

Анализ микробиологических показателей сырого молока с использованием химических газовых сенсоров

Воронежский государственный университет инженерных технологий, г. Воронеж, Российская Федерация

А. А. Шуба, Е. П. Анохина, Р. У. Умарханов, Е. В. Богданова, И. Ю. Буракова

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Богданова Е.В.,

E-mail: ek-v-b@yandex.ru

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:

данные текущего исследования доступны по запросу у корреспондирующего автора.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Шуба, А.А., Анохина, Е.П., Умарханов, Р.У., Богданова, Е.В., & Буракова И.Ю. (2024). Перспективы оценки микробиологических показателей сырого молока с применением химических газовых сенсоров. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 32(1), 144-159, 144-160. <https://doi.org/10.36107/spfp.2024.1.559>

ПОСТУПИЛА: 03.08.2023

ПРИНЯТА: 15.03.2024

ОПУБЛИКОВАНА: 30.03.2024

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств гранта РНФ № 22-76-10048 на тему «Разработка поликомпозиционных пьезо-нановесов для технологий мониторинга микробиологической безопасности молока и молочных продуктов» (соглашение от 28.07.2022 г.) в рамках программы «Проведение исследований научными группами под руководством молодых ученых» Президентской программы исследовательских проектов, реализуемых ведущими учеными, в том числе молодыми учеными.

АННОТАЦИЯ

Введение: Молоко представляет собой сложную смесь жиров, белков, углеводов, витаминов и минеральных веществ в доступной форме, благодаря чему в нем могут быстро развиваться как нативные, так и посторонние микроорганизмы. Поэтому разработка быстрых способов оценки микробиологических показателей молока и молочных продуктов является важной задачей.

Цель: сравнительная оценка микробиологических и физико-химических показателей сырого молока с результатами анализа его газовой фазы с применением массива химических газовых сенсоров для разработки экспрессного способа определения безопасности молока.

Материалы и методы: Эксперимент проводили с образцами сырого молока, полученного в нескольких хозяйствах от коров различных пород. Определяли стандартные физико-химические показатели по ГОСТ (содержание жира, белка, сухих веществ, титруемую кислотность) и микробиологические показатели (КМАФАнМ, содержание дрожжей и плесени) методом посева на питательные среды, а также идентификацию выросших на них микроорганизмов с помощью секвенирования по Сэнгеру с биоинформатическим анализом. Проводили анализ газовой фазы проб молока с помощью пьезокварцевых сенсоров с композитными покрытиями в статическом режиме сорбции с обработкой сигналов методом главных компонент.

Результаты: Определены физико-химические и микробиологические показатели проб сырого молока, а также идентифицированы микроорганизмы и фаза микрофлоры молока из каждого хозяйства. По результатам предварительного тестирования сенсоров в парах летучих соединений установлено, что они характеризуются высокой чувствительностью и различной селективностью к веществам, выделяемым посторонней микрофлорой проб сырого молока. Проведено сопоставление сигналов сенсоров и определенных показателей. Показано, что по форме «визуальных отпечатков» пробы различаются, что соответствует изменениям физико-химических и микробиологических показателей образцов молока.

Выводы: Оценка взаимосвязи результатов анализа газовой фазы проб молока и микробиологических показателей методом главных компонент позволила установить, что с помощью массива химических сенсоров возможно разделение проб молока с различным уровнем бактериальной обсемененности. Это позволяет сократить продолжительность микробиологического анализа посредством замены рутинных методов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

микробиология сырого молока; метаболиты микроорганизмов; химические сенсоры



Analysis of Microbiological Indicators of Raw Milk Using Chemical Gas Sensors

Voronezh State University
of Engineering Technologies, Voronezh,
Russian Federation

A. A. Shuba, E.P. Anokhina, R. U. Umarkhanov, E.V. Bogdanova,
I. Yu. Burakova

CORRESPONDENCE:

Bogdanova E.V.

E-mail: ek-v-b@yandex.ru

DATA AVAILABILITY:

Data from the current study are available upon request from the corresponding author.

FOR CITATIONS:

Shuba, A., Anokhina, E., Umarkhanov, R., Bogdanova, E., & Burakova, I. (2024). Analysis of Microbiological Indicators of Raw Milk Using Chemical Gas Sensors. *Storage and Processing of Farm Products*, 32(1), 144-160. <https://doi.org/10.36107/spfp.2024.1.559>

RECEIVED: 03.08.2023

ACCEPTED: 15.03.2024

PUBLISHED: 30.03.2024

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.

FUNDING

The work was carried out with the support of the Russian Science Foundation grant No. 22-76-10048 on the topic «Development of polycomposite piezonanoscopes for technologies monitoring microbiological safety of milk and dairy products» (agreement dated 28.07.2022), within the framework of the program «Conducting research by scientific groups under the guidance of young scientists» of the Presidential program of research projects implemented by leading scientists, including young scientists.

ABSTRACT

Introduction: Milk is a complex mixture of fats, proteins, carbohydrates, vitamins and minerals in an accessible form, due to which both native and pathogen microorganisms can rapidly grow in it. Therefore, the development of rapid methods for assessing the microbiological parameters of milk and dairy products is an important task.

Purpose: comparative evaluation of microbiological and physicochemical indicators of raw milk with the results of gas phase analysis over it using an array of chemical gas sensors to develop an express method for determination of its safety.

Materials and Methods: The experiment was carried out with samples of raw milk obtained in several farms from cows of various breeds. Standard physicochemical indicators were determined according to GOST (fat, protein, dry solids amount, titratable acidity) and microbiological indicators (QMAFAnM, yeast and mold concentration) by inoculation on nutrient media, as well as identification of microorganisms grown on them using Sanger sequencing with bioinformatics analysis. The gas phase of milk samples was analyzed using piezoelectric quartz sensors with composite coatings in a static sorption mode with signal processing by the principal component analysis.

Results: Physico-chemical and microbiological parameters of raw milk samples were determined, and microorganisms and the microflora phase of milk from each farm were identified. Based on the results of preliminary testing of the sensors in vapors of volatile compounds, it was established that they are characterized by high sensitivity and varying selectivity to substances emitted by microflora of raw milk samples. A comparison of sensor signals and standard indicators was carried out. It is shown that the samples differ in the shape of their “visual prints,” which corresponds to changes in the physicochemical and microbiological indicators of milk samples.

Conclusion: An assessment of the relationship between the results of the gas phase analysis of milk samples and their microbiological indicators using the principal component analysis allowed to establish that using an array of chemical sensors it is possible to separate milk samples with different levels of bacterial contamination. It reduces microbiological analysis time by replacing routine methods.

KEYWORDS

microbiology of raw milk; microorganisms' metabolites; chemical sensors



ВВЕДЕНИЕ

Молоко и молочные продукты входят в список Доктрины продовольственной безопасности¹ и имеют первостепенное значение в рационе питания населения, поскольку они содержат макро- и микрокомпоненты, рекомендуемые к потреблению различными возрастными группами людей. Молоко представляет собой сложную смесь жиров, белков, углеводов, витаминов и минеральных веществ, пригодную для питания детей, в том числе с раннего возраста. При этом молочные белки являются биологически полноценными и легко усваиваемыми относительно большинства других белков животного происхождения (перевариваемость составляет 96–98 %) (Guetouache, et al., 2014; Пономарев с соавт., 2018). Кроме того, молочный жир достаточно хорошо усваивается в организме человека благодаря относительно низкой температуре плавления (28–33 °C), а также нахождению его в молоке в тонко диспергированном виде (перевариваемость составляет 97–99 %).

