

УДК 681.586.5; 538.975

ФЛУОРЕСЦЕНТНО-СКАТТЕРОМЕТРИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЯ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДИСПЕРСНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЭМУЛЬСИЙ В ПРИМЕНЕНИИ К ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА МОЛОКА

А. В. Шкирин^{1,2}, М. Е. Асташев¹, Д. Н. Игнатенко¹,
В. А. Козлов^{1,3}, С. В. Гудков¹

Предложена методика, комбинирующая измерения рассеяния света (скаттерометрия) и флуоресценции (флуорометрия) для определения процентного состава эмульсии, протекающей внутри оптически прозрачной цилиндрической трубки. На основе этой методики разработан проточный датчик, работоспособность которого экспериментально проверена на примере молока. Принцип действия датчика основан на регистрации углового распределения рассеянного излучения полупроводникового лазера с длиной волны 532 нм и интенсивности флуоресценции молока при возбуждении УФ-светодиодом на длине волны 280 нм с помощью осесимметричной матрицы фотодиодов. Экспериментально показано, что индикатриса светорассеяния в молоке имеет вид монотонной зависимости интенсивности рассеяния от процентного содержания жира в диапазоне ~0.01–10%. Кроме того, уровень интенсивности на углах прямого рассеяния ($0^\circ < \theta < 40^\circ$) чувствителен к наличию в молоке крупномасштабных частиц. Установлена зависимость интенсивности флуоресценции от содержания белка.

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

¹ ИОФ РАН, 119991 Россия, Москва, ул. Вавилова, 38; e-mail: avshkirin@mephi.ru.

² НИЯУ «МИФИ», 115409 Россия, Москва, Каширское ш., 31.

³ МГТУ им. Н.Э. Баумана, 105005 Россия, Москва, 2-я Бауманская, 5, к. 1.

Введение. Анализ процентного состава многокомпонентных эмульсий в режиме реального времени представляет собой актуальную задачу для контроля технологических процессов, например, в молочном производстве [1]. Получение информации о количественном содержании компонентов молока лежит в основе оценки его качества. В настоящее время не существует компактно встраиваемых в молокопровод унифицированных систем, обеспечивающих одновременное измерение как расхода, так и процентного содержания компонентов молока [2]. Ввиду требования использовать контрольные устройства, не приводящие к значительному падению давления в молочном шланге, при разработке датчиков качества молока для оборудования молочных ферм в первую очередь перспективны оптические методы диагностики [3–6]. Существующие приборы для оперативной оценки содержания в молоке трех основных компонентов (жира, белка и лактозы) используют спектральные методы, в основном инфракрасную (ИК) спектроскопию [2]. Высокоточные системы, использующие ИК фурье-спектроскопию, очень дороги и как целое имеют большие габариты. Более компактной и менее дорогой альтернативой ИК фурье-спектрометрам являются коммерчески доступные анализаторы ближнего инфракрасного диапазона [7]. С точки зрения дальнейшего улучшения соотношения цены и качества перспективны анализаторы, основанные на светорассеянии. Некоторые подходы к измерению содержания компонентов молока, основанные на эффектах светорассеяния, описаны в [8–12], однако коммерческие реализации таких датчиков отсутствуют.

В нашей работе мы предлагаем методику и прототип проточного датчика для определения процентного содержания двухкомпонентных эмульсий, в которых средние размеры частиц дисперсных компонент различаются на порядок. Такая ситуация реализуется, в частности, в молоке, где частицы жира имеют размер $\sim 0.1\text{--}15$ мкм, а частицы белка $\sim 10\text{--}100$ нм. Наряду с измерением содержания основных компонентов молока актуальной задачей является также дополнительное обнаружение крупномасштабных примесей размером >10 мкм, роль которых в молоке играют, главным образом, соматические клетки. По данным наших экспериментов, наличие в молоке таких примесей приводит к относительному изменению интенсивности прямого рассеяния по сравнению с чистым молоком, что может быть использовано для оценки превышения концентрации крупных примесей над допустимым уровнем.

