

ФИЗИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕН ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА "ФИЗИКА"

ВАЛЕНТИН ГАНЧЕВ КАБАДЖОВ

ОПТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА СТРУКТУРНИТЕ ИЗМЕНЕНИЯ
НА БЕЛТЪЦИ В ПОЛИДИСПЕРСНИ СИСТЕМИ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен „доктор”
област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика
професионално направление: 4.1. Физически науки
докторска програма: Електрични, магнитни и оптични свойства на
кондензираната материя

Научен ръководител: *доц. д-р Тодорка Лулчева Димитрова*
Научно жури:
Външни членове за ПУ *проф. д-р Емилия Миткова Михайлова*
доц. д-р Стефка Любова Атанасова
Доц. д-р Кръстена Тодорова Николова
Вътрешни членове за ПУ *доц. д-р Тодорка Лулчева Димитрова*
доц. д-р Мария Георгиева Марудова

ПЛОВДИВ, 2018

Дисертационният труд е представен на 152 стандартни машинописни страници, съдържа 17 таблици и 54 фигури. Цитирани са 216 литературни източника, от които 40 на кирилица и 176 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и одобрен на разширен учебно-научен съвет (РУНС) към катедра „Физика” на ПУ «Паисий Хилендарски» – гр. Пловдив, назначен със заповед на Ректора № Р33-1115/13.03.2018 г. Заседанието на РУНС е проведено на 15.03.2018 г., и е взето решение за разкриване на процедура за защита пред научно жури, утвърдено от Факултетен съвет на Физико-технологичен факултет при ПУ «Паисий Хилендарски», гр. Пловдив (Заповед № .../.....2018 г.).

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на ... от ... часа в зала

С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е		стр.
ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ		5
УВОД		6
1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ		6
2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА РАБОТА		7
2.1.	Материали	7
2.2.	Методи на изследване	7
2.2.1.	Турбидиметрия	8
2.2.2.	Диференциална сканираща калориметрия (ДСК)	10
2.2.3.	Раманова спектроскопия	10
2.2.4.	Флуоресцентна спектроскопия	10
2.3.	Методи за изследване на микроструктурата на млечни протеини	10
2.3.1.	Флуоресцентна микроскопия	10
2.3.2.	Атомно-силова микроскопия	11
2.4.	Физико-химичен анализ	11
2.5.	Методика на провеждане на експеримента	12
2.5.1.	Ензимна коагулация	12
2.5.2.	Термо-денатурация	12
2.5.3.	Химична денатурация	13
2.6.	Използван софтуер и статистическа обработка на експерименталните резултати	13
3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ		13
3.1.	Изследване на кинетиката на ензимна коагулация на млечни белтъци	13
3.2.	Анализ на 1-ва и 2-ра производна на привидното поглъщане D	15
3.3.	Влияние на кинетичните параметри върху протичането на ензимната реакция	18
3.4.	Представяне на пресказващ модел за установяване на конформационните изменения в белтъците по време на ензимна	19

	коагулация	
3.4.1.	Избор на най-информативна дължина на вълната	19
3.5.	Химична и термо-денатурация на млечни белтъци	23
3.5.1.	Термо-денатурация	23
3.5.2.	Химична денатурация	26
3.6.	Раманова спектроскопия при изследване на структурни изменения на млечни белтъци	30
3.7.	Флуоресцентна спектроскопия на млечни белтъци	35
3.7.1.	Флуоресцентна спектроскопия при термо-денатурация, промяна рН на средата и ензимна хидролиза на млечни протеини	37
3.7.1.1.	Триптофанова флуоресценция при изследване на конформационните преходи на НОПМ под действието на коагулиращ ензим	39
3.7.1.2.	Триптофанова флуоресценция при изследване на конформационните преходи на НОПМ под действието на температура	42
3.7.1.3.	Триптофанова флуоресценция при изследване на конформационните преходи на НОПМ под действието на рН	43
3.8.	Методи за изследване на микроструктурата на млечни белтъци	45
3.8.1.	Флуоресцентна микроскопия	45
3.8.2.	Атомно-силова микроскопия	49
4.	ОСНОВНИ ИЗВОДИ	49
5.	ПРИНОСИ	50
6.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	50
	СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ	51
	ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ	51
	ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА	52

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

НОПМ – натурално обезмаслено прясно мляко

СВОМ – сухо възстановено обезмаслено мляко

НСПМ – натурално сборно пълномаслено мляко

ВОИУ – влакнесто-оптично измервателно устройство

ККФК – казеинат-калциевофосфатен комплекс

ИЧ – инфрачервен

УВ – ултравиолетов

D – привидно поглъщане на светлината (оптична плътност)

R – корелационен коефициент

R^2 – коефициент на детерминация

RSS – сума от квадратите на остатъците

RMSE – корен квадратен от средноквадратичната грешка

DSC – диференциална сканираща калориметрия

АСМ – атомно силова микроскопия

АК – аминокиселини

РС – раманов спектър

ЕМИ – електромагнитно излъчване

ИВЕМ – изопотенциални възбудно-емисионни матрици

ДРС – динамично разсейване на светлината

УВОД

Въпросът как протеините се съгват в уникално, компактно, силно организирано, функционално активно състояние е един от основните въпроси на съвременната физика на кондензираното състояние на материята. Важна особеност на протеините е тясната връзка между тяхната геометрична структура и функциите, които те изпълняват. В нативна (водна) среда те могат да приемат няколко квазиустойчиви конформации, които съответстват на определен локален минимум на потенциалната енергия.

Поради своята сложност, стандартните методи за изследване на структурни изменения на протеини се прилагат само в специализирани лаборатории. Те са разрушителни, измерванията при тях отнемат време, изискват значителни финансови разходи и висока квалификация на обслужващия персонал.

Оптичните методи са съвременни, безконтактни и безразрушителни. Те притежават висока чувствителност и лесно се автоматизират. По точност не отстъпват на познатите инструментални методи за химичен анализ. Развитието и усъвършенстването на влакнесто-оптичните технологии през последните няколко години, позволи използването им за измерване на оптичните свойства на млечно-протеиновата дисперсна среда непосредствено по време на протичане на кинетичния процес.

Оптичните прибори могат да се управляват и от тях лесно да се получават дистанционно данни – посредством Data Loggers, ПК, ИЧ порт, оптични линии и др.

Проблемът с изследването на фолдинга на протеините все още е далеч от неговото решаване и продължава да бъде актуален и днес в научен и приложен аспект.

1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационната работа е разработване на оптичен метод за проследяване на процесите на структурни изменения на белтъците по време на ензимна коагулация в млека.

За постигането на тази цел са дефинирани следните задачи:

1. Избор и оценка на оптичен метод за проследяване на процесите на структурни изменения на белтъците по време на ензимна коагулация.
2. Експериментално проследяване на процесите на структурни изменения на белтъците по време на ензимна коагулация в млека съгласно разработения оптичен метод.
3. Провеждане на съпътстващи изследвания с други експериментални методи за сравнение и потвърждаване на получените резултати.
4. Оптимизиране на експерименталния метод за проследяване процесите на структурни изменения на белтъците по време на ензимна коагулация в млека с цел изясняване на физичната същност и евентуално моделиране и оптимизиране на тези процеси.
5. Описание на методиката за проследяване на процесите на структурни изменения на белтъците чрез физични методи по време на ензимна коагулация в млека.

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА РАБОТА

2.1. Материали

Краве мляко

За извършване на експериментите е използвано натурално сборно пълномаслено краве мляко (НСПМ), натурално обезмаслено прясно мляко (НОПМ) и сухо възстановено обезмаслено мляко (СВОМ).

Референтни експериментални образци

За нуждите на експеримента бяха използвани:

- пречистен казеин на прах – съдържание на протеини min. 92.00%, съдържание на мазнини 2.00%, общ азот 13.00-16.00%;
- L-Tryptophan на прах ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) – молекулно тегло $204.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, рН (1% във вода при 25°C) – 5.50–7.00;
- L-Tyrosine на прах ($C_9H_{11}NO_3$) – молекулно тегло $181.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; D-Phenylalanine ($C_9H_{11}NO_2$) – молекулно тегло $165.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$;
- Млекокоагулиращ ензим (телешки химозин), активност 1:10000 съгласно IDF 157:2007 и ISO 11815;
- 40% разтвор на CaCl_2 .
- буферни разтвори

2.2. Методи за изследване

Изследвани са етапи от протичането на ензимна коагулация на НОПМ, НСПМ и СВОМ, инокулирани с коагулиращ ензим (телешки химозин) с активност 1:10000 съгласно IDF 157:2007 и ISO 11815 с концентрация 30, 40 и 50 $\mu\text{l}/100 \text{ ml}$ и 40% разтвор на CaCl_2 .

При провеждане на изследването на млечни белтъци чрез спектрални методи е спазено условието в изследвания вълнов диапазон да няма значително поглъщане както за дисперсната среда, така и за средата в която се намират протеиновите частици (вода, серум). При тези условия цялото регистрирано от детектора преминало през обекта излъчване се определя единствено от разсейването. Тъй като агрегиралите белтъчни молекули притежават по-добра способност да разсейват светлината за разлика от неагрегиралите, затова при изследване кинетиката на агрегация на млечните белтъци по време на ензимна коагулация широко се използва метода при, който се измерва привидното поглъщане $D = \lg \frac{I_o}{I}$ във видимата област. Съществено предимство на този метод се състои в това, че позволява непрекъснатата регистрация на кинетичните криви.

Флуоресцентната микроскопия е извършена в катедра „Физиология на животните” на Биологически факултет на ПУ “П. Хилендарски”.

АФМ визуализацията на изследваните образци е извършена в катедра „Физика” на Физико-технологичен факултет на ПУ “П. Хилендарски”.

Турбидиметричното проследяване на структурните изменения, кинетиката на агрегация на млечните белтъци, влиянието на външни и вътрешни фактори върху кинетичните свойства на млечната полидисперсна система по време на ензимна коагулация,

химична и термо-денатурация е извършено в лабораторията по биофотоника на Катедра „Физика” на Физико-технологичен факултет на ПУ “П. Хилендарски”.

Топлинна денатурация на серумни белтъци е изследвана в катедра „Физика” на Физико-технологичен факултет на ПУ “П. Хилендарски”.

Раманова спектроскопия за изследване на изменението на вторичната структура на млечните протеини при химична и термо-денатурация е извършена в Катедра „Аналитична и компютърна химия” на Химически факултет на ПУ “П. Хилендарски”.

Флуоресцентна спектроскопия за изследване на структурните изменения на ензимни млечни белтъци при термо-денатурация е извършена в лабораторията по биофотоника на Институт по електроника към БАН гр. София.

2.2.1. Турбидиметрия

За постигане на поставената цел е конструирано и разработено влакнесто-оптично измервателно устройство, влизашо в състава на създадена експериментална установка, показана на Фиг. 2(*3.1 а).



Фиг. 1(*3.1а). Експериментална установка за изследване структурните изменения на млечни белтъци по време на ензимна коагулация, химична и термо-денатурация

Тя се състои от:

1. Влакнесто-оптично измервателно устройство.
2. Многофункционален модул оптично-влакнест мини спектрометър AVANTES.
3. Персонален компютър.
4. Водна баня с терморегулатор.

Влакнесто-оптичното измервателно устройство (ВОИУ) се състои от измервателен блок, две микрометрични масички, осигуряващи точно изместване и съосяване на

електродите с оптичните влакна (входно и изходно) по X, Y и Z, гониометрична масичка за завъртане на изходното влакно спрямо входното в диапазона от 0 до 90°, работна кювета и термостатна вана.

Измервателният блок на устройството, се състои от две оптични влакна с диаметър на сърцевината 200 μm , монтирани в специален канал на металните държачи, с ширина равна на диаметъра на оптичните влакна и фиксирани от пластина от същия материал с помощта на микровинтове. Челата на оптичните влакна са полирани под 90° спрямо остъта на влакното. С помощта на SMA конектори входното влакно се присъединява към източника на светлина, а изходното - към мини спектрометъра.

Металният държач на входното оптично влакно е фиксиран неподвижно в алуминиева конзола и може да извършва преместване по X, Y, Z с точност 0.01 mm, а изходното оптично влакно заедно с вторият държач са неподвижно фиксирани в алуминиева конзола монтирана върху гониометричната масичка на устройството.

Двете оптични влакна по време на експеримента са потопени неподвижно в цилиндрична кювета с диаметър 20 mm в която се поставя изследваният дисперсен разтвор, коагуланта и 40% разтвор на CaCl_2 . По време на експеримента в кюветата се поставят термометър и електрода на рН-метъра за непрекъснат контрол на температурата и рН по време на кинетичния процес. Дебелината на изследвания слой между челата на оптичните влакна е 200 μm . Работната кювета е потопена във водата на термостатната вана, в която постоянно циркулира вода от водният термостат и обратно, за да се поддържа температурата на дисперсната среда в диапазона $T=35\pm 1^\circ\text{C}$, необходимо условие за протичане на ензимната реакция.

Измененията в оптичната плътност (D) се регистрират от многофункционален влакнесто-оптичен спектрометър «AVANTES». Работният диапазон на мини спектрометъра е от 200 до 1100 nm и се осигурява от фиксирана дифракционна решетка с плътност на шрихите 300 линии/mm. Спектрометърът разполага с комбиниран деутериево-халогенен и импулсен ксенонов източник на светлина, реализирани във вид на самостоятелни модули.

Проведено е числено диференциране на данните от изменението на привидното поглъщане по време на ензимна коагулация, химична и термо-денатурация на мляко. Изчислените първа и втора производни на стойностите на (D) като функция от времето дават възможност за установяване на изменението на скоростта и ускорението на привидното поглъщане по време на процеса.

Направена е анализ на конформационните изменения, протичащи в белтъчните молекули, чрез оценка на скоростта на ензимната реакция, началната скорост на агрегация на млечните белтъци при ензимна коагулация, константата на скоростта k_1 , времето на полупревръщане $t_{1/2}$ на млечния белтък наполовина, средната продължителност на живот на белтъчните молекули θ зависеща единствено от константата на скоростта k_1 .

Предложен е алгоритъм на предсказващ модел чрез който са дефинирани най-информативните дължини на вълните, които възможно най-точно биха описали процесите протичащи в НОПМ, СВОМ и НСПМ и настъпващите конформации на съдържащите се в тях белтъци по време на ензимна коагулация, химична и термо-денатурация.

Направен е анализ на корелационните коефициенти R , коефициентите на детерминация R^2 , корен квадратен от средната квадратична грешка (RMSE), стандартна грешка, сумата от квадратите на остатъците (RSS) и показателят (Significance), получени при

проверка на корелацията между реално измерените и предсказани стойности на привидното поглъщане D

2.2.2. Диференциална сканираща калориметрия (ДСК)

Диференциалната сканираща калориметрия (ДСК) е извършена с диференциално сканиращ калориметър DSC 204 F1 Phoenix NETZSCH Geratebau GmbH (Germany). Проведено е изследване на ДСК термограми на НОПМ, СВОМ и НСПМ. Определени са следните параметри: температурата T_m , специфичният топлинен капацитет (C_p) на последователните преходи в термограмите и енталпията на прехода ΔH_{cal} .

