THE PHYSICAL PROPERTIES OF THE CASEIN IN SOLUTION: EFFECT OF ULTRA-HIGH PRESSURE

Roman O. Budkevich*, Anastasia I. Eremina, Ivan A. Evdokimov, Nikita M. Fedortsov, Alexey A. Martak, Elena V. Budkevich

North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

For citation: Budkevich R. O., Eremina A. I., Evdokimov I. A., Fedortsov N. M., Martak A. A., Budkevich E. V. The physical properties of the casein in solution: effect of ultra-high pressure. Food systems. 2018; 1(3): 4–12. DOI: 10.21325/2618–9771–2018–1–3–4–12

The aim of this work was to study the effect of pressure (50; 90; 160; 250; 350 MPa) on a physical property of casein micelle: hydrodynamic radius, tyrosine and tryptophan fluorescence and IR spectra characteristics. According to photon-correlation spectroscopy, the average hydrodynamic radius of the casein micelle was 128 nm, increasing at 50 MPa to 467 nm with the formation of conglomerates. Further increase of pressure led to the formation of two fractions of particles, differing in hydrodynamic radius. At a pressure of 350 MPa, an average radius of 75% of particles was 121 nm. Comparison of hydrodynamic radius and tyrosine fluorescence revealed a decrease in the intensity of the glow with an increase in the proportion of large particles and an increase in the radiation in the solution with a decrease of the micelles size. The increase of casein fluorescence by tryptophan and its decrease by tyrosine indicate a change in the conformation of protein molecules during pressure treatment. FTIR spectroscopy revealed a change in the intensity of the optical density in the range of amide I, amide II and its decrease by tyrosine indicate a change in the conformation of protein molecules during pressure treatment. FTIR spectroscopy revealed a change in the intensity of the optical density in the range of amide I, amide II and valence bonds of tyrosine, confirming the absence of new bonds. The obtained physical data indicate a change in the structure of casein micelles with an increase in the proportion (25%) of large particles after the action of high pressure (350MPa), which should be taken into account in milk processing. The fluorescence of casein during pressure treatment is a poorly investigated physical indicator and can be important for the technological processing of raw milk.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: casein, high pressure treatment, hydrodynamic radius, fluorescence of tryptophan and tyrosine, IR spectroscopy of casein

1. Введение

Обработка высоким давлением является перспективным и относительно новым подходом нетепловой технологии обработки молока, способной инактивировать микроорганизмы в пищевых продуктах, а также модифицировать молочные белки. Физико-химические изменения в молочных системах, вызванные высоким давлением, включают изменение размера частиц и цвета молока (уменьшение мутности) [1,2]. Казеиновые мицеллы являются преобладающими белковыми компонентами молока, представляют собой полидисперсные, грубо сферические агрегаты и состоят из амифильных белков [4]. Казеины в молоке могут рассматриваться как нанокапсулы обеспечивающие доставку питательных веществ, их размер колеблется от 50 до 500 нм [5]. Согласно модели Horne [6], казеиновая мицелла стабильна благодаря балансу между электростатическим отталкиванием и гидрофобным притяжением. Гидрофобное взаимодействие в мицелле основано на взаимодействии между казеинами и фосфатом кальция. Действие высокого давления приводит к растворению коллоидного фосфата кальция и диссоциации гидрофобных и электростатических взаимодействий. Известно, что казеиновые мицеллы под действием давления могут необратимо распадаться на образовывать более крупные частицы [7, 8]. Структурирование белков при обработке высоким давлением может использоваться в высокотехнологичном пищевом производстве для создания нанокапсул обеспечивающих доставку питательных веществ, их размер колеблется от 50 до 500 нм.
2. Материалы и методы

2.1 Материалы и реактивы

Исследования проводились на базе НИИ «Нанобиотехнология и биоинформатика» Центра биотехнологического инжиниринга СКФУ. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Smart2Pure, Thermo Scientific, USA) и реактивы квалификации ч.д.а. (AppliChem, USA). Казеин получали из обезжиренного молока путем его подкисления. В 100 мл молока добавляли 1 мл 10% уксусной кислоты для достижения рН = 4,6. Затем образцы были центрифугированы в течение 10 мин при 3000 об/мин, осадок казеина трижды промывали дистилированной водой и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин с последующим высушиванием при 40°С.

