

УДК 543.06:664

IMPROVEMENT OF THE METHOD FOR ASSESSMENT THE EFFICIENCY OF MILK PASTEURIZATION USING COMPUTER COLORIMETRY

O. Vasheka, O. Petrusha, L. Arseniyeva*National University of Food Technologies***Key words:**

pasteurization,
phosphatase,
color characteristic,
computer colorimetry,
safety

Article history:

Received 01.10.2020

Received in revised form
10.11.2020

Accepted 15.12.2020

Corresponding author:

petrushaoo@ukr.net

ABSTRACT

The article considers the possibility of improving the standardized method for determining the efficiency of milk pasteurization process by alkaline phosphatase using the method of computer colorimetry. In order to avoid subjectivity in the interpretation of research results and the possibility of reducing the duration of thermostating test samples, the authors proposed scanning the surface of the product to characterize their color change and then processing the obtained images in the color coordinate system of the RGB. During the study to minimize the effect of external factors on the color characteristics of the product, cuvettes with samples were placed in a specially made metal black box and then scanned using a flatbed scanner Epson Perfection V370 with optical resolution 4800dpi and 48-bit color.

The expediency of using the values of the R coordinate (red component) in the interpretation of research results has been experimentally proved. The regularities of the change of color characteristics depending on the time of thermostating of the studied samples are determined. It was found that the value of the color coordinates of the red component in raw milk containing alkaline phosphatase increases during the whole process of thermostating. The nature of the corresponding curves in the experimental samples of milk that has undergone heat treatment is described by the general tendency to decrease its intensity. The given experimental data indicate the possibility of obtaining reliable results after 40 min of thermostating of experimental samples at the temperatures recommended in the standardized method. The difference in color characteristics in the R coordinate between the test samples averages 20—25 units. The developed methodology makes it possible method for determining the efficiency of milk pasteurization process by alkaline phosphatase to reduce the duration of the analysis, is the basis for the development of an automated process of processing results and saving results in digital form, which is especially relevant in the organization of traceability in product safety management systems at food enterprises.

DOI: 10.24263/2225-2916-2020-28-16

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПАСТЕРИЗАЦІЇ МОЛОКА ЗА ФОСФАТАЗОЮ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ КОМП'ЮТЕРНОЇ КОЛОРИМЕТРІЇ

О. М. Вашека, канд.техн. наук

О. О. Петруша, канд.техн. наук

Л. Ю. Арсенєва, д-р техн. наук

Національний університет харчових технологій

У статті розглянуто можливість удосконалення стандартизованого методу визначення ефективності процесу пастеризації молока за лужною фосфатазою із застосуванням методу комп'ютерної колориметрії. З метою уникнення суб'єктивності при інтерпретації результатів досліджень і можливості скорочення тривалості термостатування дослідних зразків авторами запропоновано для характеристики зміни їх кольору проводити сканування поверхні продукту з подальшою обробкою отриманих зображень у системі колірних координат RGB.

Експериментально доведено доцільність використання значень координати R (червоної складової) при інтерпретації результатів досліджень. Визначено закономірності зміни колірних характеристик залежно від часу термостатування досліджуваних зразків. Запропонована методика надає можливість скоротити тривалість аналізу, є підґрунтям для розроблення автоматизованого процесу обробки результатів і збереження результатів у цифровому вигляді, що особливо актуально при організації простежуваності в системах управління безпечністю продукції на харчових підприємствах.

Ключові слова: пастеризація, фосфатаза, колірна характеристика, комп'ютерна колориметрія, безпека.

Постановка проблеми. Вимоги споживачів щодо якості та безпечності харчових продуктів нині формують загальні тенденції розвитку харчової галузі. Прийняття та декларування останніх у низці нормативних і законодавчих документів вимагає від операторів ринку в умовах динамічного розвитку економічних відносин із європейськими державами, посиленої конкуренції, зростаючої складності технологічних процесів та обмеженої сировинної бази, забезпечити виготовлення продукції не лише високої якості, а й гарантування її безпечності. Багаторічний досвід міжнародних організацій і провідних виробників харчової промисловості довів доцільність розроблення та впровадження з цією метою систем управління безпечністю основаних на принципах ретельного аналізу небезпек і постійного й ефективного нагляду особливо в критичних контрольних точках (ККТ).