Проведено е сравнение между резултатите от изследването на структурните изменения на серумни белтъци по време на термо-денатурация по метода на турбидиметрията и резултатите получени при ДСК на НОПМ.

2.2.3. Раманова спектроскопия

Измерването на Рамановите спектри на изследваните млечни образци, казеин и ароматни аминокиселини (L - Tryptophan, L - Tyrosine и D - Phenylalanine) е извършено на Раманов Фурие-спектрометър VERTEX 70 с приставка RAM II.

2.2.4. Флуоресцентна спектроскопия

За провеждане на флуоресцентните измервания е използван спектрофлуориметър FluoroLog 3 на HORIBA Jobin Yvon, Франция. Резолуцията на FluoroLog 3 е 0.2 nm. Ширината на процепа, през който преминава възбуждащото излъчване е 3 nm. При измерванията е приложено възбуждане с дължина на вълната в диапазона от 260 nm до 500 nm със стъпка 10 nm, а флуоресценцията се детектира в диапазона от 280 nm до 600 nm. С помощта на софтуерните продукти *TableCurve 3D v.4.0.01* и *OriginPro 8.5.0.SR1* данните за спектъра на флуоресценция са трансформирани в 3D спектрални профили и ИВЕМ.

Проведено е изследване на наличието на естествено срещащи се в млякото флуоресцентни съединения, важни за състава и технологичните му качества.

2.3. Методи за изследване микроструктурата на млечни протеини

2.3.1. Флуоресцентна микроскопия

Флуоресцентната микроскопия е извършена в затъмнена стая в Биологически факултет на ПУ "П. Хилендарски" на флуоресцентен микроскоп Leica DM1000, използвайки за възбуждане филтър BP 450-490 nm с делител на лъча RCP 510 и LP>515 nm.

Направени са серия от 9 снимки на флуоресцентните изображения на микроструктурата на млечните протеини на НОПМ през различни етапи от протичането на ензимна коагулация в продължение на 75 минути, през времеви интервали от 5 минути.

Изследваният препарат- протеиновата намазка е направен на тънък слой върху сухо обезмаслено стъкло. Изсушаването на намазката се извършва на стайна температура в ексикатор. Фиксира се във фиксатор 3-4 пъти. Фиксиращият разтвор се приготвя от равни части (1:1) спирт и етер. След фиксацията се изчаква пълното изпаряване от повърхността на стъклото на спирта и етера. Промиването е извършено с дестилирана вода. Използвани са чисти обезмаслени предметни стъкла промити с етанол.

Преди провеждане на измерването всеки препарат се оцветява с луминисциращ оцветител (акредин оранж или бромел етидий). За получаване на по-ясен образ, фронталната леща на имерсионният обектив с висока разделителна способност се потапя в капка имерсионно масло, показателя на пречупване на което е близък до показателя на пречупване на стъклото, увеличавайки по този начин разделителната способност на флуоресцентния микроскоп.

Проведено е изследване на разпределението на белтъчните частици по размери по време на ензимна коагулация на НОПМ с 32,5 µl коагулиращ ензим +20 µl CaCl₂

2.3.2. Атомно-силова микроскопия (AFM)

AFM визуализацията на изследваните препарати е извършена с атомно-силов микроскоп *Nanosurf easyScan2* (*Nanosurf AG, Switzerland*), кантилевер модел: Tap190A1-G с игла TAP190ALG, глава модел: EZ2-FlexAFM, повърхност на сканиране 2 µm. Сканирането е извършено в безконтактен режим.

За подготовката на експерименталните образци е използвана капка от получения млечен разтвор, която се нанася върху повърхността на сухо обезмаслено предметно стъкло. Така получения AFM-чип се оставя на стайна температура в ексикатор с влажен тампон. След приключване на тази процедура се извършва фиксиране на AFM-чипа в разтвор на 50% етанол в продължение на 10 минути.

Извършена е визуализация и регистрация на млечни белтъчни агрегати на (СВОМ) и (НОПМ). За подложка на AFM-чипа са използвани предметни стъкла 26 x 76 mm DELTALAB.

2.4. Физико-химичен анализ

Физико-химичният анализ на НОПМ, СВОМ и НСПМ е извършен в Лабораторията за изследване на мляко и млечни продукти “LB ЛАСТ”- Пловдив и Акредитирана Лаборатория за изпитване на хранителни продукти “АЛИМЕНТИ”, съгласно изискванията на БДС EN ISO/IEC 17025:2006. Основните физико-химични показатели на СВОМ са взети от сертификат на производителя при доставката.

Усреднените стойности на резултатите от направеният физико-химичен анализ на изследваните образци НОПМ и НСПМ са посочени в Таблица 1 (*7).

Таблица 1(*7) Основни физико-химични показатели на изследваните образци

Основни физико-химични Показатели	Мерни единици	Гранични Стойности	НОПМ	НСПМ	СВОМ
Активна киселинност	pH	6,7 – 6,5	6.9	6.85	6.78
Титруема киселинност по Тьорнер	°T	16 – 19	20.50	15.00	20.00
Плътност	kg/m ³	1028 – 1030	1.034	1.027	1.021
Съдържание на сухи вещества	%	12,81-12,88	9.55	17.5	10.3
Съдържание на общ белтък	%	3,05 – 3,21	3.33	3.15	3.67
Съдържание на казеин	%	2,41 – 2,60	2.44	2.31	2.58
Съдържание на мазнини	%	-	0.20	6.15	0.1

(* - номерацията е от дисертацията)

2.5. Методика на провеждане на експеримента

2.5.1. Ензимна коагулация

За да се изследва поведението на млечната полидисперсна среда, промяната на нейната структура при превръщането и в гел по време на ензимна коагулация последователно е измерена оптичната плътност (D) и пропускането (T) в диапазона от 250 nm до 1100 nm на НОПМ, СВОМ и НСПМ. Спектрите са регистрирани в диапазона от 250 до 1100 nm с резолюция от 0.6 nm, като измерването на тъмновия сигнал на спектрометъра и еталонния спектър се извършва преди анализа на всеки образец. Всички измервания са направени при температура $T^{\circ} = 35 \pm 1^{\circ}\text{C}$. За оценка на сходимостта на резултатите от измерването за всеки отделен образец са направени по 5 измервания на спектъра, като при анализа на спектрите е взета средно аритметичната стойност от петте измервания.

Изследването на ензимна коагулация е проведено по следният начин. Подготвените образци от НСПМ, НОПМ и СВОМ с обем 100 ml предварително се загряват до 40°C след, което се хомогенизират с помощта на хомогенизатор за емулгиране на млечни образци с вибрационна помпа и двустепенна хомогенизираща глава. Така хомогенизираните млечни образци се термостатират на термостат на водна баня при температура $T^{\circ} = 35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ и при достигане на оптималната температура за начало на процеса ензимна коагулация се добавя коагулиращият ензим (химозин) в количество 30, 40 и 50 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$. След разбъркване в продължение на 30 секунди, млякото се поставя в работната кювета на ВОИУ за измерване на спектрите на поглъщане/пропускане. По време на измерването се изключва всякакво попадане на пряка светлина върху изследвания образец и приемащото оптично влакно, защото всички измервания са извършени в затъмнено помещение.

Преди поставяне на коагуланта се извършва регистрация на температурата ($T^{\circ}\text{C}$), активната киселинност (pH) и спектъра на поглъщане и пропускане, които при обработката на резултатите от измерването се приемат за референтни за съответното измерване. Следят се непрекъснато pH и $T^{\circ}\text{C}$, като температурата в кюветата не трябва да надхвърля предварително зададената граница от $\Delta T = \pm 1^{\circ}\text{C}$. За всяка концентрация на коагуланта са направени по десет (десет) експеримента и получените резултати са усреднени. Останалата част от приготвения млечен разтвор 35 ml с добавен коагулиращ ензим се използва за осъществяване на паралелен визуален контрол на ензимната коагулация.

2.5.2. Термо-денатурация

Изследването на структурните изменения на серумни белтъци при термо-денатурация е извършено с помощта на ВОИУ Фиг. 1(*3.1a) при дебелина на изследвания слой млечна емулсия 200 μm и сканиращ светлинен източник излъчващ във вълновия диапазон от 350 nm до 1050 nm със стъпка $\Delta\lambda = 50\text{ nm}$. Снета е зависимостта на оптичната плътност D от температурата в диапазона от 28°C до 81°C със стъпка от 1°C . Обект на изследването е НОПМ. При изследване на структурните изменения на млечни белтъци с помощта на ДСК, използваните образци от НОПМ, СВОМ и НСПМ са предварително лиофилизирани като технологичният процес съчетава два метода на консервиране – замразяване и изсушаване в условията на висок вакуум с продължителност минимум 24 часа. От получените лиофилизирани образци е отделен материал около 40 mg за провеждане на изследването.

При измерване на флуоресценция на белтъци при термична денатурация, температурният диапазон е от 20°C до 90°C.

2.5.3. Химична денатурация

За изследване на структурните изменения на млечните белтъци при химична денатурация е използвано НОПМ с обем 65 ml и температура 25°C, като към него е добавен разтвор от урея с концентрация 2M, 4M и 8M в съотношение 3:1. Количеството на денатуранта е избрано експериментално. Оценката за степента на протичане на химична денатурация на млечни белтъци е извършена на експерименталната установка Фиг. 1(*3.1a).

2.6. Използван софтуер и статистическа обработка на експерименталните резултати

Статистическият анализ, математическото моделиране и графичното оформление на получените резултати са извършени с помощта на софтуерите *OriginPro v.8.5.*, *Gwyddion 2.42*, *TableCurve 3D v.4.0*, *SPSS 17.0*, *Excel(MSOffice)*. Получените данни са обработени чрез дисперсионен анализ при доверителен интервал от 95 % и грешка $\alpha = 0,05$.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

3.1. Изследване на кинетиката на ензимна коагулация на млечни белтъци

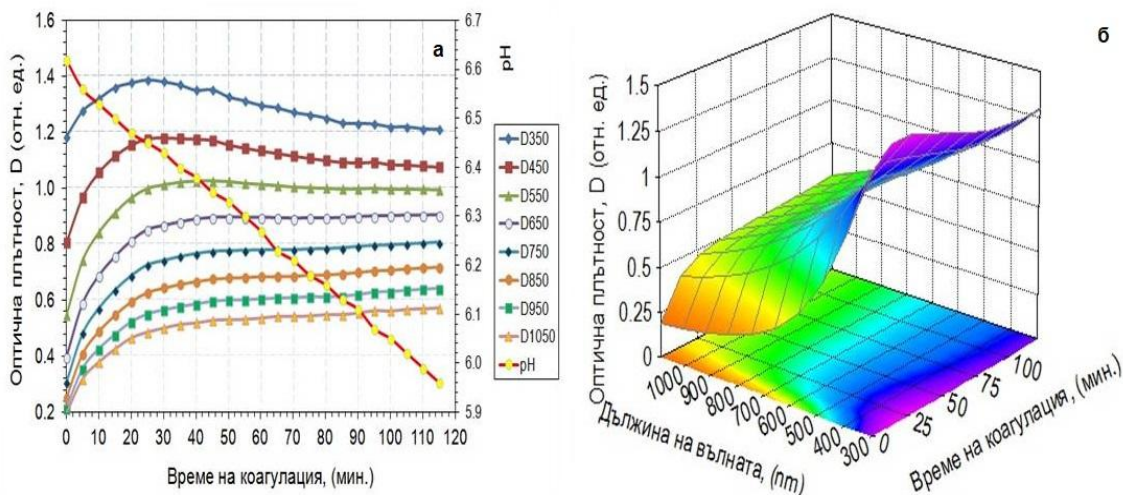
Три са основните кинетични процеси, които представляват интерес за ензимната коагулация на млякото: ензимна хидролиза на *k*-казеин, флокулация на казеиновите мицели и формиране в динамика на омрежена гел-структура. Ензимната хидролиза е първата стъпка при коагулация на млякото. Реакцията включва хидролиза на *k*-казеин, флокулация на казеиновите мицели и образуване на пара- *k* -казеин и макропептид. Реакцията следва кинетиката на Michaelis-Menten [128].

В полидисперсната система на млякото обикновено кривата, представляваща връзката между агрегацията на млечните белтъци и времето на коагулация, приема S-образна форма. Характерните кинетични криви на поглъщане, получени при различна концентрация на млечния белтък, за трите вида изследвани млека, са представени на Фиг.2(*4.1), Фиг.3(*4.2) и Фиг.4(*4.3).

След инакулацията на коагулиращия ензим, оптичната плътност *D* започва бързо да нараства или почти не се променя през вървите няколко минути от индукционният период, а след това рязко се повишава. Това е свързано с началото на процеса коагулация и с формирането на първите мицеларни агрегати.

От началото на ферментативния период до началото на явната коагулация протича известно време, наречено лаг – период (Фиг. 3(*4.2) и Фиг.4(*4.3).

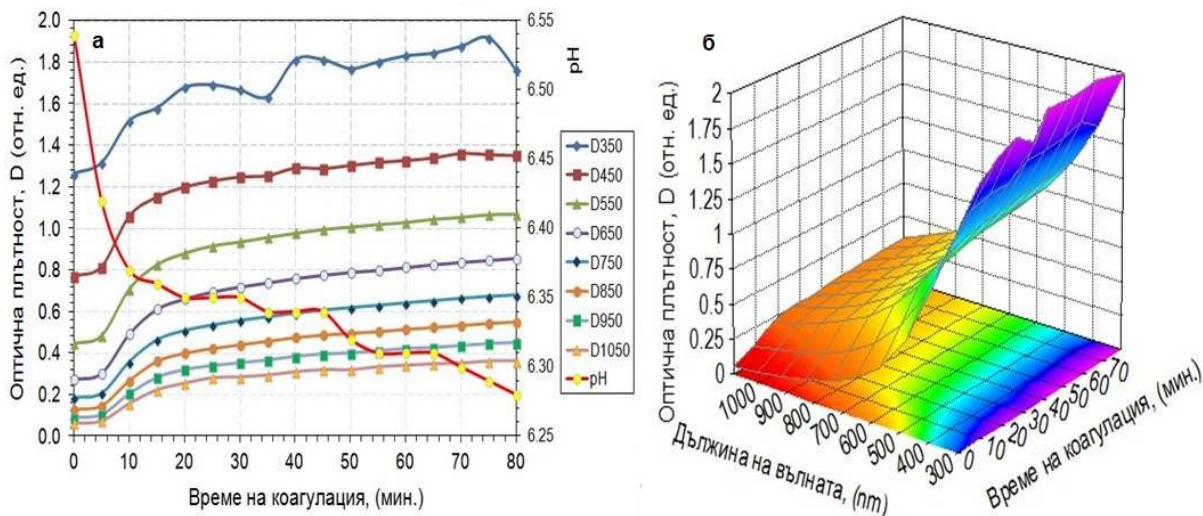
Кинетичните криви на поглъщане са получени с помощта на ВОИУ като е измерено привидното поглъщане (*D*) през времеви интервали от 5 минути. Източникът на светлина е с дължина на вълната в диапазона от 350 nm до 1050 nm със стъпка 100 nm, съобразен със средният размер на диспергираните в средата казеинови мицели.