В эксперименте для получения раствора сухой порошок казеина растворялся в деионизированной воде с концентрацией 1 мг/мл с использованием магнитной мешалки при комнатной температуре, для стандартизации условий раствор доводили до нейтральных значений рН с применением растворов NaOH и HCl. Для удаления нерастворённых частиц белка пробы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин с последующим высушиванием при 40 °С.

2.2 Методы исследования

Раствор казеина обрабатывали на лабораторном гомогенизаторе высокого давления (Stansted Fluid Power Ltd., UK). Подготовленный раствор помещали в цилиндр шприца (Photocor Complex (ООО «Фотокор», Россия). Флуоресценция оценивалась в момент максимума испускания [13] и зависела от ряда факторов, включающих флуоресценцию индольной составляющей, наличием направленных изменений свечения исследованных аминокислот [14]. Интенсивность флуоресценции может быть обусловлена разным числом аминокислот, так, мицелла казеина содержит 41 остаток тирозина и 7 остатков триптофана [15]. Сопоставление гистограмм и флуоресценции тирозина указывает на снижение интенсивности свечения при увеличении доли частиц больших размеров и рост излучения в растворе при уменьшении гидродинамического радиуса. Выявленные особенности свечения аминокислот казеина связаны со структурными перестройками при обработке давлением. Рост свечения по триптофану и снижение по тирозину при воздействии высокого давления указывают на изменение конформации белковых молекул казеина с перераспределением положения аминокислот [16]. Однонаправленные изменения свечения исследованных аминокислот, после обработки, могут быть обусловлены переносом энергии от тирозиновых к триптофановым остаткам в белках [14].

3. Результаты и обсуждение

3.1 Изменение гидродинамического радиуса казеина после воздействия высокого давления

В качестве образца для сравнения был использован казеин без обработки высоким давлением, содержащий одну фракцию частиц (Рис. 1). Воздействие давления в 50 МПа привело к четырёхкратному увеличению гидродинамического радиуса, и указывало на образование конгломератов на основе казеиновых мицелл. Вероятно, под воздействием высокого давления произошли структурные модификации «волоскового слоя», состоящего из αs1- и κ-казеинов, который отвечает за агрегирование субмицелл казеина. Это подтверждает данные о том, что после обработки давлением в обезжиренном молоке наблюдается увеличение количества комков и кластеров, полученных из субмицелл и мономеров казеина [10]. Так же считается, что увеличение размера частиц приводит к увеличению тирозина [9].

Обработка раствора казеина давлением 90 МПа привела к разделению частиц на две фракции. В меньшую фракцию, составившую 40 % от общего числа, входили крупные структуры, а оставшиеся 60 % частиц незначительно изменились относительно первоначальных значений радиуса мицелл, что также может рассматриваться как дальнейшее разрушение «волоскового слоя» [9].

После увеличения давления до 160 МПа и 250 МПа наблюдался рост доли фракции частиц большего размера до 56 % и 68 % соответственно, с тенденцией к снижению среднего значения гидродинамического радиуса в обеих фракциях.

После обработки давлением при 350 МПа агрегированные конгломераты сильно увеличивались в размерах, но их доля уменьшилась до 25 %, а основную часть (75 %) составили частицы близкие по размеру к мицеллам казеина без обработки давлением. Полученные результаты подтверждаются данными о распаде мицеллы казеина при давлении между 200–250 МПа (комнатная температура), а средний радиус мицелл после обработки давлением постепенно увеличивается и затем, при достижении 350 МПа, уменьшается [12].

