

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2025-8-2-296-305>



Поступила 13.05.2025

Поступила после рецензирования 24.06.2025

Принята в печать 27.06.2025

© Мягконосов Д. С., Топникова Е. В., Абрамов Д. В., Кашникова О. Г., 2025

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

Научная статья

Open access

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОЛОРИМЕТРИИ С ТРЕХФАЗНЫМ КОЭФФИЦИЕНТОМ ОТРАЖЕНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ФАЛЬСИФИКАЦИИ СВЕЖЕГО МОЛОКА ВОССТАНОВЛЕННЫМ СУХИМ МОЛОКОМ

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

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

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

молоко, сухое молоко, фальсификация, реакция Майяра, колориметрия

Авторами предложен метод раскрытия фальсификации натурального свежего молока добавлением сухого молока, основанный на количественной оценке содержания продуктов начальной стадии реакции Майяра, являющихся специфическим индикатором присутствия сухого молока. Реализация метода предполагает выделение из молока препарата сухого, очищенного от лактозы казеина, последующую его тепловую обработку в строго контролируемых условиях. Эти условия включают поддержание влажности на уровне приблизительно 6% и температуры $100 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение пяти часов. В процессе тепловой обработки происходит трансформация неокрашенных продуктов начальной стадии реакции Майяра (лактозилированных аминокислот) в меланоиды, характеризующиеся интенсивной окраской. Интенсивность окраски меланоидов может быть измерена с использованием колориметра и представлена в координатах цветового пространства $\text{CIE } L^*a^*b^*$. Концентрация меланоидных пигментов может быть определена с применением как стандартного критерия общего цветового различия (ΔE), так и предлагаемого авторами комплексного критерия (KCh), который рассчитывается как соотношение значений Chroma и Hue. Критерий KCh демонстрирует более высокую точность в описании взаимосвязи между интенсивностью окрашивания образца и массовой долей белка сухого молока в смеси по сравнению со стандартным критерием ΔE . Разработанный колориметрический метод обеспечивает возможность выявления добавления сухого молока на уровне приблизительно 5 граммов на 1 литр свежего натурального молока.

Received 13.05.2025

Accepted in revised 24.06.2025

Accepted for publication 27.06.2025

© Myagkonosov D. S., Topnikova E. V., Abramov D. V., Kashnikova O. G., 2025

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

Original scientific article

Open access

USE OF TRISTIMULUS REFLECTANCE COLORIMETRY FOR DETECTION OF FRESH MILK ADULTERATION WITH RECONSTITUTED DRY 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:

milk, dry milk, adulteration, Maillard reaction, colorimetry

ABSTRACT

The authors propose a method for disclosing the adulteration of natural fresh milk by adding powdered milk, based on a quantitative assessment of the content of products of the initial stage of the Maillard reaction, which are a specific indicator of the presence of powdered milk. Implementation of the method involves isolation from milk of the preparation of dry, lactose-purified casein, followed by heat treatment under strictly controlled conditions. These conditions include maintaining a moisture level of approximately 6% and a temperature of $100 \pm 1^\circ\text{C}$ for five hours. In the process of heat treatment, the transformation of uncolored products of the initial stage of the Maillard reaction (lactosylated amino groups of amino acids) into melanoids characterized by intense coloration takes place. The color intensity of melanoids can be measured using a colorimeter and represented in color space coordinates $\text{CIE } L^*a^*b^*$. The concentration of melanoid pigments can be determined using both the standard criterion of total color difference (ΔE) and the complex criterion (KCh) proposed by the authors, which is calculated as the ratio of Chroma and Hue values. The criterion KCh demonstrates a higher accuracy in describing the relationship between the staining intensity of the sample and the mass fraction of milk powder protein in the mixture compared to the standard criterion ΔE . The developed colorimetric method makes it possible to detect the addition of dry powdered milk at the level of approximately 5 grams per 1 liter of fresh natural milk.

1. Введение

Фальсификация — это умышленное изменение состава продукта или придание продукту скрытых свойств, информация о которых является заведомо неполной или недостоверной. Добавление сухого молока к натуральному молоку или продажа восстановленного сухого молока под видом натурального, являются одними из наиболее распространенных форм фальсификации молочной продукции в мире [1,2]. Раскрытие фальсификации натурального и термически обработанного молока сухим представляет собой сложную аналитическую задачу ввиду сходства их состава, так и в следствии вариации химического состава термически обработанного молока из-за широкой вариации применяемых режимов тепловой обработки [3,4].

Для обнаружения фальсификации сухим молоком молочной продукции было разработано большое количество методов, базирующихся на разных физических принципах. Ссылки на указанные методы приведены, в частности, в работах [2,4–6].

К настоящему времени наиболее надежными признаны методы выявления фальсификации сухим молоком, основанные на оценке содержания фурузона [7]. Фурузин является производным от лактозилированного лизина — продукта начальной стадии реакции Майяра, образующегося в большом количестве в процессе высушивания молока [8].

Типичное содержание фурузона составляет:

- в сыром молоке — 4–10 мг/100 г белка [9–11];
- в пастеризованном молоке с низким уровнем тепловой нагрузки — 6–7 мг/100 г белка [9];

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Мягконосов, Д. С., Топникова, Е. В., Абрамов, Д. В., Кашникова, О. Г. (2025). Использование колориметрии с трехфазным коэффициентом отражения для выявления фальсификации свежего молока восстановленным сухим молоком. *Пищевые системы*, 8(2), 296–305. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2025-8-2-296-305>

FOR CITATION: Myagkonosov, D. S., Topnikova, E. V., Abramov, D. V., Kashnikova, O. G. (2025). Use of tristimulus reflectance colorimetry for detection of fresh milk adulteration with reconstituted dry milk. *Food Systems*, 8(2), 296–305. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2025-8-2-296-305>

- в пастеризованном молоке с высоким уровнем тепловой нагрузки — 12–29 мг/100 г белка [12];
- в ультрапастеризованном (УВТ) молоке с обработкой косвенным методом нагрева — 100–250 мг/100 г белка [10,13];
- в сухом молоке — 50–300 мг/100 г белка (без хранения) и 270–700 мг/100 г белка (после 1–2 лет хранения при комнатной температуре) [9–11].

С 2005 года метод выявления фальсификации пастеризованного и УВТ молока с добавлением сухого молока по содержанию фурузона и лактулозы принят в КНР в качестве государственного стандарта [12]. В настоящее время действует новая редакция данного стандарта NY/T939-2016¹.

Регламентированная в указанном стандарте методика выявления фурузона с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и ультрафиолетового детектора ($\lambda = 280$ нм) требует тщательности проведения процедуры пробоподготовки, от которой зависит чувствительность и погрешность метода [14]. Были предприняты исследования по усовершенствованию методики. В частности, с целью повышения чувствительности и надежности ВЭЖХ-определения фурузона с применением УФ-детектора, Но et al. [3] модифицировали процедуру твердофазной экстракции на стадии подготовки образцов молока к хроматографии. Это позволило увеличить на хроматограмме амплитуду пика фурузона, по которому проводится количественная оценка доли восстановленного молока в образце свежего.

Liu et al. [12] разработали усовершенствованную модификацию метода ВЭЖХ для выявления примеси сухого молока в термически обработанном питьевом молоке по содержанию фурузона, применив вместо используемого в стандартной методике NY/T939-2016 ультрафиолетового детектора, tandemный масс-спектрометрический детектор. Модифицированный метод имеет меньшую погрешность и позволяет выявлять наличие меньшей дозы сухого молока, чем стандартный метод.

Оценка, основанная на определении содержания фурузона, не всегда позволяет достоверно выявлять наличие сухого молока в пастеризованном и УВТ молоке ввиду значительной вариативности содержания в их составе продуктов реакции Майяра [6]. Это требует разработки других, более надежных методов для дифференциации термически обработанного натурального молока и восстановленного молока, ориентированных на использование большего количества химических индикаторов [4]. Современный подход к решению таких сложных аналитических задач, как выявление фальсификации пищевых продуктов, заключается в получении от исследуемого образца массива измерительных сигналов, с максимальной полнотой отражающих его сложный химический состав. Данные измерений обрабатываются методами хемометрики, включающими как классические приемы статистической обработки, так и процедуры добычи данных с помощью машинных алгоритмов [2].

