

УДК 681.586.5; 535.361

## ДЕТЕКТИРОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В МОЛОКЕ С ПОМОЩЬЮ ЛАЗЕРНОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ

А. В. Шкирин<sup>1,2</sup>, С. Н. Чириков<sup>2</sup>, Н. В. Суязов<sup>1</sup>, М. Е. Асташев<sup>1</sup>,  
Д. Н. Игнатенко<sup>1</sup>, С. В. Гудков<sup>1</sup>

*В цилиндрической геометрии исследовано угловое распределение интенсивности лазерного излучения с длиной волны 650 нм, многократно рассеянного образцами коровьего молока различной жирности с содержанием крупномасштабных частиц размером  $\sim 20$  мкм. Показано, что интенсивность рассеяния вперед, измеренная для молока с содержанием жира в диапазоне 0–6%, монотонно уменьшается при увеличении концентрации соматических клеток в диапазоне  $5 \cdot 10^4$ – $10^6$  см<sup>-3</sup>. Вместе с тем угловая зависимость интенсивности в области бокового и обратного рассеяния, используемая для определения содержания жира в молоке, практически не изменяется при добавлении соматических клеток. Собран прототип датчика состава молока, основанный на измерении индикатрисы рассеяния в угловом диапазоне 18°–162° с помощью осесимметричного массива фотодиодов в комбинации с фотоприемной CMOS-матрицей, регистрирующей интенсивность малоуглового светорассеяния вперед (вблизи 0°).*

**Ключевые слова:** рассеяние света, оптические датчики, контроль качества молока.

*Введение.* Экспресс-диагностика содержания нативных компонентов молока и его контаминантов позволяет проводить оценку качества молока, необходимую для оперативного реагирования на отклонения показателей, характеризующих физиологическое состояние животных [1, 2]. Одним из основных показателей качества молока является

<sup>1</sup> ИОФ РАН, 119991 Россия, Москва, ул. Вавилова, 38.

<sup>2</sup> НИЯУ «МИФИ», 115409 Россия, Москва, Каширское ш., 31; e-mail: avshkirin@mephi.ru.

содержание соматических клеток (ССК), которое характеризуется количеством клеток в миллилитре молока. По результатам ветеринарных исследований превышение ССК выше  $10^5$  кл/мл расценивается как признак заражения коровы маститом [3, 4].

Поскольку контрольные устройства, предназначенные для встраивания в доильные системы, не должны приводить к значительному падению давления внутри молочного шланга, оптические методы представляются наиболее подходящей основой для создания датчиков состава молока [5–8]. Количественная оценка состава молока проводится, как правило, с помощью спектроскопических приборов, таких как инфракрасные фурье-спектрометры [9] и спектроскопические анализаторы ближнего инфракрасного диапазона [10]. В качестве альтернативы спектроскопическим анализаторам весьма перспективны датчики состава молока, основанные на светорассеянии, поскольку их можно сделать компактными, быстродействующими и дешевыми, обеспечивая при этом необходимую на практике точность измерения процентного содержания жира и белка. Несмотря на то, что существует ряд исследований, предлагающих различные схемы применения светорассеяния для определения процентного содержания компонентов в молоке [11–13], коммерческие предложения светорассеивающих датчиков состава молока в настоящее время отсутствуют. Из-за дисперсных свойств молока датчики светорассеяния, предназначенные для интеграции в системы доения, вынуждены работать в условиях многократного рассеяния. Анализаторы молока на основе однократного рассеяния требуют разбавления молока [14] и поэтому не могут быть применены для поточного мониторинга параметров молока. Измерения прямого и бокового рассеяния используются для определения ССК в молоке с помощью проточного цитометрического анализа [15], который не является неразрушающим методом и требует обработки проб молока. Многократное рассеяние света в ближнем ИК-диапазоне также может быть информативным, в частности, для мониторинга ферментации молока [16]. Для анализа размера и концентрации частиц в плотных средах, в том числе в пищевых продуктах, предлагаются приборы, использующие такие методы, как спектроскопия волн фотонной плотности [17] и статическое многократное рассеяние света [18], однако они нацелены на работу с закрытыми кюветами при использовании небольшого набора углов рассеяния. Ранее мы предложили подход к оптической диагностике мутных сред, таких как молоко, заключающийся в отслеживании изменений формы углового распределения интенсивности рассеянного света (индикатрисы рассеяния), происходящих вследствие изменения содержания таких компонентов молока, как жир и крупномасштабные примеси, роль которых в молоке играют соматические клетки [19].