Молоко, поступающее в организм человека, служит также источником минеральных веществ, которые поддерживают кислотно-щелочное равновесие в тканях и осмотическое давление крови, а также способствуют нормальной физиологической деятельности организма. Особенно следует отметить высокое содержание в молоке и молочных продуктах кальция и фосфора, выполняющих ряд важных функций в организме человека. Эти элементы находятся в молоке в соотношении 1,2–1,3:1, что обуславливает их сравнительно высокую усвояемость. Около 80 % суточной потребности человека в кальции удовлетворяется за счёт молока и молочных продуктов². Кроме того, молоко содержит практически все витамины, необходимые для нормального развития новорождённого в первые недели его жизни. Большинство витаминов (и провитаминов) поступает в организм животного с кормом и синтезируется микрофлорой рубца. В частности, в молоке содержится свободный тиамин (50–70 % от всего количества), а также фосфолированный и связанный с белком, рибофлавин, аскорбиновая кислота и жирорастворимые витамины в неактивной форме (в виде провитаминов).

В то же время присутствие в молоке большого количества макро- и микрокомпонентов в качестве доступных источников углерода и энергии, а также высокая активность воды обуславливает быстрое развитие в нем нативных и посторонних микроорганизмов (Ouamba, et al., 2022; Soumitra & Shanker, 2017). Сырое молоко, полученное от здоровых животных, при доении характеризуется достаточно низкой микробной обсемененностью (Kumar, et al., 2020). Общее содержание бактерий в молоке может увеличиться вследствие неблагоприятных санитарно-гигиенических условий получения и хранения молока, повышенной температуры его хранения и транспортирования.

В соответствии с российским законодательством (ГОСТ 52054–2003, ГОСТ 31449–2013) в сыром молоке не реже 1 раза в неделю необходимо контролировать содержание соматических клеток и бактериальную обсемененность. Для учета количества соматических клеток в молоке наиболее быстрыми и легко выполнимыми являются визуальный метод по изменению вязкости и метод с применением капиллярного вискозиметра (ГОСТ 23453–2014). Общую бактериальную обсемененность рекомендуется определять по редуктазной пробе или путем посева на твердую питательную среду предварительного подготовленного разведения сырого молока (ГОСТ 32901–2014). Однако, редуктазная проба характеризует лишь примерное содержание микроорганизмов в 1 см³, в то время как посевы на стерильных чашках Петри трудоемки и требуют достаточно много времени (обнаружение и идентификация микроорганизмов, как правило, происходит через 24–72 ч). Единственным достаточно быстрым методом определения общей бактериальной обсемененности молока является турбидофлуориметрический (ГОСТ 34472–2018), однако он не позволяет дифференцировать микроорганизмы и имеет широкий предел воспроизводимости.

В последние годы активно развиваются методы ускоренного обнаружения и мониторинга посторонних микроорганизмов в сырье, полуфабрикатах и готовом продукте. Эти методы могут быть как прямыми, основанными на определении состава внутриклеточных соединений и компонентов

¹ Минсельхоз РФ (2020). Указ Президента РФ «Об утверждении Доктрины продовольственной безопасности РФ до 2030 года». ФГБНУ «Росинформагротех», 26 с.

² Тёпел, А. (2012). *Химия и физика молока*. СПб.: Профессия.

клеточной стенки микроорганизмов, например, по строению ДНК их клеток с помощью полимеразной цепной реакции (Holeva et al., 2019; Patil-Joshi et al., 2021) или петлевой изотермической амплификации нуклеиновых кислот (He et al., 2019; Srivastava & Prasad, 2023), по биолюминесценции образующегося АТФ (Liu et al., 2023; Zhang et al., 2022), так и косвенными, основанными на распознавании продуктов метаболизма различных микроорганизмов с использованием сенсоров (Ghafouri et al., 2023; Li et al., 2021; Ropero-Vega et al., 2021).

При использовании сенсоров для оценки наличия посторонних микроорганизмов и их количественного определения в молоке показана взаимосвязь между относительными сигналами сенсора и ростом количества бактерий в пробе при различных условиях хранения (холодильник, комнатная температура) и технологических режимах (Kalit et al., 2014, Korel & Balaban, 2002, Yang & Wei, 2021, Carrillo-Gómez et al., 2021). Однако в данных работах исследовали мониторинг изменений в одной пробе молока и по отношению к неконтаминированной пробе наблюдалось увеличение сигнала. В настоящий момент доказано, что состав летучих соединений молока может варьироваться в зависимости от физико-химических показателей и сезонности (Nalepa et al., 2018), следовательно, данные подходы еще не могут быть применимы для оценки микробиологических показателей сырого молока на заводах.

В работах по определению общей обсемененности молока (Yang & Wei, 2021) не ясен механизм взаимосвязи состава летучих соединений и сигналов сенсоров, так как обработка данных сенсоров основана на применении искусственных нейронных сетей, которые строят нелинейные модели и не оценивают степень взаимосвязи выходных данных сенсоров и количества микроорганизмов. Кроме этого, выборка проб была небольшой (14 проб), в которую вошли как сырое, так пастеризованное и ультрапастеризованное молоко, что может дополнительно приводить к погрешностям при апробации модели, так как показано, что при пастеризации меняется газовый состав молока, не только за счет уменьшения количества микроорганизмов, но и за счет изменения дисперсности жировой фракции в составе молока (Reis et al., 2020).

Определение патогенных микроорганизмов (Korel & Balaban, 2002, Núñez-Carmona et al. 2009, Carrillo-Gómez et al., 2021) проводилось в пробах пастеризованного молока или искусственно созданных стандартов с заданным составом, в которых присутствие других микроорганизмов минимально и не может быть применимо к анализу сырого молока. Следовательно, на данный момент не установлена взаимосвязь между газовым составом сырого молока и сигналами сенсоров с микробиологическими показателями, а также не оценена возможность влияния видового состава микрофлоры молока на выходные данные сенсоров, значимые для оценки бактериальной обсемененности.

Цель данного исследования — сравнительная оценка микробиологических и физико-химических показателей сырого молока с результатами анализа его газовой фазы с применением массива химических газовых сенсоров для разработки экспрессного способа определения безопасности.

Для достижения поставленной цели было необходимо получить ответы на следующие исследовательские вопросы:

- (1) Отвечают ли требованиям нормативной документации физико-химические и микробиологические показатели исследованных проб сырого молока и какие основные виды микроорганизмов входят в состав их микрофлоры?
- (2) Применимы ли композитные покрытия пьезокварцевых резонаторов для анализа газовой фазы проб сырого молока?

Гипотеза исследования: в сыром коровьем молоке существовала взаимосвязь между содержанием легколетучих биомаркеров, выделяемых присутствующей в нем микрофлорой, и основными микробиологическими и физико-химическими показателями анализируемой пробы.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В процессе жизнедеятельности микроорганизмов образуется большое количество химических соединений — первичных и вторичных метаболитов. Продуктами обмена веществ являются разнообразные летучие соединения (кислоты, кетоны, альдегиды, эфиры, фенольные и гетероциклические со-

единения), так называемые летучие биомаркеры, некоторые из которых зависят от питательной среды, а некоторые являются уникальными для вида микроорганизмов (Al-Attabi et al., 2021; Biçer et al., 2021; Lu et al., 2013; Rubio-Sánchez et al., 2024). Их концентрация пропорциональна количеству микробных клеток, выделяющих такие летучие вещества. Поэтому применение этого показателя в качестве аналитического сигнала позволяет разрабатывать новые методы экспресс-контроля микробиологической безопасности молока и молочных продуктов.

В мировом сообществе ведутся разработки по применению массивов сенсоров, как газовых, так и жидкостных, для количественного определения микроорганизмов в пищевых продуктах (Bonah et al., 2020), в том числе молочных продуктах (Poghossian et al., 2019). В основном они посвящены разработке способов оценки срока хранения или порчи продуктов при нарушении условий хранения (Hussain et al., 2016; Kalit et al., 2014, Phukkaphan et al., 2021). В этих работах оценивается качество и хранение, как правило, пастеризованного молока или других готовых молочных продуктов.

Встречаются единичные работы по применению массивов газовых сенсоров для оценки общей бактериальной обсемененности молока с применением сложных математических алгоритмов обработки данных (Yang & Wei, 2021). Кроме того, в настоящее время с помощью газовых сенсоров предлагают качественное и количественное определение некоторых патогенных микроорганизмов в молоке, таких как *Campylobacter jejuni* (Núñez-Carmona et al. 2009) *Pseudomonas fluorescens* or *Bacillus coagulans* (Korel & Balaban, 2002), *E. coli* or *Enterobacteriaceae* (Carrillo-Gómez et al., 2021).

