

УДК 637.133.2.07

ANALYTICAL METHODS FOR ASSESSING THE DEGREE OF HEAT TREATMENT OF MILK

V. Ischenko, N. Kvitkovska, O. Kochubei-Lytvynenko, K. Chebanenko*National University of Food Technologies***N. Ischenko***Taras Shevchenko National University of Kyiv***Key words:**

milk,
heat treatment,
physico-chemical analysis

Article history:

Received 02.02.2025

Received in revised form
22.04.2025

Accepted 30.04.2025

Corresponding author:

suxodolska@ukr.net

ABSTRACT

In order to reduce the number of microorganisms in drinking milk, inactivate some enzymes that can cause defects in the taste and texture of the product, as well as extend the shelf life of milk, its heat treatment is used. The article considers regulated and reference methods for assessing the heat treatment of milk. They are conventionally divided into two groups: the first group includes determining the degree of denaturation and inactivation of heat-labile components, and the second group is based on the detection of substances formed during heat treatment. The first group includes the determination of alkaline phosphatase enzymes, lactoperoxidase and whey proteins: α -lactalbumin and β -lactoglobulin. The second group includes the determination of substances formed as a result of the Maillard reaction: furosine, carboxymethyl-lysine, 5-hydroxymethylfurfural, and lactulose. The quantitative characteristics of the corresponding heat treatment markers are characterized. As analytical methods for assessing heat treatment, such targeted analysis methods as high-performance liquid and ion chromatography, enzyme-linked immunosorbent assay, capillary electrophoresis were considered. These methods require lengthy sample preparation procedures, are laborious and expensive. As an alternative to these methods, studies are described in which, as analysis methods, near-IR spectroscopy and fluorescence spectroscopy are used. Promising may be studies on the determination of ionic calcium and total calcium in milk samples and discrimination of sample content on this basis, since the calcium content depends quite strongly on heat treatment and milk processing processes. It was concluded that a reliable assessment of the degree of heat treatment, possible violations in the technological process and detection of a counterfeit product should be based on the use of several markers and should include a multivariate approach to data processing. The criteria for choosing a particular method for determining the degree of heat treatment of milk should be the suitability of the method for achieving the set goal, its versatility, and the sensitivity of the analysis.

DOI: 10.24263/2225-2916-2025-37-4

АНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ ОЦІНКИ СТУПЕНЯ ТЕРМІЧНОГО ОБРОБЛЕННЯ МОЛОКА

В. М. Іщенко, канд. хім. наук, ORCID ID: 0000-0002-0218-8516

Н. П. Квітковська, ORCID ID: 0009-0008-3268-0510

О. В. Кочубей-Литвиненко, д-р. тех. наук, ORCID ID: 0000-0003-0712-448X

Х. В. Чебаненко, ORCID ID: 0000-0001-5002-1393

Національний університет харчових технологій

М. В. Іщенко, канд. хім. наук, ORCID ID: 0000-0002-0851-1679

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

У статті розглянуті регламентовані та довідникові методи оцінки термічної обробки молока, які розділені на дві групи: перша група включає визначення ступеня денатурації та інактивації термолабільних компонентів, друга група базується на виявленні речовин, які утворюються в процесі термічної обробки. Щодо аналітичних методів оцінки термічної обробки, то в переважній більшості це такі цільові методи аналізу, як вискозоефективна рідинна та йонна хроматографія, імуноферментний аналіз, капілярний електрофорез. Є дослідження, в яких як методи аналізу використовують спектроскопію ближньої ІЧ-області та флуоресцентну спектроскопію. Перспективними можуть бути дослідження з визначення йонного кальцію у молоці, яке зазнало термообробки.

Ключові слова: молоко, термічна обробка, фізико-хімічний аналіз.

Вступ. Незважаючи на велику користь молока для людини, воно водночас є чудовим середовищем для розмноження небажаних мікроорганізмів, таких як бактерії, гриби, цвілі, що часто забруднюють цей продукт, спричиняють його псування та створюють потенційні ризики для споживачів [1]. З метою зменшення кількості мікроорганізмів у питному молоці інактивування деяких ферментів, які можуть спричинити дефекти смаку й текстури продукту, а також продовження термінів зберігання молока, використовують його термічну обробку. Термічна обробка є домінуючим підходом у молочній промисловості для забезпечення безпеки продукту, проте її проведення може змінювати як хімічний склад, так і якість молока. Для оцінки фактичної інтенсивності температурної обробки молока необхідно використання аналітичних методів аналізу з визначення певних маркерів, які дають змогу однозначно встановити ступінь її проведення і, відповідно, охарактеризувати якість молочного продукту.

Огляд останніх досліджень і публікацій. Основний принцип, на якому ґрунтується термічна обробка молока, полягає в тому, щоб цей процес знищив мікрофлору в молоці, не спричиняючи надмірних хімічних змін, які негативно вплинуть на сенсорну та поживну якість продукту [2]. Проте нагрівання молока спричиняє втрату деяких органолептичних і поживних його властивостей (денатурацію сироваткових білків і зміни їх структури, проходження реакції Маяра, руйнування вітамінів, випадання в осад кальцій фосфату, зміни мінерального складу молока). Усі ці трансформації безпосередньо залежать від температурного інтервалу процесу, тому неконтрольована теплова обробка молока може призвести до певних небажаних втрат поживних і органолептичних якостей продукту. Зважаючи на ці факти, при переробці молока необхідно контролювати умови проведення термічної обробки та швидко реагувати на проблеми, які можуть виникнути в технологічному процесі. Водночас використання певного аналітичного методу визначення ступеня термічної обробки

молока може мати велике значення для подальшого виробництва молочних продуктів з молока, яке зазнало теплового оброблення, а також для можливого виявлення фальсифікованого продукту, наприклад, молочного продукту, виготовленого із сухого молока з приховуванням цього факту. Слід зазначити, що в українських наукових публікаціях практично відсутні системні дослідження цієї проблеми і відповідні експериментальні роботи, тому проведення аналітичного огляду сучасних методів визначення ступеня термічного оброблення молока є актуальним.