Фиг.2(*4.1). Кинетични криви на поглъщане (а) и 3D профил на зависимостта на оптичната плътност (D) от времето на коагулация (б) на НОПМ

На фигурите са представени 3D профилите на оптичната плътност D от времето на коагулация при концентрация на коагулиращия ензим: $32,5 \mu\text{l} + 20\mu\text{lCaCl}_2$ за НОПМ, СВОМ и НСПМ.

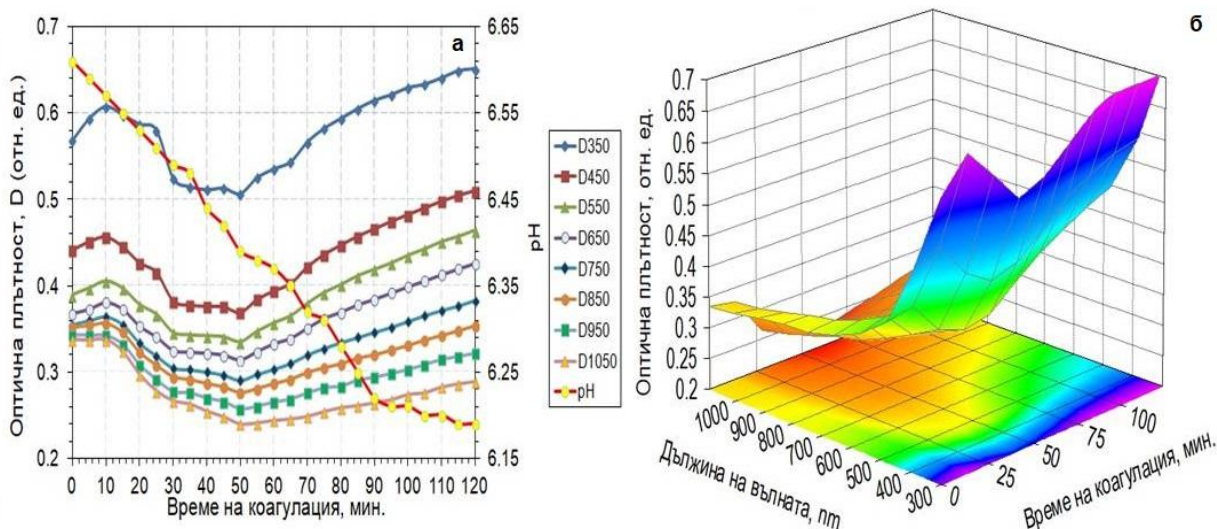
По аналогичен начин са определени кинетичните криви за трите изследвани вида млека (НОПМ, СВОМ и НСПМ) за всички използвани концентрации на коагулиращия ензим. Установена е максималната стойност на привидното поглъщане на белтъците по време на превръщането на емулсията в гел под действието на коагулиращ ензим и CaCl_2 , скоростта на протичане на ензимната реакция ($k_1 D_{\text{lim}}$), както и константата на скоростта (k_1) на ензимната реакция за различните концентрации на млечен белтък.



Фиг.3(*4.2). Кинетични криви на поглъщане (а) и 3D профил на зависимостта на оптичната плътност (D) от времето на коагулация (б) на СВОМ

Уравнението, най-добре описващо кинетичната реакция има експоненциален вид: $y = D_{\text{lim}} [1 - \exp(-k_1 t)] + C$, където t е времето на протичане на кинетичната реакция.

Използваното уравнение и направените чрез него апроксимации показват, че процеса на агрегация по време на етапа през, който най-активно се осъществяват структурните промени в млечно-протеиновата полидисперсна среда, описва реакция от първи порядък.



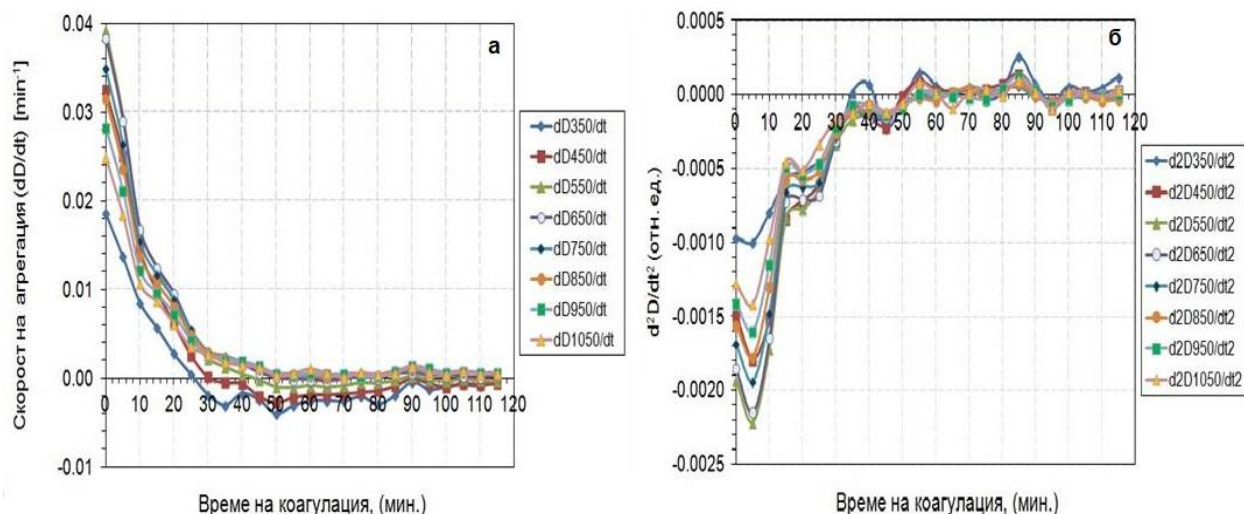
Фиг.4(*4.3). Кинетични криви на поглъщане (а) и 3D профил на зависимостта на оптичната плътност (D) от времето на коагулация (б) на НСПМ

3.2. Анализ на 1-ва и 2-ра производна на привидното поглъщане D

Поради частично препокриване на спектрите на поглъщане на отделните компоненти в поликомпонентните дисперсни среди по време на кинетичната реакция, линиите на поглъщане са слабо очертани в общия спектър. В този случай линиите за анализ се подбират въз основа на изменението на спектъра на първата и втора производни на оптичната плътност, спрямо времето на коагулация.

На Фиг. 5(*4.4), 6(*4.5) и 7(*4.6) са показани първите $\frac{dD}{dt}$ и втори $\frac{d^2D}{dt^2}$ производни на оптичната плътност за трите вида млечни образци (НОПМ,СВОМ и НСПМ) при концентрация на ензима $32,5\mu\text{l}+20\mu\text{lCaCl}_2$.

Експериментите показаха, че обикновено през първите 10 минути от началото на ензимната реакция настъпват най-съществени промени в спектъра на претърпяващите структурни конформации млечни белтъци. От графиките се вижда, че нулевите стойности на производните с не четен порядък съвпадат с екстремумите на производните на функцията от четен порядък и изходния спектър на поглъщане в зависимост от времето на протичане на ензимна коагулация. От своя страна екстремумите на производните от не четен порядък се доближават до инфлексните точки на производните от четен порядък и изходния спектър.

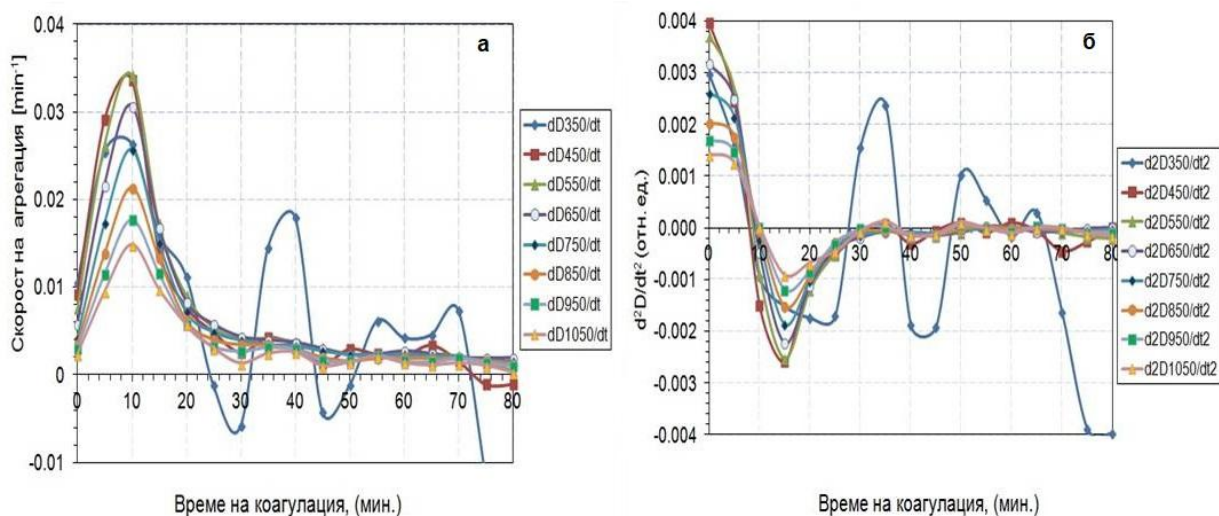


Фиг. 5(*4.4) Първа (а) и втора (б) производна на привидното поглъщане за НОПМ

Ензимната коагулация на млечни белтъци следва кинетичната реакция от първи порядък, а зависимостта на първата производна от времето има експоненциален характер.

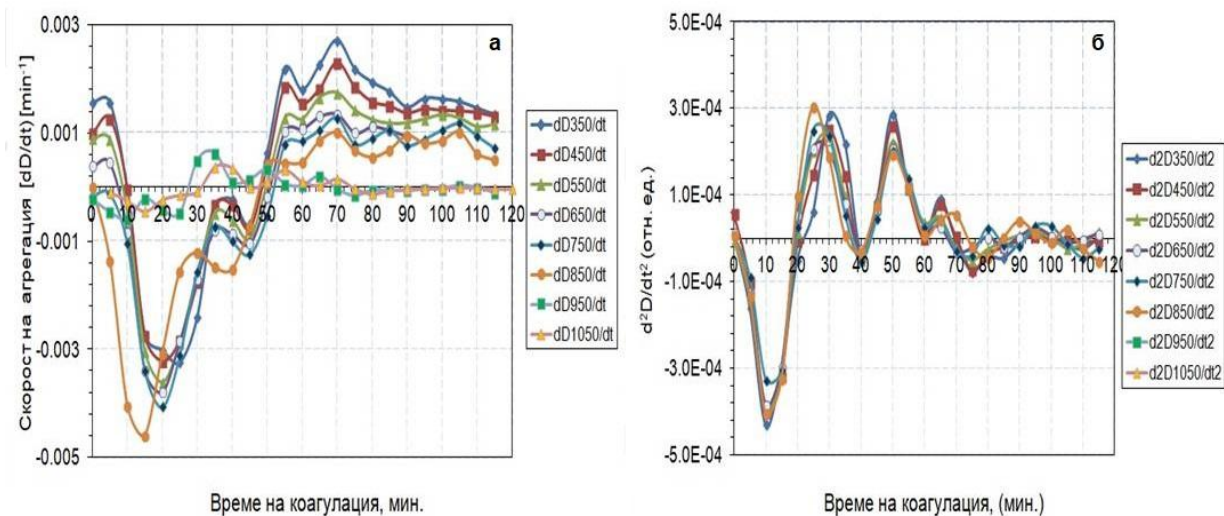
При разглежданите кинетични криви на НОПМ, стойността на $\frac{dD}{dt}$ при $t \rightarrow \infty$ се стреми към 0, като това е по-ясно изразено за дължини на вълната от по-късовълновия диапазон (350 nm и 450 nm), където и наклона на кривите е по-голям.

От направените графични зависимости на първата производна $\frac{dD}{dt}$ на привидното поглъщане от времето Фиг. 5(*4.4) може да се направи извода, че през първият и особено през вторият етап от ензимната реакция скоростта е най-висока и значително намалява през етапа на формиране на гела и синерезиса. Както беше споменато вече е ясно, че скоростта на кинетичната реакция също така зависи и от концентрацията на коагулиращия ензим.



Фиг. 6(*4.5) Първа (а) и втора (б) производна на привидното поглъщане за СВОМ

На база на установените инфлексни точки върху кривите на първа и втора производна на оптичната плътност могат да бъдат разграничени четири региона, характеризиращи се с различна динамика в скоростта и ускорението на протичащия процес (фигура 5(*4.4), 6(*4.5) и 7(*4.6)). Установените инфлексни точки са в съответствие с физико-химичните изменения в структурата на казеиновите мицели, настъпващи по време на ензимната реакция в млякото.



Фиг. 7(*4.6) Първа (а) и втора (б) производна на привидното поглъщане за НСПМ

Първият регион от 0 до 5-10 минута включва ферментативен и период на скрита коагулация през, който млечната емулсия практически не променя своите реологични и оптични свойства. Не се наблюдава склонност на казеиновите мицели да флокулират въпреки, че хидролизата на κ -казеина вече е започнала и дисперсната система губи своята устойчивост.

След завършване на индукционният период, това е вторият етап от агрегацията между 10-та и 20-та минута, формирането на структурата продължава с намаляваща скорост. В началото се осъществява агрегация на отделни параказеинови частици т.е. така наречената флокулация. Този етап продължава, докато се хидролизира достатъчно количество κ -казеин, за да се намали потенциалната бариера между мицелите до точка, откъдето започва бързата флокулация.

Третият етап от агрегацията между 20-та и 40-та минута е свързан с уплътняване на белтъчната структура, а за четвърти етап след 40-та минута условно може да се смята синерезиса, т.е. изхвърляне от вътрешността на белтъчната молекула на свързаната вода.

Предполага се, че увеличаването на привидното поглъщане на светлината е свързано преди всичко с ръста на вече обособилите се ядра на белтъчните агрегати и присъединили се към тях разгънати белтъчни вериги. Успоредно на основния процес на агрегация може да протича значително по-бавна асоциация на ядрата на агрегатите. Преминаването на кинетичната крива на относително линеен участък в по-късните времеви интервали на кинетичната реакция означава, че се осъществява слепване (обединяване) на ядрата на белтъчните агрегати в по-големи агломерати.