В основном для определения количества микроорганизмов используются металлоксидные сенсоры и их массивы (Núñez-Carmona et al. 2009, Carrillo-Gómez et al., 2021), но встречаются работы с применением других типов сенсоров: на проводящих полимерах, одностенных углеродных нанотрубках, пьезогравиметрических и др. (Hussain et al., 2016; Kalit et al., 2014, Poghossian et al., 2019, Phukkaphan et al., 2021). При этом важную роль играет математическая обработка выходных данных сенсоров, которая позволяет для косвенных методов получать градуировочные зависимости или математи-

ческие образы для распознавания определенных видов микроорганизмов (Poghossian et al., 2019, Bonah et al., 2020, Carrillo-Gómez et al., 2021).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Эксперимент проводили с 14 образцами сырого коровьего молока, полученного в хозяйствах Воронежской области от коров различных пород в период с марта по июль 2023 г. После доения каждая проба была сразу же охлаждена до температуры $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ и доставлена в лабораторию. Продолжительность хранения образцов с момента дойки до анализа микробиологических и физико-химических показателей не превышала 3 ч.

Материалы

Реактивы для анализа физико-химических показателей

При определении массовой доли жира в пробах сырого молока использовали серную кислоту (ХЧ, АО «Вектон», Россия), из которой готовили водный раствор плотностью $1810\text{--}1820\text{ кг/м}^3$, а также изоамиловый спирт (ЧДА, АО «Вектон», Россия). Для анализа массовой доли белка в образцах применяли формалин технический (АО «Химреактивснаб», Россия) и фенолфталеин (АО «ЛенРеактив», Россия), из которого готовили спиртовой раствор с массовой долей 2 %. Титруемую кислотность проб сырого молока определяли с помощью раствора гидроксида натрия концентрацией $0,1\text{ моль/дм}^3$, полученного из стандарт-титра (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия).

Питательные среды для микробиологических посевов

Посевы присутствующих в пробе микроорганизмов осуществляли с применением сухой питательной среды для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, дрожжей и плесневых грибов — питательной среды № 2 ГРМ (Сабура) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

Праймеры для секвенирования

Для выделения ДНК присутствующей микрофлоры применяли коммерческий набор «Проба-ГС» (ООО

«ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции производителя. Амплификацию бактерий проводили с помощью коммерческого микса 5X ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген», Россия) и универсального бактериального праймера, плесневых грибов — универсального грибного праймера. Последовательности праймеров представлены в Таблице 1.

Таблица 1

Последовательности праймеров

Название праймера	Последовательность 5' – 3'
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
337F	GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG
1100R	GGG TTG CGC TCG TTG

Продукты амплификации очищали от агарозного геля с использованием коммерческого набора «Cleanup Standard» (ЗАО «Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Непосредственно перед секвенированием проводили окончательную очистку полученных продуктов амплификации с использованием коммерческого реагента BigDye X Terminator™ Purification Kit («Thermo Scientific», США) согласно протоколу производителя.

Модификаторы пьезокварцевых резонаторов

В качестве сорбентов для формирования сорбционных пленок и композитных покрытий на поверхности электродов пьезокварцевых резонаторов (ПКР) с базовой частотой колебания 14,0 МГц использовали вещества различной природы. Растворители сорбционных фаз (толуол, этанол, ацетон) применяли классификации ЧДА (ООО «АО РеаХим», Россия). Все хроматографические фазы приобретены в фирме «Alfa Aesar», США; хитозан (ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, лаборатория проф. Варламова В.П.), концентрат мицеллярного казеина (КМК) (АО «Молвест»), холина хлорид, ди-гидрокверцетин, сорбит, эритрит (Shandong, Китай). Электроды пьезокварцевых резонаторов предварительно обезжиривали растворителем (ацетон), высушивали в сушильном шкафу и далее наносили покрытия. Композитные покрытия формировали из смеси растворов сорбентов в соотношении по массе 1:1 методом напыления с предварительной фильтрацией размера частиц дисперсной си-

стемы или капле раствора через насадку распылителя (Шуба с соавт., 2023). Массу полученных покрытий рассчитывали по уравнению Зауэрбрея (Sayerbrey, 1964), которая в зависимости от природы сорбента составила от 4 до 25 мкг.

Тест-вещества для оценки характеристик сорбционных покрытий

Выбраны различные классы летучих органических соединений, которые присутствуют в газовой фазе над пробами молока: спирты (этанол, бутанол, изобутанол, изопентанол), кетоны (ацетон, бутанон-2), этилацетат, ацетальдегид, карбоновые кислоты (муравьиная, уксусная, масляная), вода. (ч.д.а. ООО «Реахим»). Эти соединения, согласно литературным данным, являются метаболитами патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, которые могут присутствовать в пробах сырого молока (Heng et al., 2023; Hettinga et al., 2008; Huanhuan et al., 2022; Iacumin & Comi, 2021; Lepe-Balsalobre et al., 2022).

Оборудование

Экспериментальные исследования проводили с применением оборудования лабораторий ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»: сушильного шкафа Binder ED 53 (BINDER Inc., Германия), центрифуги лабораторной «ОКА» (ОАО «Ветзоотехника», Россия), бокса ультрафиолетового УФ-1 (ООО «Проинтех», Россия), термостата суховоздушного MIR-162 (Sanyo, Япония), автоклава вертикального MLS-3020U (Sanyo, Япония), генетического анализатора НАНОФОР 05 (научно-производственная компания «Синтол», Россия), прибора для анализа газов и паров «МАГ-8» (ООО «Сенсорика — Новые Технологии», Россия).

Инструменты

Обработку выходных данных сенсоров осуществляли в специальном программном обеспечении прибора «МАГ-8» (Kuchmenko et al., 2021), в котором в режиме реального времени с частотой 1 с записывались выходные данные каждого сенсора — в виде графика (хроночастотограммы), определялись максимальные изменения сигналов сенсоров за время

измерения — аналитические сигналы ($\Delta F_{\max,i}$, Гц), рассчитывалась площадь «визуальных отпечатков» сигналов сенсоров ($S_{в.о.}$, Гц·с). Хроматограммы, полученные в результате секвенирования, обрабатывали с помощью программы «Chromas» (Technelysium Pty Ltd, Австралия). Идентификацию последовательностей проводили с использованием программы «Basic Local Alignment Search Tool» (Blast, США).

Методы

Анализ стандартных физико-химических и микробиологических показателей

Массовую долю сухих веществ в пробах сырого молока определяли ускоренным методом высушивания навески до постоянной массы при температуре $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ (ГОСТ Р 54668–2011), массовую долю жира — кислотным методом Гербера (ГОСТ 5867–90), массовую долю белка — формольным титрованием (ГОСТ 25179–2014), плотность — ареометрическим методом (ГОСТ Р 54758–2011), титруемую кислотность — индикаторным методом по изменению окраски фенолфталеина в точке эквивалентности при титровании (ГОСТ Р 54669–2011), группу чистоты — с помощью фильтрования пробы молока и визуальной оценки фильтра после высушивания (ГОСТ 8218–89), КМАФАнМ, дрожжи и плесени — посредством микробиологической инокуляции на универсальных питательных средах (ГОСТ 32901–2014, ГОСТ 33566–2015).

Секвенирование по Сэнгеру и биоинформатический анализ

Из чистых культур микроорганизмов, полученных после посевов на питательных средах разведений нескольких образцов сырого молока, была выделена ДНК с последующей амплификацией. Условия для ее проведения: начальная денатурация при 94°C 4 мин; затем 39 циклов (общая денатурация при 94°C 20 с; отжиг праймеров при 54°C 30 с; элонгация при 72°C 50 с).