В работе Tan et al. [4] для выявления биомаркеров, которые могут быть использованы для классификации ультрапастеризованного и восстановленного молока, был применен метод нецелевой метаболизма. Анализ метаболических профилей восстановленного и ультрапастеризованного молока проводился с использованием техники сверхпроизводительной жидкостной хроматографии, совмещенной с квадрупольной времяпролетной масс-спектрометрией (UPLC-Q-TOF-MS) или с tandemной масс-спектрометрией (UPLC-MS/MS). С помощью иерархического кластерного анализа было выделено три категории маркерных метаболитов (пептиды, липиды и нуклеиновые кислоты), отличающих восстановленное сухое молоко от ультрапастеризованного молока. В частности, в ультрапастеризованном молоке наблюдалось более высокое содержание витамина B5 и его производных, метаболитов нуклеиновых кислот (никотинамид, цитидин, аденозин), фосфолипидов и продуктов их распада, а также продуктов гидролиза белка (пептидов), в сравнении с восстановленным молоком.

Cui et al. [5] в своем исследовании применили подход нецелевой липидометики в сочетании с хемометрией для различения ультрапастеризованного и восстановленного молока с помощью сверхпроизводительной жидкостной хроматографии, совмещенной с квадрупольной масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой (UPLC-Q-Exactive Orbitrap). Пятнадцать липидов были идентифицированы и выбраны в качестве биомаркеров для различения ультрапастеризованного и восстановленного молока. Содержание

одних из этих веществ было выше в ультрапастеризованном молоке, а других — в восстановленном. В соответствии с выбранными биомаркерами липидного происхождения была создана дискриминантная модель, обеспечивающая надежное дифференцирование ультрапастеризованного и восстановленного молока.

Нецелевой пептидомический подход, основанный многомерном анализе данных, был применен в работе Tan et al. [15] для выявления пептидов, потенциально позволяющих отличать ультрапастеризованное молоко от восстановленного. Анализ состава образцов проводился с использованием сверхпроизводительной жидкостной хроматографии, совмещенной с квадрупольной времяпролетной масс-спектрометрией (UPLC-Q-TOF-MS). Пептидные профили восстановленного и ультрапастеризованного молока существенно различались. Из установленных 1352 метаболитов (массой 50–2000 Да) были идентифицированы тридцать три маркерных пептида, содержание которых существенно различалось в ультрапастеризованном и восстановленном молоке. В основном пептиды имели происхождение от C- и N- терминальных групп казеина. Ключевыми факторами, приводящими к образованию пептидов, были тепловая нагрузка при производстве или гидролиз белков нативной протеазой молока.

Du et al. [16] создали чувствительный и надежный подход для обнаружения фальсификации сухим молоком натурального молока путем анализа профилей измерительных сигналов intactного белка и пептидов, полученных при гидролизе с помощью трипсина. Анализ состава образцов проводился с использованием сверхэффективной жидкостной хроматографии с квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром (UPLC-QTOF-MS). Две базы данных по профилям сигналов intactных белков и пептидов были объединены и обработаны при помощи метода анализа основных компонентов (PCA). Были обнаружены и предварительно идентифицированы некоторые репрезентативные белковые вещества, которые могут быть использованы в качестве маркеров для различения восстановленного сухого молока и натурального молока, в частности, гликозилированный полипептид, образованный из α -лактальбумина. Результаты показали, что объединение данных позволяет достигнуть высокой чувствительности анализа и отличать фальсифицированное молоко с очень низким уровнем содержания сухого молока от натурального цельного молока. Предел обнаружения сухого молока в натуральном молоке составлял 0,5 % (от общего содержания белка).

Методы с применением жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией высокой разрешающей способности (ВЭЖХ-МС), позволяют идентифицировать большое количество метаболитов и проводить измерение их концентрации. Вместе с тем эти методы сопряжены со сложной предварительной подготовкой образцов, требующей много времени и большого расхода органических растворителей. Методы инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR), спектроскопии среднего ИК-диапазона (MIR), рамановской спектроскопии и ядерного магнитного резонанса (ЯМР) позволяют получать объемы аналитических данных, сопоставимые с ВЭЖХ-МС, но при этом не требуют сложной предварительной подготовки образцов и отличаются меньшей продолжительностью анализа [6,17].

В исследовании Cui et al. [6] для определения биомаркеров, позволяющих дифференцировать ультрапастеризованное молоко от восстановленного молока, был использован метод ЯМР-анализа метаболитов в сочетании с хемометрией. В ультрапастеризованном и восстановленном молоке было идентифицировано одиннадцать соединений, содержание которых различалось между указанными типами молока. Обработка данных с помощью анализа основных компонентов (PCA) и с помощью дискриминантного анализа методом частичных наименьших квадратов (PLS-DA) позволила выявить три биомаркера (L-карнитин, янтарная и уксусная кислоты), по содержанию которых можно провести дифференциацию образцов ультрапастеризованного и восстановленного молока.

В исследовании Du [17] для определения фальсификации свежего натурального молока сухим молоком при помощи ИК-спектроскопии с уменьшенной полной отражательной способностью и преобразованием Фурье (ATR-FTIR) был проведен анализ полного спектра и трех его отдельных областей ($1800\text{--}580\text{ см}^{-1}$, $3700\text{--}2700\text{ см}^{-1}$ и $1800\text{--}580\text{ см}^{-1} + 3700\text{--}2700\text{ см}^{-1}$). Полученные спектральные данные были использованы для обучения машинного алгоритма. С помощью дискриминантного анализа методом частичных наименьших квадратов (PLS-DA) и обработки алгоритмом опорных векторов (SVM) набора данных в области спектра $1800\text{--}580\text{ см}^{-1}$ удалось получить быструю и надежную идентификацию фальсифицированного молока. К достоинствам разработанного метода относятся короткое время анализа и отсутствие этапа подготовки пробы.

¹ NY/T939-2016. (2016). Agricultural industry standards of the People's Republic of China. Identification of reconstituted Milk in pasteurized and UHT milk. Ministry of Agriculture of the People's Republic of China.

Chu et al. [18] применили ИК-спектроскопию с преобразованием Фурье (FTIR) и новейшие статистические алгоритмы машинного обучения для качественной идентификации посторонних веществ в составе натурального молока и количественной оценки их содержания. Результаты исследования показали, что применение современных нелинейных алгоритмов статистического машинного обучения повышает эффективность FTIR-спектроскопии при прогнозировании фальсификации молока. Это дало лучшие результаты по сравнению с традиционной обработкой данных методом частичных наименьших квадратов (PLS). Для качественного определения типов веществ, используемых для фальсификации молока, была разработана высокoeffективная мультиклассификационная модель с использованием алгоритма многослойного перцептрона (MLP), обеспечивающая высокую точность прогнозирования — 97,4%. Наилучшие результаты для целей количественного определения содержания примесей меламина, мочевины и сухого молока показали байесовские регуляризованные нейронные сети (BRNN). Разработанные в этой работе предсказательные модели могут быть интегрированы в состав программного обеспечения портативных ИК-спектрометров для проверок на фермах и выборочных проверок регулируемыми органами, что позволит проводить более масштабные испытания молока на безопасность.

Nikolaou et al. [2] разработали вольтамперометрический метод для выявления фальсификации натурального молока сухим молоком. Метод основан на получении окислительно-восстановительного профиля образца при помощи циклической вольтамперометрии с использованием гибридного графит-силиконового электрода. Образцы свежего молока при сканировании как с прямым, так и с обратным потенциалом показали на вольтамперограммах увеличенные пропорции «пик/плато», что в основном было связано с наличием в их составе природных оксидаз. Подобные пики отсутствовали в образцах восстановленного сухого обезжиренного молока из-за инактивации ферментов и распада некоторых антиоксидантов, вызванного тепловой обработкой. Метод контролируемой классификации данных (SIMCA) был использован для моделирования класса «свежее молоко» с предварительным обучением на наборе из 12 образцов свежего молока. Прогнозирование случаев фальсификации свежего молока сухим восстановленным обезжиренным молоком было выполнено с помощью регрессионного анализа методом частичных наименьших квадратов (PLS). Разработанный вольтамперометрический метод имеет предел обнаружения 6 % и позволяет отличать образцы свежего молока от образцов, фальсифицированных восстановленным сухим молоком. Недостатком метода можно считать сложную процедуру изготовления и контроля качества электролитической ячейки, которую можно выполнить только в специально оборудованной лаборатории.

Jin et al. [19] разработан нецелевой метод обнаружения фальсификации молочных продуктов, основанный на обработке данных, полученных с помощью радиоизотопного анализа, методами хемометрики. Методами радиоизотопного анализа было определено содержание стабильных изотопов водорода ($\delta^2\text{H}$), углерода ($\delta^{13}\text{C}$), азота ($\delta^{15}\text{N}$) и кислорода ($\delta^{18}\text{O}$) в 232 образцах сухого молока и в 88 образцах свежего молока, собранных по всему миру. Полученный массив данных был обработан методами принципиального анализа компонентов (PCA), линейного дискриминантного анализа (LDA), а также использован для обучения нейронных сетей (ANN) для определения критериев отличия свежего молока от восстановленного. С помощью оценки содержания стабильных изотопов углерода, азота, водорода и кислорода в сочетании с хемометрическими методами удалось идентифицировать восстановленное молоко и свежее молоко с точностью до 99,6 %.