В настоящей работе мы применили новый способ определения жирности молока, основанный на вычислении наклона индикатрисы рассеяния света, измеренной в области обратного и бокового рассеяния ( $72^\circ < \theta < 162^\circ$ ) с помощью аксиального фотодиодного массива, а также мы использовали измерение профиля интенсивности прямого рассеяния с помощью зондовой CMOS-камеры для определения содержания соматических клеток.

*Лазерный скаттерометр для анализа дисперсного состава молока.* Мы разработали датчик процентного содержания жира и концентрационного уровня соматических клеток в молоке, который представляет собой лазерный скаттерометр, сочетающий аксиальный массив фотодиодов и зондовую CMOS-камеру для регистрации рассеянного молоком света в цилиндрической трубке (рис. 1).

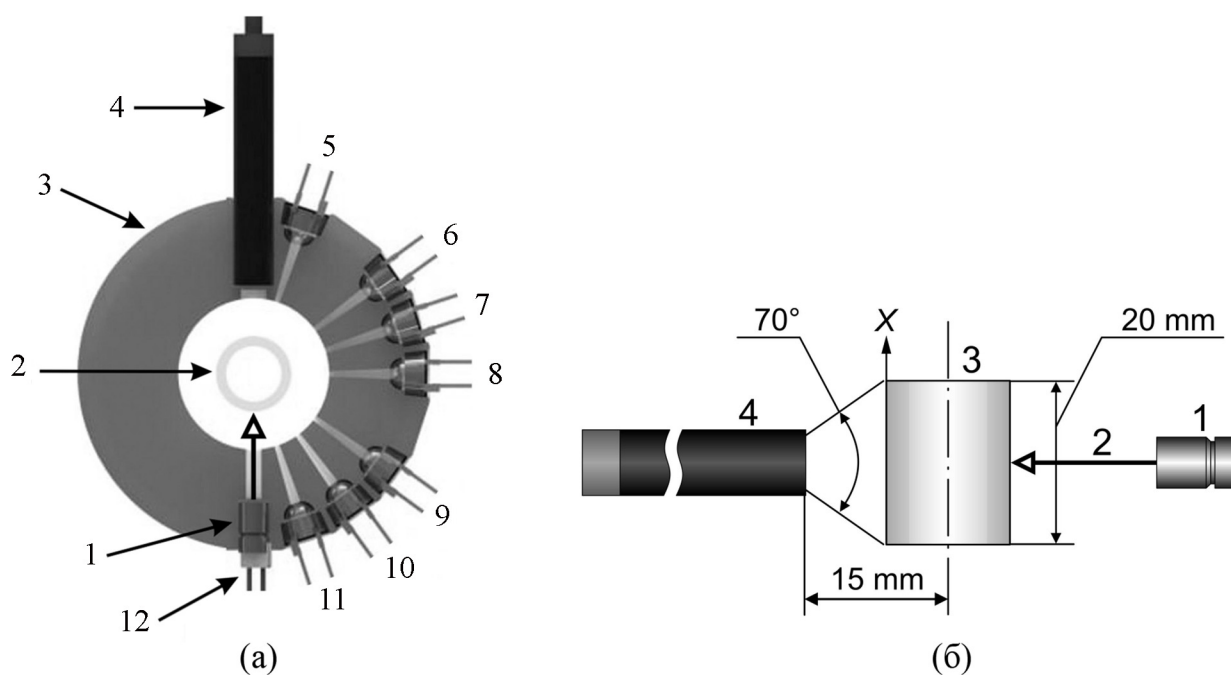


Рис. 1: Устройство лазерного скаттерометра для измерения процентного содержания жира и концентрационного уровня крупномасштабных частиц в молоке: (а) оптическая система: (1) лазерный диод с длиной волны 650 нм, (2) трубка диаметром 15 мм, заполненная протекающим молоком, (3) кольцевой держатель, (4) зондовая CMOS-камера, (5)–(11) аксиальный фотодиодный массив, (12) расширяющиеся прямоугольные оптические каналы; (б) схема детектирования рассеянного света зондовой камерой: (1) лазерный диод, (2) лазерный луч, (3) цилиндрическая трубка, заполненная молоком, (4) зондовая CMOS-камера.

Луч лазерного диода с длиной волны 650 нм и мощностью 3 мВт направлен к центру цилиндрической трубки из плавленого кварца, имеющей внешний диаметр 15 мм и толщину стенки 2 мм. Зондовая CMOS-камера типа IC-V101 (iCarTool, Китай) с разрешением  $1600 \times 1200$  пикселей, размером объектива 8 мм и углом обзора  $70^\circ$  центрирована по оси лазерного луча. Фотодиоды типа ФД263-01 (Чип и Дип, Россия) расположены аксиально вокруг трубки с шагом  $18^\circ$  тремя группами для приема рассеянного света в угловых областях прямого рассеяния ( $18^\circ$ ), бокового рассеяния ( $54^\circ$ ,  $72^\circ$ ,  $90^\circ$ ) и обратного рассеяния ( $126^\circ$ ,  $144^\circ$ ,  $162^\circ$ ). Перед каждым фотодиодом поле рассеянного света диафрагмируется посредством вырезанного в кольцевом держателе прямоугольного оптического канала с начальной шириной 1 мм.