Молоко та молочні продукти рекомендовані до щоденного споживання. Високі смакові та дієтичні властивості зумовлюють їхню широку популярність серед населення всіх вікових груп. Процес глобалізації світового молочного ринку спричинює зростання ланцюгів постачання товарів до міжнародного рівня, що в питаннях встановлення належної безпечності продукції накладає додаткову відповідальність на операторів ринку. Слід нагадати, що відповідно до переліку харчових продуктів за ступенем забруднення мікроорганізмами і частотою випадків харчових отруєнь, розробленого ВООЗ, молоко й молочні продукти відносять до I категорії, як такі, що прямо чи опосередковано можуть бути причиною харчового отруєння. Тому впровадження систем управління безпечністю та їх постійне удосконалення є безумовною вимогою нормального функціонування молочних виробництв.

Однією з головних технологічних операцій, яка забезпечує досягнення належного гігієнічного рівня молочних виробів і гарантоване отримання безпечної продукції, є теплова обробка напівфабрикатів — пастеризація або стерилізація. Часто

такі технологічні операції зазначені в планах НАССР як ККТ, що вказує на обов'язковість постійного моніторингу за дотриманням режимів їх проведення. Відомо, що технологічні режими пастеризації залежать від низки характеристик процесу та конструкції використаного обладнання. Проте вирішальну роль у визначенні ефективності теплової обробки відіграє видовий і кількісний склад наявної в сировині мікрофлори.

У виробничих умовах моніторинг теплового оброблення молока здійснюється непрямыми методами, що передбачають контроль за температурою теплоносія й тривалістю знаходження сировини в робочій зоні обладнання. Нині при пастеризації молока застосовують довготривалу ($t=62\text{—}65^{\circ}\text{C}$, із витримкою 30 хв), короткочасну ($t=74\text{—}78^{\circ}\text{C}$, із витримкою 18—20 с) та миттєву високотемпературну ($t=80\text{—}98^{\circ}\text{C}$, із різною витримкою або без неї) обробки. Підтвердженням ефективності проведеного процесу є визначення наявності чи відсутності готових виробів ферментів фосфатази або пероксидази.

Слід відмітити, що пероксидаза відноситься до термостійкої групи ферментів і при пастеризації молока за температур $74\text{—}78^{\circ}\text{C}$ із витримкою близько 20 с її залишкова активність складає 50—30%. Повна інактивація ферменту спостерігається лише при обробці сировини впродовж 5—10 с температурами понад $80\text{—}85^{\circ}\text{C}$ [1—4]. Тому в молочній галузі використовують пробу Сторча на пероксидазу для підтвердження ефективної термічної обробки молока за температур понад 80°C .

Інактивація лужної фосфатази відбувається за температур, співрозмірних знищенню патогенних мікроорганізмів. За звичайних умов відсутність лужної фосфатази вказує на проведення теплової обробки сировини за режимів довготривалої пастеризації. Водночас у [1—4] відмічається, що бактеріальна лужна фосфатаза є більш термостійкою порівняно із нативним тваринним ферментом, а збільшення вмісту сухих речовин у молоці сприяє зростанню її термостійкості. При значному мікробіологічному забрудненні молока мікрофлорою, що продукує лужну фосфатазу, температурою її інактивації вважають $72\text{—}74^{\circ}\text{C}$ із витримкою 6—15 с. Тому для гарантованого встановлення гігієнічної чистоти молочної продукції при контролі довготривалої та часто для підтвердження короткочасної пастеризації доцільно використовувати тест на лужну фосфатазу.

Залежно від фізичної суті методи визначення лужної фосфатази поділяють на колориметричні, флуориметричні, хемілюмінісцентні та імунохімічні [4; 5]. Нині низкою організацій (FDA, AOAC International), Міжнародною асоціацією зі стандартизації та Міжнародною молочною федерацією при моніторингу лужної фосфатази рекомендовано використовувати флуориметричний метод. Це пов'язано з його високою чутливістю та можливістю встановлення активності залишкової кількості ферменту або вияву його реактивації в молочних продуктах під час зберігання.