Отметим, что ранее были разработаны различные скаттерометрические схемы для характеристики и контроля дисперсных сред [13–16]. Наша методика зондирования имеет новую особенность: в отличие от распространенного в турбидиметрии подхода, когда

измеряется интегральное ослабление света мутной средой, мы сравниваем формы угловых распределений света, рассеянного эмульсиями, с различным процентным содержанием, используя безразмерный параметр, такой как отношение интенсивности при боковом ($60^\circ < \theta < 120^\circ$) или прямом ($0^\circ < \theta < 40^\circ$) углах рассеяния к интенсивности обратного рассеяния ($140^\circ < \theta < 180^\circ$).

С целью измерения процентного содержания белка в молоке, вдобавок к измерению светорассеяния на длине волны 532 нм, используется возбуждение флуоресценции молока на длине волны 280 нм, попадающей в полосу резонансного УФ-поглощения белков. Характерная область флуоресценции молочного белка (казеина) $\sim 305\text{--}400$ нм [17], что позволяет регистрировать интенсивность флуоресценции на длинноволновом краю этой области тем же массивом кремниевых фотодиодов, который используется для измерения светорассеяния.

Оптическая схема датчика процентного состава эмульсий. Нами была собрана экспериментальная установка в соответствии с оптической схемой, представленной на рис. 1, которая сочетает лазерный скаттерометр и УФ-флуориметр. Излучение лазерного диода с длиной волны 532 нм и мощностью 5 мВт рассеивается в эмульсии, протекающей через прозрачную цилиндрическую кварцевую трубку (внешний диаметр 15 мм, толщина стенки 1 мм). Рассеянное излучение регистрируется аксиальным массивом фотодиодов Ф1–Ф8, которые разделены промежутками на три группы, охватывающие угловые диапазоны прямого рассеяния ($0^\circ, 18^\circ, 36^\circ$), бокового рассеяния ($72^\circ, 90^\circ, 108^\circ$) и обратного рассеяния ($144^\circ, 162^\circ$). Перед попаданием на фотодиоды поле рассеянного света ограничивается прямоугольными диафрагмами шириной 1 мм, выполненными в пластиковом кольце. Для возбуждения флуоресценции компонентов эмульсии в схеме установлен УФ-светодиод, излучающий на длине волны 280 нм. Излучение флуоресценции наиболее эффективно детектируется фотодиодами Ф2–Ф5. Контроллер управляет работой лазерного модуля и светодиода в режиме прямоугольных импульсов и обрабатывает данные фотодиодов.

Светорассеяние в молоке с различным содержанием жира. Угловое распределение рассеянного света с длиной волны 532 нм (индикатриса рассеяния), измеренное фотодиодами Ф1–Ф8 для образцов молока с номинальным процентным содержанием жира 0.05%, 0.5%, 1.5%, 3.2%, 6% и 10% при нормальных условиях (температура 20°C) в статическом случае показано на рис. 2. Молоко, заполняющее трубку диаметром 15 мм, является многократно рассеивающей средой, так как его оптическая толщина, оцененная по данным о коэффициентах рассеяния и поглощения молока в видимом диапазоне