*Сравнительные индикатрисы светорассеяния молока различной жирности при добавлении соматических клеток.* На рис. 2(а) показаны угловые распределения многократно рассеянного света (индикатрисы светорассеяния), измеренные для серии образцов ультрапастеризованного коровьего молока с различным процентным содержанием жира 0.05%, 1.5%, 3.0%, 4.5% и 6% с помощью фотодиодов (рис. 1), установленных в поперечной плоскости по отношению к цилиндрической трубке, заполняемой молоком, в диапазоне углов рассеяния  $18^\circ$ – $162^\circ$ . С целью изучения реакции индикатрис светорассеяния на наличие соматических клеток в молоке были проведены также сравнительные измерения индикатрисы светорассеяния в образцах молока разной жирности без добавления и с добавлением соматических клеток (СК) при концентрации  $10^6 \text{ см}^{-3}$  (рис. 2(б)). В качестве подходящего аналога соматических клеток, содержащихся в молоке млекопитающих, инфицированных маститом, были использованы клетки карциномы молочной железы человека MCF-7 (АТСС № НТВ-22) со средним размером  $\sim 20$  мкм. Однородность суспензии СК в исследованных образцах молока достигалась путем их перемешивания с помощью пипеточного дозатора Finnpiquette Digital 1-5 ml (Thermo Scientific, Finland). Значения интенсивности рассеяния, изображенные на рис. 2 в логарифмическом масштабе, были получены усреднением по 3 независимо приготовленным пробам молока каждой жирности. Среднеквадратическая ошибка логарифма интенсивности рассеяния не превышает 0.02.

Индикатрисы рассеяния молока, изображенные на рис. 2, проявляют возрастание интенсивности рассеяния при переходе от прямого к обратному рассеянию, что является характерным свойством многократно рассеивающих сред [20, 21].