Мета досліджень: зробити огляд сучасних регламентованих і довідникових аналітичних методів визначення ступеня термічного оброблення молока. Провести класифікацію розглянутих аналітичних методів аналізу залежно від способу визначення речовин-маркерів молока, що реагують на зміни температури. Визначити перспективні напрямки дослідження з вибору певного фізико-хімічного методу аналізу визначення ступеня термічної обробки молока.

Матеріали і методи. Розглянуто способи термічного оброблення молока, літературні науково-практичні джерела з описом методів їх визначення, схарактеризовані маркери на термічну обробку молока. Проведено аналіз, обробку й узагальнення наукової інформації з теми дослідження.

Результати досліджень. В Україні основними промисловими процесами теплової обробки молока є: пастеризація, ультрависокотемпературне оброблення та стерилізація. Відповідно до ДСТУ 2212:2003 «Виробництво молока та молочних продуктів. Терміни та визначення понять» ці процеси визначаються так:

- пастеризація — теплове оброблення за температури понад 65 °C з відповідним витримуванням;
- ультрависокотемпературне оброблення (УВТ) — теплове оброблення впродовж кількох секунд за температури понад 135 °C;
- стерилізація — теплове оброблення за температури понад 100 °C з витримуванням до повного знищення живих мікроорганізмів і спор.

У цьому ж ДСТУ відмічається, що продукт, виготовлений із сухого молока, повинен класифікуватися як «відновлений молочний продукт» або «відновлене молоко».

У монографії Хілтона і співавторів [3] зібрані дані про вплив способів термічної обробки молока на його мікробіологічні та ферментативні показники (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив термічної обробки молока на мікробіологічні та ферментативні показники [3]

Спосіб температурної обробка	Температура та час витримування	Бактерицидний ефект	Вплив на ферменти
Пастеризація	63 °C протягом 30 хв; 65 °C протягом 15 хв; 72—82 °C протягом 15—30 с	Знищує неспороутворюючі збудники і психротрофні бактерії	Інактивує лужну фосфатазу і ліпазу
УВТ-оброблення	138—145 °C протягом 1—10 с	Знищує всі неспороутворюючі бактерії і всі спори, крім високотермостійких спор	Інактивує лужну фосфатазу, ліпазу, лактопероксидазу і більшість плазмів, але не всі бактеріальні протеази
Стерилізація	115—120 °C протягом 10—30 хв; 125 °C протягом 4 хв	Знищує всі неспороутворюючі бактерії і всі спори, крім високотермостійких спор	Інактивує практично всі ферменти

Найбільш повний огляд мікробіологічних характеристик молока залежно від способів термічної обробки та інструментів для визначення цих показників за період 1917—2017 рр. наведено в огляді [4]. У пропонованому аналітичному дослідженні акцент буде зроблено тільки на хімічних маркерах теплової обробки молока, не фокусуючись на мікробіологічних змінах складу молока при його термічній обробці, також будуть охарактеризовані методи визначення цих маркерів.

Як уже зазначалось (табл. 1), при термічній обробці молока інактивується значна частина його ферментів. Так, визначення лужної фосфатази у молоці використовують для оцінки проведеної пастеризації. Для цього застосовують фенольний метод (ISO 11816-1:2024 | IDF 155-1:2024. «Milk and milk products. Determination of alkaline phosphatase activity»). Цей метод дає змогу визначати лужну фосфатазу в сирому й термічно обробленому незбираному молоці, напівзнежиреному молоці, знежиреному молоці та ароматизованому молоці. Він також застосовний до сухого молока після відновлення. Активність лужної фосфатази виражається в мОд/л, а одиницею активності лужної фосфатази є кількість ферменту, який каталізує перетворення 1 мікромоля субстрату за хвилину. Тест на лужну фосфатазу вважається таким, що дає негативний результат, якщо виміряна активність у коров'ячому молоці не перевищує 350 мОд/л (Reg EC 1664/2006, «Official Journal of the European Union L320/13»). Позитивний тест вказує на неадекватну пастеризацію молока або можливу присутність термостабільних мікробних фосфатаз. Відповідно до ДСТУ ISO 11816-1:2016. «Молоко та молочні продукти. Визначення активності лужної фосфатази. Частина 1. Флуорометричний метод» лужну фосфатазу можна визначити за допомогою специфічного реагенту «Флуорофоса», який у присутності лужної фосфатази набуває флуоресцентних властивостей.

Для оцінки ступеня термічної обробки молока можна також визначати лактопероксидазу — це нативний фермент, більш термостабільний, ніж лужна фосфатаза. Лактопероксидаза інактивується при 75—80 °C, тож якщо молоко піддавалося вищій температурі (>75 °C) під час пастеризації відбудеться інактивація ферменту і відповідний тест на пероксидазу дасть негативний результат [5]. Фотометричний метод визначення активності лактопероксидази в молоці ISO/TS 17193:2011. «Milk — Determination of the lactoperoxidase activity — Photometric method» є референтним і дає змогу визначати цей фермент у молоці в кількості, що перевищує 50 мкг/л. Метод визначення активності лактопероксидази ґрунтується на окисненні гідроген пероксиду пероксидазою: виділяється кисень, який окиснює безбарвний 1,4-фенілєндіамін у фіолетовий індофенол (тест Шторха), інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації ферменту. Якщо молоко правильно пастеризоване, протягом 30 с після змішування з'явиться синє забарвлення; якщо забарвлення не з'явиться, це буде означати, що лактопероксидаза була інактивована після температури, вищої за температуру пастеризації.

Проте найбільш чутливими до підвищення температури є сироваткові білки [6], тому досліджень з вивчення впливу температури на білки сироватки найбільше. Основні білки сироватки, зазвичай, перераховують у порядку зменшення термостійкості таким чином: α -лактальбумін > β -лактоглобулін > альбумін > імуноглобуліни [7]. Висока стійкість α -лактальбуміну до нагрівання обумовлюється оборотністю денатурації білка — після охолодження спостерігається відновлення його нативної структури за рахунок повторного згортання ланцюгів. Дані про вплив температури на денатурацію основних білків сироватки представлені в табл. 2.

