M., Vítová, M., Sekerová, H. (2008). Colour evaluation of different pasta samples. *Czech Journal of Food Science*, 26, 421–427.
39. 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, 2019.
40. 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>
41. Van Boekel, M. A. J. S. (2001). Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Food/Nahrung*, 45(3), 150–159. <http://doi.org/10.1002/1521-3803%2820010601%2945%3A3%3C150%3A%3AAID-FOOD150%3E3.0.CO%3B2-9>
42. Leclère, J., Birlouez-Aragon, I. (2001). The fluorescence of advanced Maillard products is a good indicator of lysine damage during the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4682–4687. <https://doi.org/10.1021/jf001433o>
43. Haghani-Haghighi, H., Mortazavian, A.M., Hosseini, H., Mohammadi, A., Shojaee-Aliabadi, S., Khosravi-Darani, K. et al. (2019). Method validation and determination of hydroxymethyl furfural (HMF) and furosine as indicators to recognize adulterated cow's pasteurized and sterilized milks made by partial reconstitution of skim milk powder. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 9(2), 3842–3848. <https://doi.org/10.33263/BRIAC92.842848>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
<p>Топникова Елена Васильевна — доктор технических наук, заместитель директора по научной работе, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская обл., Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-910-666-93-93 E-mail: e.topnikova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0225-6870</p>	<p>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: e.topnikova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0225-6870</p>
<p>Мягконосов Дмитрий Сергеевич — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, руководитель направления исследований по прикладной биохимии и энзимологии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-915-973-63-13 E-mail: d.myagkonosov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4443-7573 * автор для контактов</p>	<p>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@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4443-7573 * corresponding author</p>
<p>Абрамов Дмитрий Васильевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель направления исследований по сыроделию и маслоделию, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-910-970-42-97 E-mail: d.abramov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8326-1932</p>	<p>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@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8326-1932</p>
<p>Кашникова Ольга Геннадьевна — младший научный сотрудник, отдел физической химии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская обл., Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: + 7-962-200-14-15 E-mail: o.kashnikova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7557-6835</p>	<p>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@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7557-6835</p>
Критерии авторства	Contribution
<p>Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.</p>	<p>The author has the sole responsibility for writing the manuscript and is responsible for plagiarism.</p>
Конфликт интересов	Conflict of interest
<p>Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.</p>	<p>The authors declare no conflict of interest.</p>