Описанные выше методы — ВЭЖХ–МС, инфракрасная спектроскопия, ядерный магнитный резонанс, радиоизотопный и вольтамперометрический анализ — в сочетании с продвинутой статистическими методами обработки эффективно решают поставленную задачу. Вместе с тем указанные методы требуют использования сложного дорогостоящего измерительного оборудования и привлечения высококвалифицированного персонала, что ограничивает возможность их широкого внедрения.

Целью настоящего исследования является разработка метода, предназначенного для раскрытия фальсификации сухим молоком свежего натурального молока. Колориметрический метод, предлагаемый авторами, представляет собой модификацию метода оценки интенсивности пастеризации молока, описанного в нашей работе [20]. Метод прост в реализации и не требует применения сложного и дорогостоящего оборудования.

2. Объекты и методы

2.1. Материалы

В работе были использованы образцы сборного сырого молока (8 образцов от одного поставщика-производителя — ООО «АгриВолга» (Ярославская область, Угличский район, д. Головино)), 5 образцов от разных производителей (Московская область, Дмитровский район), а также 2 индивидуальных образца от отдельных коров, всего 15 образцов сырого молока.

Были использованы 4 образца сухого обезжиренного молока и 4 образца сухого цельного молока от 8 разных производителей.

Исследование проводили на смесях натурального сырого обезжиренного молока с восстановленным сухим молоком (ВСМ), составленных по плану эксперимента, приведенному в Таблице 1. Для приготовления восстановленного сухого молока, сухое обезжиренное молоко (в количестве 10 г на 100 см³ смеси) или сухое цельное молоко (14 г на 100 см³ смеси) растворяли в деионизированной воде комнатной температуры и далее выдерживали в холодильнике при температуре 5 °C в течение ночи для полного растворения. Восстановленное цельное сухое молоко, перед смешиванием с натуральным молоком обезжиривали на центрифуге ЦЛн-16 (Changsha Xiangzhi Centrifuge Instrument Co., Ltd., КНР) при 10000 об/мин в течение 10 мин.

Таблица 1. План эксперимента

Table 1. Experiment plan

Вариант	Массовая доля ВСМ в смеси, %	Масса ВСМ, г	Масса свежего обезжиренного молока, г
1	0	0	80
2	5	4	76
3	10	8	72
4	25	20	60
5	50	40	40
6	100	80	0

Составленные согласно плану эксперимента молочные смеси использовали для получения очищенных от лактозы препаратов казеина.

2.2. Методы

2.2.1. Методы исследования фракции белков молока

Массовую долю общего белка в молоке определяли методом Кьельдала по ГОСТ 23327-1998².

2.2.2. Приготовление очищенных от лактозы препаратов казеина

Из составленных согласно плану эксперимента молочных смесей получали 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%-ной уксусной кислоты, перемешивали, выдерживали 10 мин для формирования хлопьев белка и центрифугировали на центрифуге ЦЛн-16 (Changsha Xiangzhi Centrifuge Instrument Co., Ltd., КНР) при 5000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливали, а казеиновый осадок промывали деионизированной водой. Для этого в стакан с осадком добавляли воду, доводя массу содержимого центрифужной пробирки до 35,0 ± 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 55,0 ± 0,1 г, перемешивали, и центрифугировали на центрифуге ЦЛн-16 (Changsha Xiangzhi Centrifuge Instrument Co., Ltd., КНР) при 5000 об/мин в течение 5 мин. Надосадок отбрасывали. Проводили пять циклов промывания. Получали очищенный от свободной лактозы казеиновый стусток.

Промытый казеиновый стусток нарезают ножом на части размером не более 3 × 10 мм, после чего измельчали, продавливая через сито из проволоочной сетки 14 Mesh (размер ячейки — 1,43 × 1,43 мм). Частицы измельченного стустка высушивали на открытых чашках Петри под тягой при комнатной температуре в течение 2,5 ч с периодическим перемешиванием. Получали очищенный от свободной лактозы сухой препарат казеина. Массовая доля влаги в препаратах варьировала в пределах 6,15 ± 0,71 %.

² ГОСТ 23327-98. Молоко и молочные продукты. Метод измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка. М.: Стандартинформ, 2009. — 8 с.

2.2.3. Контроль эффективности промывания казеинового осадка от лактозы

Эффективность промывания казеинового осадка от свободной лактозы оценивали косвенно, по содержанию в промывных водах белковых веществ, растворимых в 2,5 %-м растворе трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Для этого в центрифужный стакан на 50 см³ помещали образец промывной воды в количестве 12 см³, к которой добавляли 0,8 см³ раствора ТХУ концентрацией 40 % (вес/вес), для получения концентрации ТХУ в растворе 2,5 %.

Смесь перемешивали на вортексе VX-MT (Xiamen Branch Tongxin Biomedical Technology Co., Ltd., КНР), после чего выдерживали в состоянии покоя в течение 10–15 мин для формирования хлопьев белка. Продолжительность выдерживания была установлена авторами в предыдущем исследовании [21]. Далее образцы центрифугировали на центрифуге ЦЛн-16 (Changsha Xiangzhi Centrifuge Instrument Co., Ltd., КНР) при 10000 об/мин в течение 10 мин. Надосадок фильтровали на фильтрах из нейлона с размером пор 0,45 мкм (Tianjin Jinteng Experiment Equipment Co., Ltd, КНР).

Содержание белковых веществ в пробе проводили спектрофотометрическим методом по величине поглощения на длинах волн 280 и 320 нм [22]. Оптическую плотность образцов измеряли в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм на спектрофотометре РВ2201 (ЗАО «Спектроскопия, оптика и лазеры — авангардные разработки», Республика Беларусь).

Количество промываний считается достаточным, если в осветленном с помощью ТХУ фильтрате из промывной воды величина поглощения ($Abs_{280} - Abs_{320}$) < 0,1, где Abs_{280} и Abs_{320} — оптическая плотность фильтрата на длинах волн 280 и 320 нм соответственно.

2.2.4. Процесс тепловой обработки препаратов казеина

Перед тепловой обработкой высушенные препараты промытого от свободной лактозы казеина упаковывали на машине Henkelman Boxer 42 (Henkelman Vacuum Systems, Нидерланды) под вакуумом (отрицательное давление 1 Бар; продолжительность вакуумирования 20 с) в пакеты из кэшированной фольги толщиной 200 мкм (Hefei Tao Lai Tao to E-commerce Co., Ltd, КНР). Герметичная упаковка была необходима для предотвращения выпаривания влаги из препаратов казеина.

Тепловую обработку препаратов казеина проводили в нагревательном электрошкафе марки СНОЛ-3,5,3,5,3,5-И5М («НПФ Термикс», Россия) при поддержании температуры на уровне $101 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5 ч. Необходимая температура и продолжительность тепловой обработки была установлена в предыдущей работе авторов [20].

2.2.5. Методы исследования окрашивания

Измерение интенсивности окрашивания препаратов казеина проводили в цветовом пространстве CIE $L^*a^*b^*$ [23] при помощи колориметра модели NR20XE (Shenzhen Threeneh Technology Co., Ltd., КНР) с оптической геометрией сенсора $45^\circ/0^\circ$ (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, КНР), имеющую геометрию кюветы для образца: диаметр 21 мм, глубина 4 мм. Порошок выравнивали при помощи шпателя. Проводили 5 последовательных измерений, из которых отбирали 3 результата, дающих наименьшую сумму стандартных отклонений для L^* , a^* , b^* . Результат измерений вычисляли как среднее значение по трем отобраным результатам измерений.

Величину общего цветового отличия ΔE_{ab} в соответствии со стандартом CIE1976 [23] рассчитывали по формуле:

$$\Delta E_{ab} = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}, \quad (1)$$

где $\Delta L^* = L_1^* - L_0^*$; $\Delta a^* = a_1^* - a_0^*$; $\Delta b^* = b_1^* - b_0^*$; L_0^* , a_0^* , b_0^* — показатели стандартного образца сравнения; L_1^* , a_1^* , b_1^* — показатели исследуемого образца.

В качестве стандартного образца сравнения использовали препараты казеинов до тепловой обработки, в качестве исследуемого образца применяли препараты казеинов после тепловой обработки.

Уровни цветовых показателей, характеризующих оттенок и насыщенность цвета, определяли по адаптированной цветовой шкале CIE $L^*C^*h^*$, отложенной на полярных координатах, по формулам:

$$h_{ab} = \left(\frac{b^*}{a^*} \right), \quad (2)$$

где h_{ab} — цветовой угол (hue angle), рад;

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}, \quad (3)$$

где C_{ab}^* — насыщенность цвета (chroma).