Последующую визуализацию полученных продуктов амплификации проводили с помощью метода гель-электрофореза в 2% агарозном геле в 1хтрис-ацетатном буфере. Далее продукты амплификации были механически вырезаны из агарозного геля для последующей очистки. Затем

с продуктами ПЦР проводилась сиквенсная амплификация с использованием ITS4 и 1100R праймеров и реакционной смеси Quantum Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя. Протокол амплификации: начальная денатурация при 96°C 1 мин; затем 25 циклов (общая денатурация при 96°C 10 с; отжиг праймеров при 50°C 5 с; элонгация при 60°C 4 мин).

После продукты амплификации очищали, проводили их секвенирование и анализ полученных последовательностей для нахождения сходства с имеющимися в базах данных.

Анализ газовой фазы проб молока с помощью сенсоров

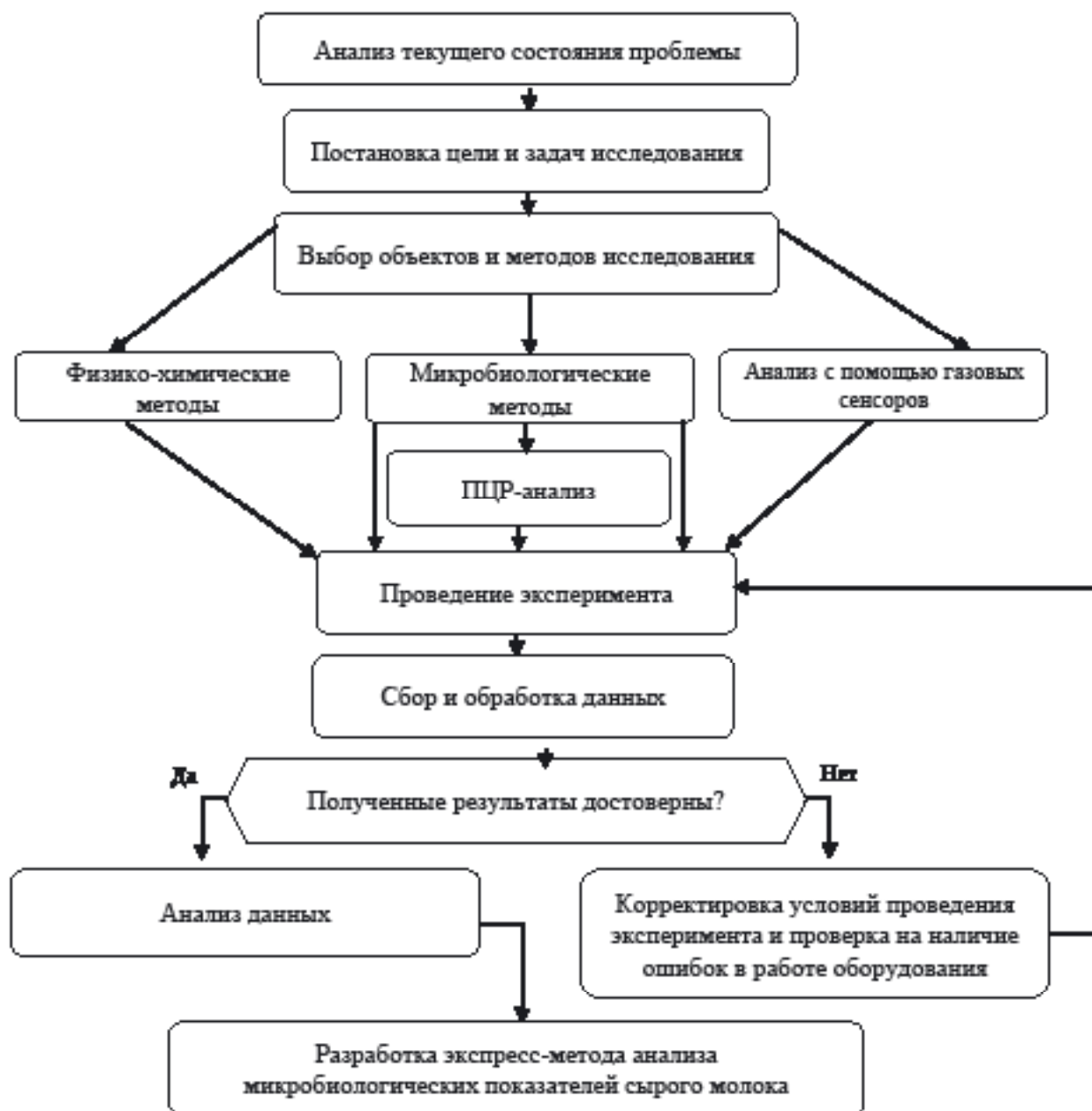
Исследование сорбции летучих соединений проводилось на приборе «МАГ-8» с пьезокварцевыми датчиками и инжекторным вводом газовой фазы в ячейку детектирования (Kuchmenko et al., 2022). Равновесная газовая фаза объемом 3 см^3 над образцом сырого молока объемом 20 см^3 , помещенным в стерильную, плотно закрывающуюся тару, отбиралась стерильным герметичным шприцем и вводилась в патрубок для ввода пробы. Время измерения сорбции паров равновесной газовой фазы над чистыми соединениями или образцами сырого молока составило 80 с. Перед исследованием газовой фазы над пробами молока аналогично проводили анализ равновесной газовой фазы над чистыми летучими соединениями (тест-веществами). Во время исследования проб сырого молока в течение дня по обоснованному ранее алгоритму (Shuba et al., 2021) проводили измерение газовой фазы над дистиллированной водой, как основного компонента молока. Эффективность сорбции летучих соединений полученными покрытиями оценивали по величинам удельной массовой чувствительности ($S_m^{уд}$, Гц·см³/мкг²) и коэффициента селективности ($K_{уд}$) (Шуба с соавт., 2023).

Процедура исследования

Методологическая схема проведения исследований приведена на Рисунке 1.

Рисунок 1

Дизайн эксперимента



Анализ данных

Каждый показатель был измерен не менее 5–10 раз в трехкратной последовательности. Расчеты проводились методами математической статистики с использованием программного обеспечения Statistica (StatSoft, США). Ограничениями экспериментальных исследований были ошибки и неопределенности используемых методов анализа.

Нормальное распределение переменных по каждому показателю было определено с использованием критерия Шапиро-Уилка. Полученные результаты выражены как среднее $\pm$ стандартное отклонение и медиана (минимальное значение ~ максимальное значение) для данных с нормальным и ненормальным распределением соответственно. Доверительный интервал — $P > 0,95$ при условии, что рассчитанные величины были значимыми.

Для визуализации данных сенсоров строили «визуальные отпечатки» аналитических сигналов сенсоров, которые позволяют проводить визуальное сравнение проб между собой. Также для оценки тонких различий в составе газовой фазы над пробами молока и компенсации возможного дрейфа сенсоров при эксплуатации в различных условиях рассчитывали относительные сигналы сенсоров путем деления сигнала сенсора для пробы молока на сигнал сенсора при измерении равновесной газовой фазы воды, как стандарта (Shuba et al., 2021). Оценку взаимосвязи между относительными сигналами сенсоров и физико-химическими и микробиологическими характеристиками проб сырого молока проводили методом главных компонент (МГК) (Esbensen et al., 2002). Алгоритм расчета главных компонент — NIPALS, проверку модели ввиду небольшой выборки проводили методом кросс-валидации. Обработку экспериментальных данных, полученных с помощью сенсоров, и расчет их статистических параметров проводили в программе MS Excel (надстройка Chemometrix-Add-in).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлены физико-химические и микробиологические показатели проб сырого молока (Таблица 2). Из образцов, полученных из разных хозяйств, были выделены чистые культуры бактерий, дрожжей и плесеней, которые затем были подвергнуты ПЦР-анализу. В результате секвенирования были идентифицированы видовые названия и процент идентичности микроорганизмов, выросших на микробиологических питательных средах. Основные представители микрофлоры образцов сырого молока из различных хозяйств представлены в Таблице 3.