Таблиця 2. Температурна денатурація основних білків сироватки

Білок сироватки	Температура	Посилання
α -лактальбумін (α -LA)	Середнє значення температури денатурації для α -LA становить 63,7 °C при нейтральному pH. α -LA може повторно згортатися в нативну структуру при температурі нагрівання менше 80 °C і починає агрегувати з іншими білками при температурі вище 80 °C. Нагрівання впродовж 5 хв при 85 °C призводить до повної денатурації α -LA	8, 9, 10
β -лактоглобулін (β -LG)	Нагрівання β -LG при 70 °C впродовж 30 хв призводить до розгортання β -LG та проходження необоротної реакції димеризації. 70 °C є критичною температурою для денатурації β -LG при нейтральному pH	11

Так, в огляді [11] узагальнені дослідження, проведені у 1999—2009 рр., щодо поведінки β -лактоглобуліну під час термічної обробки молока при pH>6,8 в діапазоні температур до 150 °C. Усі результати показують, що дисоціація та конформаційні зміни β -LG є оборотними при термічній обробці до 60 °C. Незворотні модифікації мономерів з'являються між 60 і 70 °C, починаючи з незначної конформаційної зміни, яка називається «станом розплавленої глобули». Підвищений вплив тіолових груп при температурах від 65 до 75 °C викликає утворення малих олігомерів головним чином шляхом окиснення тіолів. Реакції обміну тіол/дисульфід домінують між 75 і 85 °C (при pH>7,0), а неспецифічна нековалентна агрегація індукуює більші агрегати. Утворенню великих агрегатів при температурах від 85 до 105 °C запобігає подальше швидке охолодження. Розгортання залишкових структур β -лактоглобуліну спостерігається вище при 125 °C і, можливо, викликане хімічним розпадом дисульфідних зв'язків.

Загалом механізм денатурації β -LG описують за такими напрямками: його зв'язування з іншим денатурованим сироватковим білком (α -LA), реакція з міцелярним к-казеїном або його адсорбція на поверхні жирових кульок [12—15]. Автори [16] вважають, що роль β -LG в процесі термічного оброблення молока є центральною. Дослідження Рюкке і співавторів [17] показали, що β -LG денатурує на 12% при 65 °C через 15 с і на 60% при 85 °C після 30 с теплової обробки. Водночас ступінь денатурації сироваткових білків і склад розчинних комплексів залежать не лише від температури та часу нагрівання, але й від концентрації білка. У концентрованому молоці спостерігається вищий ступінь агрегації білка і значна різниця в розмірі та складі агрегатів, присутніх у фракції, що не осаджується [18].

Як уже відмічалось, α -LA, який містить чотири внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки, є більш стійким до дії температури. Денатурація α -LA відбувається за рахунок утворення комплексів з агрегатами β -LG і as2-казеїнів. Середні значення щодо вмісту α -LA в залежності від способу термічної обробки для пастеризованого молока змінюються в межах 400—900 мг/л. Вважається, що за вмістом α -LA можна диференціювати молоко тривалого зберігання, одержане непрямою пастеризацією, від УВТ молока. Результати [19] показали можливість використання розподілу α -LA і сироваткового альбуміну в білкових фракціях при підкисленні молока до pH 4,6 до нерозчинного β -LG як показників інтенсивності термічної обробки молока.

Якісне і кількісне визначення білків сироватки α -LA і β -LG залежно від ступеня термічного оброблення молока можна проводити електрофоретичним методом, ос-

кільки це швидка і надійна техніка скринінгу для розрізнення різних категорій термічно обробленого молока. Застосовуються електрофоретичні методи для розділення білків молока за якісною ознакою з використанням електрофорезу у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE), кількісна оцінка також можлива, хоча це досить громіздка процедура, яка вимагає багато часу. Хейві із співавторами [20] вивчали агрегацію концентратів сироваткових білкових з використанням одновимірного і двовимірного SDS-PAGE. Розчини концентрату сироваткового білка (WPC), що містять 10, 30, 60 і 120 г сухого порошку/кг, нагрівали при 75 °C і агрегацію сироваткового білка вивчали шляхом спостереження за змінами в розподілі α -LA і β -LG та сироваткового альбуміну. Результати одновимірного PAGE показали, що мінімальна кількість великих агрегатів утворювалася, коли розчини з концентрацією 10 г WPC/кг нагрівали при 75 °C протягом 16 хв, тоді як помітні кількості утворювалися, коли 30, 60 і 120 г WPC/кг розчини обробляли аналогічно. Двовимірний PAGE-аналіз показав, що деякі дисульфідно-пов'язані димери β -LG були присутні в нагрітому 10 г WPC/кг розчині, але їх було зовсім мало в нагрітому 120 г WPC/кг розчині. Навпаки, додецилсульфат натрію (SDS) зміг відокремити мономерний білок від агрегатів високої молекулярної маси в нагрітому розчині WPC 120 г/кг, але не в розчині з концентрацією 10 г WPC/кг, нагрітому протягом 30 хвилин. Швидкість втрати нативного і SDS-мономерного β -LG, α -LA та сироваткового альбуміну під час нагрівання зростає, коли концентрація WPC була збільшена з 10 до 120 г/кг. У 120 г WPC/кг розчину, нагрітого при 75 °C, кількість SDS-мономерного β -LG в кожному зразку була більшою, ніж кількість нативного білка. Однак у розчинах WPC 10, 30 і 60 г/кг відмінності між кількістю нативно-подібних і SDS-мономерних білків були незначними. Загалом, ці результати вказують на те, що на додаток до дисульфідно-пов'язаних агрегатів, гідрофобні агрегати, які включають α -LA, β -LG і сироватковий альбумін, утворилися в нагрітому розчині WPC при високій концентрації білка, що було підтверджено модельними дослідженнями з використанням бінарних сумішей цих білків.

Інші можливості капілярного електрофорезу для кількісного визначення α -LA і β -LG розглянуто в дослідженнях [21—23].