3.2 Флуоресценция казеина по тирозину и триптофану

Образцы казеина до обработки давлением характеризовались значительной интенсивностью свечения тирозина. После действия давления в 50 МПа фиксировалось наименьшее значение флуоресценции, которое характеризовалось тенденцией к росту с увеличением значений оказываемого давления. Отмечается достоверный всплеск значений при 90 и 250 МПа, однако свечение казеина после обработки не достигало уровня контрольного образца (Рис. 2А). Флуоресценция триптофана в контрольном образце была достоверно выше, чем после обработки давлением. Повышение давления сопровождалось ростом свечения в два этапа: первый при давлении от 50 до 160 МПа и второй при 250–350 МПа (Рис. 2Б). Флуоресценция оценивалась в момент максимального испускания [13] и зависела от ряда факторов, включающих флуоресценцию индольной составляющей, наличием направленных изменений свечения исследованных аминокислот [14]. Интенсивность флуоресценции может быть обусловлена разным числом аминокислот, так, мицелла казеина содержит 41 остаток тирозина и 7 остатков триптофана [15].

Сопоставление гистограмм и флуоресценции тирозина указывает на снижение интенсивности свечения при увеличении доли частиц больших размеров и рост излучения в растворе при уменьшении гидродинамического радиуса. Выявленные особенности свечения аминокислот казеина связаны со структурными перестройками при обработке давлением. Рост свечения по триптофану и снижение по тирозину при воздействии высокого давления указывают на изменение конформации белковых молекул казеина с перераспределением положения аминокислот [16]. Однонаправленные изменения свечения исследованных аминокислот, после обработки, могут быть обусловлены переносом энергии от тирозиновых к триптофановым остаткам в белках [14].
3.3 Характеристика ИК-спектров мицеллы казеина

В проведённых исследованиях казеина были выявлены стабильные пики 1638–1649 см⁻¹, что является характерной областью спектра для амид I, 1600–1700 см⁻¹ [17,18,19]. В спектральный диапазон 1700–1550 см⁻¹ среднего ИК попадают все белковые вторичные структуры (α-спирали, β-листы и β-витки), а также динамические конформации белков, характеризующиеся одной или несколькими (мажорной и ми- норными) характерными полосами и соответствующими коэффициентами экстинациии в области амид I [18,19].

При 50 МПа на ИК-спектре отмечалось увеличение общей интенсивности и слаживание всех пиков, что сопровождалось описанным выше падением интенсивности флуоресценции триптофана (Рис. 3). Вероятно, при слипании белковых частиц происходит переход принятого молекулы фотовна на другие связи и изменяется величина испускания при флуоресценции, что согласуется с литературными данными [20]. При дальнейшем повышении давления наблюдается изменение оптической плотности в ИК-спектрах, с увеличением интенсивности в различных зонах, а именно

Рис. 1. Гистограмма распределения гидродинамического радиуса до (A) и после обработки давлением: (B) 50 МПа; (В) 90 МПа; (Г) 160 МПа; (Д) 250 МПа; (Е) 350 МПа. Вынесены средние значения гидродинамического радиуса фракции

Рис. 2. Динамика флуоресценции казеина по тирозину (A) и триптофану (B) до и после обработки высоким давлением

Рис. 3. Интенсивность, ат см⁻1
Рис. 3. ИК-спектры казеина до и после обработки высоким давлением

белковые группы амид I (1638–1649 см⁻¹), амид II (1560–1567 см⁻¹) и характерных для колебаний связей в тирозино-вом кольце (1514–1519 см⁻¹) и может указывать на увеличе-ние количества связей данного типа. В исследованиях [21] показаны аналогичные изменения оптической плотности области амид I и диссоциация мицелл казеина из-за электро-статического отталкивания на более мелкие отрицательно заряженные фрагменты. Полосы, центрированные вблизи 1647 см⁻¹ могут быть теоретически отнесены к элементам α-спирали. Полосы, находящиеся вблизи 1669 см⁻¹ и 1680 см⁻¹ относятся к β-виткам и β-листам соответственно [22]. Следо-вательно, отсутствие смещений специфических ИК спектров указывает на стабильность β-структуры казеина.