Параллельно был проведен анализ газовой фазы всех проб молока с помощью массива газовых сенсоров для оценки соответствия полученных результатов изученным физико-химическим и микробиологическим показателям. Некоторые характеристики использованных покрытий указаны в Таблицах 4 и 5. По результатам тестирования сенсоров в парах летучих соединений установле-

Таблица 2
Физико-химические и микробиологические показатели образцов сырого молока

Расположение хозяйства	№ пробы	Массовая доля сухих веществ, %	Массовая доля жира, %,	Массовая доля общего белка, %	Титруемая кислотность, °Т	КМАФАнМ, КОЕ/см³	Дрожжи, КОЕ/см³	Плесени, КОЕ/см³
Хохольский район, хозяйство № 1	1	16,02 ± 0,12	7,5 ± 0,3	3,46 ± 0,15	19 ± 0,5	10,0·106	1,0·104	0
	4	15,15 ± 0,14	7,5 ± 0,5	3,26 ± 0,10	15 ± 0,5	3,4·105	0	0
	14	15,07 ± 0,15	6,5 ± 0,3	3,07 ± 0,10	16 ± 0,5	3,9·107	1,0·104	0
Хохольский район, хозяйство № 2	2	12,22 ± 0,13	3,8 ± 0,1	3,74 ± 0,10	20 ± 0,5	4,0·106	1,0·103	6,6·102
	6	11,77 ± 0,11	3,1 ± 0,1	3,30 ± 0,15	19 ± 0,5	5,9·105	6,5·102	9,0·102
	8	12,31 ± 0,12	3,7 ± 0,1	3,10 ± 0,15	18 ± 0,5	9,8·107	8,0·103	60
	11	11,72 ± 0,07	3,4 ± 0,1	1,16 ± 0,10	15 ± 0,5	3,5·107	1,8·103	1,4·103
Репьевский район, хозяйство № 1	3	13,36 ± 0,08	4,8 ± 0,1	3,45 ± 0,10	19 ± 0,5	4,5·106	1,0·103	10
	9	11,41 ± 0,06	3,2 ± 0,1	2,00 ± 0,05	15 ± 0,5	4,8·105	0	10
	13	11,44 ± 0,11	3,6 ± 0,1	2,59 ± 0,15	17 ± 0,5	3,4·106	1,7·104	10
Рамонский район	5	11,63 ± 0,13	3,5 ± 0,1	3,01 ± 0,10	19 ± 0,5	2,4·106	1,5·103	1,6·102
	10	12,14 ± 0,10	4,1 ± 0,1	2,88 ± 0,10	16 ± 0,5	5,7·106	3,4·104	3,0·102
Репьевский район, хозяйство № 2	7	10,83 ± 0,09	3,9 ± 0,1	2,40 ± 0,10	15 ± 0,5	4,6·106	5,7·103	0
	12	10,92 ± 0,09	3,3 ± 0,1	1,35 ± 0,10	11 ± 0,5	2,0·106	2,3·103	10

Таблица 3
Характеристика идентифицированных с помощью ПЦР-анализа микроорганизмов в пробах сырого молока

Расположение хозяйства	Вид микро-организма	Идентифицированное видовое название	% совпадения с базами данных	Спорообра-зование	Патогенность
Хохольский район, хозяйство № 1	Бактерия	<i>Corynebacterium variabile</i>	94,56	Нет	Непатогенный
	Дрожжи	<i>Clavispora lusitaniae</i>	95,18	Есть	Условно-патогенный
Хохольский район, хозяйство № 2	Бактерия	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	96,47	Есть	Условно-патогенный
	Бактерия	<i>Pseudomonas helleri</i>	93,26	Нет	Условно-патогенный
Рамонский район	Бактерия	<i>Bacillus thuringiensis</i>	85,92	Есть	Непатогенный для теплокровных
	Бактерия	<i>Uncultured Acinetobacter sp.</i>	93,78	Нет	Малопатогенный
	Дрожжи	<i>[Candida] pseudoglaebosa</i>	99,83	Нет	Малопатогенный
	Дрожжи	<i>Clavispora lusitaniae</i>	97,58	Есть	Условно-патогенный
	Гриб	<i>Geotrichum candidum</i>	99,7	Есть	Патогенный
Репьевский район, хозяйство № 1	Бактерия	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	97,87	Есть	Условно-патогенный
	Бактерия	<i>Corynebacterium variabile</i>	98,61	Нет	Непатогенный
	Дрожжи	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	100	Есть	Патогенный
	Дрожжи	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	99,65	Есть	Патогенный
	Гриб	<i>Schizophyllum commune</i>	99,33	Нет	Условно-патогенный
	Гриб	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	99,27	Есть	Патогенный
Репьевский район, хозяйство № 2	Бактерия	<i>Uncultured Acinetobacter sp.</i>	83,2	Нет	Малопатогенный
	Дрожжи	<i>Clavispora lusitaniae</i>	98,03	Есть	Условно-патогенный
	Гриб	<i>Schizophyllum commune</i>	100	Нет	Условно-патогенный
	Гриб	<i>Dothiorella gregaria</i>	98,82	Есть	Патогенный

Таблица 4
Характеристики покрытий сенсоров

Номер сенсора	Состав покрытия	Растворитель	Масса, мкг	Дрейф*, МГц
1	ДЦГ18К6, хитозан	Толуол	28,7	2,58
2	ДГК, хитозан	Этанол	14,7	1,818
3	Хитозан, КМК	Этанол	12,5	1,41
4	Холин, сорбит	Этанол	15,2	-0,736
5	Холин, эритрит, АОК	Этанол	5,29	0,519
6	ПВП, хитозан	Ацетон	12,0	1,123
7	ПЭГ-2000, хитозан	Ацетон	3,41	-0,454
8	Эритрит, АОК	Этанол	7,97	0,945

Примечание. * Оценивали по сдвигу базовой частоты колебания сенсора за 6 мес. активной эксплуатации.

Таблица 5
Массовая удельная чувствительность ($S_m^{уд}$, Гц·см³/мкг²) покрытий сенсоров к парам летучих соединений

№	Покровтие	муравьиная кислота	уксусная	масляная	этанол	бутанол	изобутанол
1	ДЦГ18К6/хитозан	0,09	1,08	26,42	0,14	0,54	2,43
2	ДГК/хитозан	0,85	8,70	1,10	0,18	0,23	2,55
3	Хитозан/КМК	0,29	5,32	5,03	0,11	0,39	0,05
4	Холин+сорбит	0,82	11,25	10,13	0,46	0,34	2,48
5	Холин+эритрит+АОК	0,52	6,54	23,84	0,50	1,17	1,94
6	ПВП/хитозан	0,25	2,60	1,13	0,09	0,09	0,51
7	ПЭГ-2000/хитозан	0,73	13,85	26,95	0,43	1,06	2,61
8	Эритрит+АОК	0,17	1,95	27,81	0,25	0,65	3,61

№	Покровтие	изопентанол	гексанол	ацетон	бутанон-2	ацетальдегид	этилацетат
1	ДЦГ18К6/хитозан	1,70	0,99	0,07	1,55	0,42	0,29
2	ДГК/хитозан	4,04	2,85	0,03	1,77	0,85	1,05
3	Хитозан/КМК	1,26	1,02	0,05	0,24	0,61	0,52
4	Холин+сорбит	3,57	4,16	0,08	1,65	1,93	1,55
5	Холин+эритрит+АОК	7,13	9,27	0,14	3,13	2,06	1,15
6	ПВП/хитозан	0,80	0,98	0,01	0,28	0,21	0,31
7	ПЭГ-2000/хитозан	15,18	7,76	0,20	1,44	2,65	0,20
8	Эритрит+АОК	3,41	2,34	0,08	3,16	0,85	0,62

18К6 – дициклогексан-18-краун-6, ДГК – дигидроокверцетин, КМК – концентрат мицеллярного казеина, ПВП – поливинилпирролидон, АОК – аморфный оксид кремния

но, что они характеризуются различной чувствительностью и селективностью к веществам, выделяемым посторонней микрофлорой проб сырого молока (Рисунок 2).

На Рисунке 3 представлены «визуальные отпечатки» усредненных аналитических сигналов сенсоров для образцов сырого молока, характеризующихся максимальным содержанием микроорганизмов или существенным изменением их соотношения в составе КМАФАнМ (Таблица 2).