Незважаючи на те, що хроматографічне розділення білків вважається дорогим, метод рідинної хроматографії досить широко використовується для кількісного визначення білків сироватки. Проведені дослідження [24—28] з хроматографічному розділення білків відрізняються використанням різних моделей колонок, розчинниками та часом елюювання. В більшості цих досліджень використовувалось УФ-детектування або мас-спектрометрія. Заслуговує на увагу статистичне експериментальне проєктування, здійснене у праці Бордіна і співавторів [26]. В проведеному дослідженні розділення основних білкових компонентів молока було проведено за допомогою високоефективної обернено-фазової іон-парної хроматографії з фотодіодним детектуванням, використовуючи колонку C4. Ідентифікація кожного білка визначалась за допомогою часу утримування, співвідношення площ піків і УФ-спектрів другої похідної. Кількісне визначення базувалося на калібрувальних кривих, одержаних з використанням очищених білків. Було встановлено основні джерела невизначеності та повний бюджет невизначеності. Процедура спочатку була розроблена з використанням сертифікованого еталонного матеріалу сухого знежиреного молока CRM 063R, а потім була застосована до різних типів комерційного молока, а також до сирого молока. Метод здатний розділити та кількісно визначити сім основних білків (к-ка-

зеїн, α 2-казеїн, α 1-казеїн, β -казеїн, α -лактальбумін, β -лактоглобулін В і β -лактоглобулін А) за один цикл, а також забезпечити точне визначення загальної концентрації білка.

У праці [29] представлено новий метод ВЕРХ для швидкого визначення β -LG лише за 1,8 хв (загальний час роботи 3 хв) з використанням простого УФ-детектування при 205 нм. Була перевірена селективність розділення для можливо спільного елюювання інших основних сироваткових білків (сироваткового альбуміну, лактоферину, α -LA, імуноглобуліну G). Метод валідований для аналізу рідких зразків молока щодо лінійності (20—560 мг/мл, $R^2 > 0,99$), меж виявлення та кількісного визначення (7 та 23 мг/л молока), повторюваності ($RSD \leq 2,6\%$) та ступеня повернення (103%). Загалом 71 промисловий зразок рідкого молока, виробленого з використанням різних методів теплового навантаження, були профільовані за рівнем внутрішнього неденатурованого кислоторозчинного β -LG. Як і очікувалося, пастеризоване молоко продемонструвало найвищі концентрації вище 3000 мг/л через те, що пастеризація була найм'якшою термічною обробкою, тоді як, навпаки, УВТ молоко показало найменші кількості (< 200 мг/л). Для молока з подовженим терміном придатності (в ЄС його маркують як ESL) було визначено досить різноманітні рівні в діапазоні від ~ 100 до 4000 мг/л, оскільки технології виробництва молока, які використовуються для ESL, можуть суттєво відрізнятися та наразі не регулюються в ЄС.

Проаналізувавши 71 промисловий зразок в 2012 р. та 80 зразків молока у 2015 р. з різним ступенем термічної обробки та технологією виготовлення, автори [30] роблять висновок, що отримані результати у різні роки суттєво між собою не відрізнялися. Встановлено, що за допомогою фуросину, лактулози та α -LA можна провести диференціацію пастеризованого, фільтрованого та прямо нагрітого ESL молока від ESL молока непрямого нагрівання, а також УВТ молока, тоді як β -LG дозволяв дискримінацію безпосередньо нагрітого ESL молока від фільтрованого ESL молока та пастеризованого молока відповідно. Аналіз проводили методом обернено-фазової високорідинної хроматографії (RP-HPLC).

Аккерман із співавторами [31] повідомили про визначення методом рідинної хроматографії з тандемною квадрупольно часпролітною мас-спектрометрією (LC/MS Q-TOF) білків сироватки залежно від різних стратегій нагрівання, таких як нагрівання в пластинах і трубчастих теплообмінниках і використання прямого впорскування пари. Розділення проводили з колонкою Xbridge BEH300C18 (250 $\times$ 2,1 мм, 3,5 μ m), використовували лінійне градієнт (розчинник А=0,05% трифтороцтова кислота (TFA) у воді; розчинник В=0,1% TFA в ацетонітрилі) починаючи зі 100% розчинника А. Температуру колонки встановлювали 45 °C і проводили УФ-детектування на 214 нм.

Міжнародна молочна федерація (IDF, 2005) надала рекомендації щодо ВЕРХ для аналізу кислоторозчинних α -LA і β -LG за допомогою обернено-фазової колонки PLRP-S (довжина 150 мм, внутрішній діаметр 4,6 мм, розмір частинок 5 чи 8 μ m, розмір пор 30 нм) або еквівалентні колонки з дериватизованим полістирол дивінілбензолом. Розчинник А складається з 0,1% трифтороцтової кислоти у воді та розчинник В 0,1% трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі. Градієнт елюювання починався при 35% В з часом роботи приблизно 38 хв. Виявлення β -LG було зроблено при 205 нм.

Одним із сучасних методів аналізу білків молока є похідна спектроскопія, що була розроблена для вирішення проблеми високої подібності УФ-спектрів (UV-Vis). Метод застосовується для якісного і кількісного аналізу багатьох груп хімічних сполук,

що містять хромофори [32]

Луф і Брендл [33] запропонували використання другої похідної спектрофотометричного методу для визначення теплової класифікації знежиреного рідкого та сухого молока від кількості неденатурованого сироваткового білка, що залишився після термічної обробки в фільтраті при рН 4,6. Метод ґрунтується на поглинанні УФ-променів триптофаном і тирозином, кожен з характерними максимумами і мінімумами між 270—300 нм. Мейзел [34] застосував четверту похідну УФ спектрофотометрії для швидкого визначення співвідношення казеїну та білків сироватки в молоці.

У дослідженні [35] безпосередньо вимірювали білкові фракції білка УФ-спектрофотометрією четвертої похідної без таких процедур, як знежирення молока та осадження казеїну. Було проаналізовано 45 зразків свіжого молока. Перед вимірюваннями зразки витримували при 40 °С на водяній бані; потім 20 мл молока розбавили в 50 разів 6М гуанідин гідрохлоридом в 0,1 М натрій ацетатному буфері, рН 5,0 і перемішували. Використовували 10 мм кварцову кювету і записували УФ-спектри від 320 до 260 нм стосовно гуанідинового буфера. Загальний вміст білка та казеїну, визначених цим методом, статистично не відрізнялись від значень, отриманих за допомогою еталонного методу, що ґрунтується на визначенні нітрогену за Кьельдалем ($p < 0,05$).