Освен това, в хода на изследването е установено, че скоростта на кинетичната реакция и по-специално наклонът на кривата се влияе от дължината на вълната на светлинния източник, което е показател как и с каква продължителност светлинните кванти взаимодействат с белтъчните частици в млякото. Разбираемо е, че скоростта на химичната реакция постоянно се променя, така както се променя и концентрацията на участващите в ензимната реакция белтъци.

Производните на спектъра на привидното поглъщане като функция от времето на протичане на процеса на ензимна коагулация са изчислени с помощта на програмно осигуряване OriginPro 8.5.

3.3. Влияние на кинетичните параметри върху протичането на ензимната реакция

Установена е зависимостта за времето на полупревръщане $t_{1/2}$ който представлява времето за което изходната концентрация на участващите в процеса млечни белтъци намалява наполовина:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1}$$

От тази зависимост следва, че при кинетични реакции от първи порядък каквато е ензимната коагулация на мляко, параметърът $t_{1/2}$ не зависи от изходната концентрация на участващите в реакцията белтъци, а само от константата на скоростта k_1 . Константата на скоростта характеризира също така средната продължителност на живот на участващите в реакцията белтъчни молекули, тъй като по време на процеса на протичане на химичната реакция едни молекули реагират практически веднага, а някои от тях остават в първоначалното си не агрегирало състояние до края на процеса. Средната продължителност на живот на белтъчните молекули θ при всички реакции от първи порядък е равна на реципрочната стойност на константата на скоростта k_1 , или:

$$\theta = \frac{1}{k_1}$$

В Таблица 9 на дисертационният труд са представени стойностите на времето на полупревръщане $t_{1/2}$ и средната продължителност на живот на белтъчните молекули θ в зависимост от константата на скоростта k_1 за целия изследван спектрален диапазон. Получените резултати са показателни за това, че в млечно-протеиновата дисперсна среда на НСПМ, в която съдържанието на общ белтък (3,15%) и казеин (2,31%) е най-малко за разлика от НОПМ, където съдържанието на общ белтък (3,33%) и казеин (2,44%) и СВМ, където съдържанието на общ белтък (3,67%) и казеин (2,58%) е по-голямо, времето на полупревръщане $t_{1/2}$ на млечния белтък наполовина е най-кратко. То зависи от дължината на вълната на светлинния източник, като кванти с по-голяма дължина на вълната по-дълго време взаимодействат с белтъчните молекули. Същата тенденция се наблюдава и при

показателя средна продължителност на живот на белтъчните молекули θ , който също зависи от дължината на вълната на светлинния източник.

3.4. Представяне на предсказващ модел за установяване на конформационни изменения в белтъци по време на ензимна коагулация

Направен е сравнителен анализ на резултатите от изследването и начинът за неговото валидиране. На база на направения анализ на корелационните коефициенти R , коефициентите на детерминация R^2 , корен квадратен от средната квадратична грешка (RMSE), стандартна грешка, сумата от квадратите на остатъците (RSS) и показателят (Significance), получени при проверка на корелацията между реално измерените и предсказани стойности на привидното поглъщане D по време на ензимна коагулация, са дефинирани най-информативните дължини на вълните, които възможно най-точно биха описали процесите протичащи в млечно-протеиновите дисперсни среди и настъпващите структурни промени в тях по време на ензимна коагулация.

3.4.1. Избор на най-информативна дължина на вълната

Избраният оптичен диапазон от 350 nm до 1050 nm има за цел да изследва влиянието на различни монохроматични светлинни източници, различаващи се по дължината на вълната с интервал от 100 nm, върху изменението на D , скоростта на кинетичната реакция, началната скорост и количеството агрегирал белтък, през различните етапи на ензимна коагулация. В настоящото изследване по-специално внимание е обърнато на видимия диапазон, където монохроматичните светлинни източници и детекторите са значително по-евтини и достъпни. За разлика от анализа в ИЧ диапазон, видимата и близката ИЧ области са по-слабо чувствителни към компоненти различни от млечните белтъци, което дава несъмнено предимство при тяхното изследване.

От направените изследвания на спектрите на поглъщане на НОПМ, СВОМ и НСПМ представени съответно на Фиг. (*3.2), (*3.3) и (*3.4) в дисертационния труд отчитайки условието в изследвания вълнов диапазон да няма значително поглъщане както за дисперсната среда, така и за средата в която се намират протеиновите частици (вода, серум) се вижда, че в диапазона от 550 nm до 750 nm за целият период на коагулация изменението на оптичната плътност (D) е както следва:

За НОПМ – от 0.067 до 0.0147 ; За СВОМ – от 0.417 до 0.519; За НСПМ – от 0.098 до 0.125.

По данните от измерването на спектрите на поглъщане на изследваните млечни образци, както и от направеният регресионен анализ във вълновият диапазон от 550 nm до 750 nm се наблюдава незначителна разлика в поглъщането както между отделните времеви интервали на протичане на ензимната коагулация, така и между началото и края на кинетичната реакция.

За да бъде потвърдена или отхвърлена идеята за избор на най-оптимална дължина на вълната на светлинното излъчване, апроксимацията на експерименталните резултати от измерената оптична плътност и нейното изменение през различните етапи на протичане на процеса за различните млечни образци е извършена с помоща на различни функции по

метода на най-малките квадрати. Най-голяма точност е получена при използването на апроксимационна функция от вида - $y = D_{i,n} [1 - \exp(-k_1 t)] + \zeta$, където t е времето на протичане на кинетичната реакция.

Използван е метод частична регресия на най-малките квадрати. Точността на полученият модел е проверена посредством коефициентите на регресия R и на детерминация R^2 и грешките - RSS (сума от квадратите на остатъците), RMSE (корен квадратен от средноквадратична грешка), стандартна грешка и параметъра (Significant).

Изчислените минимални стойности за грешките и максимални за R и R^2 са получени с помощта на избраното регресионно уравнение в избрания доверителен интервал от 95% и грешка $\alpha = 0,05$. Направеният линеен регресионен анализ показва, че силата на връзката между измереното и предсказано привидно поглъщане при НОПМ с концентрация на ензима 32,5 μl +20 μl CaCl_2 е много силна. Показател за това е коефициента на корелация $R = 0.9992$. Това означава, че и най-малките промени в параметрите на D проявени чрез построената кинетична крива са резултат от настъпили изменения в структурата на млечните протеини.

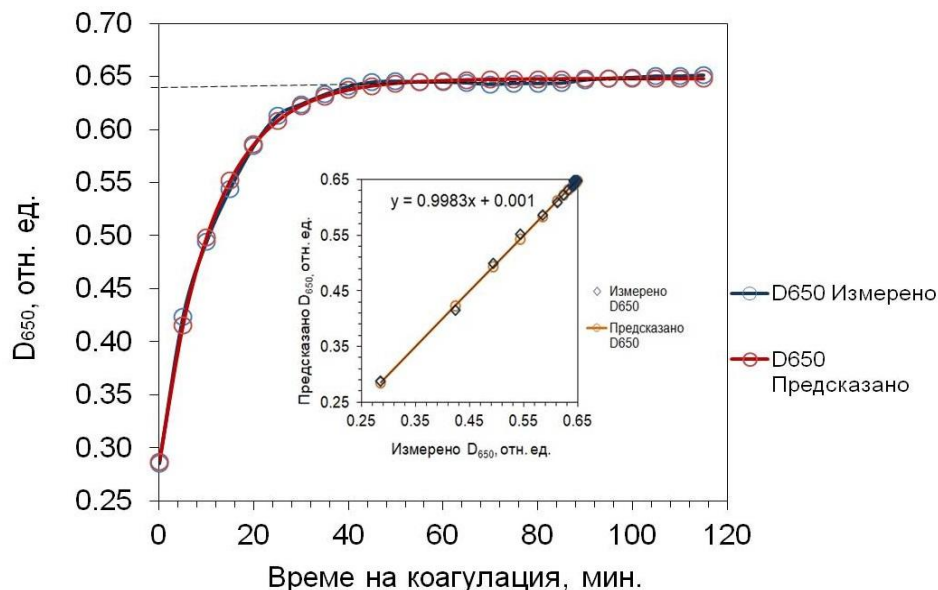
Таблица 10 от дисертационният труд показва, че използването на монохроматични източници с дължина на вълната $\lambda = 650 \text{ nm}$ дава най-високи стойности за коефициент на детерминация $R^2=0,9983$ при прогнозиране на структурните изменения на диспергирания в средата млечен белтък, като нивата на грешките за тази дължина на вълната са минимални: Standart Error = 0.0037, RMSE = 0.0038, RSS = 0.0003 и нивото на значимост (Significance = $4.6 \cdot 10^{-32}$).

Коефициентът на детерминация R^2 е показател, че почти цялата енергия на монохроматичният източник (99, 8 %) се използва за регистриране на всички протичащи по време на кинетичната реакция структурни промени, а показателят Significance показва много малка вероятност, че процесът може да протече по различен от направеният чрез прогнозата начин и структурните изменения да настъпят във времеви интервали различни от предсказаните. От това следва изводът, че всяка промяна в D на светлината както и скоростта с която протича кинетичната реакция показва кога, с какъв интензитет и колко бързо настъпват протичащите в млечно-протеиновата среда структурни промени по време на ензимна коагулация.

Установено е, че с намаляване концентрацията на коагулиращия ензим от 32,5 μl +20 μl CaCl_2 до 19,5 μl +20 μl CaCl_2 , точността на измерването на привидното поглъщане D се измества към близкия ИЧ диапазон към дължина на вълната $\lambda \sim 750 \div 850 \text{ nm}$.

Следователно, основавайки се на резултатите обобщени в Таблица 10 може да се каже, че изследването на структурни изменения в млечните белтъци на НОПМ, с най-ниско съдържание на млечна мазнина 0,2 % е най-добре да се извършва с монохроматични светлинни източници излъчващи във видимия диапазон. Вероятността да настъпят случайни флукуации в промяната на структурата на млечния гел по време на ензимна коагулация, изразяващи се в промяна на интензитета на разсейване на светлината върху кинетичните криви е много малка и е от порядъка $1,69 \cdot 10^{-17}$ при използване на коагулиращ ензим с концентрация 19,5 μl + 20 μl CaCl_2 до $4,58 \cdot 10^{-32}$ при използване на коагулиращ ензим с концентрация 32,5 μl + 20 μl CaCl_2 .

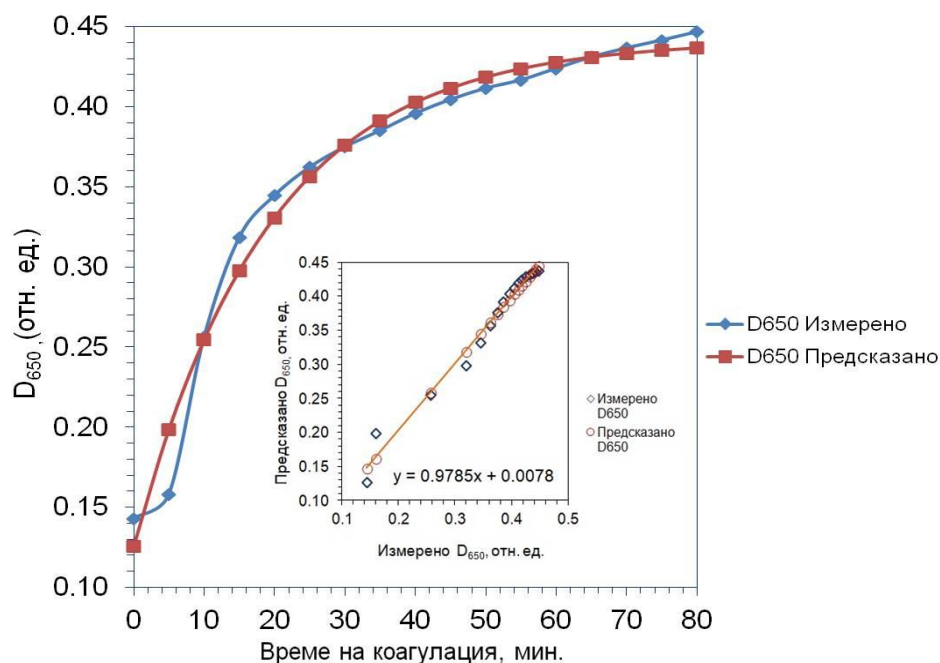
На Фиг. 8(*4.8) е показана високата степен на корелация между кинетичните криви на измереното и предсказано привидно поглъщане ($D=f(t)$) при най-информативната дължина на вълната $\lambda=650$ nm за НОПМ.



Фиг. 8(*4.8). Измерени и предсказани стойности на привидното поглъщане (D) при най-информативната дължина на вълната $\lambda=650$ nm за НОПМ

Аналогично алгоритъмът на предсказващият модел е приложен за СВОМ и за НСПМ. Резултатите от направеният регресионен анализ за СВОМ и НСПМ са представени в Таблица 11 и Таблица 12 на дисертационният труд. Аналитичните модели с измерените и прогнозни стойности на привидното поглъщане за СВОМ и НСПМ експериментални образци са представени на Фиг. 9(*4.10) и Фиг. 10(*4.12). Моделите са построени съответно за най-информативните дължини на вълните.

Както се вижда от Таблица 11, коефициентът на детерминация R^2 приема много близки стойности за дължини на вълните на светлинния източник в диапазона от 650 nm до 1050 nm. Нивото на значимост (Significance) при така избрания вълнов диапазон (650 – 1050 nm) е от порядъка на 10^{-14} за всяка една дължина на вълната от диапазона, което ни дава основание да предположим, че използването на всяка една дължина на вълната от избрания вълнов диапазон би довело до разлика в прогнозата в размер на 0,06 % въз основа на изчислените коефициенти R^2 и до разлика в прогнозата в размер на 0,7 % на база направените изчисления за RMSE, което е много по-малко за избраният доверителен интервал от 95 % и грешка $\alpha = 0,05$ (5 %).



Фиг. 9(*4.10). Измерени и прогнозни стойности на привидното поглъщане (D) при най-информативната дължина на вълната $\lambda = 650 \text{ nm}$ за СВОМ

При СВОМ, където общото съдържание на разтворен белтък е най-високо (3,67 %) най-информативни се оказаха светлинни източници с дължини на вълната във видимия VIS от 650 nm до 750 nm и в близкият ИЧ спектрален диапазон от 850 до 1050 nm.