*Влияние соматических клеток на измерение жирности молока.* Из графиков на рис. 2 видно, что значения интенсивности рассеяния, с одной стороны, возрастают с уве-

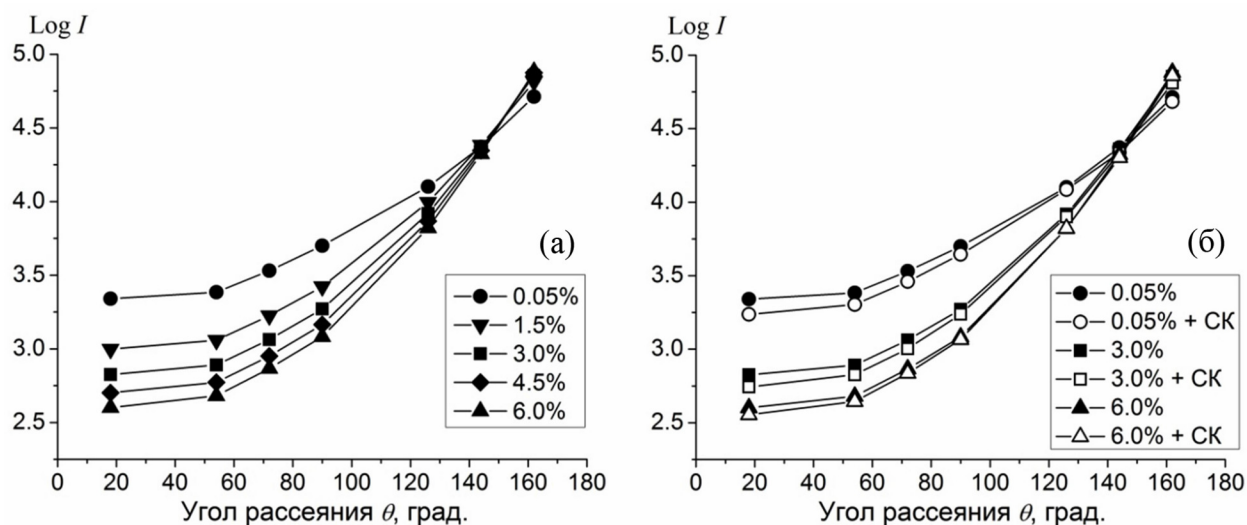


Рис. 2: Индикатрисы светорассеяния, измеренные для ультрапастеризованного молока при длине волны лазера 650 нм: (а) молоко с жирностью 0.05%, 1.5%, 3.0%, 4.5%, 6% без добавления крупномасштабных примесей; (б) беспримесное молоко с жирностью 0.05%, 3.0% и 6.0% в сравнении с молоком, содержащим соматические клетки (СК) при концентрации  $10^6 \text{ см}^{-3}$ . Температура образцов молока  $20^\circ \text{C}$ .

личением угла рассеяния в диапазоне  $72^\circ < \theta < 162^\circ$  при заданной жирности молока, а, с другой стороны, монотонно изменяются с увеличением жирности. Таким образом, наклон зависимости логарифма интенсивности рассеяния от угла рассеяния можно принять в качестве параметра, чувствительного к процентному содержанию жира. Наклон может быть определен путем расчета коэффициентов линейной регрессии по методу наименьших квадратов [22] на угловом интервале  $72^\circ$ – $162^\circ$ . С целью оптимизации вычислений контроллером датчика угловая переменная была умножена на коэффициент  $2^{10} = 1024$  так, чтобы значения наклона стали существенно больше 1. Значения наклона  $A$ , полученные для исследованных образцов молока с жирностью 0–6%, показаны на рис. 3(а). Зависимость наклона от жирности нелинейная, однако её можно линеаризовать простой функциональной заменой:

$$B = \frac{1}{a - A}, \quad (1)$$

где  $A$  – наклон логарифмической индикатрисы рассеяния;  $a$  – экспериментально определяемый параметр, который для ультрапастеризованного молока оказался равным 28.5;  $B$  – характеристическая функция для измерений жирности молока по светорассеянию. Применяя линейную регрессию в соответствии с алгоритмом наименьших квадратов,

можно получить формулу линейной зависимости  $B$  от жирности ультрапастеризованного молока:

$$B = 0.01894C + 0.06584, \quad (2)$$

где  $C$  – процент жирности молока, а коэффициент детерминации  $R^2$  оказался равен  $R^2 = 0.9998$ . Соответствующий график характеристической функции  $B$  представлен на рис. 3(б).