На вітчизняних підприємствах України у виробничих умовах для визначення ферменту фосфатази широко застосовують метод із використанням розчину фенолфталейнфосфату натрію відповідно до [6]. Сутність методу полягає в тому, що при наявності лужної фосфатази в сировині фермент взаємодіє та від'єднує фосфор від фенолфталейнфосфату. Вільний фенолфталейн у лужному середовищі змінює колір розчину від блідо-рожевого до оранжевого, що свідчить про порушення технологічних режимів пастеризації або про наявність домішок сирого (понад 2%) чи термічно необробленого молока. Недоліком цього методу є його тривалість (понад 60 хв) і можливий вплив зовнішніх суб'єктивних факторів (психофізичний стан людини, суб'єктивність людського ока, освітленість приміщення та зразка, який аналізується) на трактування результатів досліджень.

Мета дослідження полягає в удосконаленні методу визначення ефективності пастеризації молока за лужною фосфатазою із застосуванням комп'ютерної колориметрії.

Матеріали і методи. Заропонована для удосконалення методика є стандартизованою та використовується на молокопереробних підприємствах України вже багато років. Як зазначалось вище, недоліком методу є тривалість його проведення, що унеможлиблює використання останнього як ефективного засобу моніторингу процесу низькотемпературного теплового оброблення молока. Аналізуючи хід проведення дослідження з виявлення лужної фосфатази, очевидною є необхідність скорочення тривалості термостатування зразка та уникнення суб'єктивності обробки результатів дослідження, що пов'язані із сприйняттям кольору оком людини.

Рівень розвитку цифрової техніки зумовив появу нового напрямку у вимірюванні кольору та забарвлення сировини, інгредієнтів, напівфабрикатів і готової продукції — комп'ютерної колориметрії. Його використання в експериментальних дослідженнях надає можливість не лише отримати об'єктивну інформацію про кольорні характеристики об'єкта, а якісно диференціювати кольорні відтінки під час розшифровування кожного пікселя в системі кольорних координат [5; 7; 8]. Для реалізації та використання методу при проведенні експериментів застосовують планшетні сканери, цифрові фото і відеокамери. Особливістю таких досліджень є стандартизування умови отримання цифрового зображення об'єктів, що вивчаються.

Удосконалення методу виявлення наявності лужної фосфатази в молоці полягало у застосуванні комп'ютерної колориметрії на етапі визначення зміни кольору дослідних зразків. Для реалізації задуму, після підготовки реактивів і проведення дослідження відповідно до стандартизованої методики [6], під час термостатування зразків, на етапі визначення їх кольору застосовували планшетний сканер та отримували цифрове зображення розчину реагентів шляхом їх сканування. Для сканування досліджувані зразки наливали в кювети які розміщували в металевому чорному боксі. В подальшому, після обробки цифрових зображень, отримували вимірні кольорних характеристик об'єктів досліджень. Для визначення достовірних параметрів методу дослідження проводили у трьох паралельно відібраних дослідних зразків та із трикратною повторюваністю експерименту. Графічне представлення результатів досліджень є усередненим значенням отриманих експериментальних даних.

Як систему електронного ока використовували планшетний сканер Epson Perfection V370, який обладнано технологією ReadyScan LED — миттєва готовність до роботи й економія електроенергії. Ключовим елементом є можливість отримання високоякісного зображення завдяки оптичному розширенню 4800dpi і 48-бітному кольору [5; 8; 9]. Товщина оптичного шару складала 20 мм.