Цікавою є праця [36], в якій застосовували три методи кількісного визначення співвідношення білків сироватки до загального білка (капілярний електрофорез, капілярний електрофорез з використанням додецилсульфату натрію та УФ четверта похідна спектроскопія поглинання), які застосували до зразків сирих ($n=21$), пастеризованих ($n=5$) та УВТ-оброблених ($n=18$) проб молока. Середні значення співвідношення, отримані цими методами, становили, відповідно, 17,1, 18,5 і 17,2% для сирого молока, 16,6, 17,7 і 18,8% для пастеризованого молока та 16,8, 17,0 і 17,2% для УВТ молока. Проте в порівнянні з електрофорезом спектроскопія є значно дешевшим методом, що робить його більш придатним для рутинного аналізу.

Порівняльне дослідження використання різних методів для визначення білків різних зразків сухого молока було проведено в праці [37]. Визначення проводили методом К'ельдаля та двома спектрофотометричними методами Бредфорда та Лоурі, які використовували для визначення загального білка в низці зразків сухого молока (знежирене сухе молоко, незбиране сухе молоко, порошок сироваткового протеїну та суха сироватка). Дослідження показали, що метод Бредфорда доцільно використовувати для визначення загального вмісту білків у знежирених зразках, крім того, цей метод показав найвищу чутливість. Використовуючи стандарти казеїну і сироваткового білка альбуміну, метод Лоурі показав найнижчу варіацію питомої абсорбції. Метод УФ при 220 нм з попередньою екстракцією ліпідів показав найкращі результати визначення загального білка в усіх пробах; усі результати статистично не відрізняються ($P > 0,05$) від отриманих за загальним білковим азотом без екстракції ліпідів. Найкращі результати визначення загального білка у всіх зразках без екстракції ліпідів показав метод Бредфорда; результати статистично не відрізнялися ($P > 0,05$) від отриманих для загального азоту методом К'ельдаля.

Казеїн, який являє собою комплекс чотирьох фракцій, досить стійкий до дії високої температури порівняно з білками молочної сироватки, оскільки казеїни не мають третинної та четвертинної структури. Відповідно до класичного тесту термостійкості за алкогольною пробою, коров'яче молоко повинне бути стабільним до нагрівання при 140 °С впродовж щонайменше 20 хв, тобто не коагулювати. Проте коагуляція казеїну може відбуватися під час ультрапастеризації, якщо рН молока занадто низьке

(<6,5) або в молоці з високою концентрацією йонного кальцію [3]. Хоча казеїн не коагулює при нагріванні, його міцели беруть участь у багатьох рівноважних процесах в молоці, в результаті змінюється склад міцел казеїну, а також збільшується їх діаметр за рахунок реакції з β -лактоглобуліном. Оскільки казеїн є основним білковим компонентом молока, досліджень з вивчення змін у властивостях казеїну при нагріванні досить багато: найбільш повний літературний огляд цього питання представлено в огляді Анема [38]; щодо визначення фракцій казеїну у молоці заслуговує на увагу метод йонної хроматографії [39] та електрофорезу [40]. Методом електрофорезу вдалося оцінити розподіл денатурованих сироваткових білків і казеїнів між розчинними та міцелярними комплексами при нагріванні впродовж 10 хв до температури 90 °C. Розчинні комплекси і сироваткові протеїни були відокремлені від міцел казеїну за допомогою методів фракціонування.

За рахунок великого вмісту хімічних сполук молоко є ідеальною основою для виникнення і перебігу хімічних реакцій між ними. При термічній обробці молока відбувається реакція конденсації між карбонільною групою (альдегідна або кетонна група), що міститься в лактозі та аміногрупою в амінокислотах пептидів. Це так звана реакція Маяра, чи реакція цукроамінної конденсації. В реакції розглядають три етапи: початковий етап, проміжна стадія (перегрупування Амадорі) та розвинена стадія (утворення меланоїдинів). На проходження реакції Маяра впливають час нагріву, вміст води та її активність, температура, рН та йони металів. Досить детальний літературний огляд реакції Маяра, що відбувається у молоці при нагріванні, наведено в [41]. До числа найбільш відомих продуктів реакції Маяра, що містяться в молоці і можуть бути маркерами його термічної обробки, відносять фуризин, карбоксиметилізін (CML) і 5-гідроксиметилфурфурол (HMF).

Вміст фуризину визначають методом йонно-парної обернено-фазової високо-ефективної рідинної хроматографії (RP-HPLC) з УФ-детектуванням при 280 нм за стандартним методом ISO (ISO 18329:2004, «Milk and milk products — Determination of furosine content — Ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography method»). Утворення фуризину пов'язане з ранньою стадією реакції Маяра, при якій відбувається перетворення лактозилізіну за допомогою перегрупування Амадорі до більш стабільної сполуки лактозилізіну, яка є біологічно недоступною формою незамінної амінокислоти лізіну. Фуризин утворюється при кислотному гідролізі лактозилізіну. Концентрація фуризину різко зростає у молоці при ультрапастеризації за температури вище 120 °C (23 мг/л при 120 °C і 80 мг/л при 150 °C) [42].

Як альтернативу досить складному та дорогому методу визначення фуризину автори [43] запропонували використовувати флуоресценцію продуктів реакції Маяра і розчинного триптофану. Метод ґрунтується на одночасному визначенні денатурації білка за флуоресценцією триптофану (λ_{exc} 290 нм; λ_{em} 340 нм) і вимірювання флуоресценції продуктів реакції Маяра (λ_{exc} 350 нм; λ_{em} 440 нм) у фракції молока, розчинній при рН 4,6. Перша реакція характеризується низькою тепловою обробкою, така як пастеризація, а друга відбувається при більш високій температурі (УВТ або стерилізація). Для характеристики теплової обробки молока автори цього дослідження вводять індекс FAST, який являє собою відношення інтенсивності флуоресценції продуктів реакції Маяра до інтенсивності флуоресценції триптофану в молочній фракції при рН 4,6 після осадження білка. На перший погляд здавалося, що знайдено простий, недорогий і чутливий спосіб визначення ступеня термічної обробки молока, який, зокрема, дасть змогу реагувати на будь-які технологічні проблеми під час теплового процесу, а також визначати добавку сухого молока чи навіть повну заміну

натурального молока на «молоко», одержане розчиненням сухого молока у воді, тобто його відновлений продукт, який інколи нечесні виробники молочної продукції продають як звичайне молоко. Подальші дослідження в цьому напрямку, зокрема автори дослідження [44] 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 [45]. Цікавою є думка Фейнберга зі співавторами [46], які вважають, що жоден індикатор не може бути універсальним для виявлення ступеня термічної обробки молока, якщо він не пов'язаний з іншими маркерами. В дослідженні були вибрані такі маркери: фурозин, лактулоза, нативний α -лактальбумін, денатурований α -лактальбумін, відсоток денатурованого α -лактальбуміну, індекс FAST, флуоресценція триптофану, β -лактоглобулін і лактопероксидаза та здійснено 5000 вимірювань. Проведений дисперсійний аналіз показав, що не можна вибрати жоден індикатор для універсальної ідентифікації молока залежно від його температурної обробки. Автори роблять висновок, що така ідентифікація повинна базуватися на багатоваріантному підході. Застосування факторного дискримінантного аналізу шляхом комбінування принаймні п'яти показників дає можливе вирішення цього питання.