4. Выводы

В соответствии с целью данного исследования изучено влияние высокого давления на ряд физических свойств мицеллы казеина: гидродинамический радиус, флюоресцен-цию тирозина и триптофана и характеристику ИК-спектров. Обработка мицелл казеина давлением приводит к транс-формации их размера, что обусловлено слипанием частиц (350 МПа), что следует учитывать в переработке молока. Флюоресценция казеина при обработке давлением являет-ся слабо исследованным физическим показателем и может иметь прикладное значение в технологической обработке молочного сыра.

5. Выражение признательности

Авторы выражают признательность Кирп И.В., менед-жеру по работе с ключевыми партнерами ГК «Арма», за воз-можность проведения исследований на лабораторном го-моагенизаторе высокого давления и Блинову А.В., аспиранту кафедры прикладной биотехнологии (СКФУ), за помощь в проведении фотонно-корреляционной спектроскопии.

1. Introduction

High-pressure processing is a promising and relatively new approach of non-thermal milk processing technology, capable of inactivating microorganisms in food products, as well as modi-fying milk proteins. Physical and chemical changes in dairy sys-tems caused by high pressure include change of particle size and milk color (turbidity reduction) [1,2].

Casein micelles are the predominant protein components of milk, polydisperse, roughly spherical aggregates consisting of several phosphoproteins: AS1 -, AS2 -, β -, and k-casein [3]. The structure of casein micelles is poorly studied, but a number of models with their consideration as amphiphilic proteins are proposed [4]. Caseins in milk can be considered as nanocapsules providing the supply of nutrients, their size ranges from 50 to 500 nm [5]. According to the Horne model [6], the casein micelle is stable due to the balance between electrostatic repulsion and hydrophobic attraction. The hydrophobic interaction in the mi-celle is based on the interaction between casein and calcium phosphate. The action of high pressure leads to the dissolution of colloidal calcium phosphate and dissociation of hydrophobic and electrostatic interactions. It is known that casein micelles under pressure can irreversibly decompose or to form larger

7
particles [7, 8]. Protein structuring in high-pressure processing can be used in high-tech food production of protein nanoparticles, which requires the search for new physical methods of research [9].

The aim of this study was to investigate the high pressure effect on a physical properties of casein micelle: hydrodynamic radius, fluorescence of tyrosine and tryptophan and IR spectra characteristics.

2. Materials and methods

2.1 Materials and Reagents

The study was carried out in the research laboratory «Nanotechnology and Biophysics» (Center for biomedical engineering, NCFU). For the preparation of solutions used deionized water (Smart2Pure, Thermo Scientific, USA) and reagents qualification «p.a.» (AppliChem Inc., USA). Casein was obtained from skim milk by its acidification. In 100 ml of milk, 1 ml of 10% acetic acid is added to achieve pH = 4.6. Then the samples were centrifuged for 10 min at 3000 rpm, the precipitate of casein washed three times with distilled water and centrifuged at 3000 rpm for 15 min, followed by drying at 40°C.

Dry casein powder was dissolved in deionized water at a concentration of 1 mg/ml using a magnetic stirrer at room temperature; to standardize the conditions, the solution was brought to neutral pH values using NaOH and HCl solutions. To remove undissolved protein particles, the solution was centrifuged at 10,000 rpm (MPW-352r, MPW MED INSTRUMENTS, Poland).