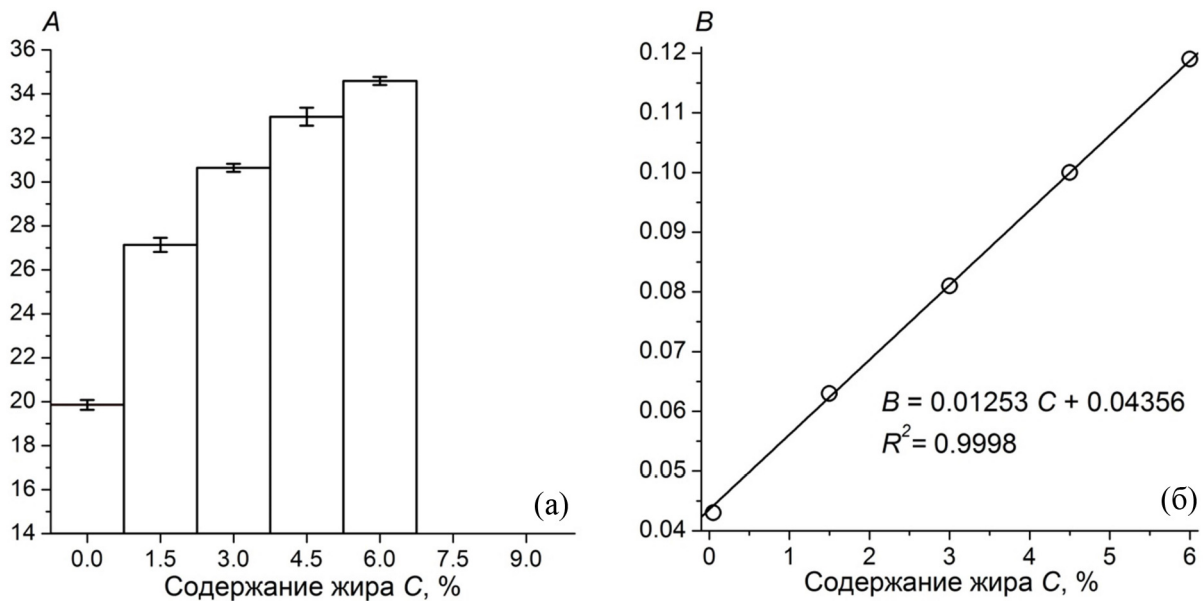


Рис. 3: Зависимости характеристических параметров индикатрисы рассеяния от содержания жира, построенные на основе экспериментальных данных для ультрапастеризованного молока в диапазоне 0–6% (рис. 2): (а) наклон логарифмической индикатрисы рассеяния  $A$  в угловом интервале ( $72^\circ - 162^\circ$ ) после умножения на коэффициент 1024; (б) линеаризация характеристической кривой содержания жира в молоке, где  $B$  – функция наклона индикатрисы, заданная формулой (1).

Сравнительные графики на рис. 2(б) показывают, что наличие в молоке крупномасштабных примесных частиц типа соматических клеток оказывает специфическое влияние на форму индикатрисы рассеяния, приводя к заметному отклонению интенсивности света только при рассеянии вперед. Это является важным обстоятельством с точки зрения методики измерения содержания жира в молоке, так как наличие клеток не будет существенно искажать измеренные значения процентного содержания жира, полученные по наклону индикатрисы рассеяния при боковом и обратном рассеянии,

поскольку практически сохраняется средняя скорость изменения индикатрис на этих углах. Расчеты наклона, полученные по данным рис. 2(б) в интервале углов  $72^\circ$ – $162^\circ$ , показывают, что относительное изменение наклона, вызванное уровнем концентрации клеток  $10^6$ /мл, составляет 0.042 и 0.024 для ультрапастеризованного молока с 3% и 6% жирностью, соответственно. В соответствии с характеристическим графиком (рис. 3(б)) такая вариация наклона приводит к абсолютной погрешности измерения жирности не более 0.15%, которую можно снизить, если использовать для расчета наклона меньший угловой интервал. Отметим, что по мере увеличения жирности молока влияние добавления клеток на индикатрису рассеяния начинает постепенно уменьшаться, по-видимому, из-за их экранирования растущим количеством жировых частиц.