2.2.6. Методы статистического анализа

Математическая обработка данных осуществлялась с применением программных пакетов Microsoft Excel и Statsoft Statistica (v. 5.5). Оценку влияния фактора «массовая доля ВСМ» на переменные отклика проводили методами дисперсионного, кластерного и регрессионного анализа. Оценку достоверности отличий по окрашиванию между вариантами препаратов казеина, проводили с помощью однокритериального дисперсионного анализа методом парных сравнений Тьюки. Достоверность отличий между факторами принималась при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Формирование окрашивания

В процессе высушивания молока происходит интенсивное развитие реакции Майяра, на ранней стадии которой формируются лактозилированные группы аминокислот. Их содержание может быть использовано в качестве маркерного признака отличия восстановленного сухого молока от свежего и термически обработанного натурального молока [8].

Физический принцип описываемого в настоящей работе метода основан на оценке содержания лактозилированных аминокислот в исследуемом образце молока колориметрическим методом. Для этого из исследуемого образца молока выделяют препарат казеина и подвергают его тепловой обработке, для преобразования содержащихся в нем продуктов начальной стадии реакции Майяра (лактозилированные аминокислоты), которые не имеют цвета, в продукты финальной стадии реакции Майяра (меланоиды), имеющие интенсивное окрашивание. Получаемая интенсивность окрашивания препарата пропорциональна концентрации меланоидов, которая, в свою очередь, пропорциональна концентрации прекурсоров реакции — лактозилированных аминокислот. Перед тепловой обработкой препарат казеина очищают от свободной лактозы. Очистка казеина от свободной лактозы позволяет избежать формирования новых лактозилированных групп аминокислот и провести реакцию формирования меланоидов только из лактозилированных аминокислот, образовавшихся в процессе производства сухого молока. Авторы подтвердили возможность применения аналогичного подхода для оценки содержания продуктов ранней стадии реакции Майяра при разработке колориметрического метода определения интенсивности пастеризации молока [20]. Указанный метод был модифицирован в целях повышения интенсивности окрашивания образцов за счет оптимизации условий реакции формирования меланоидов.

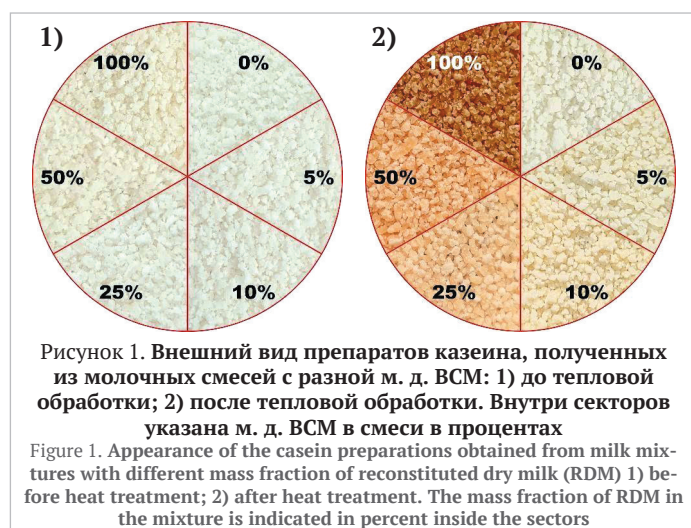
Исследования указывают на сильное влияние концентрации воды в реакционной среде на формирование меланоидов в течение финальной стадии реакции Майяра [24,25]. Неферментативное побурение (формирование меланоидов) является реакцией, ограничиваемой скоростью диффузии (diffusion-limited reaction). Вода выступает в роли растворителя и переносчика прекурсоров реакции. При низком содержании воды происходит снижение скорости диффузии реагирующих молекул, что ведет к замедлению реакции Майяра вплоть до полной остановки [26]. В целях сохранения влаги в препаратах казеина их герметично запечатывали в пакеты из фольги, после чего подвергали тепловой обработке в соответствии с процедурой, описанной в разделе 2.2.4, для формирования меланоидов.

3.2. Визуальная оценка интенсивности окрашивания

Были исследованы показатели окрашивания препаратов казеина, приготовленных в соответствии с планом эксперимента (Таблица 1) из молочных смесей с разной массовой долей восстановленного сухого молока.

Внешний вид образцов препаратов казеина, полученных из молочных смесей с разной массовой долей ВСМ (далее, по тексту, в сокращенной форме — «образцов с разной м. д. ВСМ»), до и после тепловой обработки представлен на Рисунке 1.

При оценке внешнего вида препаратов казеина, представленных на Рисунке 1, видно, что влияние м. д. ВСМ в смеси на интенсивность окрашивания препарата казеина проявляется еще до тепловой обработки. Препараты, изготовленные из молочных смесей с м. д. ВСМ 50 и 100 %, имеют более выраженное желто-бурое окрашивание в сравнении с препаратами, изготовленными из смесей с более низкой м. д. ВСМ. Это связано с тем, что протекающая в сухом молоке при его изготовлении и хранении реакция Майяра приводит к формированию меланоидов, имеющих бурую окраску [7,27]. Однако



формирующееся в сухом молоке количество меланоидов не высоко, поскольку лимитированное температурное воздействие на стадии производства и хранения ограничивают развитие реакции Майяра. В сухом молоке большая часть продуктов реакции Майяра представлена продуктами начальной и отчасти продвинутой стадии данной реакции, которые не имеют окрашивания [8,27].

В процессе тепловой обработки происходит преобразование продуктов начальной и промежуточной стадии реакции Майяра в продукты завершающей стадии реакции гликирования (advanced glycated end products — AGE). Далее, через реакцию полимеризации AGE превращаются в меланоиды — вещества с высоким молекулярным весом, имеющие выраженное красно-бурое окрашивание [7,24]. Интенсивность окрашивания определяется концентрацией меланоидов, а количество формирующихся меланоидов зависит от концентрации прекурсоров реакции [24,25]. На Рисунке 1.2 видно, что интенсивность окрашивания препаратов казеина после тепловой обработки пропорциональна м. д. ВСМ в молочной смеси — чем выше м. д. ВСМ, тем темнее окраска.

Использование визуальной оценки интенсивности окрашивания не позволяет проводить точную оценку содержания примеси сухого молока в исследуемом образце. Поэтому на следующих этапах исследований проводили оценку уровней окрашивания с помощью колориметра.

3.3. Колориметрическая оценка интенсивности окрашивания по критерию общего цветового отличия

Показатели окрашивания образцов были измерены с помощью колориметра в значениях цветовых координат $CIE L^*a^*b^*$. Измеренные значения цветовых координат L^* , a^* , b^* в отдельности не могут быть использованы для характеристики цвета объекта или оценки величины различий в цвете разных объектов. Для характеристики изменения окрашивания препаратов казеина под действием тепловой обработки были рассчитаны изменения в уровне цветовых координат ΔL^* , Δa^* , Δb^* и показатель общего цветового отличия ΔE_{ab} .

На Рисунке 2 показано влияние доли ВСМ в молочной смеси на изменение отдельных цветовых координат (ΔL^* , Δa^* , Δb^*) и величины общего цветового отличия ΔE_{ab} в препаратах казеинов под действием тепловой обработки.

Из приведенных на Рисунке 2 графиков видно, что имеет место нелинейная зависимость между значениями ΔE_{ab} для препаратов казеинов и м. д. ВСМ в молочной смеси. Причина состоит в разной реакции индексов ΔL^* , Δa^* , Δb^* на рост концентрации ВСМ и, связанное с этим, повышение концентрации меланоидов. Снижающееся значение индекса ΔL^* указывает на потемнение препаратов при повышении м. д. ВСМ в смеси. Индекс ΔL^* показывает практически линейную зависимость от дозы ВСМ, однако из-за значительной вариации данного индекса отсутствуют статистически достоверные отличия по ΔL^* между образцами натурального молока и образцами с добавлением 5% и 10% ВСМ ($p < 0,05$; тест Тьюки). Индекс Δa^* , указывающий на повышение интенсивности красного оттенка, линейно возрастает при повышении концентрации ВСМ до 25%, после чего рост индекса несколько замедляется. Индекс Δb^* , указывающий на повышение интенсивности желтого оттенка, реагирует резким ростом на увеличение дозы ВСМ до 25% включительно, после чего данный показатель практически не реагирует на повышение дозы ВСМ. Подобное поведение ΔL^* , Δa^* , Δb^* приводит к получению нелинейной зависимости рассчитываемого на основе данных индексов индекса ΔE_{ab} от дозы ВСМ.