Рисунок 3

«Визуальные отпечатки» сигналов сенсоров для некоторых проб сырого молока, Гц

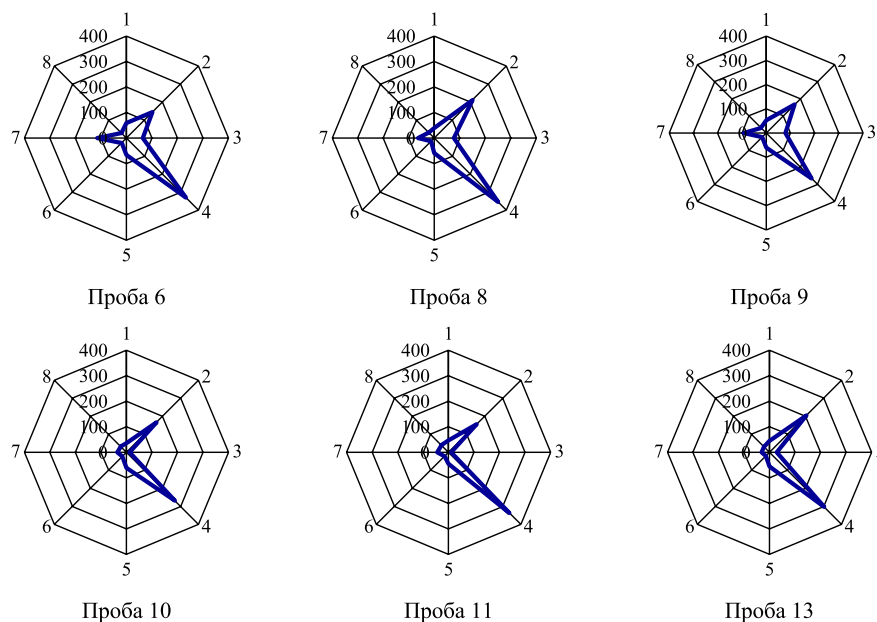
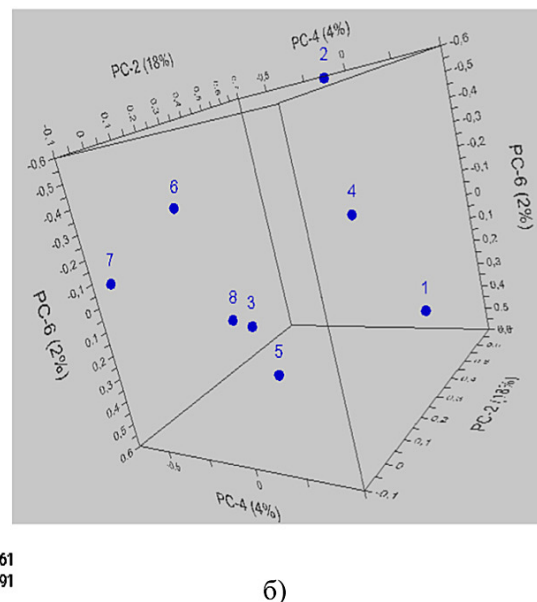
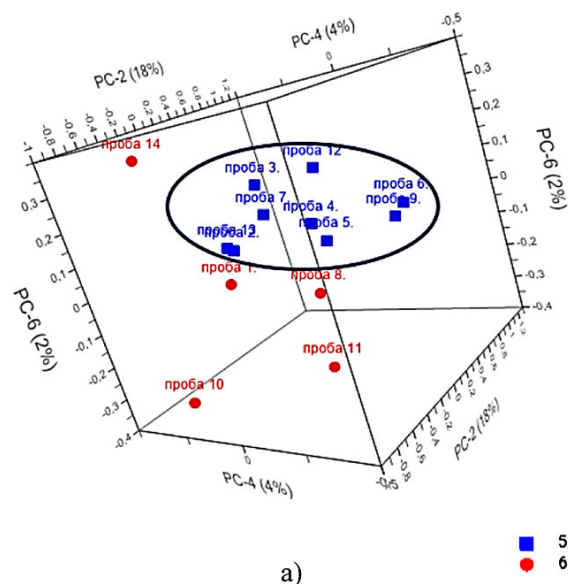


Рисунок 4

График счетов (а) и график нагрузок (б) модели при обработке относительных сигналов сенсоров методом главных компонент



По форме «визуальных отпечатков» пробы различаются, что соответствует изменениям физико-химических и микробиологических показателей этих проб молока. Для одновременной оценки взаимосвязи результатов всех экспериментов применен проекционный метод анализа — метод главных компонент (Рисунок 4).

Все пробы были разделены на две группы (разные маркеры) по значениям $\lg(\text{КМАФАНМ, КОЕ/см}^3)$. По значениям трех главных компонент (PC-2, PC-4, PC-6) можно выделить пробы с крайне высоким содержанием КМАФАНМ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По величине титруемой кислотности и микробиологическим показателям образцов молока можно сделать вывод, что микрофлора проб № 4, 7, 9 находилась в бактерицидной фазе, в то время как остальные пробы характеризовались фазой смешанной микрофлоры, и, следовательно, большим содержанием легколетучих метаболитов бактерий. При этом соотношение между дрожжами и плесеньями в общем количестве микроорганизмов в пробах было различным, что оказало влияние на качественное содержание летучих веществ в их газовой фазе. Кроме того, низкая массовая доля общего белка в пробах № 10, 11 и 13 с достаточно высокой бактериальной обсемененностью свидетельствует об активном развитии присутствующей микрофлоры и выделении в молоко продуктов своей жизнедеятельности.

По результатам проведенных исследований с применением разработанных газовых сенсоров установлено, что их покрытия характеризуются высокой удельной чувствительностью к парам изопентанола, бутанола-2, ацетальдегида, уксусной и масляной кислоты (Таблица 5), которые по литературным данным являются маркерами таких патогенных микроорганизмов как *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp.*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* (Afreen et al., 2022; Bekuma & Galmessa, 2018; Boor et al., 2017; Eugster & Jakob, 2019; Huanhuan et al., 2022; Quigley et al., 2013). При этом они обладают разной селективностью к этим маркерам и могут быть обнаружены в газовой фазе над водными растворами. Согласно рис. 2 с помощью сенсора № 1 и № 8 можно обнаружить изопентанол и бутанол-2 в газовой фазе над пробой, с помощью сенсоров № 2, № 3, № 6 — пары уксусной кислоты, с помощью сенсоров № 5, № 7 — пары уксусной кислоты и изопентанола. Таким образом, комбинация сигналов сенсоров позволяет обнаружить эти соединения в газовой фазе над водными растворами или пробами с большим содержанием воды, например, в молоке.

Установлено, что формы «визуальных отпечатков» аналитических сигналов сенсоров для проб № 6 и 9 имеют максимальное сходство (рис. 3), что связано с их близкими значениями таких макрокомпонентов, как массовая доля сухих веществ и массовая доля жира, а также КМАФАнМ (табл. 2). Пробы № 10, 11, 13 по форме «визуальных отпечатков» (Рисунок

3) могут быть также отнесены к одной группе, для которых характерно высокое КМАФАнМ и содержание дрожжей (более 10^5 КОЕ/см³, Таблица 2). Проба № 8 по форме «визуального отпечатка» отличается от всех вышеперечисленных проб, так как характеризуется наибольшим значением КМАФАнМ и содержанием дрожжей.