Для роботи у видимій області спектра застосовували кювети з кварцу (кварц починає поглинати світло з довжиною хвилі менше 190 нм). Забруднення стінок кювет, подряпини на них тощо спричиняють розсіювання і поглинання світла, що призводить до викривлення результатів дослідження. Зважаючи на це, під час проведення експерименту кювети брали руками тільки за ребра, а після кожного аналізу мили спеціальними розчинами для запобігання налипанню жирових кульок на стінки кювети. Також, з метою уникнення впливу зовнішніх чинників на кольорні характеристики об'єктів досліджень, використовували металевий чорний бокс, у який поміщали кювету із дослідним зразком під час сканування.

Результати дослідження. На першому етапі досліджень встановлювали можливість практичного застосування комп'ютерної колориметрії при визначенні лужної фосфатази в молоці із використанням розчину фенолфталейнофосфату натрію. Для цього було здійснено серію дослідів, де як зразки використовували термічно оброблене при температурі понад 100°C впродовж не менше 60 с молоко питне пастеризоване та молоко-сировину першого ґатунку, що відповідали вимогам [10] та не

проходили теплову обробку. Визначення кольору та встановлення найбільш репрезентативних кольірних координат дослідних зразків проводили із використання систем RGB та CIELab. Вибір проб для визначення кольірних характеристик здійснювали на етапі їх термостатування перед початком, після 5 хв та після завершення витримки дослідних зразків на водяній бані за температури $42 \pm 2^\circ\text{C}$. Результати отриманих досліджень наведено на рис. 1 та 2.

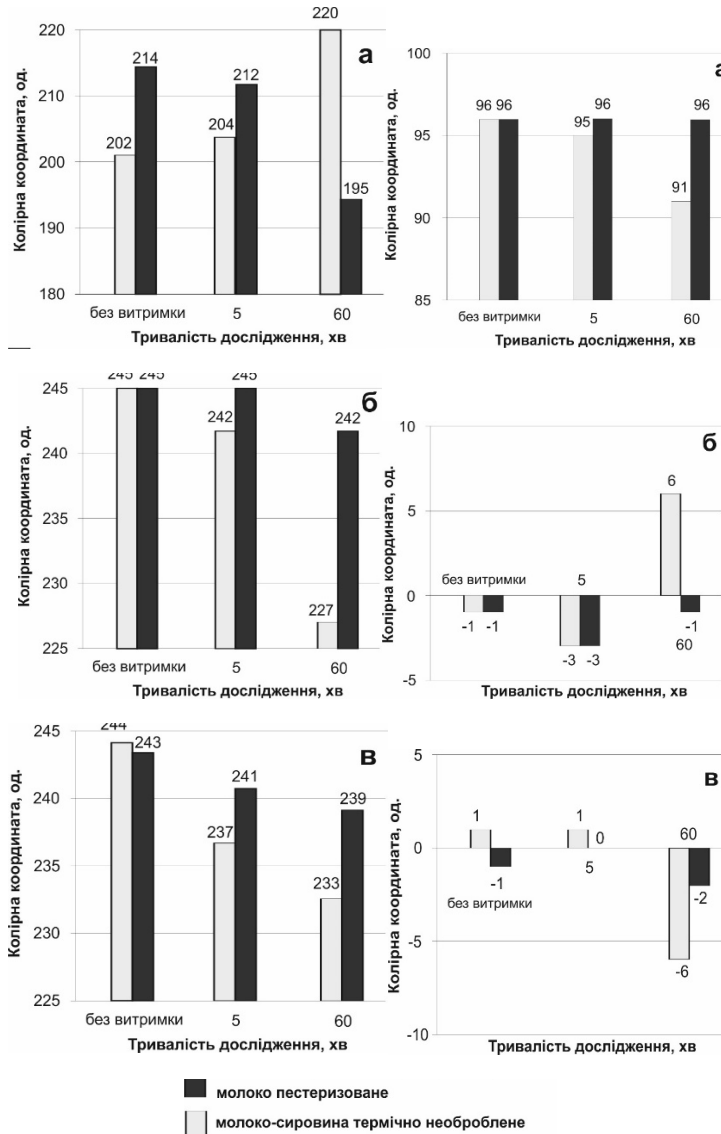


Рис. 1. Залежність кольірних координат RGB для дослідних зразків молока:
а — зміна значень кольірної координати R (червоний);
б — зміна значень кольірної координати G (зелений);
в — зміна значень кольірної координати B (голубий)