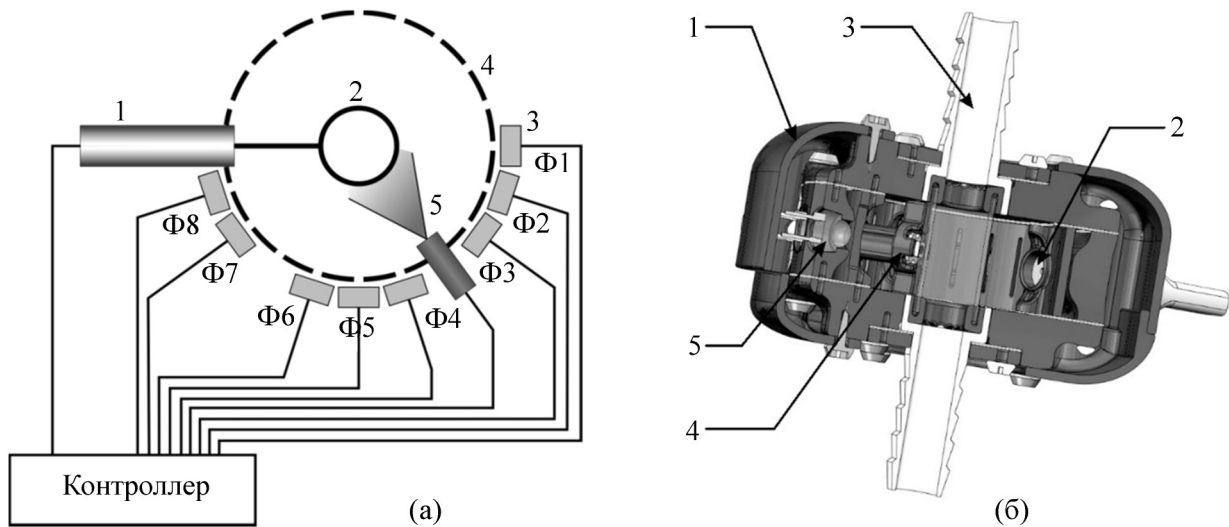


Рис. 1: Устройство флуоресцентно-скаттерометрического датчика процентного состава эмульсий. (а) Оптическая схема: (1) лазерный диод с длиной волны 532 нм; (2) цилиндрическая трубка диаметром 15 мм, заполненная протекающим молоком; (3) аксиальный фотодиодный массив $\Phi 1$ – $\Phi 8$; (4) кольцо с прямоугольными диафрагмами; (5) УФ-светодиод с длиной волны 280 нм. (б) Трехмерный вид разработанного прототипа датчика: (1) корпус датчика; (2) лазерный диод; (3) штуцер типа “елочка” для шланга 14 мм; (4) УФ-светодиод; (5) фотодиоды.

[18], превышает 10, что означает выполнение условия преобладания многократного рассеяния [19, 20]. Как следствие, индикатрисы рассеяния (рис. 2) имеют типичный для многократно рассеивающей среды вид, а именно, значения интенсивности рассеяния возрастают от углов прямого рассеяния к углам обратного рассеяния, что согласуется с результатами теоретического моделирования для среды, характеризующейся многократным рассеянием [21].

Рис. 2 демонстрирует монотонную зависимость интенсивности рассеяния I от содержания жира на углах бокового ($\Phi 4$ – $\Phi 6$) и прямого ($\Phi 1$ – $\Phi 3$) рассеяния. Также видно, что перепад значений интенсивности от углов обратного рассеяния ($\Phi 7$, $\Phi 8$) к углам бокового ($\Phi 4$ – $\Phi 6$) и прямого ($\Phi 1$ – $\Phi 3$) рассеяния монотонно растет с увеличением жирности молока. Это обстоятельство позволяет ввести безразмерный скаттерометрический параметр, не зависящий от мощности лазера и являющийся, как показали эксперименты, однозначной функцией процентного содержания жира в молоке, в виде логарифма отношения интенсивности при боковых углах рассеяния к интенсивности, например,

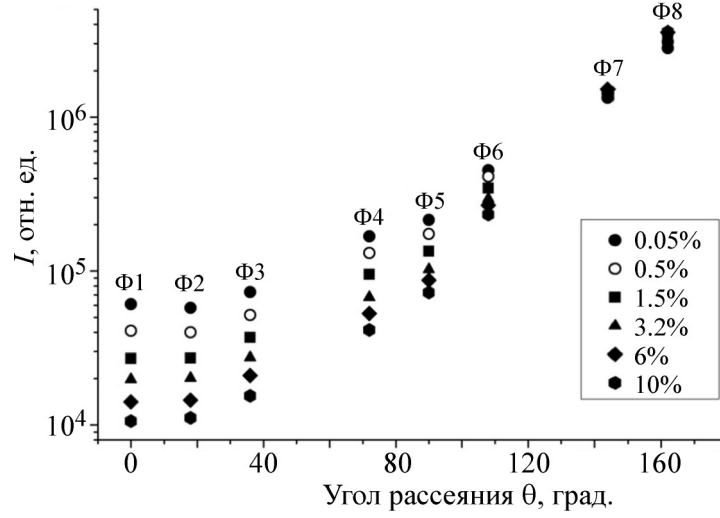


Рис. 2: Индикатриса рассеяния измерена для проб молока номинальной жирностью 0.05%, 0.5%, 1.5%, 3.2%, 6% и 10% при нулевой скорости потока в трубке. Температура молока 20 °С. Длина волны лазера 532 нм.