*Методика измерения содержания соматических клеток (СК) в молоке.* Как следует из рис. 2(б), величина отклонения индикатрисы рассеяния для молока высокой жирности (3%–6%) с добавлением СК, измеряемая в диапазоне углов рассеяния  $18^\circ$ – $162^\circ$ , недостаточна для надежного определения присутствия СК. Поэтому для регистрации СК мы использовали измерение светорассеяния вперед с помощью зондовой камеры. В то время как фотодиоды фиксируют угловое распределения интенсивности света в плоскости рассеяния, ориентированной поперечно к оси трубки, камера регистрирует двумерное распределение интенсивности светорассеяния с максимумом, соответствующим направлению строго прямого рассеяния, т. е. углу рассеяния  $0^\circ$  (рис. 1). Для детектирования СК мы использовали профили интенсивности светорассеяния, регистрируемые линейкой пикселей центрального сечения CMOS-матрицы вдоль боковой поверхности трубки, заполненной молоком (рис. 4).

В качестве информативного параметра  $P_{SC}$ , чувствительного к концентрации СК, имеет смысл взять отношение интегралов профиля интенсивности, измеренного камерой вдоль оси  $X$  для молока, содержащего СК, и беспримесного молока:

$$P_{SC} = \frac{\int_{-h/2}^{h/2} I(X) dX}{\int_{-h/2}^{h/2} I_{\text{pure}}(X, C) dX}, \quad (3)$$

где  $h$  – длина отрезка интегрирования, определяемая количеством используемых пикселей камеры,  $I(X)$  – измеренный профиль интенсивности,  $I_{\text{pure}}(X, C)$  – базовый профиль интенсивности для беспримесного молока с жирностью  $C$ . Значения  $P_{SC}$ , рассчитанные для профилей интенсивности на рис. 4 по формуле (3) при  $h = 1000$ , приведены в табл. 1.

