

Application of Fluorescent Spectroscopy and Ultrasound Analysis for Dairy Products Identification

V.M. Ischenko[†], N.P. Kvitkovska[‡], O.V. Kochubei-Lytvynenko[†], M.V. Ischenko^{**}

[†] National University of Food Technologies, 68, Volodymyrska str., 01601, Kyiv, Ukraine;

[‡] Taras Shevchenko National University of Kyiv 64, Volodymyrska str., 01033, Kyiv, Ukraine,

*e-mail: ischenko_mv@knu.ua

Received: April 04, 2018; Accepted: July 23, 2018

DOI: 10.17721/moca.2018.xx-xx

Ultrasound analysis of more than 60 samples of pasteurized natural whole milk and of milk product made from dried milk was performed using ultrasonic analyzer "Ecomilk-Bond". Validation of this method for determination of quality indicators was performed. It was found that the precision of determination of milk quality indicators by the abovementioned method fits the purpose. Method of principal components was applied to the obtained pool of data, and this allowed to partially clusterize the samples of milk. Fluorescent spectroscopy was utilized in order to detect reconstituted milk. Fluorescence of tryptophane was recorded in 305–420 nm range with excitation at 290 nm; for the spectra of products of Maillard reaction in 345–500 nm with excitation at 330 nm. It was determined that the results of these measurement can only be markers of natural whole milk.

Keywords: milk, ultrasound analysis, fluorescence, principal component analysis

Використання флуоресцентної спектроскопії та ультразвукового аналізу для ідентифікації молочної продукції

V.M. Іщенко[†], Н.П. Квітковська[‡], О.В. Кочубей-Литвиненко[†], М.В. Іщенко^{**}

[†] Національний університет харчових технологій, 68, Володимирська, Київ, Україна, 01601;

[‡] Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 60, Володимирська, Київ, Україна, 01033,

*e-mail: ischenko_mv@knu.ua

Надійшла: 04 квітня 2018 р; Прийнята: 23 липня 2018 р

DOI: 10.17721/moca.2018.xx-xx

Проведено ультразвуковий аналіз більше 60 зразків натурального незбираного, пастеризованого молока та молочного продукту, виготовленого із сухого молока із використанням ультразвукового аналізатора молока «Екомілк-Бонд» та здійснено валідацію методики визначення показників якості молока цим методом. Встановлено, що прецизійність визначення показників якості молока є достатньою для вирішення поставлених завдань. Застосування методу головних компонент для обробки масиву одержаних даних дозволило провести часткову кластеризацію зразків молока. З метою виявлення відновленого молока застосовано метод флуоресцентної спектроскопії. Флуоресценцію триптофану здійснювали у діапазоні 305–420 нм зі збудженням при довжині хвилі 290 нм, реєстрацію спектрів флуоресценції продуктів реакції Майяра проводили у діапазоні 345–500 нм зі збудженням при довжині хвилі 330 нм. Встановлено, що вимірні значення флуоресценції триптофану та продуктів реакції Майяра можуть бути маркером тільки на натуральне незбиране молоко.

Ключові слова: молоко, ультразвуковий аналіз, флуоресценція, метод головних компонент

Молоко та молочні продукти відносяться до найбільш цінних харчових продуктів, займаючи в продовольчій корзині споживачів чільне місце. Впродовж останніх десятиріч світове виробництво молока невинно зростає. Великі обсяги виробництва і глобалізація молочної промисловості призводять до зниження цін, що в свою чергу знижує прибутки, а значить, не може не наводити недобропорядних виробників на думку про застосування різних недозволених прийомів, щоб захистити та збільшити свої доходи. Найчастіше фальсифікація молока здійснюється

додаванням консервантів (таких як формальдегід або гідроген пероксид), розведення молока водою з подальшим додаванням речовин з високим вмістом Нітрогену для компенсації рівня вмісту білка, заміна молочного жиру жиром рослинного походження, додаванням в деякі молочні продукти натуральної або сухої молочної сироватки, тощо [1]. Наразі набуває поширення підміна молока його відновленим аналогом, тобто «молоком», одержаним із сухих молочних продуктів. Причому для здешевлення сухого молока його можуть фальсифікувати сухою молочною сироваткою.

Виробники вважають, що сухе або приготоване з нього відновлене молоко за своїми якостями нічим не відрізняється від звичайного. Але при високотемпературній термічній обробці молоко не тільки змінює смакові властивості – в ньому руйнуються вітаміни, ензими, зменшується вміст Кальцію. В той же час споживачі, що придбали молочні продукти, хочуть бути впевненими, що ці продукти відповідають заявленому виробником маркуванню. Тому пошук маркерів відновленого молока є надзвичайно актуальним, тим більше, що в Україні не проводяться наукові дослідження по даній проблемі.