при угле обратного рассеяния 144°:

$$X_i = -\log\left(\frac{I(\theta_i)}{I(144^\circ)}\right), \theta_i = \{72^\circ, 90^\circ, 108^\circ\}. \quad (1)$$

Нами построена зависимость значений содержания жира в молоке C_i от X_i , измеренных на углах бокового рассеяния θ_i (рис. 3). Экспериментальные точки для каждого θ_i аппроксимируются полиномом четвертой степени, который может служить калибровочной кривой для преобразования сигналов фотодиода в процент жирности:

$$C_i = A_{i0} + A_{i1}X_i + A_{i2}(X_i)^2 + A_{i3}(X_i)^3 + A_{i4}(X_i)^4, \quad i = 1 \dots N, \quad (2)$$

где $N = 3$ – количество обрабатываемых каналов бокового рассеяния, обеспечиваемых соответствующими фотодиодами, расположенными под углами $\theta_i = \{72^\circ, 90^\circ, 108^\circ\}$; X_i – скаттерометрический параметр каждого канала. Если использовать усреднение, то процентное содержание жира P_f можно определить как:

$$P_f = \sum_i C_i / N. \quad (3)$$

Коэффициенты A_{ij} , определенные по экспериментальным данным методом наименьших квадратов, представлены в табл. 1.

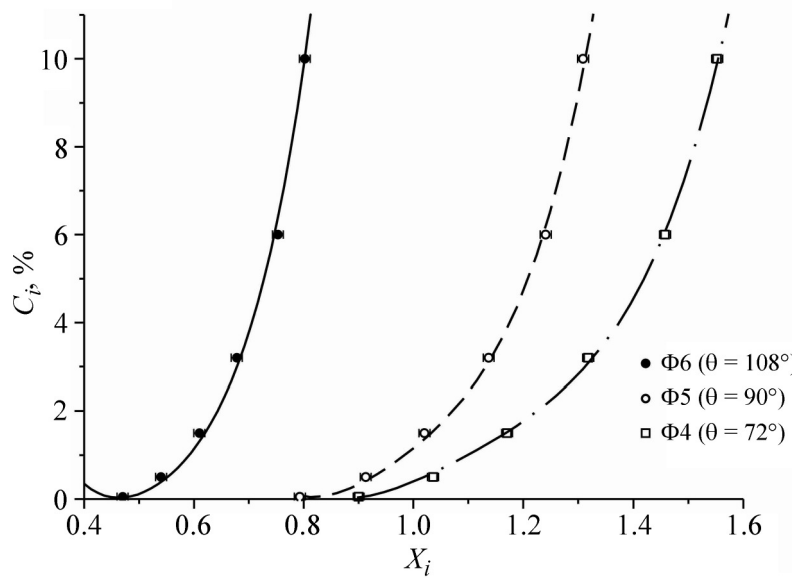


Рис. 3: Зависимость процентного содержания жира в молоке C_i от скаттерометрического параметра X_i в диапазоне 0.05%–10%. Среднеквадратическое отклонение X_i не более 0.01.

Т а б л и ц а 1

Коэффициенты A_{ij}

(i, j)	0	1	2	3	4
1 ($\theta = 108^\circ$)	57	-397.6	1049.2	-1264.5	602.8
2 ($\theta = 90^\circ$)	237.15	-971.4	1486.2	-1016.3	263.5
3 ($\theta = 72^\circ$)	137.6	-507.6	695.2	-421.6	96.8

Нами было экспериментально проверено, что X_i при соответствующем процентном содержании жира остается неизменным с точностью $\sim 0.01\%$ при расходе молока до 100 мл/сек, т. е. действительна калибровка (рис. 3).