Полученные данные по изменению индексов ΔL^* , Δa^* , Δb^* (Рисунок 2) совпадают с данными Roux et al. [28], исследовавших формирование продуктов реакции Майяра в модельных смесях для детского питания в процессе высокотемпературной обработки. В указанной работе было установлено, что при повышении интенсивности тепловой обработки происходило повышение содержания продуктов реакции Майяра, сопровождавшееся изменением значений по цветовым координатам L^* , a^* , b^* . Светлота L^* снижалась, происходило потемнение образцов, a^* и b^* возрастали, оттенок цвета образцов становился более красным и желтым. Результатом такого совместного изменения значений L^* , a^* и b^* было формирование бурого цвета.

Roux et al. [28] отмечали линейное изменение индексов ΔL^* , Δa^* и Δb^* от температуры и продолжительности теплового воздействия и связанной с этим скоростью реакции Майяра. В их исследовании линейные изменения ΔL^* , Δa^* и Δb^* наблюдались в диапазонах: ΔL^* — от 0 до минус 10, Δa^* — от 0 до 3, Δb^* — от минус 2 до 10. Аналогичная линейная зависимость этих индексов от массовой доли ВСМ в молочной смеси отмечается и в нашем исследовании (Рисунки 2.1–2.3).

Roeder et al. [29] в своих исследованиях по влиянию температуры и продолжительности тепловой обработки на реологические характеристики и скорость реакции Майяра в белом шоколаде выявили возникновение сигмовидного характера зависимости ΔE_{ab} при высоком содержании меланоидов, когда значение ΔE_{ab} превышало 30. Это совпадает с результатами наших исследований. На графике, приведенном на Рисунке 2.4, видно, что при дозах внесения ВСМ выше 25% и связанным с этим повышением концентрации меланоидных пигментов происходит сигмовидный загиб зависимости ΔE_{ab} .

Нелинейный характер зависимости индексов ΔL^* , Δa^* и Δb^* от интенсивности окрашивания связан с нелинейным масштабом осей цветового пространства $CIE L^*a^*b^*$. Разрешающая способность по осям L^* , a^* , b^* соответствует чувствительности глаза человека к различению отдельных цветов [30,31]. Глаз человека наиболее чувствителен и лучше всего различает цвета в области участка спектра около 560 нм, что лежит на границе между зеленым и желтым цветом [30]. По этой причине мы не вооруженным глазом способны различить образцы казеина из натурального молока и из молока с добавлением 5% ВСМ (Рисунок 1.2), которые наиболее сильно различаются по интенсивности желтого цвета, т. е. по величине показателя b^* (Рисунок 2). Колориметр, дающий результаты измерений в величинах цветовых координат $CIE L^*a^*b^*$, т. е. адаптированный под цветовое восприятие человека, обладает высокой разрешающей способностью при низких уровнях a^* и b^* и позволяет обнаруживать различия в цвете между образцами без добавления и с добавлением 5% ВСМ.

В цветовом пространстве $CIE L^*a^*b^*$ критерий общее цветовое отличие ΔE_{ab} дает в виде одной цифры меру отличия между двумя объектами, имеющими разный цвет. На практике критерий ΔE_{ab} применяется при промышленном контроле цвета красок, тканей, пластмасс, строительных материалов и т. п. изделений, для установления допустимого предела отклонения цвета от нормируемых значений и выявления брака [31]. Недостатком критерия ΔE_{ab} является то, что он выражает только величину различия, но не качественное различие сравниваемых цветов. Одинаковые различия по ΔE_{ab} между двумя цветами не будут равнозначны визуальным различиям между этими цветами. Это является серьезным ограничением при измерении цвета пищевых продуктов, поскольку интерес представляет не только то, как сильно цвет пищевых продуктов отклоняется от стандарта, но и в какую сторону он изменяется в процессе обработки и хранения [32].

3.4. Колориметрическая оценка интенсивности окрашивания по критериям насыщенности и оттенка цвета

При необходимости детального сравнения цветов CIE рекомендуется использовать адаптированную цветовую шкалу $CIE L^*C^*h^*$, по которой цвет измеряется в координатах L^* («светлота»), C^* (Chroma, «насыщенность цвета») и h^* (Hue, «оттенок цвета»). В этой системе координат Hue = 0° соответствует красному цвету, Hue = 90° — желтому цвету, Hue = 180° — зеленому, а Hue = 270° — синему цвету. Цветовая модель $CIE L^*C^*h^*$ имеет физический смысл, связанный с зависимостью цвета от концентрации пигмента. Повышение концентрации пигмента до определенного предела приводит к повышению насыщенности цвета (Chroma). Дальнейшее повышение концентрации пигмента сопровождается стабилизацией или даже снижением уровня Chroma. Вместо этого происходит потемнение образца, выражающееся в снижении показателя L^* [32]. Потемнение, вместо ожидаемого повышения насыщенности цвета, происходит из-за особенностей зрения человека и происходящих из этого ограничений, накладываемых на границы варьирования цветовых

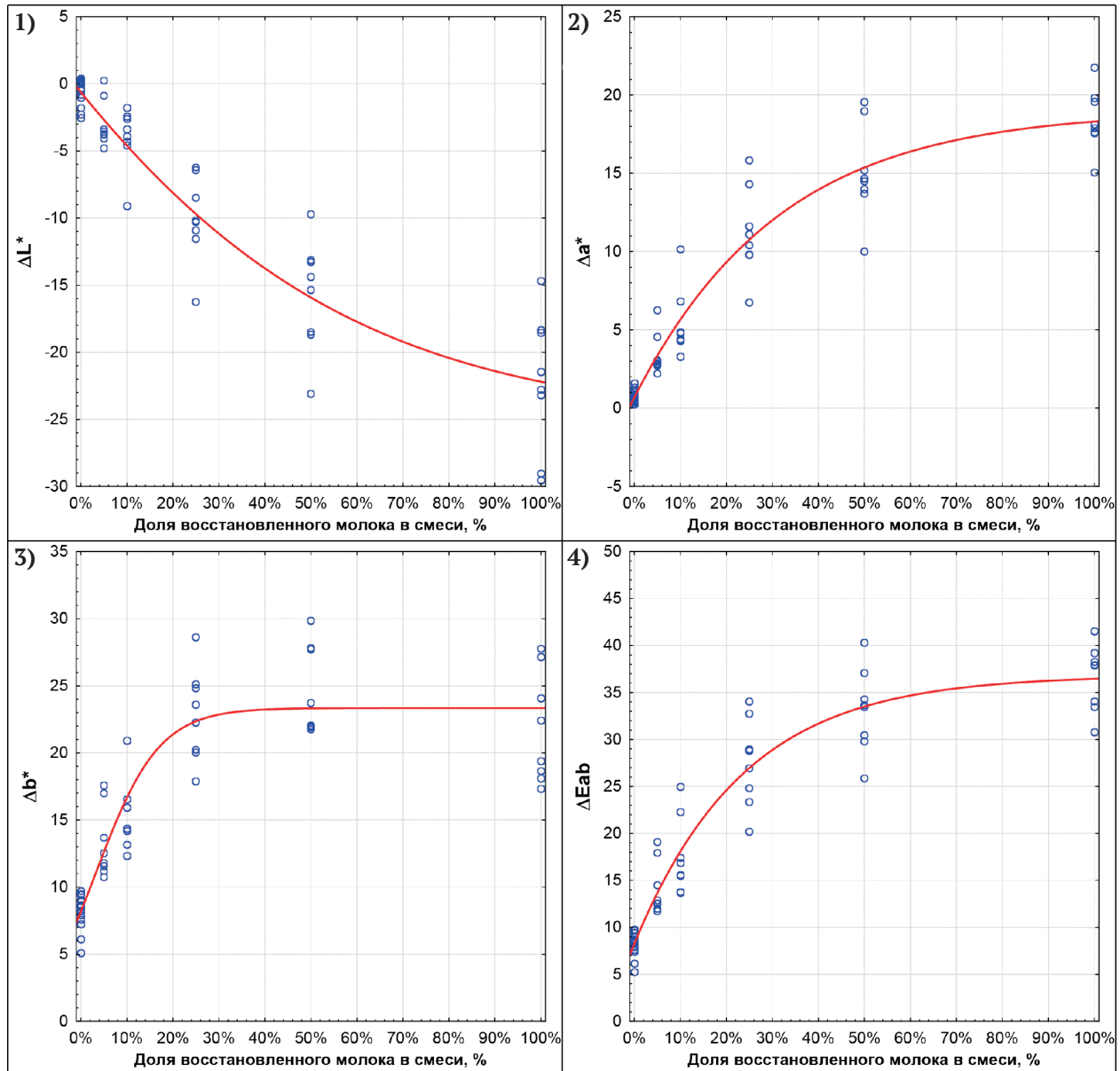


Рисунок 2. Зависимость изменения отдельных цветовых индексов (ΔL^* , Δa^* , Δb^*) и общего цветового отличия ΔE_{ab} для препаратов казеинов до и после тепловой обработки в зависимости от доли ВСМ в молочной смеси

Figure 2. Dependence of changes in certain color indices (ΔL^* , Δa^* , Δb^*) and total color difference ΔE_{ab} for the casein preparations before and after heat treatment depending on the fraction of RDM in the milk mixture

показателей L^* , a^* , b^* (и рассчитываемых от них ΔE , C_{ab}^* и h_{ab}) в цветовом пространстве CIE $L^*a^*b^*$, где не все сочетания координат L^* , a^* , b^* возможны [21].