На пізній стадії реакції Майяра відбувається деградація лактулозилізіну та утворення CML. У дослідженні [47] наводяться такі концентрації CML: 16 мг/кг білка для пастеризованого молока, 53 мг/кг білка для пастеризованого молока з низьким вмістом жиру, близько 60 мг/кг білка для УВТ цільного молока та 343 мг/кг білка для стерилізованого молока. Дані одержані імуноферментним аналізом (ELISA).

5-Гідроксиметилфурфурол (HMF), що утворюється в молоці за рахунок реакції Майяра, може бути цінним індикатором ступеня термічного оброблення та свіжості молока. Проте досліджень з визначення HMF у молоці досить мало через дуже малі концентрації речовини. Ріхман із співавторами [48] вважають, що додавання сухого молока до рідкого можна виявити за вмістом HMF. Вміст HMF, визначений методом ВЕРХ, у сирому молоці становив 7,66 мкмоль/літр, а в пастеризованому та УВТ молоці коливався від 10,52—16,0 до 16,33—20,85 мкмоль/літр відповідно. HMF у сухому молоці, відновленому до рідкого молока, становив 28,0 мкмоль/літр. Зроблено висновок, що ці значення HMF можна використовувати для виявлення фальсифікації сирого, пастеризованого та УВТ молока сухим молоком.

Під час термічної обробки молока відбувається ще один цікавий процес: частина лактози молока ізомеризується до лактулози, яка являє собою дисахарид галактози і фруктози. Лактулоза не міститься в сирому молоці і мало змінюється під час його зберігання. Отже, вміст лактулози може також бути показником теплової обробки молока. Лактулозу в молоці, яке зазнало термічної обробки, можна визначити ферментативним методом (ISO 11285:2004, «Milk — Determination of lactulose content Enzymatic method») або методом ВЕРХ, що регламентується ISO (ISO 11868:2007, «Heat-treated milk — Determination of lactulose content — Method using high-performance liquid chromatography»). Метод ВЕРХ використовується у спірних випадках і є специфічним для визначення вмісту лактулози в підігрітому молоці, знежиреному, частково знежиреному або незбираному молоці, щоб відрізнити молоко, стерилізоване за допомогою ультратермічної обробки, від стерилізованого молока. В 2012 р. корейські дослідники [49] визначали методом ВЕРХ співвідношення лактулози до фуразину як маркер на теплову обробку молока та вміст у ньому сухого молока. Для

дослідження виготовлялись зразки молока із сирого продукту нагріванням на масляній бані при 75 °C протягом 10—120 с та нагріванням при 130 °C від 2 до 60 с. Відновлене молоко добавляли до свіжого молока у кількості 10, 20 та 30%. Вміст лактулози і фурузину, у молоці, обробленому при 75 °C, коливався від 1,61 до 2,96 мг/100 мл молока та від 0,37 до 1,69 мг/100 мл відповідно. Для молока, обробленого при 130 °C, концентрації лактулози та фурузину коливались від 9,29 до 26,60 мг/100 мл і від 2,16 до 7,58 мг/100 мл відповідно. Встановлено, що порівняно із сирим молоком спостерігається більш ніж удвічі зниження співвідношення LU/FU після додавання відновленого молока ($p < 0,05$). Ці дослідження продовжили китайські вчені [50], які описали розробку методики ідентифікації відновленого молока за співвідношенням вмісту лактулози та фурузину методом рідинної хроматографії в поєднанні з тандемною мас-спектрометрією (LC-MS/MS). Межа кількісного виявлення лактулози становила 0,05 мг/л, а фурузину 0,01 мг/л.

Усі вище розглянуті методи ґрунтуються на визначенні органічних складових молока, адже мінеральні речовини складають незначну його частину (8—9 г/л). Мінеральні речовини молока представлені такими елементами, як кальцій, калій, магній, натрій і хлоридом, сульфатом, фосфатом та цитратом. Деякі із цих компонентів, такі як Cl^- , Na^+ , K^+ , існують у йонній формі, а інші — в рівновазі між розчинною та колоїдною формами. Вважається, що від 10 до 30% кальцію знаходиться у молоці в йонному стані (гідратовані йони Ca^{2+}); більша його частина у вигляді складного комплексу кальцій казеїнату з колоїдним кальцій фосфатом, а невелика кількість зв'язана з α -лактоальбуміном [51]. Значний вплив на неорганічну складову молока має його термічна обробка: ці питання детально розглянуто в [3], зокрема, вплив рН, йонної сили на зміну концентрації Ca^{2+} під час термічного оброблення молока. Відмічається, що в процесі нагрівання кальцій гідрогенфосфат, який знаходиться у вигляді істинного розчину, переходить у нерозчинний фосфат кальцію, що у вигляді колоїду осідає на казеїнових міцелах. Показник рН теж зменшується при термічній обробці молока і це могло б призвести до часткового розчинення кальцій фосфату, але очевидно утворення нерозчинного $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ за підвищення температури є домінуючим фактором і загалом кількість йонного кальцію і фосфору у молоці, яке зазнало температурної обробки зменшується [52].