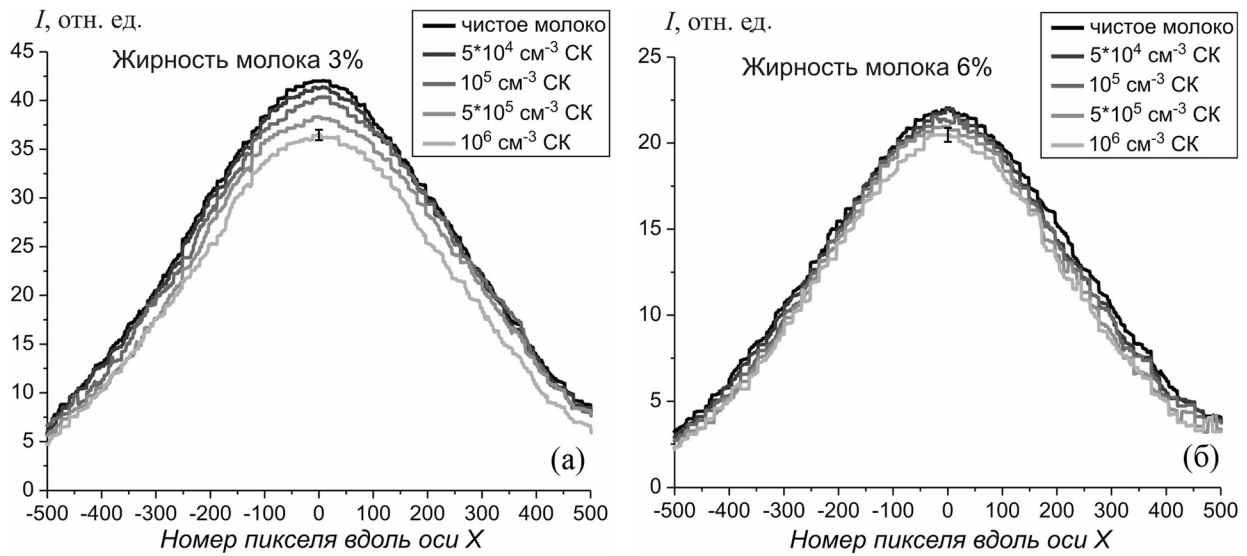


Рис. 4: Профили интенсивности светорассеяния, измеренные зондовой камерой вдоль оси  $X$  в соответствии со схемой (рис. 1) для беспримесного молока и молока с добавками СК с концентрациями  $5 \cdot 10^4$ ,  $10^5$ ,  $5 \cdot 10^5$  и  $10^6 \text{ см}^{-3}$ : (а) жирность молока 3%; (б) жирность молока 6%. Температура образцов молока  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Длина волны лазера 650 нм. Каждая кривая получена усреднением по десяти кадрам, последовательно записанным с интервалом 2 с.

Т а б л и ц а 1

Значения  $P_{SC}$  для различных концентраций СК в молоке

Жирность молока, $C$	Концентрация СК, $\text{см}^{-3}$				Относительная погрешность, $\delta P_{SC}$
	$5 \cdot 10^4$	$10^5$	$5 \cdot 10^5$	$10^6$	
	$P_{SC}$				
3%	0.974	0.946	0.908	0.845	0.04
6%	0.971	0.950	0.916	0.889	0.06

Такой относительный способ анализа содержания СК требует знания жирности молока  $C$ , которая может быть независимо определена по наклону индикатрисы рассеяния, измеряемой фотодиодами, с помощью формул (1) и (2). Наклон индикатрисы рассеяния можно считать независимым от входной интенсивности. В то же время, интенсивность зондирующего пучка влияет на высоту профиля интенсивности рассеяния, регистрируемого CMOS-камерой. Поэтому, для корректной работы предлагаемого устройства необходимо нормировать измеряемые профили интенсивности рассеяния на



интенсивность источника излучения. На практике такая нормировка может быть реализована путем установки дополнительного фотодиода, детектирующего текущий уровень мощности лазерного диода.

*Выводы.* Таким образом, в настоящей работе на примере молока показано, что с помощью измерений индикатрисы многократного рассеяния света в широком диапазоне углов рассеяния в мутной среде можно определить наличие примесных крупных частиц. В исследованном диапазоне жирностей молока (0–6%) установлено, что профиль интенсивности рассеянного лазерного излучения, регистрируемый с помощью зондовой CMOS-камеры, проявляет отклик на присутствие соматических клеток в молоке, который заключается в снижении значений интенсивности рассеяния вперед. Уровень содержания СК в молоке может быть оценен по относительному изменению площади профиля интенсивности в сравнении с беспримесным молоком такой же жирности. Поскольку для корректного определения базового профиля интенсивности светорассеяния, отвечающего беспримесному молоку, необходимо независимо определять значение жирности молока, предлагаемая схема детектирования содержания СК дополнительно включает измерение индикатрисы рассеяния с помощью аксиального массива фотодиодов. Разработана методика измерения жирности молока по наклону индикатрисы рассеяния в области углов рассеяния  $72^\circ$ – $162^\circ$ . Показано, что в этом угловом диапазоне присутствие СК оказывает пренебрежимо малое влияние на значения интенсивности светорассеяния и, таким образом, не искажает измеренные значения жирности. Сравнительно небольшая величина отклонения профиля интенсивности, вызванная СК, затрудняет точное определение их концентрации в молоке, однако рассмотренная методика способна решить задачу оперативного сигнализирования о факте отклонения уровня концентрации СК от порогового значения, что актуально для экспресс-анализа в процессе доения непосредственно на молочных фермах.