Наибольший практический интерес и наибольшую трудность представляет дифференциация образцов с м. д. ВСМ, равной 0%, 5% и 10%, которые содержат малое количество меланоидных пигментов и слабо различаются между собой. Поскольку между указанными образцами отсутствовали статистически достоверные различия по величине L^* ($p > 0,1$, тест Тьюки), сравнение для данных образцов по шкале CIE $L^*C^*h^*$ достаточно будет проводить только по критериям C_{ab}^* и h_{ab} .

Значения цветового угла h_{ab} и насыщенности цвета C_{ab}^* для исследованных образцов с разной м. д. ВСМ после выдерживания при 100 °С в течение 5 ч были вычислены в соответствии со стандартом CIE по формулам (2) и (3). Положение точек, соответствующих образцам с разной м. д. ВСМ на полярных координатах C_{ab}^* и h_{ab} , приведено на Рисунке 3.

Из приведенного на Рисунке 3 графика видно, что выбранные для сравнения образцы хорошо дифференцируются в полярных цветовых координатах по величине C_{ab}^* и h_{ab} .

Математическое доказательство возможности дифференциации образцов с м. д. ВСМ, равной 0%, 5% и 10%, по уровням критериев C_{ab}^* и h_{ab} можно выполнить методом кластерного анализа. Кластерный анализ служит инструментом для разбиения множества исследуемых объектов на однородные группы (кластеры) по набору признаков,

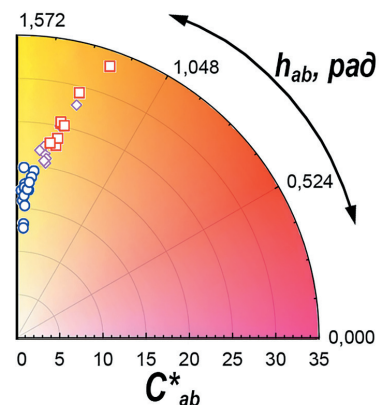


Рисунок 3. Зависимость цветового угла h_{ab} и насыщенности цвета C_{ab}^* для препаратов казеинов после тепловой обработки в зависимости от м. д. ВСМ в молочной смеси: $\circ$ — 0% ВСМ (натуральное молоко); $\diamond$ — 5% ВСМ; $\square$ — 10% ВСМ

Figure 3. Dependence of hue angle h_{ab} and chroma C_{ab}^* for the casein preparations after heat treatment depending on the mass fraction of RDM in the milk mixture: $\circ$ — 0% RDM (natural milk); $\diamond$ — 5% RDM; $\square$ — 10% RDM

имеющих наибольшее сходство [33]. Выделение из группы образцов с м. д. ВСМ равной 0%, 5% и 10% на основании критериев C_{ab}^* и h_{ab} отдельного кластера, состоящего только из образцов с м. д. 0% ВСМ, будет свидетельствовать о достаточности использования пары данных критериев для дифференциации натурального и восстановленного молока.

В работе Benedetti et al. [34] иерархический метод кластерного анализа был использован для классификации сыров по степени зрелости с использованием набора признаков, включающего цвет сырного теста, выраженный в величине цветового угла (Hue). В нашей работе разделение на кластеры проводилось способом, описанным в работе Benedetti et al. [34]: расстояния между объектами в пространстве параметров рассчитывались по величине квадрата Евклидова расстояния, объединение образцов в кластеры проводилось по методу Уорда.

Диаграмма иерархической классификации образцов с разной м. д. ВСМ по критериям цветового окрашивания C_{ab}^* и h_{ab} приведена на Рисунке 4.

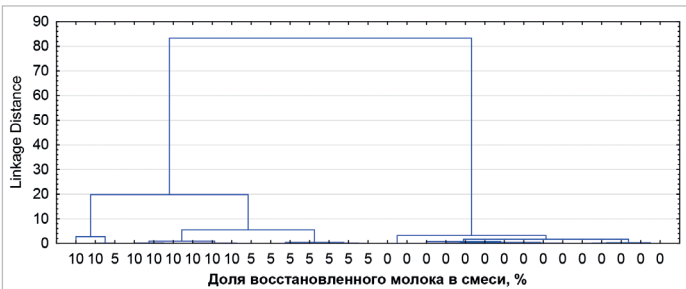


Рисунок 4. Древовидная диаграмма кластерного анализа для образцов с разной м. д. ВСМ
Примечание: Linkage distance — расстояние между объектами в пространстве параметров.
Figure 4. Tree diagram of the cluster analysis for the samples with different mass fraction of RDM
Note: Linkage distance — is the distance between objects in the space of parameters.

Из представленной на Рисунке 4 диаграммы видно, что разделение образцов на кластер, содержащий образцы с 0% ВСМ, и кластер, содержащий образцы с 5% и 10% ВСМ, происходит на самом верхнем уровне иерархии дерева классификации. Это свидетельствует о значительном сходстве между входящими в кластеры образцами и значительном различии кластеров между собой. Следовательно, кластерный анализ с использованием указанных выше критериев для объединения позволяет достоверно подтвердить дифференциацию образцов по уровню цветовых координат C_{ab}^* и h_{ab} на 2 однородные группы (кластера) — натуральное молоко и смеси с добавлением ВСМ.

3.5. Введение комплексного критерия оценки интенсивности окрашивания для повышения степени дифференциации образцов с разной м. д. ВСМ

Для разрабатываемого метода измерений желательно использование единого критерия для дифференциации между образцами натурального молока и образцами с добавлением ВСМ. Отдельными исследователями предложены собственные критерии оценки цвета пищевых продуктов, рассчитываемые на основе стандартных критериев цветового пространства CIE: L^* , a^* , b^* , C_{ab}^* (Chroma) и h_{ab} (Hue). Признаком пригодности подобных критериев для практического использования служит наличие их более высокой корреляции с физико-химическими, органолептическими и иными показателями исследуемых продуктов в сравнении со стандартными критериями оценки цвета [35].

Для оценки интенсивности окрашивания образцов с разной м. д. ВСМ возможно введение комплексного показателя K_{Ch} , рассчитываемого по формуле:

$$K_{Ch} = C_{ab}^*/h_{ab}.$$
 (4)

Предлагаемый комплексный показатель K_{Ch} (так же, как общее цветовое отличие ΔE) дает оценку цвета образца в виде одной цифры, но имеет ряд преимуществ над ним.

Соотношение C_{ab}^*/h_{ab} связано с физической природой образцов. Низкая концентрация меланоидных пигментов в образцах без добавления ВСМ приводит к окрашиванию их в желтый цвет низкой насыщенности. Высокая концентрация меланоидных пигментов в образцах, содержащих ВСМ, придает им интенсивный бурый цвет (Рисунок 1). Поэтому для образцов натурального молока без добавления ВСМ типичны более высокие значения цветового угла h_{ab} при более низких значениях C_{ab}^* , чем для образцов молочных смесей с добавлением ВСМ (Рисунок 3).

Использование соотношения C_{ab}^*/h_{ab} позволяет повысить степень дифференциации между образцами с разной м. д. ВСМ. Применительно к натуральному молоку деление низких значений C_{ab}^* на высокие значения h_{ab} ведет к снижению величины показателя K_{Ch} . Для молочных смесей с добавлением ВСМ деление высоких значений C_{ab}^* на низкие значения h_{ab} увеличивает значение K_{Ch} . Также при использовании для оценки критерия K_{Ch} , вместо критерия ΔE_{ab} снижается трудоемкость анализа, т. к. требуется измерять показатели окрашивания только в образцах после тепловой обработки.

3.6. Сравнение эффективности дифференциации образцов натурального молока и молока с добавлением ВСМ с применением разных критериев отличия

Для объективного сравнения эффективности разных критериев цветовой оценки, количество вносимого ВСМ было пересчитано в количество белка сухого молока, внесенного в состав ВСМ. Содержание белка было измерено методом Кельдаля. На Рисунке 5 приведены графики зависимости общего цветового отличия ΔE_{ab} и критерия K_{Ch} от содержания белка сухого молока, выраженного в виде доли от общей м. д. белка в молочной смеси.