2.2 Research Methods

The solution of casein was treated with a laboratory high-pressure homogenizer (Stansted Fluid Power Ltd., UK). The prepared solution was placed into the cylinder of the syringe a volume of 20 ml and was inserted into the inlet valve, the device automatically selected the right amount to fill the cell and began processing. Processing was carried out in the range from 50 MPa to 350 MPa. The treated sample was drained from the exhaust valve into a separate tube and stored at plus 4°C. The hydrodynamic radius was determined using photon-correlation spectroscopy on the spectrometer Photocor Complex (Fotokor, Russia). Casein fluorescence was evaluated on a multi-modal reader Varioskan Flash (Thermo Scientific, USA) by tryptophan and tyrosine at the following wavelengths, respectively: excitation 280 nm / reading 328–350 nm and excitation 275 nm / reading 305 nm. IR spectra of casein solutions were studied by ATR-FTIR spectrometer Nicolet iS50 -rharmo Fisher, USA). Statistical analysis of the data was carried out using the descriptive statistics unit, Excel (Microsoft Office, USA).

3. Results and discussions

3.1 The change in the hydrodynamic radius of casein after exposure to high pressure homogenization

As a sample for comparison, casein without high pressure processing containing one particle fraction was used (Fig. 1). The pressure of 50 MPa led to a hydrodynamic radius fourfold increase, and indicated the formation of conglomerates based on
casein micelles. Probably, under the influence of high pressure there were structural modifications of the «hair layer», consisting of α,1 — and κ-casein, which is responsible for aggregation of casein submicelles. This confirms the data that after pressure treatment of skim milk, an increase in the number of clusters derived from casein submicelles and monomers [10]. Thus, it is believed that the increase in the size of the particles is preceded by the disintegration of the casein micelles [11].

Treatment of a casein solution at 90 MPa caused the separation of the particles into two fractions. The smaller fraction, which made up 40% of the total, included large structures, and the remaining 60% of the particles slightly changed relative to the original values of the micelles size, which can also be considered as a further destruction of the «hair layer» [9].

After increasing the pressure to 160 MPa and 250 MPa, an increase in the fraction of larger particles to 36% and 68%, respectively, was observed, with a tendency to reduce the size of the average hydrodynamic radius in both fractions.

After treatment with a pressure of 350 MPa aggregated conglomerates greatly increase in size, but their share was reduced to 25%, and the bulk (75%) was particles close in size to the casein micelles without pressure processing. The results obtained are confirmed by the data on the decay of the casein fluorescence which made up 40% of the total, included large structures, and the remaining 60% of the particles slightly changed relative to the original values of the micelles size, which can also be considered as a further destruction of the «hair layer» [9].

After pressure treatment, the fluorescence of tyrosine residues and 7 tryptophan residues. [15]. A significant spikes were recorded at 50 MPa. A significant increase was accompanied by fluorescence increase in two stages: the first at pressure of 50 to 160 MPa and the second at 250-350 MPa (Fig. 2 B). Fluorescence was estimated at the time of maximum intensity and smoothing of all peaks, which is accompanied by the described above decrease of tryptophan fluorescence intensity.

3.3 Characterization of IR spectra of casein micelle

In the carried out studies of casein, stable peaks of 1658–1649 cm⁻¹ belonging to a characteristic region of the spectrum for amide I, 1600–1700 cm⁻¹ [17,18,19] were revealed. Spectral range 1700–1550 cm⁻¹ mid-IR includes all of the protein secondary structure (α-helix, β-sheets and β-turns), as well as the dynamic conformations of proteins, characterized by one or more (major and minor) of characteristic bands and the respective extinction coefficients in the amide I region [18,19].

At 50 MPa, the IR spectrum shows an increase in the total intensity and smoothing of all peaks, which is accompanied by the described above decrease of tryptophan fluorescence intensity.

3.2 Tyrosine and tryptophan fluorescence of casein

Samples of casein were characterized by an expressed intensity of tyrosine fluorescence prior to pressure treatment. The pattern of tyrosine fluorescence had a tendency to increase with increasing values of the pressure. The lowest value of fluorescence was registered at 50 MPa. A significant spikes were registered at 90 and 250 MPa, but the fluorescence did not reach the level of the control sample. (Fig. 2 A).