С целью тестирования поведения индикатрисы рассеяния молока, имеющего крупномасштабные примеси, проводилось сравнение измерений, сделанных для чистого молока жирностью 1.5% и того же молока, куда были добавлены соматические клетки с концентрацией 10^6 см^{-3} (рис. 4). В качестве релевантной модели соматических клеток, которые появляются в молоке млекопитающих, в частности коров, вследствие мастита были использованы клетки карциномы молочной железы человека MCF-7 (АТСС № НТВ-22), средний размер которых составляет ~ 20 мкм. Клетки культивировали в колбах Т-25 (ТРР, Трасадинген, Швейцария) при 37°C и 5% CO_2 в инкубаторе S-Vt

Smart Biotherm (Biosan, Рига, Латвия). В качестве среды использовали DMEM, содержащую 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки культивировали в течение 7 дней для достижения максимальной конfluence (~98%). Перед экспериментом клетки открепляли от поверхности культурального флакона с помощью 0.05% раствора трипсин-ЭДТА. Трипсин инактивировали 10% раствором ЭТС, клетки центрифугировали при 350 g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в среде DMEM без добавок и подсчитывали с помощью счетной камеры и лабораторного инвертированного микроскопа.

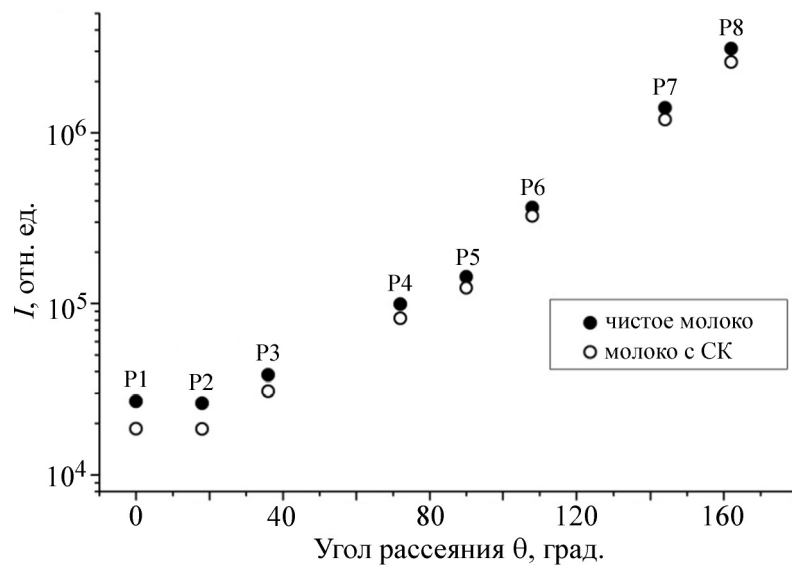


Рис. 4: Индикатриса рассеяния измерена для образцов молока с номинальной жирностью 1.5%: без крупномасштабных примесей (черные кружки), с добавлением соматических клеток (СК) на уровне концентрации 10^6 см^{-3} (красные кружки). Скорость потока молока в трубке равна нулю. Температура 20°C . Длина волны лазера 532 нм.

Отметим, что добавление соматических клеток слабо влияет на соотношение интенсивностей бокового и обратного рассеяния, а именно, скактерометрический параметр при углах 72° , 90° и 108° испытывает относительное отклонение 0.01, 0.005 и 0.036, соответственно. Таким образом, измерения содержания жира на этих углах практически не нарушаются присутствием соматических клеток, а относительное изменение X_i на углах прямого рассеяния $\theta_i = \{0^\circ, 18^\circ, 36^\circ\}$ может служить индикатором наличия в молоке крупных частиц.

Измерение содержания белка в молоке по интенсивности флуоресценции. При включении УФ-светодиода происходила регистрация интенсивности флуоресценции об-

разцов молока с номинальным процентным содержанием жира 0.05%, 0.5%, 1.5%, 3.2%, 6% внутри цилиндрической кварцевой трубки. Считая, что флуоресценция обезжиренного молока (жирность – 0.05%) вызвана только белком (нулевой уровень флуоресценции жира), содержание которого одинаково во всех остальных образцах молока, можно получить зависимость флуоресценции жировой компоненты молока от содержания жира в виде, показанном на рис. 5(а). Чтобы получить экспериментальную зависимость интенсивности флуоресценции от содержания белка (рис. 5(б)), были использованы разбавления обезжиренного молока с исходным содержанием белка 3% водой.