Для кількісного визначення вмісту кальцію в молоці наразі використовують декілька методів, в основному це полуменева атомно-абсорбційна спектрометрія (ПААС) та індуктивно-зв'язана плазма — оптична емісійна спектрометрія (ІЗП-ОЕС) [53]. Але ці методи дають інформацію тільки про загальний вміст кальцію, без його розподілу за формами. Для технологічного контролю процесу більш важливим є вимірювання йонного кальцію, що можна зробити з методом прямої потенціометрії з використанням йон-селективного електроду на кальцій [54]. Останній метод є достатньо популярним через низьку вартість обладнання, високу експресність та простоту пробопідготовки. Але як і в огляді Левіса [55], так і в інших дослідженнях, в яких проводили визначення йонного кальцію методом прямої потенціометрії, не приводяться дані щодо невизначеності вимірювань, а, отже, загальна якість результатів вимірювань лишається невідомою. Загалом праця, присвячених використанню відношення йонного та загального кальцію і фосфору як маркерів на температурну обробку молока, не знайдено.

Висновки. Більшість відомих довідникових та офіційних методів оцінки термічної обробки молока можна умовно розділити на дві групи: *перша група* включає визначення ступеня денатурації та інактивації термолабільних компонентів, тоді як

друга група базується на виявленні речовин, які утворюються в процесі термічної обробки. До першої групи відноситься визначення ферментів лужної фосфатази, лактопероксидази та білків сироватки: α -лактальбуміну і β -лактоглобуліну. До другої групи визначення фуринозу, карбоксиметил-лізину, 5-гідроксиметилфурфурол і лактулози. Щодо аналітичних методів оцінки термічної обробки, то в переважній більшості це такі цільові методи аналізу, як високоефективна рідинна та йонна хроматографія, імуоферментний аналіз, капілярний електрофорез. Проте ці методи вимагають тривалих процедур пробопідготовки, є трудомісткими і дорогими. Є дослідження, в яких, як методи аналізу використовують спектроскопію ближньої ІЧ-області та флуорисцентну спектроскопію. Перспективними можуть бути дослідження з визначення йонних кальцію та фосфору у зразках молока, яке зазнало відповідної термообробки. Надійна оцінка ступеня термічної обробки, можливих порушень у технологічному процесі та виявлення сфальсифікованого продукту повинна ґрунтуватися на використанні кількох маркерів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Fusco, V., Chieffi, D., Fanelli, F., Logrieco, A. F., Cho, G. S., Kabisch, J., Franz, C. M. (2020). Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2013—2049.
2. Deeth, H. C. (2022). Heat Treatment of Milk: Principles and Purpose. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H.C. Deeth. London, United Kingdom: Academic Press.
3. Deeth, H. C., Lewis, M. J. (2017). *High Temperature Processing of Milk and Milk Products*. John Wiley & Sons.
4. Boor, K. J., Wiedmann, M., Murphy, S., Alcaine, S. (2017). A 100-Year Review: Microbiology and safety of milk handling. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9933—9951.
5. Deeth, H. C. (2021). Heat-induced inactivation of enzymes in milk and dairy products. A review. *International Dairy Journal*, 121, 105104.
6. Pelegrine, D. H. G., Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *Food Science and Technology*, 38(1), 77—80.
7. Van den Oever, S. P., Mayer, H. K. (2021). Analytical assessment of the intensity of heat treatment of milk and dairy products. *International Dairy Journal*, 121.
8. Carrota, R., Arleth, L., Pedersen, J. S., Bauer, R. (2003). Small-angle x-ray scattering studies of metastable intermediates of beta-lactoglobulin isolated after heatinduced aggregation. *Biopolymers*, 70, 377—390.
9. Akkerman, M., Rauh, V. M., Christensen, M., Johansen, L. B., Hammershoj, M., Larsen, L. B. (2016). Effect of heating strategies on whey protein denaturation-Revisited by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 152—166.
10. Krämer, A. C., Torreggiani, A., Davies, M. J. (2017). Effect of oxidation and protein unfolding on cross-linking of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 47.
11. De Wit, J. N. (2009). Thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 150 °C: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(1), 27—34.
12. Claey, W. L., van Loey, A. M., Hendrickx, M. E. (2002). Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 293311.
13. Corredig, M., Dalgleish, D. (1996). Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. *Journal of Dairy Research*, 63(3), 441—449.
14. Haque, M. A., Aldred, P., Chen, J., Barrow, C., Adhikari, B. (2014). Drying and denaturation characteristics of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, and bovine serum albumin in a convective drying process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4695—4706.
15. Sakas, L., Moutafi, A., Moschopoulou, E., Moatsou, G. (2014). Assessment of heat treatment of various types of milk. *Food Chemistry*, 159, 293-301.