Огляд наукових публікацій показав, що основними методами аналізу молока на виявлення його підміни відновленим чи виявлення додавання відновленого молока є спектроскопія ближньої ІЧ-області, капілярний електрофорез та флуоресцентна спектроскопія [2-7]. В той же час, автори огляду [7] відзначають що, капілярний електрофорез дозволяє надійно визначити білки сироватки, а метод ближньої ІЧ-спектроскопії дає багатообіцяючі результати тільки у виявленні відновленого молока в сирому молоці. Метод флуоресцентної спектроскопії є більш специфічний, ніж інші спектроскопічні методи, оскільки флуоресцентні сполуки дуже чутливі до матричного оточення. Таким чином, флуоресценція може бути використана для характеристики конформаційних змін, що відбуваються в різних умовах виробництва молочної продукції [4,6]. Метод базується на визначенні амінокислот, які зазнають змін під час термічної обробки молока, зокрема, триптофану та виявленню речовин, що утворюються в результаті реакції Майяра. Автори роботи [8] запропонували для оцінки ступеня термічної обробки молока використовувати флуоресценцію продуктів реакції Майяра і розчинного триптофану (FAST). Індекс FAST являє собою відношення інтенсивності флуоресценції продуктів реакції Майяра до інтенсивності флуоресценції триптофану в молочної фракції при рН 4,6 після осадження білку. Автори [9] припускають, що за індексом FAST можна виявити до 5% відновленого молока у свіжому молоці. Проте в інших дослідженнях, де використовувалися модельні системи, було встановлено, що на вихід флуоресценції продуктів реакції Майяра впливає не тільки ступінь термічного оброблення, але й інші параметри, зокрема, рН та сольовий склад [10]. Автори роботи [11] вважають, що жоден флуоресцентний індикатор не може бути універсальним для виявлення ступеню термічної обробки молока, якщо він не пов'язаний з іншими маркерами.

Метою даного дослідження була оцінка можливості використання ультразвукового аналізу та флуоресцентної спектроскопії для ідентифікації молочної продукції з метою виявлення продуктів, одержаних із сухих молочних сумішей (відновленого

молока).

Експериментальна частина

В дослідженнях, які проводились впродовж 2015-17 років, були проаналізовані 69 зразків натурального, пастеризованого молока та питного молока, виготовленого із сухих молочних продуктів, які умовно розділені на три групи.

Перша група зразків – питні види молока майже всіх відомих українських виробників молочної продукції, які були придбані в супермаркетах м. Києва. Між собою вони відрізнялись за такими показниками: складом – вмістом лактози, жиру; способом пастеризації (пастеризоване (П) і ультрапастеризоване (УП)); упаковкою (скляна тара, поліетиленові пакети чи пакети «Тетра-Пак», «Пюр-Пак»). Серед зразків цієї групи було молоко, заявлене як органічне та зразки, які мали сертифікат відповідності міжнародному стандарту безпечності харчових продуктів ISO 22000.

Друга група зразків – натуральне незбиране молоко (незбиране молоко з не зміненою жирністю), умовне позначення - НН. Це молоко було *придбано* у індивідуальних сільгосптоваровиробників Київщини.

Третя група зразків – відновлене молоко (В). Зразки готували із сухого продукту українських виробників сухого молока жирністю 25% та знежиреного сухого молока розпилювального сушіння, розчиняючи порошок у відповідному об'ємі підготовленої питної води за температури (40 ± 2) °С. Кількість води розраховували, щоб одержати продукти жирністю 2.5% і 0.05% (відповідає знежиреному молочному напою). Одержані зразки відновленого молока гомогенізували на диспергаторі SONOPULS HD 2070 (Bandelin, Німеччина).

Такі фізико-хімічні показники складу молока як вміст жиру, білку, лактози, сухого знежиреного молочного залишку (далі – СЗМЗ), густину та температуру замерзання визначали на ультразвуковому аналізаторі молока «Екомілк-Бонд» (Болгарія), який широко використовуються в заводських і ветеринарних лабораторіях, пунктах прийому молока, міні-заводах, і молочних фермах для контролю якості молока.

Валідацію методики визначення показників якості молока із використанням ультразвукового аналізатора молока «Екомілк-Бонд» здійснено згідно з рекомендаціями [12]. Перевіряли такі робочі характеристики як прецизійність в умовах збіжності та внутрішньо лабораторної відтворюваності. Протокол валідації включав проведення повторних вимірювань (умови збіжності) у три неспідовні дні (умови внутрішньо лабораторної відтворюваності) на шести зразках молока.