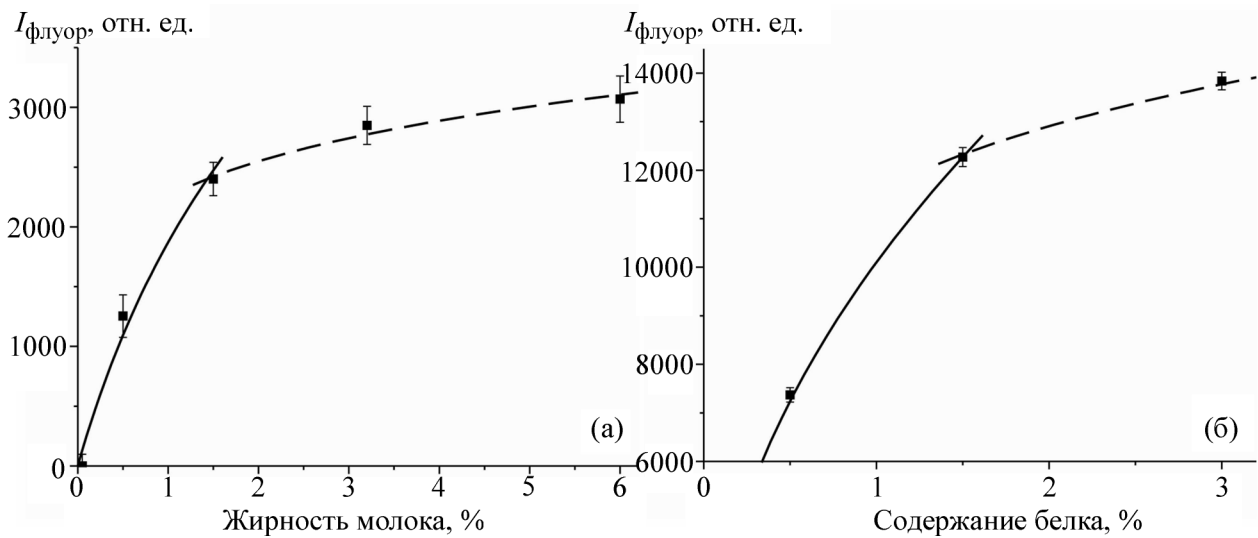


Рис. 5: Интенсивность флуоресценции: (а) жировой компоненты молока в диапазоне жирностей 0–6%, (б) обезжиренного молока с процентным содержанием белка 0.5–3%. Температура 20 °С. Длина волны возбуждения 280 нм.

Разбивая график (рис. 5(а)) на два участка, можно получить функциональную аппроксимацию интенсивности флуоресценции жировой компоненты молока:

$$F_f(x) = \left\{ \begin{array}{ll} 2700 \cdot \ln(x + 1), & 0 < x < 1.5\% \\ 2250 \cdot x^{0.18}, & x > 1.5\% \end{array} \right\}. \quad (4)$$

График флуоресценции белковой компоненты (рис. 5(б)) также может быть аппроксимирован составной функцией:

$$F_p(x) = \left\{ \begin{array}{ll} 10100 \cdot x^{0.48}, & 0 < x < 1.5\% \\ 11550 \cdot x^{0.16}, & x > 1.5\% \end{array} \right\}. \quad (5)$$

Для определения содержания белка по интенсивности флуоресценции необходимо использовать обратную функцию $F_p(x)^{-1}$. С учетом калибровочной функции F_f и независимо измеренного по светорассеянию процентного содержания жира P_f , процентное содержание белка P_p можно вычислить из детектируемой интенсивности флуоресценции молока $I_{\text{флуор}}$ следующим образом:

$$P_p = F_p^{-1}(I_{\text{флуор}} - F_f(P_f)). \quad (6)$$

Выводы. Результаты экспериментального измерения параметров светорассеяния и флуоресценции в цилиндрической геометрии позволили предложить методику анализа процентного содержания компонентов эмульсий и разработать компактный датчик процентного содержания компонентов жира и белка, а также уровня концентрации соматических клеток в молоке. Нами был введен скаттерометрический параметр в виде логарифма уменьшения интенсивности рассеяния от обратного к боковому, который оказался высокочувствителен к жирности молока в диапазоне 0–10%. В исследованном диапазоне расхода молока 0–100 мл/сек скаттерометрический параметр можно считать с хорошей точностью постоянным. Поведение индикатрисы рассеяния молока при добавлении соматических клеток показало, что скаттерометрический параметр на углах бокового рассеяния не возмущается и, таким образом, процентное содержание жира измеряется корректно даже при наличии соматических клеток в молоке. В то же время скаттерометрический параметр на углах прямого рассеяния увеличивается за счет присутствия соматических клеток, достигая относительного изменения ~ 0.1 при концентрации клеток 10^6 см^{-3} . Измерение флуоресценции молока при возбуждении на длине волны 280 нм позволяет дополнительно определять содержание белка при учете содержания жира, независимо измеряемого по светорассеянию.