Предложенная схема регистрации лазерного излучения, рассеянного молоком, которая сочетает фотодиодный массив и CMOS-камеру для одновременного измерения содержания жира и соматических клеток в молоке, может служить основой компактных и недорогих лазерных датчиков состава молока, предназначенных для интеграции в доильные системы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00110, <https://rscf.ru/project/23-26-00110/>.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] Z. Alsaftli, J. Adv. Dairy. Res. **8**, 233 (2020). <https://doi.org/10.35248/2329-888X.20.8.1.233>.
- [2] Z. Abdel-Salam, S. A. Attala, E. Daoud, M. A. Harith, Dairy Sci. & Technol. **95**, 331 (2015). <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0213-x>.
- [3] A. S. El-Tahawy, A. H. El-Far, Int. J. Dairy Technol. **63**, 463 (2020). <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00597.x>.
- [4] M. Cinar, U. Serbester, A. Ceyhan, M. Gorgulu, Ital. J. Anim. Sci. **14**, 3646 (2015). <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3646>.
- [5] Y. T. Hu, Y. Ting, J. Y. Hu, S. C. Hsieh, Journal of Food and Drug Analysis **25**, 16 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.021>.
- [6] L. L. Chaikov, K. V. Kovalenko, S. V. Krivokhizha, et al., Phys. Wave Phen. **27**, 87 (2019). <https://doi.org/10.3103/S1541308X1902002X>.
- [7] M. E. Khosroshahi, Y. Patel, V. Woll-Morison, Laser Phys. Lett. **19**, 075602 (2022). <https://dx.doi.org/10.1088/1612-202X/ac6fc5>.
- [8] R. Lu, *Light Scattering Technology for Food Property, Quality and Safety Assessment* (CRC Press, Boca Raton, 2016).
- [9] D. E. Burmistrov, D. Y. Pavkin, A. R. Khakimov, et al., Photonics **8**, 551 (2021). <https://doi.org/10.3390/photonics8120551>.
- [10] S. Uusitalo, J. Diaz-Olivares, J. Sumen, et al., Foods **10**, 2686 (2021). <https://doi.org/10.3390/foods10112686>.
- [11] S. Kucheryavskiy, A. Melenteva, A. Bogomolov, Talanta **121**, 144 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.055>.
- [12] P. Jain, S. E. Sarma, Light scattering and transmission measurement using digital imaging for online analysis of constituents in milk, In: Proceedings of the SPIE 9525, Optical Measurement Systems for Industrial Inspection, 21 June 2015, Munich, Germany (SPIE, Bellingham, 2015). <https://doi.org/10.1117/12.2184903>.
- [13] T. Katsumata, H. Aizawa, S. Komuro, et al., Int. Dairy J. **109**, 104743 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104743>.
- [14] A. V. Shkirin, D. N. Ignatenko, S. N. Chirikov, et al., Phys. Wave Phen. **30**, 186 (2022). <https://doi.org/10.3103/S1541308X22030116>.
- [15] J. Widmer, L. Descloux, C. Brügger, et al., J. Dairy Sci. **105**(11), 8705 (2022). <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22038>.

- [16] M. Ramezani, G. Ferrentino, K. Morozova, M. Scampicchio, *Foods* **10**(7), 1582 (2021). <https://doi.org/10.3390/foods10071582>.
- [17] S. V. Ruiz, R. Hass, O. Reich, *Int. Dairy J.* **26**(2), 120 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.03.012>.
- [18] H. Zhu, H. Fu, P. Yan, et al., *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **640**, 128374 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128374>.
- [19] А. В. Шкирин, М. Е. Асташев, Д. Н. Игнатенко и др., *Краткие сообщения по физике ФИАН* **50**(5), 14 (2023). <https://doi.org/10.3103/S1068335623050081>.
- [20] V. V. Tuchin, *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnostics, Third Edition* (SPIE: Bellingham, 2015). <https://doi.org/10.1117/3.1003040>.
- [21] K. Muinonen, J. Markkanen, T. Väisänen, et al., *Opt. Lett.* **43**, 683 (2018). <https://doi.org/10.1364/OL.43.000683>.
- [22] J. Nocedal, S. Wright, *Numerical optimization* (Springer Science+Business Media: New York, 2006). <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-40065-5>.

Поступила в редакцию 2 апреля 2024 г.

После доработки 11 апреля 2024 г.

Принята к публикации 12 апреля 2024 г.