Рис. 2. Залежність кольірних координат CIELab для дослідних зразків молока:
а — зміна значень кольірної координати L;
б — зміна значень кольірної координати A;
в — зміна значень кольірної координати B

З даних, наведених на рис. 1, видно, що зміна компоненти кольору R за червоною складовою є найбільш репрезентативною, оскільки різниця між значеннями колірних координат зразків спостерігається вже від початку проведення дослідження, а після завершення термостатування відмінність значень стає більш суттєвою. Колірні характеристики пастеризованого та сирого молока за зеленою та синьою складовою в системі координат RGB, як і в системі CIELab (див. рис. 2), на початку термостатування для обох зразків мають схожі значення та виявляють суттєві відмінності лише після завершення їх витримки, передбаченої стандартизованим методом. Тому для аналізу подальших результатів досліджень доцільно використовувати значення колірної координати R, отримані у системах колірних координат RGB.

З метою встановлення залежності щодо появи та збільшення інтенсивності кольору в дослідних зразках визначали колірні характеристики пастеризованого молока, що гарантовано не містить лужної фосфатази, та сирого необробленого молока за координатою R у процесі їх термостатування, передбачаючи періодичність відбору проб через кожні 5 хв. Під час проведення експерименту також фіксували час появи забарвлення за результатами візуальних спостережень. Результати дослідження представлено на рис. 3.

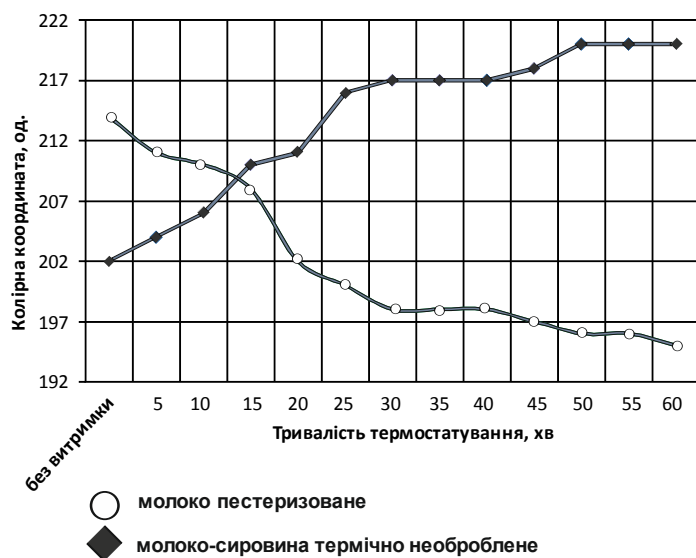


Рис. 3. Залежність зміни колірної координати R від тривалості термостатування

Наведені на рис. 3 результати свідчать про відмінні процеси перебігу хімічних реакцій у розчинах та, відповідно, появи кольору в дослідних зразках. Значення колірної характеристики за червоною складовою в необробленому молоці впродовж усього процесу термостатування зростає в середньому на 18 одиниць. Слід відмітити, що найбільш інтенсивне збільшення — на 15 од, спостерігається у перші 30 хв дослідження. Водночас значення координати R пастеризованого молока характеризується загальною тенденцією зниження інтенсивності кольору, що більш виражено після 15 хв його витримки на водяній бані. Остаточна різниця колірних характеристик за координатою R між пастеризованим і молоком-сировиною після завершення проведення визначення складала 25 одиниць.

Характеризуючи результати візуальних досліджень, слід відмітити, що після додавання реагентів в обох зразках спостерігалась зміна забарвлення від білого до

блід-рожевого, що зникло після проведення їх термостатування впродовж 10-15 хв. Повторна чітка зміна кольору та поява блідого рожевого забарвлення була властива зразку термічно необробленого молока після 40 хв його витримки на водяній бані.