Пробопідготовку зразків молока для запису спектрів флуоресценції проводили за наступною методикою. Відбір аліквот зразків молока із усіх

зазначених груп здійснювали після врівноваження температури зразків із кімнатною. Для осадження казеїну до 0.50 см³ проби додавали 9.5 см³ ацетатного буферного розчину з концентрацією 0.10 моль/л (pH=4.60±0.05). Одержаний зразок витримували 30 хвилин і центрифугували на швидкості 3000 об/хв впродовж 10 хв. Отриманий розчин фільтрували крізь беззольний фільтр «синя стрічка». Попередньо було показано, що фільтрування крізь целюлозний мембранний фільтр 0.45 мкм та паперовий дають однакові результати. Перед реєстрацією спектрів флуоресценції отримані розчини додатково розбавляли у 5 разів дейонізованою водою.

Спектри флуоресценції реєстрували на флуоресцентному спектрометрі LS 55 (Perkin Elmer). Реєстрацію спектрів флуоресценції триптофану здійснювали у діапазоні 305-420 нм зі збудженням при довжині хвилі 290 нм; реєстрацію спектрів флуоресценції продуктів реакції Майяра здійснювали у діапазоні 345-500 нм зі збудженням при довжині хвилі 330 нм. Ширина спектральної щілини монохроматора для збудження становила 10 нм, для флуоресценції – 7.5 нм, швидкість

сканування становила 600 нм/хв.

Результати досліджень

Обробку результатів валідації методики визначення показників якості молока на ультразвуковому аналізаторі молока «Екомілк-Бонд» (зразки молока були взяті із перших двох груп) здійснювали згідно рекомендацій, наведених у [12, 13] методом дисперсійного аналізу. Тест Кохрена на однорідність дисперсій не виявив статистично значущої (p=0.05) різниці у прецизійності визначення між різними зразками. Встановлено, що у дослідженому діапазоні значень показників якості складу молока сталим лишається абсолютне значення стандартного відхилення. Результати валідації наведено у таблиці 1. Видно, що прецизійність визначення показників якості молока із застосуванням аналізатора «Екомілк-Бонд», виражена як відповідне стандартне відхилення, є достатньою для вирішення поставлених завдань. Відносно невеликий розкид результатів в умовах внутрішньо лабораторної відтворюваності (RSD ≤5%) вказує також на стабільність показників якості молока при нетривалому зберіганні зразків.

Таблиця 1. Результати валідації методики визначення показників якості молока.

Показник якості	Робочий діапазон	Прецизійність в умовах збіжності, s_r	Прецизійність в умовах внутрішньолабораторної відтворюваності, s_w
Вміст СЗМЗ, (%)	7-10	0.069	0.13
Вміст білка (%)	2-6	0.085	0.093
Вміст жиру (%)	0-10	0.066	0.13
Вміст лактози (%)	3.0-7.0	0.041	0.073
Густина, (г/см ³)	1.220-1.320	0.0026	0.0064
Температура замерзання, (°C)	-(0.42-0.61)	0.0044	0.010

Для візуалізації даних, одержаних на ультразвуковому аналізаторі «Екомілк-Бонд», проводили хемометричний аналіз методом головних компонент. Метод головних компонент дає можливість компактифікувати масив даних шляхом його зведення до масиву меншої розмірності шляхом переведення початкових змінних до нових (головних компонент), що мають більшу інформативність. Метод головних компонент часто використовують для розвідувального аналізу даних з метою пошуку кластерів або груп зразків [14]. На рис.1 наведено графік навантажень першої та другої головних компонент, а на рис.2 – другої та третьої головних компонент. Видно, що спостерігається певна кластеризація зразків. Зокрема, зразки відновленого, натурального незбираного та пастеризованого молока утворюють певні групи. Слід звернути увагу, що у групу відновленого молока потрапила достатньо велика

кількість зразків пастеризованого молока, що може свідчити про їх фальсифікацію: додавання чи повна заміна відновленим молоком, проте, звичайно, не є однозначним доказом. Кластеризації згідно терміну виготовлення та пакування продукту не спостерігалось.

У таблиці 2 наведено навантаження перших трьох головних компонент. Видно, що найбільших внесок у головні компоненти, а отже і вплив на кластеризацію зразків роблять такі показники як СЗМЗ, вміст білку, вміст лактози, температура замерзання та вміст жиру. Зразки відновленого молока характеризуються у цілому меншими значеннями вмісту жиру і більшою густиною. Кореляційна матриця вказує на присутність значущої (на рівні p=0.05) кореляції між такими показниками якості як вміст білку (%) та вміст лактози (%).