The fluorescence of tryptophan in the control sample was significantly lower than after pressure processing. The pressure rise was accompanied by fluorescence increase in two stages: the first at pressure of 50 to 160 MPa and the second at 250–350 MPa (Fig. 2 B). Fluorescence was estimated at the time of maximum emission [13] and depends on a number of factors, including the indole component fluorescence, the presence of several tryptophan molecules in most proteins and the environment of the molecule [14]. The fluorescence intensity can be due to the different number of amino acids, so the casein micelle contains 41 tyrosine residues and 7 tryptophan residues. [15].

Comparison of histograms and fluorescence of tyrosine indicates a decrease in the intensity of the glow with an increase in the proportion of large particles and the increase in radiation in the solution with a decrease in the hydrodynamic radius. Peculiarities of casein amino acids glow are associated with structural rearrangements during the processing pressure. The growth of tryptophan and decrease of tyrosine fluorescence under the influence of high pressure indicate a change in the conformation of protein molecules of casein with the reallocation provisions of amino acids [16]. Unidirectional changes in the amino acids glow, after treatment, can be due to the energy transfer from tyrosine to tryptophan residues in proteins. [15].

4. Conclusion

In accordance with the purpose of this study, the effect of high pressure on a number of physical properties of the casein micelle was studied: hydrodynamic radius, fluorescence of tyrosine and tryptophan and the characteristic of IR spectra. Pressure processing of casein micelles leads to transformation of their size, which is due to the adhesion of particles (50 MPa) and stepwise crushing with pressure increasing. This is accompanied...
Figure 3. IR spectra of casein before and after high pressure treatment

by fluctuations in the fluorescence level of tyrosine and tryptophan, indicating a rearrangement of the casein molecular structure. IR-Fourier spectroscopy revealed a change in the intensity of the optical density in the range of amide I, amide II and valence bonds of tyrosine, confirming the absence of new bonds. The obtained physical data indicate a change in the structure of casein micelles with an increase in the proportion (25%) of large particles after the action of high pressure (350 mpa), which should be taken into account in milk processing. The fluorescence of pressure-processed casein is a poorly investigated physical indicator and can have an applied value in the processing of raw milk.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to Kirpa I.V., kay account manager of GK Arma, for the possibility to perform research on laboratory high-pressure homogenizer, and Andrey Blinov, post-graduate student of the applied biotechnology department (NCFU) for the assistance in carrying out photon-correlation spectroscopy.
REFERENCES

1. Bolumar, T., Middendorf, D., Toepfl, S., Heinz, V. (2016). Structural Changes in Foods Caused by High-Pressure Processing. In: High pressure processing of food: principles, technology and applications. New York: Springer, 309–337 p. ISBN978-1-4939-5234-4.

2. Huppertz, T., Kelly, A.L., Fox, P.F. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. International Dairy Journal, 12(7), 561–572.

3. Fox, P.F, Brodkorb, A. (2008). The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. International Dairy Journal, 18(7), 677–684.

4. Bannikova, A.V., Evdokimov, I.A. (2015). Innovative approach to the creation of enriched dairy products with high protein content. M: Deli print. — 135 p. ISBN978-5-905170-17-0. (in Russian).

5. Evdokimov, I.A., Golovach, T.N., Kuchenko, V.P., Alieva, L.R., Budkevich, R.O. (2013). Modern problems of science in food and processing industries of the agroindustrial complex. Part I. Specific properties of milk proteins and their modification during technological processing (textbook). Stavropol: North-Caucasus Federal University. — 21 p. (in Russian)

6. Horne, D.S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 11(2–3), 148–153.

7. Huppertz, T., Smiddy, M.A., Upadhyay, V.K., Kelly, A.L. (2006). High-pressure-induced changes in bovine milk: A review. International Journal of Dairy Technology, 59(2), 38–66.