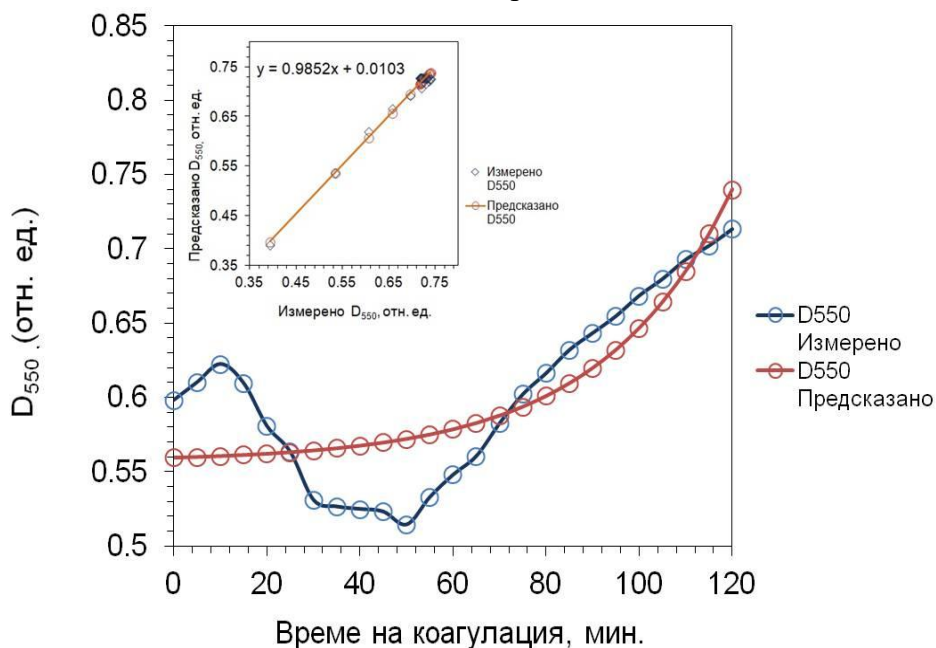
При тези изследвани образци, вероятността да настъпят случайни флуктуации в промяната на структурата на млечния гел по време на ензимна коагулация, изразяващи се в промяна на интензитета на разсейване на светлината върху кинетичните криви също е много малка и е от порядъка на 10^{-14} .

При НСПМ, където количеството на разтворен общ белтък (3,15 %) и казеин (2,31 %) са най-ниски, диапазона с дължини на вълните на монохроматичният източник значително се стеснява и обхваща източници с дължини на вълните от $\sim 550 \text{ nm}$ до $\sim 750 \text{ nm}$. Направеният регресионен анализ показва, че по-голямо предпочитание се отдава на източници с $\lambda = 550 \text{ nm}$, където силата на връзката между факторните променливи (интензитет на разсейване и ниво на структурни промени) е най-силна ($R = 0,8347$). Коефициентът на детерминация $R^2 = 0,6968$ е най-нисък в сравнение с останалите изследвани образци. Направените изчисления за грешките показват стойности по-малки от грешката $\alpha = 0,05$ (5 %) за избраният доверителен интервал от 95 % (Таблица 12). Избраният регресионен модел е адекватен при установеното ниво на значимост (Significance = $2,1 \cdot 10^{-7}$).

Изчислените грешки показаха, че получените резултати за привидното поглъщане на светлината, са статистически значими (Significance) в избраният доверителен интервал от 95 % и грешка $\alpha = 0,05$. Показателят „Значимост” от Табл. 12 показва каква е вероятността, че случайна величина със същото разпределение при изпълнение на нулевата хипотеза, ще се различава от фактически измерената при експеримента.

Въпреки, че в НСПМ, процентът разтворен общ белтък и казеин е най-нисък – 3,15 % за общ белтък и 2,31 % за казеин, вероятността от появата на отклонения в получените резултати на интензитета на разсейване при анализа на структурните изменения на белтъците по време на кинетичната реакция е най-голяма: от $0,005$ при използване на коагулиращ ензим с концентрация $19,5 \mu\text{l} + 20\mu\text{l CaCl}_2$ до $2,13 \cdot 10^{-7}$ при използване на коагулиращ ензим с концентрация $32,5 \mu\text{l} + 20\mu\text{l CaCl}_2$.

Можем да приемем, че приложеният линеен регресионен модел е адекватен за всички изследвани образци и съответните факторни променливи, а получените резултати са статистически значими в избраният доверителен интервал от 95 % и грешка $\alpha = 0,05$. Основание за това ни дава равнището на значимост на F – критерия, означено като Significance F, чийто стойности са по – малки от грешката $\alpha = 0.05$.



Фиг. 10(*4.12). Измерени и прогнозни стойности на привидното поглъщане (D) при най-информативната дължина на вълната $\lambda=550 \text{ nm}$ за НСПМ

Както се вижда от Фиг. 10(*4.12), 9(*4.10) и 8(*4.8), съществува удовлетворителна корелация между измерените и прогнозни стойности на привидното поглъщане по време на ензимна коагулация. Тези резултати могат да се разглеждат като потвърждение на идеята за съществуване на пропорционалност между мътността на разтвора и количеството агрегирал млечен белтък.

3.5. Химична и термо- денатурация на млечни белтъци

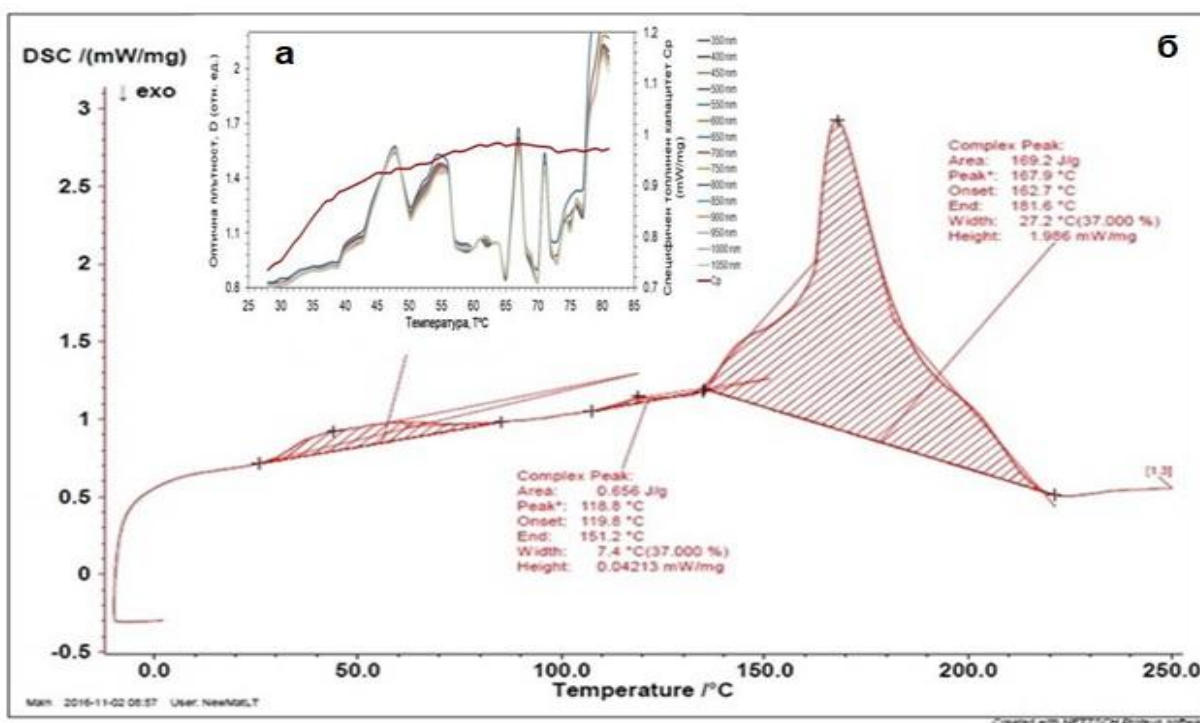
3.5.1. Термо- денатурация

Топлинната денатурация на глобуларните белтъци обикновено протича в два етапа, като през първият се извършва както обратима, така и необратима денатурация. През вторият етап агрегират само необратимо денатуриралите белтъчни молекули.

Изследването на структурните изменения на млечните белтъци през първият етап от денатурацията е извършено по два метода – оптичен и термокалориметричен. Първият – по метода на турбидиметрията с помощта на ВОИУ Фиг. 2(*3.13а) и вторият – чрез ДСК с калориметър DSC 204 F1 Phoenix NETZSCH Geratebau GmbH (Germany). Обект на изследването при турбидиметричния метод е НОПМ. Проведени са измервания на ДСК на НОПМ, СВОМ и НСПМ.

Усредненият резултат на спектъра на поглъщане през целия период на протичане на процеса при увеличаване на температурата през интервали от 5 (пет) °С, отразяват зависимостта на светлинният поток регистриран от фотодатчика, с дължина на вълната λ от 200 до 1100 nm, който преминава през тънък слой от 200 μm на изследвания образец, от температурата на дисперсната среда в работната кювета на прибора. Изследването е проведено в температурен интервал от 25°C до 81°C. Измерванията на структурните изменения на млечните белтъци с помощта на ДСК са проведени при скорост на загряване 0,25°/min. в температурен диапазон от 0°C до 250°C.

На 11(*Фиг.4.13 а и б) е представена зависимостта на оптичната плътност D и pH от температурата на загряване на образца $T^\circ\text{C}$ и калориметричният ДСК профил на НОПМ.



Фиг. 11(*4.13). Зависимост на оптичната плътност D и pH от температурата (а); Калориметричен ДСК профил на натурално обезмаслено прясно мляко (НОПМ) (б)

Върху калориметричния профил на изследваните млечни образци (НОПМ и СВОМ) се наблюдават основно четири максимума, а при НСПМ - пет. Първият максимум съответства на т.н. *Transition temperature* T_{tr} , или температурата при която се осъществява преход в структурата на белтъчната молекула „глобула – клъбо”. Първият ниско температурен фазов преход се дължи на конформацията на серумните белтъци α –

лакталбумин и β -лактоглобулин, които по литературни данни денатурират при температура в диапазона 62÷78°C. За НОПМ (Фиг. 11(*4.13 б) температурният интервал, през който се осъществява този структурен преход е от 29,7°C до 67,9°C с максимум при 60,9°C, за НСПМ структурният преход е от 43,5°C до 77,6°C с максимум при 69,8°C, а за СВОМ – структурният преход се извършва от 22,08°C до 74,6°C с максимум при 64,08°C. Последният максимум от фигурата отговаря на температурата, при която настъпва пълна денатурация и разрушаване на структурата на белтъка.

В Табл. 13 от дисертационният труд са представени термодинамичните параметри на ДСК профилите на изследваните млечни образци, където $T_{m1} \div T_{m5}$ са температурите на калориметричните преходи; $\Delta H_{cal1} \div \Delta H_{cal5}$ – енталпия на прехода; $C_{p1} \div C_{p5}$ – специфичен топлинен капацитет на прехода. Номерът след символа на термодинамичният параметър показва номера на термодинамичният преход върху ДСК – термограмите.

От резултатите посочени в Табл. 13 се вижда, че при НОПМ най-висок е топлинния капацитет на четвъртия преход $C_{p4} = 1,986 [mW/mg]$, което означава, че термодинамичната система на НОПМ ще погълне най-много енергия от околната среда за да може белтъчната молекула да се разгъне и да осъществи структурна конформация. Третият преход е кооперативен и непосредствено предхожда четвъртият при, който се поглъща най-много енергия. Той, най-вероятно е свързан с дестабилизацията на остатъчни структури β -лактоглобулин. Високият специфичен капацитет C_p на денатурирания белтък при прехода е следствие на увеличената контактна повърхност между хидрофобните групи и водата при частично или пълно разгъване на структурата на белтъчната молекула.

Най-много енергия поглъща системата за разгъване на белтъчната глобула и осъществяване на денатурация на казеина. Най-малко енергия от околната среда поглъща системата при денатурацията на серумните белтъци, които са най-термо лабилната част от дисперсна среда на млякото. Това са първи $C_{p1} = 0.129 [mW/mg]$ и втори $C_{p2} = 0.042 [mW/mg]$ ендотермичен преход.

Аналогично, от ДСК-термограмите са получени термодинамичните параметри на останалите два изследвани млечни образца СВОМ и НСПМ.

От направеният корелационен анализ на зависимостите на оптичната плътност от температурата при използваните дължини на вълните в диапазона от 450 nm до 1050 nm в температурния интервал от 63°C до 78°C, коефициентът на корелация R приема стойности от 0,9983 до 0,9999. Най-силна е връзката между спектралните криви за λ между 650 nm и 850 nm, като е установена най-висока корелация при $\lambda = 800$ nm. Така направеният корелационен анализ дава основание да се твърди, че всеки монохроматичен светлинен източник с дължина на вълната между 650 nm и 850 nm с достатъчно висока достоверност на резултатите може да се използва за изследване на процеса на термо денатурация на серумни белтъци при НОПМ.

На Фиг. 12(*4.14) са представени спектралният (1) и калориметричният (2) ДСК профил на НОПМ.



Фиг. 12(*4.14). Спектрален (1) и калориметричен (2) ДСК профил на натурално обезмаслено прясно мляко (НОПМ)

След направеният анализ на пиковете на спектралния и калориметричния профили с помощта на програмния продукт OriginPro 8.5, върху калориметричния ДСК профил (2) на Фиг. 12(*4.14) бяха установени 5 (пет) ендотермични пика в температурния интервал от 60°C до 80°C, в който обикновено денатурират серумните белтъци и се формират комплекси между κ -казеина и денатуриралите серумни белтъци. Стойностите на специфичния топлинен капацитет C_p за отделните ендотермични пикове са следните: $C_{p1}=0,9813$ [mW/mg] при $T^{\circ}=64^{\circ}\text{C}$; $C_{p2}=0,9757$ [mW/mg] при $T^{\circ}=67^{\circ}\text{C}$; $C_{p3}=0,9698$ [mW/mg] при $T^{\circ}=71^{\circ}\text{C}$; $C_{p4}=0,9720$ [mW/mg] при $T^{\circ}=74^{\circ}\text{C}$; $C_{p5}=0,9754$ [mW/mg] при $T^{\circ}=77^{\circ}\text{C}$.

Анализът на зависимостта на оптичната плътност D от температурата на загряване по време на кинетичния процес установи наличието на 4 (четири) характерни максимума на поглъщане на светлина напълно съвпадащи по местоположение върху температурната скала с максимумите на C_p за всеки регистриран ендотермичен пик.