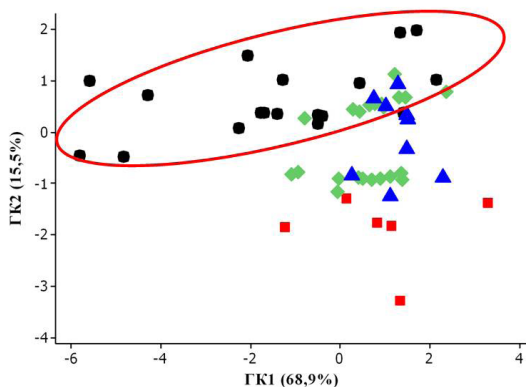


Рис. 1. Графіки рахунків першої та другої головних компонент.

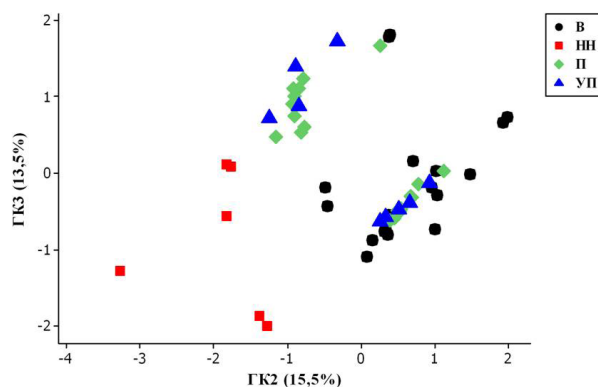


Рис. 2. Графіки рахунків другої та третьої головних компонент.

Таблиця 2. Навантаження перших трьох головних компонент (ГК).

Показник якості	ГК1	ГК2	ГК3
Вміст жиру (%)	0.225	-0.697	-0.642
Вміст СЗМЗ, (%)	0.48	0.02	0.221
Вміст білка (%)	0.477	0.054	0.227
Вміст лактози (%)	0.469	-0.064	-0.074
Густина, (г/см ³)	0.204	0.711	-0.663
Температура замерзання, (°C)	-0.48	-0.013	-0.209

Оскільки для встановлення принципової можливості використання флуоресцентної спектроскопії для ідентифікації молочної продукції, необхідності у великій кількості зразків не було, для запису спектрів було обрано сім зразків: один зразок натурального незбираного молока від надійного сільгоспвиробника, один зразок ультрапастеризованого, три зразки пастеризованого молока різних виробників, причому один із зразків за хемометричною кластеризацією потрапляв у групу

відновленого молока та два зразки виготовленого відновленого молока із сухого продукту різних виробників. Вимірювання на зразках, що мали однакове походження, проводили з інтервалом в 10 днів впродовж грудня 2017 року. Одержані результати мали хорошу прецизійність (RSD < 5%). Спектри флуоресценції молока та виготовленого молочного продукту представлені на рис. 3 (1-7 - флуоресценція триптофану, 8-14 - флуоресценція продуктів реакції Майяра).

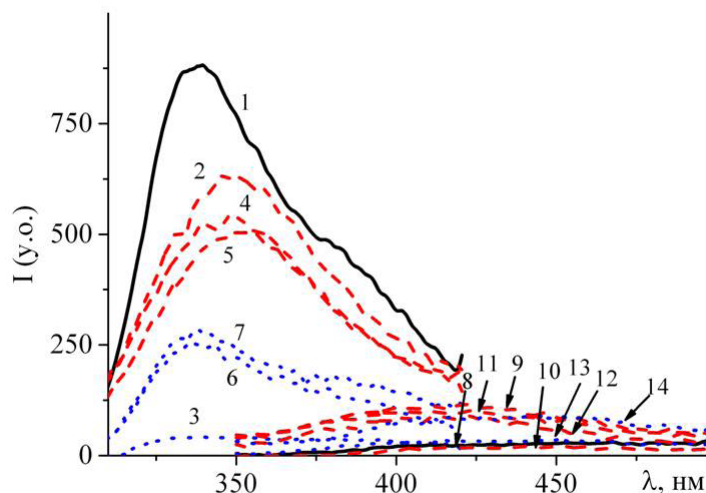


Рис. 3. Спектри флуоресценції молока та виготовленого молочного продукту при довжині хвилі збудження 290 нм (1-7) та при довжині хвилі збудження 330 нм (8-14). 1, 8 – натуральне незбиране, 2-5, 9-12 – пастеризоване, 6-7, 13-14 – відновлене.