Показатели точности описания зависимости интенсивности окрашивания от м. д. белка сухого молока по различным критериям цветового отличия приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Показатели точности аппроксимации для уравнений линейной регрессии

Table 2. Indicators of the accuracy of approximation for linear regression equations

Критерий оценки	R^2	F	p
ΔE_{ab}	0,7375	81,48	<0,0000001
K_{Ch}	0,7550	89,35	<0,0000001

Примечание: R^2 — коэффициент детерминации; F — Критерий Фишера; p — уровень значимости.

Как следует из данных, приведенных в Таблице 2, применение разных критериев для описания зависимости интенсивности окрашивания образцов с разной м. д. ВСМ от фактического содержания белка сухого молока характеризуется разной точностью. Исходя из показателей точности аппроксимации R^2 и F, критерий K_{Ch} более точно описывает зависимость между интенсивностью окрашивания образца и м. д. белка сухого молока в смеси. Критерий оценки ΔE_{ab} характеризуется большей вариабельностью, т. к. данная величина рассчитывается от значений L^* , a^* и b^* образцов до и после тепловой обработки. При расчете значения ΔE_{ab} , погрешности измерения образцов складываются.

3.7. Установление границ интервалов интенсивности окрашивания для образцов натурального молока

Описываемый в настоящей работе метод выявления наличия примеси сухого молока в натуральном молоке может быть использован только как качественный метод контроля. Причина этому — существенная неоднородность в группах сырого и восстановленного молока по содержанию продуктов реакции Майяра. Для дифференциации образцов натурального молока и молочных смесей с добавлением ВСМ были вычислены границы доверительных интервалов окрашивания в этих группах по критериям ΔE_{ab} и K_{Ch} . В Таблице 3 приведены граничные значения уровней окрашивания для натурального молока и для образцов, содержащих 5% ВСМ.

Таблица 3. Границы интервалов окрашивания для групп молока с добавлением и без добавления ВСМ

Table 3. Boundaries of intervals of staining for the groups of milk with and without addition of RDM

Критерий оценки	Для натурального молока			Для молока с м. д. 5% ВСМ		
	n	Max	P(+0,95)	n	Min	P(-0,95)
ΔE_{ab}	15	9,72	8,99	8	11,71	11,75
K_{Ch}	15	13,14	11,94	8	14,47	14,19

Примечание: n — количество образцов в выборке; Max, Min — максимальное и минимальное значение по выборке; P(+0,95), P(-0,95) — верхняя и нижняя границы доверительного интервала для уровня доверительной вероятности P = 0,95.

На основании данных, приведенных в Таблице 3, видно, что максимальные значения интенсивности окрашивания для натурального молока, оцениваемые по ΔE_{ab} и K_{Ch} , не пересекаются с минимальными значениями для молока с м. д. 5% ВСМ. Для сырого

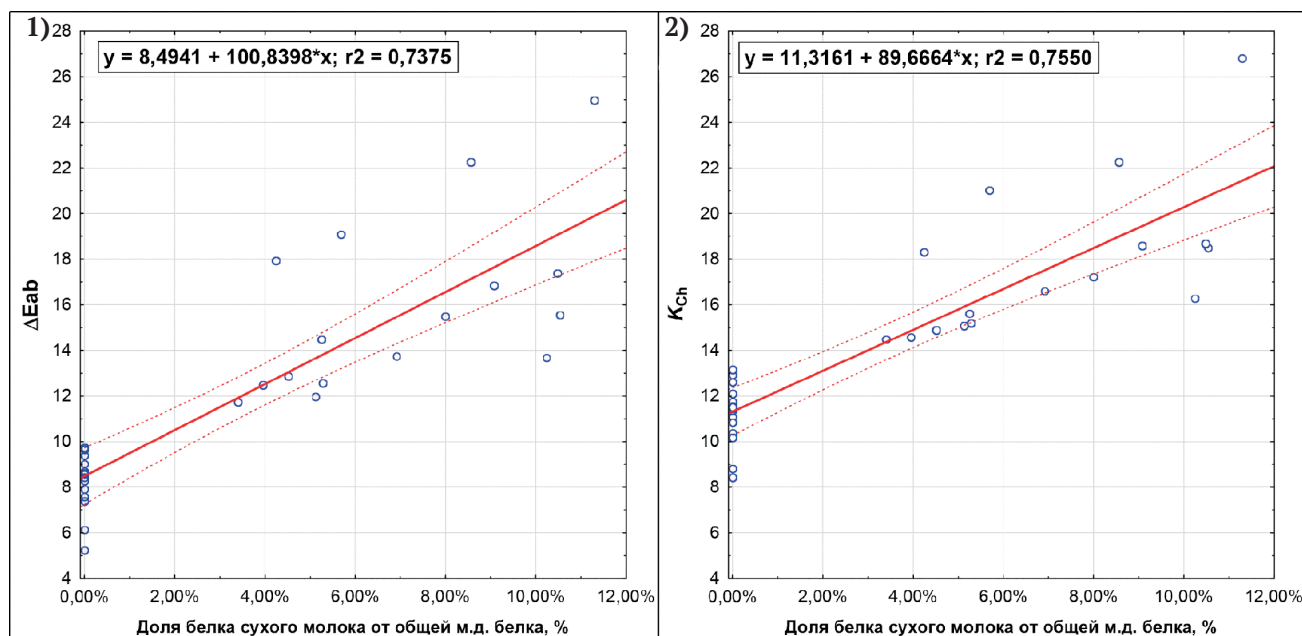


Рисунок 5. Зависимость значений: 1) общего цветового отличия ΔE_{ab} и 2) критерия K_{ch} — от доли содержания белка сухого молока от общей м. д. белка в молочной смеси

Figure 5. Dependence of the values of total color difference ΔE_{ab} (1) and K_{ch} criterion (2) on the percent of the dry milk protein content of the total mass fraction of protein in the milk mixture

молока целесообразно установить границу по наибольшему максимальному фактическому значению: для критерия ΔE_{ab} — на уровне 9,72 (округленно 10 ед.), для критерия K_{ch} — на уровне 13,14 (округленно 14 ед.). Образцы молока, в которых обнаруживаются уровни окрашивания выше указанных значений, следует считать содержащими примесь ВСМ в количестве свыше 5 % (по массе).

На практике, имеет место фальсификация добавлением сухого молока к натуральному молоку, в целях повышения в последнем содержания белка и придания ему более высокого сорта, который дороже оплачивается при покупке переработчиками. При м. д. сухих веществ в ВСМ, равной 10 %, добавление 5 % ВСМ от массы молочной смеси эквивалентно внесению 5 г сухого молока на 1 дм³ натурального молока. При содержании белка в сухом молоке 33 % это соответствует добавлению ~1,7 г белка на 1 дм³ натурального молока, что приводит к увеличению содержания белка в нем примерно на 0,17 %. Внесение сухого молока в количестве, превышающем этот порог, достоверно выявляется с помощью разработанного метода.

4. Заключение

На основании полученных данных, можно сделать следующие выводы:

- ❑ проблема фальсификации свежего молока добавлением сухого обусловлена, в том числе, сложностью существующих методов контроля и отсутствием достаточно простого и надежного способа выявления такой примеси;
- ❑ существует потребность в разработке простого в реализации инструментального метода для выявления наличия примеси сухого молока в свежем натуральном молоке.

Авторами предлагается метод выявления примеси сухого молока, основанный на оценке содержания продуктов начальной стадии реакции Майяра, являющихся маркерным признаком сухого молока. Метод реализуется посредством приготовления из молока препарата высушенного, очищенного от лактозы казеина с содержанием влаги около 6 %. Затем препарат подвергается тепловой обработке при температуре 100 ± 1 °C в течение 5 часов в герметичной упаковке, обеспечивающей сохранение влаги. В процессе тепловой обработки происходит трансформация продуктов начальной стадии реакции Майяра (лактозилированных аминокислот, не обладающих окрашиванием) в продукты финальной стадии реакции Майяра (меланоиды, имеющие интенсивную окраску). Интенсивность этой окраски можно измерить с помощью колориметра с представлением результатов в координатах цветового пространства CIE $L^*a^*b^*$.

Содержание меланоидных пигментов может быть оценено как с помощью стандартного критерия общего цветового отличия ΔE , так и с применением предлагаемого авторами комплексного критерия K_{ch} , который рассчитывается как соотношение C^*_{ab}/h_{ab} .

Критерий K_{ch} более точно описывает зависимость между интенсивностью окрашивания образца и м. д. белка сухого молока в смеси в сравнении со стандартным критерием оценки ΔE_{ab} . Также при использовании для оценки критерия K_{ch} вместо критерия ΔE_{ab} уменьшается трудоемкость анализа, т. к. требуется измерять показатели окрашивания только в образцах после тепловой обработки.