3.5.2. Химична денатурация на белтъци

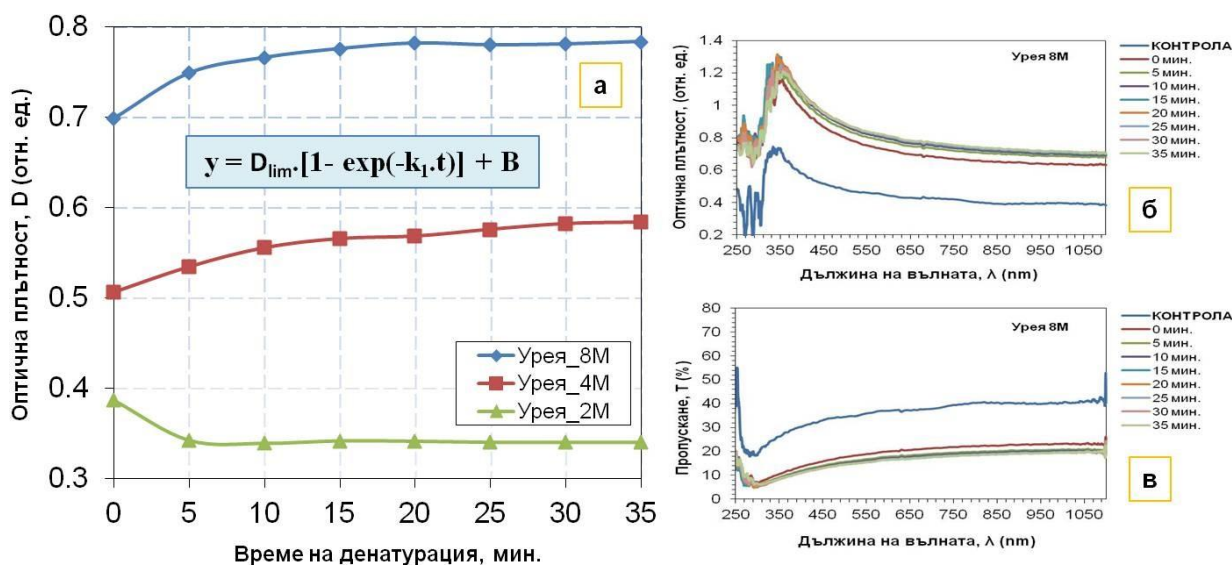
За изследване на химична денатурация е използвано НОПМ с обем 65 ml и температура 25°C, с добавен денатурант урея с концентрация 2M, 4M и 8M в съотношение 3:1. Количеството на денатуранта е избрано експериментално.

На Фигура 13(*4.15) са представени спектрите на поглъщане (б) и спектрите на пропускане (в) на НОПМ с добавен денатуриращ агент Урея с концентрация 8M, както и кинетичните криви на денатурация (а) при облъчване с дължина на вълната $\lambda = 650$ nm на изследваните образци НОПМ с концентрация на урея съответно 8M, 4M и 2M. От графиката се вижда добре, че в диапазона от 550 nm до 900 nm за целият период на протичане на процеса химична денатурация, изменението на оптичната плътност D е незначително:

- За НОПМ с 8M Урея – от 0.753389 до 0.727561 разлика - 0,025828;
- За НОПМ с 4M Урея – от 0.530228 до 0.528497 разлика - 0,001731;
- За НОПМ с 2M Урея – от 0.382579 до 0.314791 разлика – 0,067788.

Анализът на кинетиката на агрегацията на НОПМ в присъствието на 8 М урея (рН6.66÷6.56, T=25°C) показва, че при сравнително ниски концентрации на общ белтък завършващата фаза на агрегация, проследена по увеличаването на абсорбцията при 650 nm, следва кинетиката на реакция от първи порядък. Както се вижда от Фиг.13(*3.34 а), кинетичните агрегационни криви на химичната денатурация на НОПМ, при съдържание на общ белтък от 3.33 % и концентрация на урея (2М, 4М и 8М) удовлетворително се описват чрез уравнение $y = A * (1 - \exp(-k_1 * t)) + B$. Описанието на кинетичните криви, дава следните стойности на кинетичните параметри, които са представени в Табл. 14 от дисертационния труд.

При концентрация на денатуранта 8М - $D_{lim} = 0,7823 \pm 0,0009$, $k_1 = 0,1747 \pm 0,0098$ (min^{-1}) и $t_{1/2} = 4,0 \pm 0,1$ (min), $\theta = 5.7$ (min).



Фиг. 13(*4.15). Кинетика на агрегация на НОПМ ($\lambda=650$ nm) под действието на Урея с концентрация 8М, 4М и 2М (а); спектър на поглъщане (б) и спектър на пропускане (в)

При химична денатурация на белтъци се променят оптичните свойства, което е свързано с разрушаването на α -спиралите. По разликата в оптичните свойства, които проявяват белтъците преди и след денатурация може да се определи степента на разрушаване на α -спиралите.

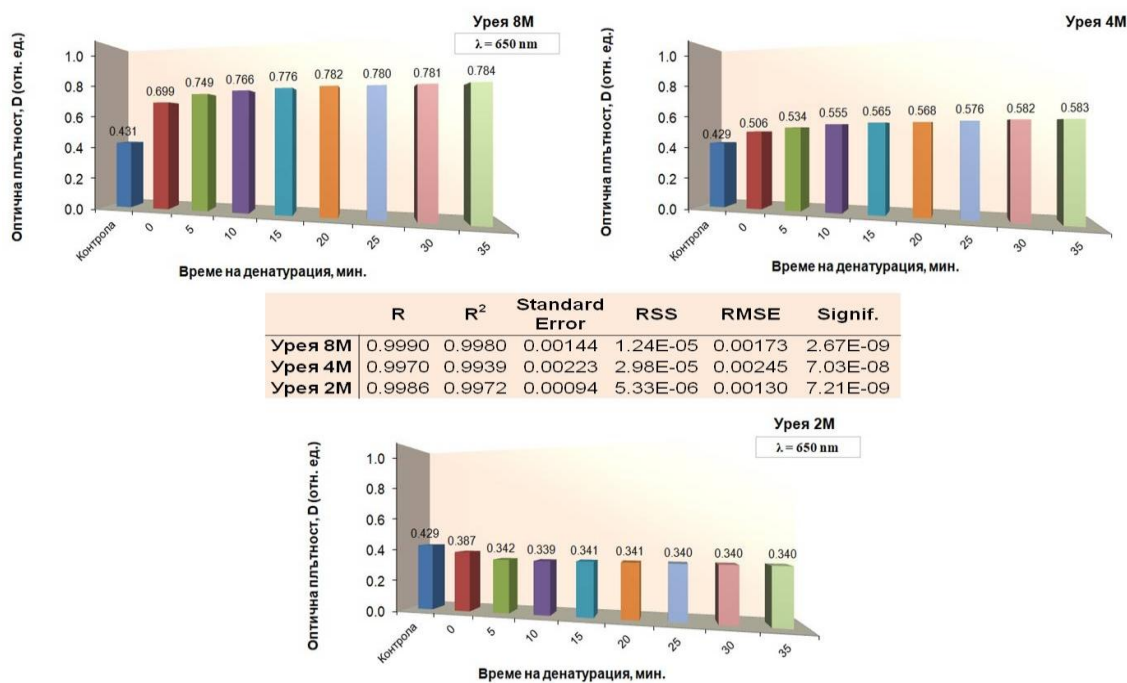
За определяне на дължините на вълните на облъчващият монохроматичен светлинен източник, определени като най-информативни при изследване на химична денатурация е използван метод частична регресия на най-малките квадрати. Точността на използваният модел е проверена посредством изчисляване на корелационните коефициенти R и R^2 и грешките - RSS , $RMSE$ и стандартна грешка.

Направеният линеен регресионен анализ показва, че силата на връзката между измереното и предсказано привидно поглъщане в НОПМ по време на химична денатурация предизвикани от урея с концентрация 8М е най-силна. Показателно за това са стойностите на коефициентите $R = 0.999$ и $R^2 = 0.998$ при $\lambda = 650$ nm. Това означава, че и най-малките промени в интензитета на разсейване на светлината проявени върху кинетичната крива (Фиг.

13(*4.15)) са резултат от настъпили изменения в структурата на участващите в процеса протеинови частици.

Аналогично бяха изчислени коефициентите R , R^2 , както и грешките - RSS , $RMSE$ и стандартна грешка за останалите две концентрации на денатуриращия агент. Изчислените грешки показаха, че получените резултати за D на светлината са статистически значими (Significance) в избраният доверителен интервал от 95 % и грешка $\alpha = 0,05$ (Фиг. 14(*4.16)).

На Фиг. 14(*4.16) е представена промяната на оптичната плътност D по време на кинетичния процес от момента на внасяне на денатуранта през интервали от 5 минути във вид на хистограми. Стойностите на оптичната плътност са съпоставени с оптичната плътност на контролния образец преди добавяне на денатуранта с концентрация 8М, 4М и 2М. За оценка на сходимостта на резултатите от измерването за всеки отделен млечен образец бяха извършени по 5 (пет) измервания спектъра, като при анализа на спектрите е взета средно аритметичната стойност от петте измервания. Анализът на получените резултати показва, че концентрацията 8М урея предизвиква най-забележимо повишаване на оптичната плътност D в изследвания времеви диапазон от 0 до 35 минути. Стойността на D за контролния образец (НОПМ без урея) варира от 0,429 до 0,431. След инокулацията на денатуриращ агент с концентрация 8М, оптичната плътност нараства до 0,784 в края на кинетичната реакция. При концентрация на урея 4М оптичната плътност достига стойност от 0,583, а при концентрация 2М тя е най-ниска 0,340 (отн. ед.).



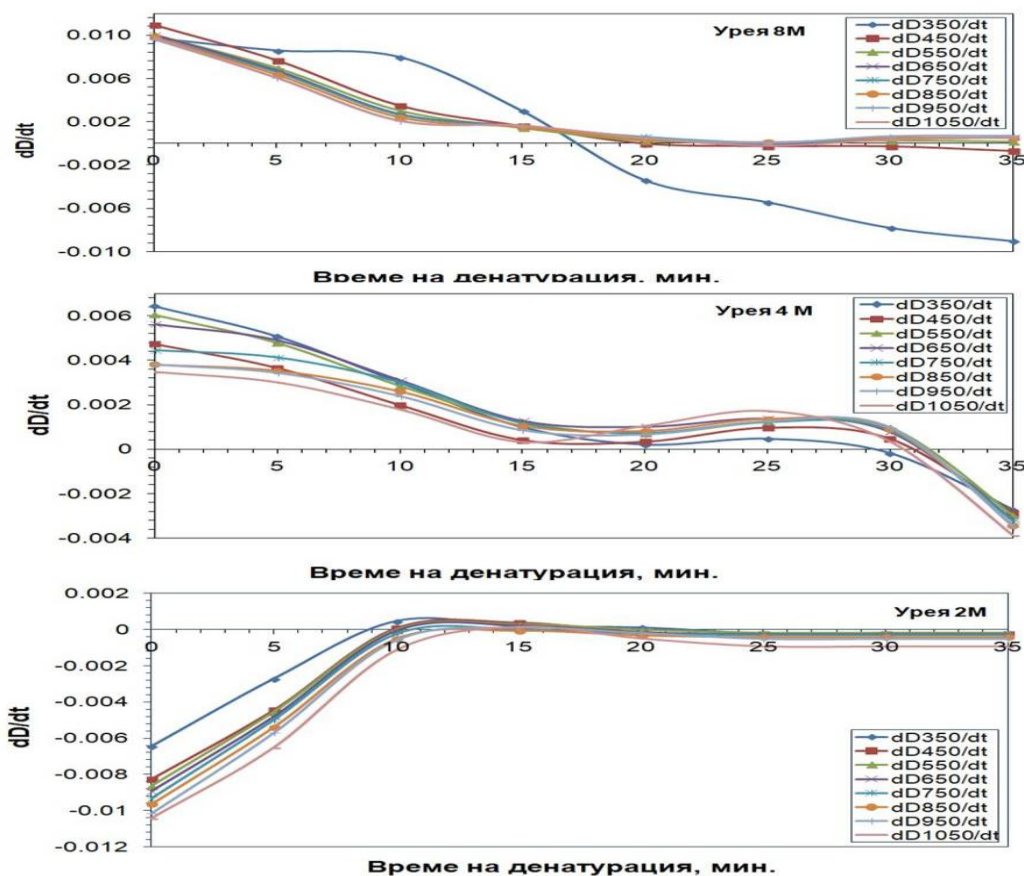
Фиг. 14(*4.16). Зависимост на оптичната плътност D от концентрацията на денатуриращия агент (урея 8М, 4М и 2М) при химична денатурация

Нарастването на привидното поглъщане D в разтвора се дължи на нарастването на броя на вече обособилите се ядра на белтъчните агрегати по време на фазата на нуклеация и присъединили се към тях разгнати белтъчни вериги. Успоредно на основния процес на агрегация може да протича значително по-бавна асоциация на ядрата на агрегатите. Премаването на кинетичната крива на относително линеен участък в по-късните времеви

интервали на кинетичната реакция означава, че се осъществява слепване на ядрата на белтъчните агрегати в по-големи агломерати. На Фиг. 15(*4.17) са показани първите $\frac{dD}{dt}$ производни на спектъра на поглъщане във времеви интервал от 0 до 35 минути.

При анализа на спектрите на поглъщане е за предпочитане използването на първа производна като по-информативна за разлика от втората, която по-често се използва при изследване на флуоресценция.

От направените графични зависимости на първата производна $\frac{dD}{dt}$ на привидното поглъщане от времето Фиг. 15(*4.17) може да се направи извода, че през първият и особено през вторият етап от ензимната реакция (етапа на разгъване на белтъчната молекула), скоростта на протичането ѝ е най-висока и значително намалява през етапа на формирането на белтъчните ядра около които се оформят агрегатите.



Фиг. 15(*4.17). Първа (dD/dt) производна на кинетичните криви на химическа денатурация на НОПМ с концентрация на Урея 8М, 4М и 4М

При концентрация на денатуриращият агент (8М), скоростта на кинетичната реакция през първите 10 мин. е най-висока и съответства на процеса на разгъване на белтъчните молекули. През следващите 10 минути се наблюдава тенденция към плавно намаляване на скоростта и достигане на своя минимум на 20-та минута. С това процеса на разгъване на

молекулите може да се смята за приключил и отстъпва място на процеса на нуклеация и формиране на белтъчните ядра около, които бавно започват да се формират нови белтъчни агрегати. Високата концентрация на денатуранта отслабва взаимодействията между белтъчните молекули, което води до повишаване на разтворимостта на протеините проявяващо се в много слабо повишаване на скоростта на кинетичната реакция свързано най-вероятно с бавно протичащите агрегативни процеси през оставащото време от експеримента.

Същата тенденция се наблюдава при концентрация 4М с тази разлика, че продължителността на етапа на разгъване на белтъчните молекули намалява и минималните стойности на първите производни се изместват вляво и се забелязва съкращаване на времето за формиране на белтъчните ядра. Малко преди приключване на процеса около 31÷32 минута се наблюдава много рязка промяна на скоростта на реакцията, което вероятно се дължи на фазов преход свързан с агрегацията на разкъсаните връзки, резултат от действието на уреята върху белтъчната молекула.