8. Huppertz, T., Fox, P.F., Kelly, A.L. (2004). High-pressure treatment of bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. Journal of Dairy Research, 71(1), 97–106.

9. Khramtsov, A.G., Evdokimov, I.A., Lodygin, A.D., Budkevich, R.O. (2014). Technology development for the food industry: a conceptual model. Foods and Raw Materials, 2(1), 22–26.

10. Patel, H.A., Huppertz, T. (2014). Effects of high-pressure processing on structure and interactions of milk proteins. In: Milk Proteins: From Expression to Food. 2nd ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc. 245–267 p. ISBN9780124051751.

11. Broyard, C., Gaucheron, F. (2015). Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. Dairy science & technology, 95(6), 831–862.

12. Needs, E.C., Stening, A.A., Gill, A.L., Ferragut, V., Rich, G.T. (2000). High-pressure treatment of milk: Effects on casein micelle structure and on enzymic caseagulation. Journal of Dairy Research, 67(1), 31–42.

13. Shaikh, S.M.T., Seetharamappa, J., Randagal, P.R., Manjunatha, D.H., Ashoka, S. (2007). Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin. Dyes and Pigments, 74(3), 665–671.

14. Vekshin N.L. (2008). Fluorescence Spectroscopy of Biomacromolecules. M: Photon-century. — 168 p. ISBN978504144716. (in Russian)

15. Larson, B.L., Smith, V.R. (1974). Lactation: a Comprehensive Treatise, Volume 3: Nutrition and Biochemistry of Milk/Maintenance. Academic press. — 440 p. ISBN: 0-12-436703-8.

16. Wang, Y.X., Li, J., Sheng, L.J., Song, G.W., Xu, Z.S. (2011). Spectroscopic study on the inherent binding information of cationic perfluorinated surfactant with bovine serum albumin. Journal of Fluorine Chemistry, 132(7), 489–494.

17. Qi, P.X., Ren, D., Xiao, Y., Tomasula, P.M. (2015) Effect of homogenization and pasteurization on the structure and stability of whey protein in milk. Journal of Dairy Science, 98(5), 2884–2897.

18. Kong, J., Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 39(8), 549–559.

19. Cadesky, L., Walking-Ribeiro, M., Kriner, K.T., Karwe, M.V., Moraru, C.I. (2017). Structural changes induced by high-pressure processing in micellar casein and milk protein concentrates. Journal of Dairy Science, 100(9), 7055–7070.

20. Ruan, K., Lange, R., Meersman, F., Heremans, K., Balny, C. (1999). Fluorescence and FTIR study of the pressure-induced denaturation of bovine pancreas trypsin. European Journal of Biochemistry, 265(1), 79–85.

21. Gebhardt, R., Takeda, N., Kulozik, U., Doster, W. (2011). Structure and Stabilizing Interactions of Casein Micelles Probed by High-Pressure Light Scattering and FTIR. Journal of Physical Chemistry B, 115(10), 2549–2559.

22. O'Loughlin, I.B., Kelly, P.M., Murray, B.A., Fitzgerald, R.J., Brodkorb A. (2015). Concentrated whey protein ingredients: A Fourier transformed infrared spectroscopy investigation of thermally induced denaturation. International Journal of Dairy Technology, 68(3), 349–356.
### Сведения об авторах