В таблиці 3 представлений індекс FAST - відношення флуоресценції продуктів реакції Майяра (330/440 нм) до флуоресценції триптофану (290/340 нм). Значення FAST для натурального незбираного молока (1-й зразок) має таке ж значення, що й представлене в літературі [9]. Дивує те, що для пастеризованого і ультрапастеризованого молока індекс FAST має приблизно ті ж значення, що й для відновленого, хоча по технологічним параметрам (триваліша термічна обробка при розпилювальному сушінні молока) відновлений продукт повинен був би мати вище значення індексу. Зразок № 3, який випадає із показників своєї групи як за FAST, так і за хемометричною кластеризацією, можливо, являється фальсифікатом; серед зразків відновленого молока 6 і 7, що різняться за FAST, теж ймовірний сфальсифікований продукт. Спроба включити індекс FAST в хемометричну кластеризацію досліджуваних зразків не дала результату: кластеризація не відбувається. Таким чином, на значення індексу FAST впливають тільки абсолютні значення інтенсивності флуоресценції, але не беруться до уваги відмінності у формі спектрів. Так, наприклад, для зразку 6 (відновлене молоко) високе значення індексу спостерігається не за рахунок високої інтенсивності флуоресценції триптофану, а за рахунок низького значення інтенсивності флуоресценції продуктів реакції Майяра.

Література

1. Moore J. C., Spink J., Lipp M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* 2012, 77(4), 118-126.
2. Stadler R., Tran L.-A., Cavin C., Zbinden P., Konings E.J.M. Analytical Approaches to Verify Food Integrity: Needs and Challenges. *J. AOAC Int.* 2016, 99(5), 1135-1144.
3. Kamal M., Karoui R. Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2015, 46(1), 27-48.
4. Andersen C., Mortensen G. Fluorescence Spectroscopy: A Rapid Tool for Analyzing Dairy Products. *J. Agric. Food. Chem.* 2008, 56(3), 720-729.
5. Karoui R., Blecker C. Fluorescence Spectroscopy Measurement for Quality Assessment of Food Systems—a Review. *Food Bioproc. Tech.* 2011, 4(3), 364-386.
6. Shaikh S., O'Donnell C. Applications of fluorescence spectroscopy in dairy processing: a review. *Curr. Opin. Food Sci.* 2017, 17, 16-24.
7. Poonia A., Jha A., Sharma R., Bahadur Singh H., Kumar Rai A., Sharma N. Detection of adulteration in milk: A review. *Int. J. Dairy Technol.* 2017, 70(1), 23-42.

Таблиця 3. Відношення флуоресценції продуктів реакції Майяра до флуоресценції триптофану.

Досліджувані зразки	FAST-індекс
1 – натуральне незбиране	0.082
2 – ультрапастеризоване	0.256
3 - пастеризоване (виробник 1)	0.485
4 - пастеризоване (виробник 2)	0.246
5 – пастеризоване (виробник 3)	0.257
6 – відновлене I	0.136
7 - відновлене II	0.265

Висновки

Застосування методу головних компонент для основних показників якості молока, одержаних на ультразвуковому аналізаторі «Екомілк-Бонд», дозволило провести кластеризацію зразків молока та виготовленого молочного продукту, проте вона виявилась не повною. Встановлено, що виміряні значення флуоресценції триптофану, продуктів реакції Майяра і розрахований індекс FAST можуть бути маркером тільки на натуральне незбиране молоко. Для виявлення відновленого молока або можливої фальсифікації пастеризованого молока відновленим молоком необхідно перш за все мати надійні (несфальсифіковані) зразки та зробити значно більшу вибірку, а також долучити додаткові дослідження.

8. Birlouez-Aragon I., Nicolas M., Metais A., Marchond N. A Rapid Fluorimetric Method to Estimate the Heat Treatment of Liquid Milk. *Int. Dairy J.* 1998, 8(9), 771-777.
9. Rong-fa Guan, Dong-hong Liu, Xing-qian Ye, Kai Yang. Use of fluorometry for determination of skim milk powder adulteration in fresh milk. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2005, 6(11), 1101-1106.
10. Matiacevich S.B., Pilar Buera M. A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chem.* 2006, 95, 423-430.
11. Feinberg M., Dupont D., Efstathiou T., Louâpre V., Guyonnet J.-P. Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. *Food Chem.* 2006, 98(1), 188-194.
12. B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0.
13. ISO 5725-3:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method.
14. Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., DeJong S., Lewi P.J., Smeyers-Verbeke J. Handbook of chemometrics and qualimetrics: part A. Elsevier: Amsterdam, 1997. P. 867.