Отже, отримані результати вказують на можливість використання методу комп'ютерної колориметрії із подальшим оброблення цифрових зображень у системі RGB та інтерпретацією даних за колірною координатою R при визначенні лужної фосфатази в молоці із використанням розчину фенолфталеїнофосфату натрію. Також слід відмітити, що характер кривих, наведених на рис. 3, вказує на можливість скорочення процесу термостатування дослідних зразків до 30—35 хв.

Застосування стандартизованого методу визначення лужної фосфатази надає можливість встановити кількість термічно необробленого молока — понад 2%. Тому на наступному етапі експерименту, при встановленні ефективного часу термостатування, як дослідні зразки використовували молоко пастеризоване, що гарантовано не містить лужної фосфатази, і молоко пастеризоване із додаванням до нього 2% необробленого молока-сировини 1 гатунку. Результати дослідження наведено на рис. 4.

Аналізуючи результати досліджень, слід зазначити, що впродовж перших 10 хв термостатування спостерігається загальна тенденція до зниження інтенсивності забарвлення в обох зразках, що більш виражено для молока із домішками термічно необробленої сировини. У подальшому наявність лужної фосфатази спричинює гідроліз фенолфталеїнофосфату натрію із вивільненням фенолфталеїну та, відповідно, зміною кольору розчину до світло-рожевого. Про перебіг процесів гідролізу реагенту свідчить поступове зростання колірного числа в молоці із додаванням термічно необробленої сировини на 13 од. Загальна тенденція зміни кольору в дослідному зразку молока, що гарантовано не містить лужної фосфатази, характеризується зниженням інтенсивності червоної складової в цілому на 20 од. Слід відмітити, що максимальне зменшення колірної характеристики відмічається у перші 35 хв його термостатування.

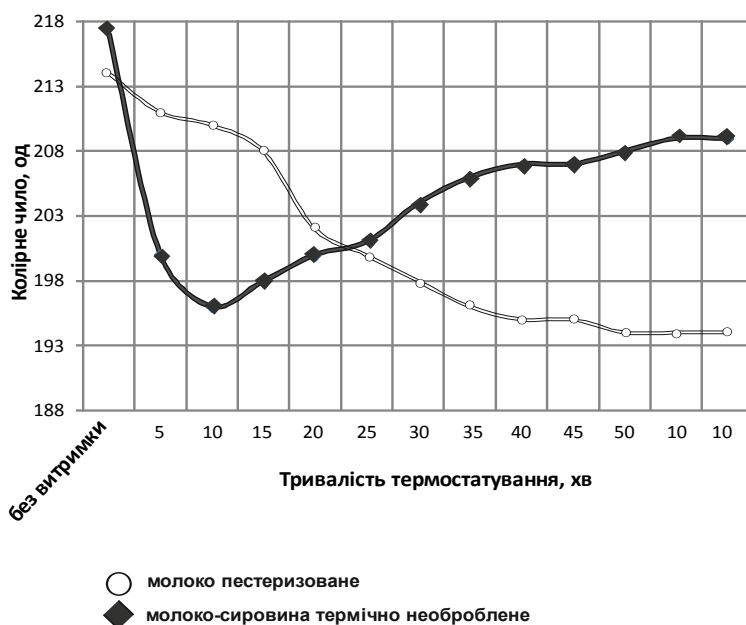


Рис. 4. Зміна колірної координати R залежно від тривалості термостатування

Характер кривих зміни червоної складової при формуванні кольору дослідних зразків вказує на можливість отримання достовірних результатів вже після 40 хв їх витримки за рекомендованих у стандартизованому методі температур.

Візуальні спостереження за зміною забарвлення дослідних зразків упродовж усього періоду термостатування вказують на подібність їх кольорів, а також свідчать про можливість встановлення наявності в молоці домішок термічно необробленого молока лише після завершення часу витримування на водяній бані, зазначеного в стандартизованій методиці.

Отже, у результаті експериментальних досліджень встановлено доцільність застосування кольірних координат RGB за значенням кольірної координати R при проведенні оцінки забарвленості дослідного зразка, а час термостатування може бути скорочено до 35—40 хв.