| Автор | Принадлежность к организации |
|-------|-----------------------------|
| Будкевич Роман Олегович | кандидат биологических наук, доцент, заведующий НИЛ «Нанобиотехнология и биофизика», Центр биотехнологического инжиниринга, Северо-Кавказский федеральный университет |
| | 355009, Ставрополь, ул. Пушкина, 1 |
| | Тел.: +7-962-445-20-91 |
| | E-mail: budkev@mail.ru |
| Еремина Анастасия Игоревна | аспирант, инженер, НИЛ «Нанобиотехнология и биофизика», Центр биотехнологического инжиниринга, Северо-Кавказский федеральный университет |
| | 355009, Ставрополь, ул. Пушкина, 1 |
| | Тел.: +7-918-759-07-60 |
| | E-mail: eremina.93@yandex.ru |
| Евдокимов Иван Алексеевич | доктор технических наук, профессор, заведующий базовой кафедрой технологии молока и молочных продуктов, Северо-Кавказский федеральный университет |
| | 355009, Ставрополь, ул. Пушкина, 1 |
| | Тел.: +7-962-403-08-47 |
| | E-mail: ievdokimov@ncfu.ru |
| Федорцов Никита Михайлович | магистр, инженер, НИЛ «Нанобиотехнология и биофизика», Центр биотехнологического инжиниринга, Северо-Кавказский федеральный университет |
| | 355009, Ставрополь, ул. Пушкина, 1 |
| | Тел.: +7-928-329-20-53 |
| | E-mail: hagen729@rambler.ru |
| Мартак Алексей Алексеевич | инженер, НИЛ «Нанобиотехнология и биофизика», Центр биотехнологического инжиниринга, Северо-Кавказский федеральный университет |
| | 355009, Ставрополь, ул. Пушкина, 1 |
| | Тел.: +7-961-446-52-56 |
| | E-mail: alexey_martak@mail.ru |
| Будкевич Елена Владимировна | кандидат медицинских наук, инженер, Центр биотехнологического инжиниринга, Северо-Кавказский федеральный университет |
| | 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1 |
| | Тел.: +7-962-444-89-94 |
| | E-mail: budkevich.ev@yandex.ru |

### Авторская информация

| Автор | Принадлежность к организации |
|-------|-----------------------------|
| Roman O. Budkevich | Candidate of Biological Sciences (PhD), associate professor, Head of the Laboratory, Laboratory for Nanobiotechnology and Biophysics Center of bioengineering, North-Caucasus Federal University |
| | 355009, Stavropol, Pushkin Street, 1 |
| | Tel.: +7-962-445-20-91 |
| | E-mail: budkev@mail.ru |
| Anastasiya I. Eremina | post-graduate student, Engineer, Laboratory for Nanobiotechnology and Biophysics Center of bioengineering, North-Caucasus Federal University |
| | 355009, Stavropol, Pushkin Street, 1 |
| | Tel.: +7-918-759-07-60 |
| | E-mail: eremina.93@yandex.ru |
| Ivan A. Evdokimov | Doctor of Technical Sciences, Head of the basic Department of milk and dairy products technology, North-Caucasus Federal University |
| | 355009, Stavropol, Pushkin Street, 1 |
| | Tel.: +7-962-403-08-47 |
| | E-mail: ievdokimov@ncfu.ru |
| Nikita M. Fedortsov | master, Engineer, Laboratory for Nanobiotechnology and Biophysics Center of bioengineering, North-Caucasus Federal University |
| | 355009, Stavropol, Pushkin Street, 1 |
| | Tel.: +7-928-329-20-53 |
| | E-mail: hagen729@rambler.ru |
| Alexey A. Martak | Engineer, Laboratory for Nanobiotechnology and Biophysics Center of bioengineering, North-Caucasus Federal University |
| | 355009, Stavropol, Pushkin Street, 1 |
| | Tel.: +7-961-446-52-56 |
| | E-mail: alexey_martak@mail.ru |
| Elena V. Budkevich | Candidate of Medical Sciences (PhD), Engineer, Center of bioengineering, North-Caucasus Federal University |
| | 355009, Stavropol, Pushkin Street, 1 |
| | Tel.: +7-962-444-89-94 |
| | E-mail: budkevich.ev@yandex.ru |

### Критерии авторства

- Авторы внесли одинаковый вклад в статью. Авторы одинаково несут ответственность за плагиат.

### Конфликт интересов

- Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Поступила 25.07.2018

- The authors declare no conflict of interest.

### Received 25.07.2018