Както бе споменато по-рано, при ниски концентрации на денатуриращия агент от 2М се наблюдават слаби структурни промени, което много ясно се вижда от графиката на Фиг. 15(*4.17), където през първите 10 минути се наблюдава увеличаване на скоростта на реакцията, където слабо концентрираният денатурант прави неуспешни опити да преодолее силните електростатични и Ван дер Ваалсови взаимодействия вътре в белтъчната молекула. Както се вижда, с това приключват неговите възможности, защото от този момент нататък не се наблюдават почти никакви промени в скоростта на кинетичната реакция, което е показателно за липсата на агрегативна активност, както и отсъствието на фазови преходи. Най-правдоподобното обяснение на това наблюдение е, че агрегацията може да бъде ограничена или поради спадане на скоростта на протичане на ензимната реакция, или от факта, че в системата е настъпило равновесие.

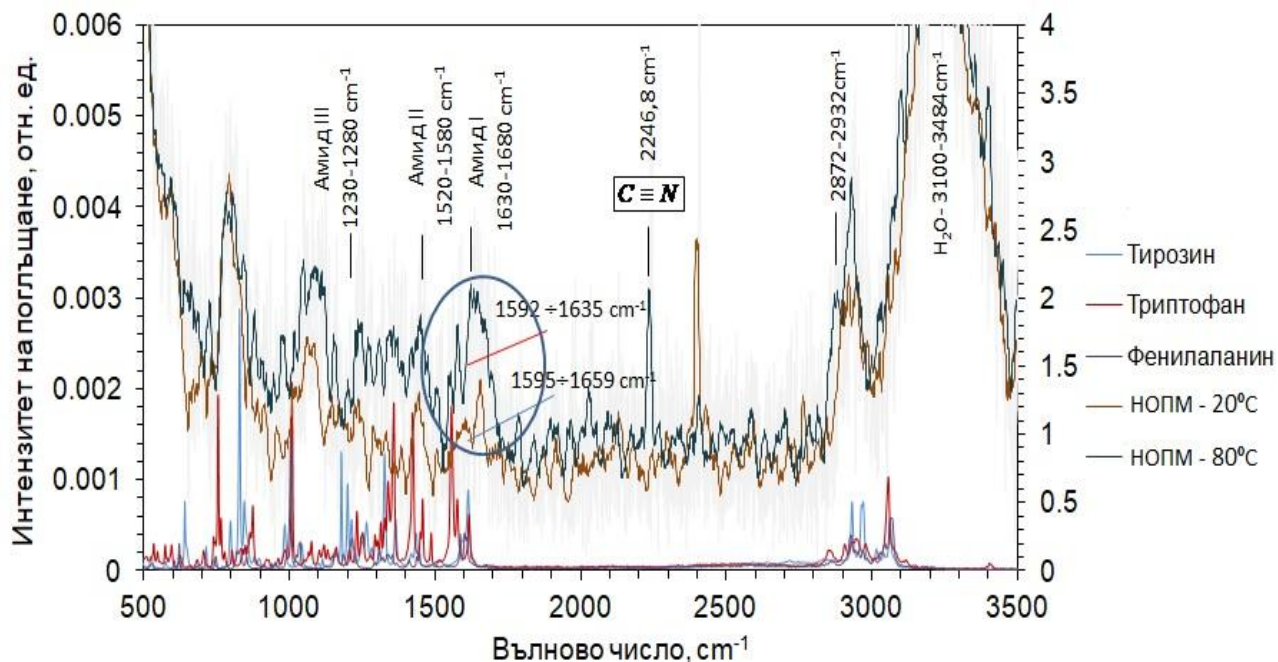
3.6. Раманова спектроскопия при изследване на структурни изменения на млечни белтъци

Изследван е алкален разтвор на пречистен казеин, разтворен в NaOH в съотношение 33,3 mg казеин на 1 ml NaOH, сух пречистен казеин на прах, сухо обезмаслено мляко и аминокиселини (L-Tryptophan, L-Tyrosine и D-Phenylalanine). Количеството на използваните сухи образци от пречистен казеин и аминокиселини L-Tryptophan, L-Tyrosine и D-Phenylalanine е от 5 до 10 mg.

Изследвана е термо- денатурация на серумни белтъци на НОПМ в диапазона от 20°C до 85°C. Построени са рамановите абсорбционни спектри на триптофан, тирозин и фенилаланин, които изпълняват ролята на маркери при изследване на вторичната структура на млечни белтъци в НОПМ при термична денатурация и при химична денатурация на казеин. В ролята на денатуриращ агент е използвана урея с концентрация 2М, 4М и 8М.

На Фиг. 16(*4.18) са представени рамановите спектри на НОПМ в изследвания честотен диапазон от 500 cm^{-1} до 3500 cm^{-1} преди (при 20°C) и след загряване (при 80°C) в продължение на 60 min. На графиката са показани и спектрите на АК- Туг, Тгу, Phe. Силният интензитет на поглъщане във ВЧ диапазон от 3100 до 3484 cm^{-1} съответства на валентните

вибрации на H₂O молекули. Спектралните линии в диапазона от 700 до 1350 cm⁻¹, т.н. «област на пръстовите отпечатъци», изпълняват ролята на индивидуална характеристика на всяко вещество.



Фиг.16(*4.18) Раманов спектър на НОПМ преди и след загряване до 80°C в продължение на 60 мин.; Спектри на поглъщане на Tyr, Try, Phe.

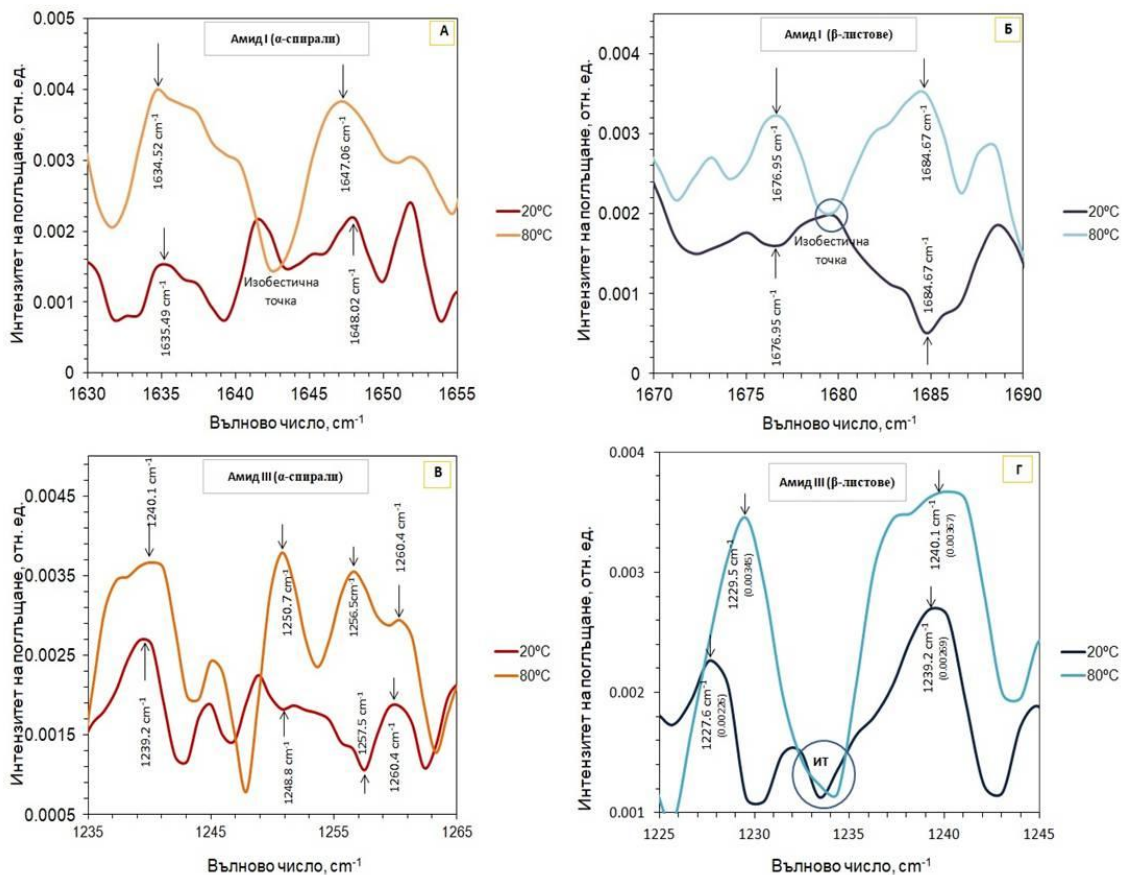
Най-интензивните линии съответстват на валентните бибрации на С-Н (2872÷2932 cm⁻¹), N-H (3323 cm⁻¹), O-H (3100-3484 cm⁻¹) връзки. Много добре се проявяват НЧ и ВЧ линии на спектралната полоса Амид I (1630-1690 cm⁻¹), където се наблюдават валентните вибрации на С-О връзките на α-спирални (1630-1655 cm⁻¹), β-листови (1660-1690 cm⁻¹) и не подредени (1660-1670 cm⁻¹) структури. Деформационните вибрации на пептидната група се проявяват в спектралната полоса Амид III (1220-1280 cm⁻¹), където вибрират α-спирални (1235-1265 cm⁻¹), β-листови (1225-1245 cm⁻¹) и не подредени (1240-1260 cm⁻¹) структури. Деформационните N-H и валентните С-N връзки на пептидната група на Амид II (1520-1580 cm⁻¹) се проявяват по интензитет.

Областта Амид I (1630-1680 cm⁻¹), където се проявяват вибрации на главната полипептидна верига най-често се използва за изследване на вторичната структура на белтъците. При повишаване на температурата до 80°C и протичащият в резултат на това процес термо-денатурация, се наблюдава хипсохромно изместване на честотата на централната спектрална линия на Амид I от 1659 до 1635 cm⁻¹, дължащо се на деформационните вибрации на свободната вода в белтъчната молекула (Фиг. 16(*4.18)). При стайна температура (20°C), в спектъра на НОПМ освен централният честотен пик (1659 cm⁻¹) се наблюдава и по-нискоинтензивно НЧ рамо (1595 cm⁻¹), което при термо-денатурация преминава в самостоятелна високоинтензивна хипсохромно изместена спектрална линия с честота (1592 cm⁻¹), което е сигурен признак за промяна в структурата на белтъка.

Валентните вибрации на нитрилната група $C \equiv N$ са разположени в областта $2240-2260 \text{ cm}^{-1}$, там където обикновено няма други линии. Валентните вибрации с повишен интензитет на $C \equiv N$ групата на честота $2246,8 \text{ cm}^{-1}$ съответства на промяната на полярността на разтворителя при термо-денатурация, затова тя е достатъчно характеристична.

Областта Амид II ($1520-1580 \text{ cm}^{-1}$) е слабо чувствителна към конформациите на вторичната структура и не се използва за анализ на структурните изменения на белтъци.

Измененията, които настъпват в интензитета и местоположението на честотните линии на α -спиралите и β -листове в полосите Амид I и Амид III на белтъчните структури на НОПМ при промяна на температурата от 20°C до 80°C са илюстрирани на Фиг. 17(А-Г).



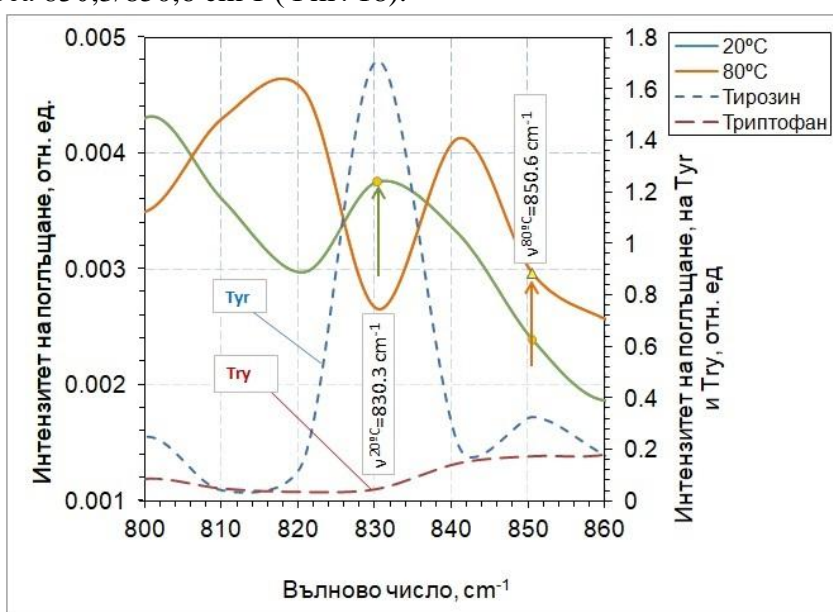
Фиг. 17. Раманов абсорбционен спектър на α -спиралните и β -листовите структури в полосите Амид I и Амид III при термична денатурация с визуализация на измененията на спектралните полоси Амид I, Амид III до и след загряване до 80°C - 60 мин.

На първата фигура, на която е представен РС на НОПМ в диапазона ($1630-1655 \text{ cm}^{-1}$), където се намират α -спиралите след загряване в продължение на 60 min. се наблюдават два максимума на честота $1634,52 \text{ cm}^{-1}$ и на $1647,06 \text{ cm}^{-1}$, което е показателно, че в дисперсната среда на млякото са денатурирали два вида серумни белтъци. Аналогичен е резултатът и при β -листовите структури, където не се наблюдава изместване на честотните, но се наблюдава съществено повишаване на интензитета на поглъщане. И при α -спиралните и β -листовите структури се проявяват т.н. изобестични точки – т.е. точки върху спектъра на поглъщане, където двата белтъка имат еднакви или приблизително еднакви моларни

коэффициенти на поглъщане. Увеличаването на интензитета на поглъщане при термоденатурация е признак за настъпила конформация в структурата на белтъка, т.к. количеството α -спиралите и β -листове на белтъка намиращ се в нативно (20°C) състояние са значително по-малко от тяхното количество след загряване при (80°C) в продължение на 60 минути. Резултатите от РС много добре се съгласуват с резултатите от ДСК и оптичният метод за изследване на термо-денатурация на серумни белтъци.

В диапазона Амид III ($1230\text{--}1280\text{ cm}^{-1}$), спектралните линии са в резултат на вибрациите на N-H връзките и деформационните вибрации на разтягане на C-N връзките, които са особено чувствителни към конформационните изменения на вторичната структура.

Удобен начин да се установят настъпили конформационни изменения на белтъците е чрез изследване на измененията на спектрите на поглъщане при тирозиновия (Tyr) дублет в спектрална полоса $830,3/850,6\text{ cm}^{-1}$ (Фиг. 18).