Были проведены испытания разработанного колориметрического метода на смесях из свежего натурального молока с восстановленным сухим молоком. Установлено, что разработанный колориметрический метод позволяет обнаруживать добавление сухого молока на уровне ~5 г на 1 дм³ свежего натурального молока.

REFERENCES

- Poonia, A., Jha, A., Sharma, R., Singh H.-B., Rai, A. K., Sharma, N. (2016). Detection of adulteration in milk: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 70(1), 23–42. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12274>
- Nikolaou, P., Deskoulidis, E., Topoglidis, E., Kakoulidou, A. T., Tsopelas, F. (2020). Application of chemometrics for detection and modeling of adulteration of fresh cow milk with reconstituted skim milk powder using voltammetric fingerprinting on a graphite/ SiO₂ hybrid electrode. *Talanta*, 206, Article 120223. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120223>
- Ho, J.-H., Chou, M.-Y., Chan, Y.-J., Chow, C.-F., Lee, T.-A., Lu, W.-C. et al. (2024). Discrimination of reconstituted milk from fresh skim milk by using lactulose and furosine as milk quality indicators. *Journal of Agriculture and Food Research*, 18, Article 101336. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101336>
- Tan, D., Zhang, X., Su, M., Jia, M., Zhu, D., Kebede, B. et al. (2021). Establishing an untargeted-to-MRM liquid chromatography-mass spectrometry method for discriminating reconstituted milk from ultra-high temperature milk. *Food Chemistry*, 337, Article 127946. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127946>
- Cui, J., Zhu, D., Su, M., Tan, D., Zhang, X., Jia, M. et al. (2021). Lipidomics strategy for the identification of ultra-high temperature and reconstituted milk by UPLC-Q-Exactive orbitrap mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 14, 1064–1073. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01947-5>
- Cui, J., Zhu, D., Su, M., Tan, D., Zhang, X., Jia, M. et al. (2019). The combined use of 1H and 2D NMR-based metabolomics and chemometrics for non-targeted screening of biomarkers and identification of reconstituted milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14), 6455–6461. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9924>
- Fan, X., Wang, C., Cheng, M., Wei, H., Gao, X., Ma, M. et al. (2023). Markers and Mechanisms of deterioration reactions in dairy products. *Food Engineering Reviews*, 15, 230–241. <https://doi.org/10.1007/s12393-023-09331-9>
- Guyomarc'h, F., Warin, F., D. Muir, D., Leaver, J. (2000). Lactosylation of milk proteins during the manufacture and storage of skim milk powders. *International Dairy Journal*, 10(12), 863–872. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00020-6)

9. Resmini, P., Pellegrino, 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.
10. Baptista, J. A. B., Carvalho, R. C. B. (2004). Indirect determination of Amadori compounds in milk-based products by HPLC/ELSD/UV as an index of protein deterioration. *Food Research International*, 37(8), 739–747. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.02.006>
11. 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>
12. Liu, H., Huang, R., Zeng, G., Xu, Z., Sun, Y., Lei, H. et al. (2020). Discrimination of reconstituted milk in China market using the content ratio of lactulose to furosine as a marker determined by LC–MS/MS. *LWT – Food Science and Technology*, 117, Article 108648. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108648>
13. 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
14. He, Y., Cao, X., Ji, K., Yang, A., Chen, X., Chen, C. (2022). Uncertainty evaluation for the determination of furosine in milk by HPLC[J]. *China Dairy*, 9, 71–80. <https://doi.org/10.12377/1671-4393.22.09.16> (In Chinese)
15. Tan, D., Zhang, H., Tan, S., Xue, Y., Jia, M., Zhu, X. et al. (2022). Differentiating ultra-high temperature milk and reconstituted milk using an untargeted peptidomic approach with chemometrics. *Food Chemistry*, 394, Article 133528. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133528>
16. Du, L., Lu, W., Zhang, Y., Gao, B., Yu, L. (2020). Detection of milk powder in liquid whole milk using hydrolyzed peptide and intact protein mass spectral fingerprints coupled with data fusion technologies. *Food Science and Nutrition*, 8(3), 1471–1479. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1430>
17. Du, L. (2024). New insights into raw milk adulterated with milk powder identification: ATR-FTIR spectroscopic fingerprints combined with machine learning and feature selection approaches. *Journal of Food Composition and Analysis*, 133, Article 106443. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106443>
18. Chu, C., Wang, H., Luo, X., Fan, Y., Nan, L., Du, C. et al. (2024). Rapid detection and quantification of melamine, urea, sucrose, water, and milk powder adulteration in pasteurized milk using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy coupled with modern statistical machine learning algorithms. *Heliyon*, 10(12), Article e32720. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32720>
19. Jin, B., Zhou, X., Rogers, K. M., Yi, B., Bian, X., Yan, Z. et al. (2022). A stable isotope and chemometric framework to distinguish fresh milk from reconstituted milk powder and detect potential extraneous nitrogen additives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 108, Article 104441. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104441>
20. 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. [Топникова, Е. В., Мягконосов, Д. С., Абрамов, Д. В., Кашникова, О. Г. (2024). Colorimetric method for estimating the intensity of heat load during milk pasteurization. *Food Systems*, 7(3), 481–490. (In Russian)] <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-3-481-490>
21. Мягконосов, 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. [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. (In Russian)] <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-1-105-113>
22. 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)
23. Hill, B., Roger, T., Vorhagen, F. W. (1997). Comparative analysis of the quantization of color spaces on the basis of the CIELAB color-difference formula. *ACM Transactions on Graphics (TOG)*, 16(2), 109–154. <https://doi.org/10.1145/248210.248212>
24. Croguennec, T. (2016). Non-Enzymatic Browning. Chapter in a book: Handbook of Food Science and Technology 1: Food Alteration and Food Quality. ISTE Ltd and John Wiley & Sons, Inc, 2916. <https://doi.org/10.1002/9781119268659.ch5>
25. Nath, P., Pandey, N., Samota, M., Sharma, K., Kale, S., Kannaujia, P. et al. (2022). Browning Reactions in Foods. Chapter in a book: Advances in Food Chemistry. Springer, Singapore, 2022. https://doi.org/10.1007/978-981-19-4796-4_4
26. Saltmarch, M., Labuza, T. P. (1982). Nonenzymatic browning via the maillard reaction in foods. *Diabetes*, 31(Supplement_3), 29–36. <https://doi.org/10.2337/diab.31.3.S29>
27. Phosanam, A., Chandrapala, J., Zisu, B., Adhikari, B. (2021). Storage stability of powdered dairy ingredients: A review. *Drying Technology*, 39(11), 1529–1553. <https://doi.org/10.1080/07373937.2021.1910955>
28. Roux, S., Courel, M., Ait-Ameur, L., Birlouez-Aragon, I., Pain, J.-P. (2009). Kinetics of Maillard reactions in model infant formula during UHT treatment using a static batch ohmic heater. *Dairy Science and Technology*, 89, 349–362. <https://doi.org/10.1051/dst/2009015>
29. Rodier, L. C., Hartel, R. W. (2021) Characterizing Maillard reaction kinetics and rheological changes in white chocolate over extended heating. *Journal of Food Science*, 86(6), 2553–2568. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15772>
30. Dawson, P. L., Acton, J. C. (2018). Impact of proteins on food color. Chapter in a book: Proteins in Food Processing. Elsevier Ltd, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00023-1>
31. Karma, I. G. M. (2020). Determination and measurement of color dissimilarity. *International Journal of Engineering and Emerging Technology*, 5(1), 67–71.
32. Wrolstad, R. E., Smith, D. E. (2017). Color Analysis. Chapter in a book: Food Analysis, Food Science Text Series. Springer International Publishing, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_31
33. Афонин, П. Н., Афонин, Д. Н. (2017). Статистический анализ с применением современных программных средств: учебное пособие. СПб.: Интермедия, 2017. [Afonin, P. N., Afonin, D. N. (2017). Statistical analysis using modern software: a tutorial. St. Petersburg: Intermedia, 2017. (In Russian)]
34. Benedetti, S., Sinelli, N., Buratti, S., Riva, M. (2005). Shelf life of crescenza cheese as measured by electronic nose. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3044–3051. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72985-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72985-4)
35. Pathare, P. B., Opara, U. L., Al-Said, F. A.-J. (2012). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food Bioprocessing Technology*, 6, 36–60. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>

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 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	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
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: topnikova.l@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0225-6870	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
Абрамов Дмитрий Васильевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель направления биохимических 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	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
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	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
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	The authors are equally involved in writing the manuscript and are equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.