16. Considine, T., Patel, H. A., Anema, S., Singh, H., Creamer, L. K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 1—23.
17. Rukke, E. O., Sørhaug, T., Stepaniak, L. (2011). *Heat treatment of milk e thermization of milk*. In J. W. Fuquay (Ed.). *Encyclopedia of dairy science*. London, UK: Elsevier Ltd.
18. Li, Y., Dalgleish, D., Corredig, M. (2015). Influence of heating treatment and membrane concentration on the formation of soluble aggregates. *Food Research International*, 76, 309316.
19. Pizzano, R., Manzo, C., Nicolai, M. A. Addeo, F. (2012). Occurrence of major whey proteins in the pH 4.6 insoluble protein fraction from UHT-treated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8044—8050.
20. Havea, P., Singh, H., Creamer, L. K., Campanella, O. H. (1998). Electrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions. *Journal of Dairy Research*, 65, 79—91.
21. Kinghorn, N. M., Norris, C. S., Paterson, G. R., Otter, D. E. (1995). Comparison of capillary electrophoresis with traditional methods to analyse bovine whey proteins. *Journal Chromatography A*, 700(1—2), 111—123.
22. Feng, P., Fuerer, C., & McMahon, A. (2018). Quantification of whey protein content in milk-based infant formula powders by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis (SDS-CGE): Multi-laboratory testing study, final action 2016.15. *Journal of AOAC International*, 101, 1566—1577.
23. Miralles, B., Rothbauer, V., Manso, M. A., Amigo, L., Krause, I., Ramos, M. (2001). Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-kappa-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 915, 225—230.
24. Bobe, G., Beitz, D. C., Freeman, A. E., Lindberg, G. L. (1998). Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 458—463.
25. Villamiel, M., Arias, M., Corzo, N., Olano, A. (1999). Use of different thermal indices to assess the quality of pasteurized milk. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und — Forschung A*, 208, 169—171.
26. Bordin, G., Cordeiro Raposo, F., de la Calle, B., Rodriguez, A. R. (2001). Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 928, 63—76.
27. Moatsou, G., Hatzinaki, A., Kandarakis, I., Anifantakis, E. (2003). Nitrogenous fractions during the manufacture of whey protein concentrates from Feta cheese whey. *Food Chemistry*, 81, 209—217.
28. Losito, I., Carbonara, T., Monaci, L., Palmisano, F. (2007). Evaluation of the thermal history of bovine milk from the lactosylation of whey proteins: An investigation by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 2065—2074.
29. Boitz, L. I., Fiechter, G., Seifried, R. K., Mayer, H. K. (2015). A novel ultra-high performance liquid chromatography method for the rapid determination of b-lactoglobulin as heat load indicator in commercial milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1386, 98—102.
30. Boitz, L. I., Mayer, H. K. (2017). Extended shelf life milk — one concept, different qualities: A comprehensive study on the heat load of differently processed liquid milk retailed in Austria in 2012 and 2015. *LWT — Food Science and Technology*, 79, 384—393.
31. Akkerman, M., Rauh, V. M., Christensen, M., Johansen, L. B., Hammershoj, M., & Larsen, L. B. (2016). Effect of heating strategies on whey protein denaturation e revisited by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 99, 152—166.
32. Kus, S., Marczenko, Z., Obarski, N. (1996). Derivative UV-vis spectroscopy in analytical chemistry. *Chemia Analytyczna*, 41, 899—930.
33. Luf, W., E. Brandl, E. (1997). Quantification of the ratio of whey powder to milk powder using spectroscopy in alkali. *Milchwissenschaft*, 52, 213—216.
34. Meisel, H. (1995). Application of fourth derivative spectroscopy to quantitation of whey protein and casein in total milk protein. *Milchwissenschaft*, 50, 247—251.
35. Qiaoqian, Lu, Zdenko, P. (1999). Determination of protein and casein in milk by fourth derivative UV spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 393, 227—234.
36. Miralles, B., Bartolome, B., Amigo, L., Ramos, M. (2000). Comparison of Three Methods to Determine the Whey Protein to Total Protein Ratio in Milk. *Journal of Dairy Science*, 83(12), 2759—2765.

37. Neide, K. K. Kamizake, Mauricio, M. Goncalves, Cassia, T. B. V. Zaia, Dimas, A. M. Zaia. (2003). Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 507—516.
38. Anema, S. (2021). Heat-induced changes in caseins and casein micelles, including interactions with denatured whey proteins. *International Dairy Journal*, 122:105136.
39. Holland, B., Rahimi Yazdi, S., Ion Titapiccolo, G., Corredig, M. (2010). Short communication: Separation and quantification of caseins and casein macropeptide using ion-exchange chromatography. *Journal of Dairy Science*, 93, 893—900.
40. Pesic, M. B., Barac, M. B., Stanojevic, S. P., Vrvic, M. M. (2014). Effect of pH on heatinduced casein-whey protein interactions: A comparison between caprine milk and bovine milk. *International Dairy Journal*, 39, 178—183.
41. Xiang J., Liu F., Wang B., Chen L., Liu W., Tan S. A. (2021). Literature Review on Maillard Reaction Based on Milk Proteins and Carbohydrates in Food and Pharmaceutical Products: Advantages, Disadvantages, and Avoidance Strategies. *Foods*, 10, 1998—2006.
42. Nangpal, A., Reuter, H., Dehn-Mueller, B., Erbersdobler, H. F. (1990). Formation of furosine during UHT treatment of milk-comparison between direct and indirect heating. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 42, 43—51.
43. Birlouez-Aragon, I., Nicolas, M., Metais, A., Marchond, N. (1998). A Rapid Fluorimetric Method to Estimate the Heat Treatment of Liquid Milk. *International Dairy Journal*, 8, 771—777.
44. Guan, R., Liu, D., Ye, X., Yang, K. (2005). Use of fluorometry for determination of skim milk powder adulteration in fresh milk. *Journal of Zhejiang University Science*, 6B(11), 1101—1106.
45. Matiacevich, S. B., Santagapita, P. R., Buera, M. P. (2005). Fluorescence from the Maillard Reaction and its Potential Applications in Food Science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6), 483—495.
46. Feinberg, M., Dupont, D., Efstathiou, T., Louâpre, V., Guyonnet, J.-P. (2006). Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. *Food Chemistry*, 98, 188—194.
47. Mehta, B. M., Deeth, H. C. (2015). Blocked Lysine in Dairy Products: Formation, Occurrence, Analysis, and Nutritional Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 206—218.
48. Rehman, Z. U., Saeed, A., Zafar, S. I. (2000). Hydroxymethylfurfural as an indicator for the detection of dried powder in liquid milk. *Milchwissenschaft*, 55, 256—257.
49. Cho, Y.-H., Hong, S.-M., Kim, C.-H. (2012). Determination of Lactulose and Furosine Formation in Heated Milk as a Milk Quality Indicator. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 32(5), 540—544.
50. Hongting, L., Riming, H., Guangfeng, Z., Zhenlin, X., Yuanming, S., Hongtao, L., Yudong, S., Haiming, W., Baojun, X., Wei, X. (2020). Discrimination of reconstituted milk in China market using the content ratio of lactulose to furosine as a marker determined by LC-MS/MS. *Food Science and Technology*, 108648.
51. Gancheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45, 473—483.
52. Pouliot, Y., Boulet, M., Paquin, P. (1989). Observation on the heat induced salt balance changes in milk. 1. Effect of heating time between 4 and 90 °C. *Journal of Dairy Research*, 56, 185—192.
53. Bakircioglu, D., Topraksever, N., Yurtsever, S., Kizildere, M., Kurtulus, Y. B. (2018). Investigation of macro, micro and toxic element concentrations of milk and fermented milks products by using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, to improve food safety in Turkey. *Microchemical Journal*, 136, 133—138.
54. Silanikove, N., Fira Shapiro, F., Shamay, A. (2003). Use of an ion-selective electrode to determine free Ca ion concentration in the milk of various mammals. *Journal of Dairy Research*, 70, 241—243.
55. Lewis, M. J. (2011). The measurement and significance of ionic calcium in milk — A review. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 1—13.