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] М. Н. Кириченко, К. В. Коваленко, С. В. Кривохижа и др., Краткие сообщения по физике ФИАН **48**(6), 34 (2021). <https://doi.org/10.3103/S1068335621060038>.
- [2] D. E. Burmistrov, D. Y. Pavkin, A. R. Khakimov, et al., Application of Optical Quality Control Technologies in the Dairy Industry: An Overview, *Photonics* **8**, 551 (2021). <https://doi.org/10.3390/photonics8120551>.

- [3] *Optical methods and physics of colloidal dispersions* (Progress in Colloid and Polymer Science, Volume 104). Ed. by T. Palbergand, M. Ballauf (Darmstadt, Steinkopff, 1997). <https://doi.org/10.1007/BFb0110733>.
- [4] R. Xu, *Particle characterization: light scattering methods* (Kluwer Academic Publisher, New York, 2002). <https://dx.doi.org/10.1007/0-306-47124-8>.
- [5] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy* (Springer Science+Business Media, New York, 2006).
- [6] M. E. Khosroshahi, Y. Patel, V. Woll-Morison, *Laser Phys. Lett.* **19**, 075602 (2022). <https://dx.doi.org/10.1088/1612-202X/ac6fc5>.
- [7] S. Uusitalo, J. Diaz-Olivares, J. Sumen, et al., *Foods* **10**, 2686 (2021). <https://doi.org/10.3390/foods10112686>.
- [8] S. Kucheryavskiy, A. Melenteva, A. Bogomolov, *Talanta* **121**, 144 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.055>.
- [9] 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>.
- [10] C. Crofcheck, F. Payne, C. Hicks, et al., *J. Food Process Eng.* **23**, 163 (2000). <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2000.tb00509.x>.
- [11] S. Ohtani, T. Wang, K. Nishimura, M. Irie, *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **18**, 580 (2005). <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.580>.
- [12] F. Angrasari, A. Arifin, B. Abdullah, *J. Phys.: Conf. Ser.* **1341**, 082038 (2019). <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/1341/8/082038>.
- [13] R. Liao, W. Guo, N. Zeng, et al., *Appl. Sci.* **11**, 5992 (2021). <https://doi.org/10.3390/app11135992>.
- [14] R. Hussain, M. Alican Noyan, G. Woyessa, et al., *Light Sci. Appl.* **9**, 1 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41377-020-0255-6>.
- [15] J. Jakmunee, Y. Udnan, R. Morrison, et al., *Anal. Sci.* **19**, 1495 (2003). <https://doi.org/10.2116/analsci.19.1495>.
- [16] D. N. Ignatenko, A. V. Shkirin, Y. P. Lobachevsky, S. V. Gudkov, A Review, *Appl. Sci.* **12**, 5258 (2022). <https://doi.org/10.3390/app12105258>.
- [17] Y. Lang, H. Gao, J. Tian, et al., *Food Science and Technology* **115**, 108434 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127526>.
- [18] B. Aernouts, R. Van Beers, R. Watté, et al., *J. Dairy Sci.* **98**, 6727 (2015). <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9630>.

- [19] J. Jönsson, E. Verrocal, Opt. Express **28**, 37612 (2020). <https://doi.org/10.1364/OE.404005>.
- [20] G.-O. Regnima, T. Koffi, O. Bagui, et al., Appl. Opt. **56**, 3929 (2017). <https://doi.org/10.1364/AO.56.003929>.
- [21] 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>.

Поступила в редакцию 11 марта 2023 г.

После доработки 3 апреля 2023 г.

Принята к публикации 4 апреля 2023 г.