Висновки. Запропоновано спосіб удосконалення стандартизованого методу визначення наявності лужної фосфатази в молоці термічно обробленому із застосуванням методу комп'ютерної колориметрії. Рекомендовані заходи надають можливість опрацювати цифрове зображення досліджуваного об'єкта, отримати його кольірні характеристики та розрахувати інтенсивність забарвлення за значенням кольірних координат пікселів зображення, скоротити час проведення аналізу, автоматизувати процес обробки результатів та збереження даних про дослідження в цифровому вигляді, що є особливо актуальним як елемент простежуваності в системах управління якістю продукції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Harding F. Alkaline phosphatase test as a measure of correct pasteurization / Harding F. // Bull. of the JDF. — 1991. — № 262. — P. 32—34.
2. Schimme E. Chemical process parameters for thermal inactivation of alkaline phosphatase in milk / Schimme E., Kiesner C., Lorenzen P., Martin D. // Kiel. milchwirt. Forschungsber. — 1997. — V. 49. — № 3. — P. 207—219.
3. Справочник технолога молочного производства. — СПб: ГТОРД, 2006. Т. 10. Шидловская В. П. Ферменты молока. — 296 с.
4. Hilal A. P. Validation of milk product pasteurization by Alkaline Phosphatase Activity / Hilal A. P. // Con Dai & Vet Sci. — 2018. — 1(3) .CDVS. MS.ID.000113. DOI: 10.32474/CDVS.2018.01.000113.
5. Анализ тенденций развития метода химической цветометрии (Обзор) // А. Н. Чеботарев, Д. В. Снигур, Е. В. Бевзюк, И. С. Ефимова // Methods and objects of chemical analysis. — 2014. — Vol. 9, No. 1. — P. 4—11.
6. ДСТУ 7380:2013 Молоко та молочні продукти. Методи визначення наявності пероксидази й фосфатази (лужної та кислої) — [Чинний від 2013-08-22]. — К.: Держспоживстандарт України, 2013. — 17 с. — (Національний стандарт України).
7. Exploring the color of plant powders using computer colorimetry / A. Nemirich, O. Petrusha, O. Vasheka, L. Trofymchuk, N. Myndrul // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. — 2016. — № 4/11(82). — pp. 15—20.
8. Визначення активності лужної фосфатази при оцінці безпеки молока за якістю пастеризації / Т. Євшко, Т. Кішик, Ю. Новожицька, В. Сухенко // Якість. — 2017. — 23—28.
9. Antonelli A. et al. Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a wavelet-based classification algorithm / Antonelli A. et al. // Analytica Chimica Acta. — 2004. — p. 3—13.
10. ДСТУ 3662:2018. Молоко коров'яче незбиране. Технічні умови — [Чинний від 2019-01-01] — Київ.: Держспоживстандарт України, 2019 — 23 с. (Національний стандарт України).

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПАСТЕРИЗАЦИИ МОЛОКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНОЙ КОЛОРИМЕТРИИ

О. Н. Вашека, О. А. Петруша, Л. Ю. Арсеньева

Национальный университет пищевых технологий

В статье описаны результаты исследования, проведенного с целью совершенствования метода определения эффективности пастеризации молока, по реакции определения щелочной фосфатазы с фенолфталеинфосфатом натрия. С целью исключения субъективности при интерпретации результатов исследований и возможности сокращения продолжительности термостатирования опытных образцов авторами предложено для характеристики изменения их цвета проводить сканирование поверхности продукта с последующей обработкой полученных изображений в системе цветовых координат RGB.

Экспериментально доказана целесообразность использования значений координаты R (красной составляющей) при интерпретации результатов исследований. Определены закономерности изменения цветовых характеристик в зависимости от времени термостатирования исследуемых образцов. Предложенные усовершенствования позволяют сократить длительность анализа, являются основой для разработки автоматизированного процесса обработки результатов и сохранения результатов в цифровом виде, что особенно актуально при организации прослеживаемости в системах управления безопасностью продукции на пищевых предприятиях.

Ключевые слова: пастеризация, фосфатаза, цветовая характеристика, компьютерная колориметрия, безопасность.