Пробы № 6, 8 и 12 имеют сходные физико-химические характеристики по содержанию белка, жира и сухих веществ, но при этом существенно различаются по микробиологическому составу. При сравнении форм «визуальных отпечатков» для пробы № 6 по сигналам сенсоров № 2, 3 и 7 характерно меньшее содержание в газовой фазе органических кислот и большее количество изоспиртов по сравнению с другими пробами, что связано с достаточно высоким содержанием дрожжей и плесневых грибов в этом образце. При увеличении дрожжей в пробе сырого молока № 13 по сигналам сенсора № 2 в газовой фазе детектируется увеличение концентрации органических кислот (в основном уксусной кислоты), этанола и уменьшение содержания других летучих соединений. При кратном увеличении в пробе молока КМАФАнМ (проба № 8) наблюдается увеличение сигналов сенсоров № 3, 4 и, следовательно, содержания летучих кислот (уксусной и масляной) и кетонов в газовой фазе над пробой молока по отношению к другим классам летучих соединений. Увеличение кетонов в газовой фазе над пробами молока может также быть связано с естественными изменениями в пробе молока при хранении (Li et al., 2022), а также со степенью дисперсности жировой фракции в составе сырого молока (Reis et al., 2020). Для снижения влияния этих факторов время доставки и анализа проб строго контролировали, и разница в степени дисперсности жировой фракции для сырого молока не превышала 2% от всей массы жира.

При одновременном анализе относительных сигналов сенсоров методом главных компонент, установлено, что можно ранжировать пробы по величине КМАФАнМ. При этом необходимо учитывать комбинации относительных сигналов всех сенсоров для расчета второй (PC-2), четвертой (PC-4) и шестой (PC-6) главной компоненты, в этом случае доля объясненной дисперсии по трем главным компонентам составляет всего 24%. Это обусловлено тем, что максимальные изменения сигналов сенсоров, которые соответствуют первой главной

компоненте, преимущественно связаны с содержанием белка и кислотностью проб молока. Более тонкие различия в составе газовой фазы можно отследить, анализируя старшие главные компоненты (2 и выше). При сопоставлении графика счетов и нагрузок модели по результатам обработки относительных сигналов сенсоров методом главных компонент видно, что для проб с меньшими значениями КМАФАнМ (выделено областью, Рисунок 4) наиболее важными являются относительные сигналы сенсоров с покрытиями № 1, 2, 3, а для проб с большими значениями КМАФАнМ — относительные сигналы сенсоров с покрытиями, № 5, 6, 7. В первом приближении можно предположить на основе величин удельной массовой чувствительности (Таблица 5), что для проб с меньшим содержанием КМАФАнМ наряду с кислотами и спиртами в газовой фазе преобладает изобутанол, этилацетат, и по мере увеличения содержания микроорганизмов повышается массовая доля уксусной кислоты, изопентанола, ацетальдегида, что соответствует по литературным данным тенденции изменения классов летучих соединений в газовой фазе молока при изменении количества микроорганизмов в нем (Chramostová et al., 2016; Galaby et al., 2021; Reis et al., 2020; Wang et al., 2021). При этом данные изменения характерны для проб молока независимо от принадлежности к хозяйству и видового разнообразия микроорганизмов.

Небольшая выборка проб и диапазон варьирования КМАФАнМ (от $3,4 \cdot 10^5$ до $9,8 \cdot 10^7$ КОЕ/см³) ограничивают применение полученных выводов. Кроме того, для увеличения точности и надежности прогнозирования микробиологических показателей необходимо более глубокое изучение влияния компонентов молока (содержания аминокислот, жирных кислот, лактозы) на состав и количество летучих соединений молока при различной бактериальной обсемененности проб, в том числе различными видами условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам выполненных исследований проведена сравнительная оценка микробиологических и физико-химических показателей сырого молока с результатами анализа его газовой фазы с применением массива химических газовых сенсоров.

Установлено, что не все пробы отвечают требованиям нормативной документации по физико-химическим и микробиологическим показателям, также идентифицированы виды микроорганизмов, входящие в состав микрофлоры проб молока. С помощью разработанных сенсоров возможно проведение анализа газовой фазы проб сырого молока, поскольку установлено, что по их выходным данным возможно определение летучих веществ в водных растворах.

Полученные данные сенсоров подтвердили гипотезу исследования о взаимосвязи между содержанием легколетучих биомаркеров, выделяемых присутствующей в молоке микрофлорой, и основными микробиологическими и физико-химическими показателями анализируемой пробы. Разработан подход для анализа выходных данных сенсоров, позволяющий ранжировать пробы молока с различной степенью бактериальной обсемененности.

Данный подход может быть принят за основу для разработки экспрессного способа определения КМАФАнМ молока, что позволит в несколько раз сократить продолжительность анализа посредством замены рутинных методов, используемых на предприятиях молочной отрасли. Основными ограничениями данного исследования являются небольшая выборка проб с ограниченным диапазоном варьирования КМАФАнМ (от $3,4 \cdot 10^5$ до $9,8 \cdot 10^7$ КОЕ/см³), а также необходимость более глубокого изучения влияния компонентов молока (содержания аминокислот, жирных кислот, лактозы) на состав и количество летучих соединений молока при различной бактериальной обсемененности проб, в том числе различными видами условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

В дальнейшем для определения более значимых различий в составе газовой фазы над пробами молока и более глубокой его дифференциации в зависимости от содержания и соотношения различных видов микроорганизмов необходимо изучение особенностей кинетики сорбции на покрытиях, расчет дополнительных параметров по информативным участкам выходных кривых сенсоров и составление многомерных паттернов на основе сигналов сенсоров и параметров.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Шуба Анастасия Александровна - методология и концепция исследования; обработка данных методом главных компонент; верификация данных; подготовка черновика и редактирование рукописи.

Анохина Екатерина Петровна - проведение микробиологического исследования проб молока; поиск и систематизация литературных источников.

Умарханов Руслан Умарханович - проведение анализа газовой фазы молока; визуализация.

Богданова Екатерина Викторовна - определение физико-химических показателей проб молока; верификация данных, подготовка черновика и оформление рукописи.

Буракова Инна Юрьевна - проведение молекулярно-генетического анализа проб молока; подготовка черновика рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

- Пономарев, А. Н., Мельникова, Е. И., Богданова, Е. В. (2018). Молочная сыворотка как сырьевой ресурс для производства пищевых ингредиентов. *Молочная промышленность*, 7, 38-39.
- Шуба, А. А., Кучменко, Т. А., & Умарханов, Р. У. (2023). Оценка возможности прогноза и регуляции сорбционных свойств композитных покрытий пьезокварцевых сенсоров. *Сорбционные и хроматографические процессы*, 23(4), 630-641. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11571>
- Afreen, A., Ashraf, A., & Chaudhry, A. (2022). Assessment of microbiological quality of raw milk and identification of pathogenic bacteria: microbiological quality of raw milk. *Pakistan BioMedical Journal*, 5(5), 88-93. <https://doi.org/10.54393/pbmj.v5i5.469>
- Al-Attabi, Z. H., Ehsan, S., & Rahman, M. S. (2021). *Quality assessment of milk by sensory and instrument methods*. In M.S. Khan & M. Shafiur Rahman (Eds.), *Techniques to measure food safety and quality*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-68636-9_16
- Bekuma, A., & Galmessa, U. (2018). Review on hygienic milk products practice and occurrence of mastitis in cow's milk. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, 18(2), e556053. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2018.18.556053>
- Biçer, Y., Ezgi Telli, A., Sönmez, G., Telli, N., & Uçar, G. (2021). Comparison of microbiota and volatile organic compounds in milk from different sheep breeds. *Journal of Dairy Science*, 104(12), 12303-12311. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20911>
- Bonah, E., Huang, X., Aheto, J.H., & Osae R. (2020). Application of electronic nose as a non-invasive technique for odor fingerprinting and detection of bacterial foodborne pathogens: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 1977-1990. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04143-4>
- 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. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12969>
- Chramostová, J., Hanuš, O., Klimešová, M., Němečková, I., Roubal, P., Kopecký, J., Jedelská, R., & Nejeschlebová, L. (2016). Proteolysis in raw milk in relation to microbiological indicators. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(4), 306-312. <https://doi.org/10.17221/64/2016-CJFS>
- Carrillo-Gómez, J. K., Acevedo, C. M. D., & García-Rico, R. O. (2021). Detection of the bacteria concentration level in pasteurized milk by using two different artificial multisensory methods. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 33, 100428. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2021.100428>
- Esbensen, K. H., Guyot, D., Westad, F., & Houmoller, L. P. (2002). *Multivariate data analysis: in practice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design*. CAMO AS publ.
- Eugster, E., & Jakob, E. (2019). Pre-treatments of Milk and their Effect on the Food Safety of Cheese. *Milk Science International*, 72(8), 45-52.
- Galaby, S., Maharik, N., & Khalifa, M. I. (2021). Prevalence of some deteriorating microorganisms in raw milk and some locally made cheese. *New Valley Veterinary Journal*, e245155271 <https://doi.org/10.21608/nvj.2021.205838>
- Ghafari, P., Kasaei, B., Aghili, S., Monirvaghefi, A., Hosseini, A. M., Amoozegar, H., & Mirfendereski, G. (2023). Application of nanobiosensors in detection of pathogenic bacteria: An update. *Research in Biotechnology and Environmental Science*, 2(4), 65-74. <https://doi.org/10.58803/rbes.v2i4.22>
- Guétouache, M., Guessas, B., & Medjekal, S. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(10), 115-122. <http://dx.doi.org/10.15739/ibspr.005>
- He, X. P., Zou, B. J., Qi, X. M., & Yi, Ch. (2019). Methods of isothermal nucleic acid amplification-based microfluidic chips for pathogen microorganism detection. *Yi Chuan*, 41(7), 611-624. <https://doi.org/10.16288/j.ycz.19-051>
- Heng, W. S., Jadhav, S. R., Ueland, M., & Shellie, R. A. (2023). Rapid detection of *Escherichia coli* in dairy milk using static headspace-comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415, 2535-2545 <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04485-7>

- Hettinga, K. A., van Valenberg, H. J. F., Lam, T. J. G. M., & van Hooijdonk, A. C. M. (2008). Detection of mastitis pathogens by analysis of volatile bacterial metabolites. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 3834–3839. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0941>
- Holeva, M. C., Morán, F., Scuderi, G., González, A., López, M. M. (2019). Development of a real-time PCR method for the specific detection of the novel pear pathogen *Erwinia uezensis*. *PLOS ONE*, 14 (7), e0219487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219487>
- Iacumin, L., & Comi G. (2021). A survey of a blown pack spoilage produced by *Clostridium perfringens* in vacuum-packaged wurstel. *Food Microbiology*, (94), e103654. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103654>
- Kennang, A., Gagnon, M., LaPointe, G., Chouinard, Y., & Roy, D. (2022). Graduate Student Literature Review: Farm management practices: Potential microbial sources that determine the microbiota of raw bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 105(9). <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21758>.
- Korel, F., & Balaban, M. Ö. (2002). Microbial and sensory assessment of milk with an electronic nose. *Journal of Food Science*, 67(2), 758–764. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10672.x>
- Kuchmenko, T., Menzhulina, D., & Shuba, A. (2022). Noninvasive detection of bacterial infection in children using piezoelectric e-nose. *Sensors*, 22(21), e8496. <https://doi.org/10.3390/s22218496>
- Kuchmenko, T., Shuba, A., Umarhanov, R., & Chernitskiy, A. (2021). Portable electronic nose for analyzing the smell of nasal secretions in calves: toward noninvasive diagnosis of infectious bronchopneumonia. *Veterinary Sciences*, 8(5), 74. <https://doi.org/10.3390/vetsci8050074>
- Kumar, N., Kumar, V., Waheed, S. M., & Pradhan, D. (2021). Efficacy of reuterin and bacteriocins nisin and pediocin in the preservation of raw milk from dairy farms. *Food Technology & Biotechnology*, 58(4), 359–369. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.04.20.6728>
- Lepe-Balsalobre, E., Rubio-Sánchez, R., Ubeda, C. & Lepe, J. A. (2022). Volatile compounds from *in vitro* metabolism of seven *Listeria monocytogenes* isolates belonging to different clonal complexes. *Journal of Medical Microbiology*, 71(6). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001553>
- Li, D., Liu, L., Huang, Q., Tong, T., Zhou, Y., Li, Z., Bai, Q., Liang, H., & Chen, L. (2021). Recent advances on aptamer-based biosensors for detection of pathogenic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(3), e45. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03002-9>
- Li, H., Geng, W., Zhang, M., He, Z., Haruna, S. A., Ouyang, Q., & Chen, Q. (2022). Qualitative and quantitative analysis of volatile metabolites of foodborne pathogens using colorimetric-bionic sensor coupled robust models. *Microchemical Journal*, 177, e107282. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107282>
- Li, H., Xi, B., Yang, X., Wang, H., He, X., Li, W., & Gao, Y. (2022). Evaluation of change in quality indices and volatile flavor components in raw milk during refrigerated storage. *LWT*, 165, 113674. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113674>
- Liu, S., Zhao, J., Guo, Y., Ma, X., Sun, C., Cai, M., Chi, Y., & Xu, K. (2022). Application of ATP-based bioluminescence technology in bacterial detection: A review. *Analyst*, 26, 148(15), 3452–3459. <https://doi.org/10.1039/d3an00576c>
- Lu, M., Shiau, Y., Wong, J., Lin, R., Kravis, H., Blackmon, T., Pakzad, T., Jen, T., Cheng, A., Chang, J., Ong, E., Sarfaraz, N., & Sun Wang, N. (2013). Milk spoilage: Methods and practices of detecting milk quality. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 113–123. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.47A014>
- Nalepa, B., Olszewska, M. A., & Markiewicz, L. H. (2018). Seasonal variances in bacterial microbiota and volatile organic compounds in raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 267, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.024>
- Patil-Joshi, A., Rangaswamy, B. E., & Apte-Deshpande, A. (2021). Paper-based PCR method development, validation, and application for microbial detection. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 19, e37. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00110-1>
- Poghossian, A., Geissler, H., & Schöning, M. J. (2019). Rapid methods and sensors for milk quality monitoring and spoilage detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 140, 111272. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.040>
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Reis, M. G., Harris, P., Berry, C., Nguyen, H., Maclean, P., & Weeks, M. (2020). Tracking changes in volatile components and lipids after homogenisation and thermal processing of milk. *International Dairy Journal*, 103, e104624. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104624>
- Ropero-Vega, J. L., Albiarés-Sánchez, L. J., León-Sánchez, W. R., Valdivieso-Quintero, W., & Flórez-Castillo, J. M. (2022). Detection of pathogenic *E. coli* by electrochemical biosensors based on aptamers designed by bioinformatic tools. *Chemical Engineering Transactions*, 93, 283–288. <https://doi.org/10.3303/CET2293048>
- Rubio-Sánchez, R., Lepe-Balsalobre, E., Ubeda, C., & Lepe-Jiménez, J. A. (2024). Volatile biomarkers of Gram-positive bacteria of clinical relevance as a tool for infection diagnosis. *International Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10123-024-00511-z>
- Sayerbrey, G. (1964). Messung von plattenschwingungen sehr kleiner amplitude durch lichtstrommodulation. *Zeitschrift Fuer Physik*, 178, 457–471.
- Shuba, A., Kuchmenko, T., & Menzhulina, D. (2021). Drift compensation of the electronic nose in the development of instruments for out-of-laboratory analysis. *Chemistry Proceedings*, 5(1), 68. <https://doi.org/10.3390/CSAC2021-10464>
- Soumitra, B., & Shanker, L. S. (2017). Recent trends in milk processing — A short review. *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*, 2(1), e000527. <https://doi.org/10.31031/APDV.2017.02.000527>
- Srivastava P., & Prasad D. (2023). Isothermal nucleic acid amplification and its uses in modern diagnostic technologies. *Biotech*, 13, e200. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03628-6>

- Wang, Y., Nan, X., Zhao, Y., Jiang, Y. L., Wang, M., Wang, H., Zhang, F., Xue, F., Hua, D., Liu, J., Yao, J., & Xiong, B. (2021). Rumen microbiome structure and metabolites activity in dairy cows with clinical and subclinical mastitis. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12, e36. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00543-1>
- Zastempowska, E., Grajewski, J., & Twarużek, M. (2016). Food-borne pathogens and contaminants in raw milk — A review. *Annals of Animal Science*, 16(3), 623-639. <https://doi.org/10.1515/aoas-2015-0089>