Фиг. 18. Установяване на структурни изменения на белтъците по изменението на спектрите на поглъщане на Tyr дублет - $830,3/850,6\text{ cm}^{-1}$

Намаляването на отношението на интензитета на поглъщане при тирозиновия дублет

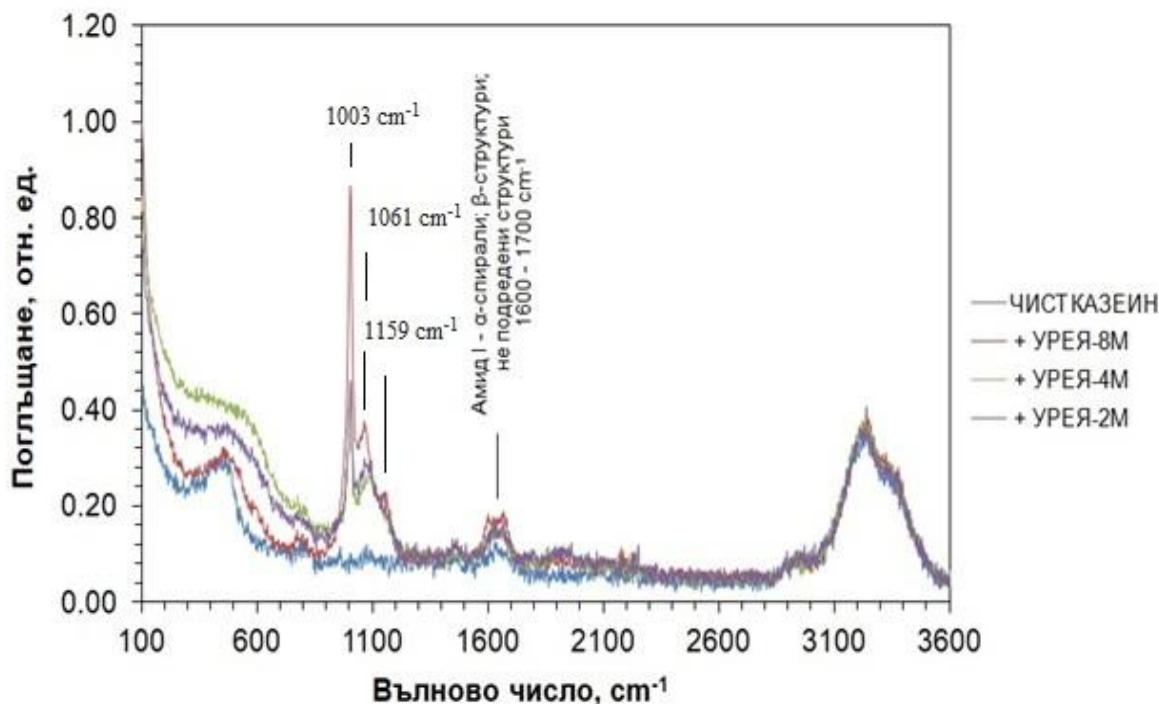
(Фиг. 18) преди загряване - $\frac{I_{\nu_1=830.3\text{cm}^{-1}}^{20^\circ\text{C}}}{I_{\nu_2=850.6\text{cm}^{-1}}^{20^\circ\text{C}}} = \frac{0.00376}{0.00239} = 1.573$ и след загряване до 80°C в

продължение на 60 минути - $\frac{I_{\nu_1=830.3\text{cm}^{-1}}^{80^\circ\text{C}}}{I_{\nu_2=850.6\text{cm}^{-1}}^{80^\circ\text{C}}} = \frac{0.00266}{0.00297} = 0,896$ отразява отслабването на

водородните връзки образувани от аминикиселинните остатъци на тирозина със съседните атомни групи. Това е сигурен признак за протичащи структурни изменения в млечно-протеиновата среда на НОПМ по време на термо-денатурация.

Проведена е химична- денатурация на алкален разтвор на пречистен казеин, получен чрез разтваряне на $33,3\text{ mg}$ казеин на прах в 1 ml HCl с денатуриращ агент Урея с

концентрация 8М, 4М и 2М. Резултатите от направеното изследване са представени на Фиг. 19(*4.21).



Фиг. 19(*4.21). Абсорбционен Раманов спектър на разтворен пречистен казеин при химична денатурация

Резултатите от експеримента показват намаляване на интензитета на пиковете в рамановите спектри, отнасящи се към дисулфидните връзки влизащи в състава на дисулфидните мостове, при внасяне на денатурант разкъсващ тези връзки. Известно е, че дисулфидните мостове са важни компоненти от структурата на белтъчната молекула. Те ограничават възможното конфигурационно пространство на протеина, което помага за стабилизирането на структурната конфигурация на протеиновата молекула. Разкъсването на всички или на част от дисулфидните мостове води до разгъване на молекулата, т.е. до частична или пълна денатурация на протеина.

Най-забележими промени се проявяват в интензитета на линията с пикове при честоти 1003 cm⁻¹, 1061 cm⁻¹, при взаимодействието на казеина с Урея с концентрация 8М. Спектралните линии се наблюдават при действието и на трите концентрации на денатуранта. При пречистен казеин в нативно състояние видими изменения в спектъра не се наблюдават. При 8М концентрация на урея се проявява още една спектрална линия с ниско интензивен пик на честота 1159 cm⁻¹, която не се проявява при по-ниските концентрации 4М и 2М.

Начина по който вибрират химичните връзки в казеиновата молекула при по-ниските концентрации на Урея (4М и 2М) силно се различава от вибрациите при въздействие с Урея с концентрация 8М. Това може да се обясни с по-интензивното отслабване на водородни връзки между аминокиселинните остатъци на тирозина и намиращите се около нея атомни групи. С намаляване концентрацията на денатуриращият агент това отслабване постепенно

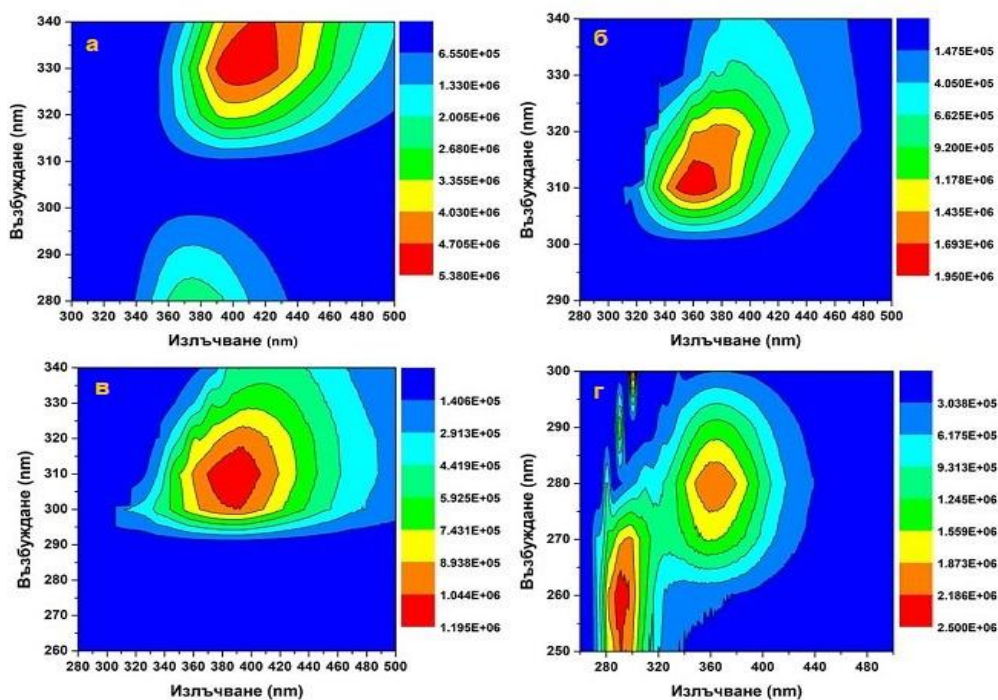
намалява и белтъчната молекула започва да проявява стремеж към стабилизиране на нейната структура. Потвърждение на това е увеличаването на отношението на интензитета на поглъщане преди и след внасяне на денатуриращия агент с концентрация 8M.

3.7. Флуоресцентна спектроскопия на млечни протеини

Флуоресциращите аминокиселинни остатъци на белтъка (Try, Trp и Phe), изпълняват ролята на репортерни групи. Промените на физичните и химични свойства на обкръжението, в което се намира флуорофора при осъществена конформация, носи информация за локалните изменения, протичащи вътре в самата белтъчна молекула. Проява на това обикновено е свързано с изместването на спектъра на флуоресценция в дълговълновата област, предизвикваща увеличаване на поглъщателната способност на хромофорите [216].

Изопотенциалните възбудно-емисионни матрици (ИВЕМ) на флуоресцентните спектри изпълняват ролята на своеобразни „пръстови отпечатъци“ на изследвания обект и са особено полезни при извършване на бърз анализ на компонентния състав на млека и други белтъчни разтвори, както и при изследване на измененията в структурата на млечно-протеиновата полидисперсна среда.

На Фиг. 20(*4.22) са представени ИВЕМ на казеин, Try, Trp и Phe, а на Фиг.21(*4.23) – ИВЕМ на разтворителите използвани при експеримента.



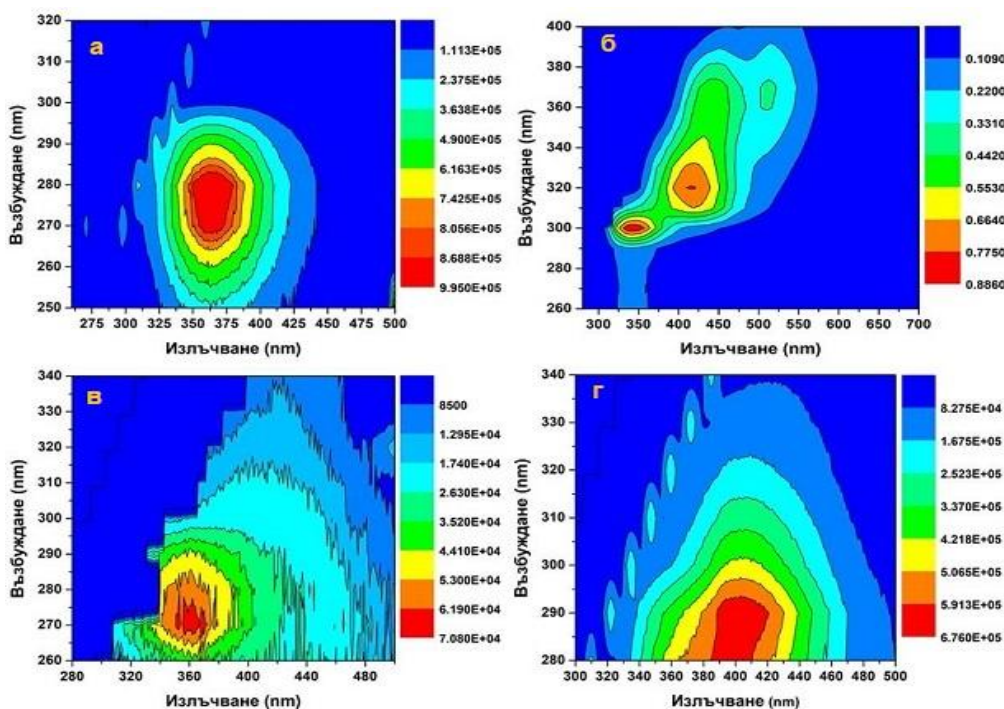
Фиг. 20(*4.22). Изопотенциални възбудно-емисионни матрици на: (а) Казеин; (б)Триптофан; (в)Тирозин; (г)Фенилаланин

В Таблица 15 на дисертационният труд са представени собствени резултати за дължините на вълните на възбуждане и флуоресценция чрез измерените ИВЕМ на млечните флуорофори и използваните разтворители.

Таблица 2(*15). Собствени резултати

Млечни флуорофори и разтворители	Възбуждаща λ [nm]	Излъчваща λ [nm]
L-Tryptophan	310	362
L-Tyrosine	310	385
L-Phenylalanine	260, 270	291, 297
Пречистен казеин	330, 340	404, 420
Млечен серум	300, 320	341, 415
Дестилирана вода	270, 280	364, 362
HCl 1M	265, 275, 280	370, 357, 353
NaOH	280, 290	393, 403

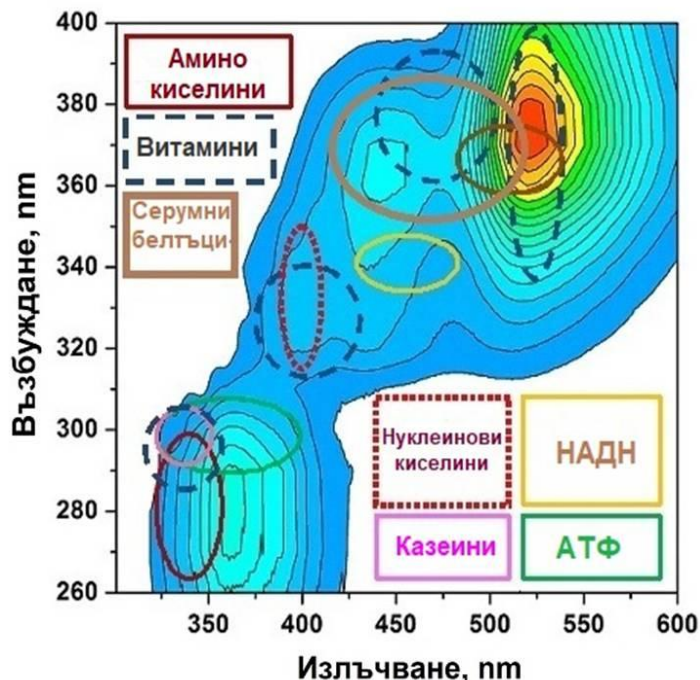
Изследвани са спектрите на флуоресценция и е направено числено диференциране от втори порядък на данните от изменението на спектъра на флуоресценция на НОПМ и СВМ. Измерени са ИВЕМ на пречистен казеин, АК (L-Tryptophan, L-Tyrosine и D-Phenylalanine) Фиг. 20(*4.22) и на техните разтворители (дестилирана вода, 1M HCl и 1% р-р на NaOH) Фиг. 21(*4.23).



Фиг. 21(*4.23). ИВЕМ на разтворителите използвани в експеримента: (а) дестилирана вода; (б) млечен серум; (в) HCl 1M; (г) NaOH

Изчислени са флуоресцентните спектри и техните 2-ри производни по метода на Savitzky-Golay с 20 изглаждащи точки, 3D топографските профили на флуоресцентните спектри, както и ИВЕМ на спектъра на флуоресценция.

На Фиг.22(*4.24) е представена флуоресцентна изопотенциална карта на флуорофорите, съдържащи се обикновено в обезмаслени млека с ниско съдържание на млечна мазнина.



На картата са представени областите на поглъщане и излъчване на основните хромофори за образец на мляко с 0.2% млечна мазнина.

От направените ИВЕМ на НОПМ и млечен серум (Фиг. 3.45.), могат да се идентифицират няколко основни източника на флуоресценция. Основните АК в белтъците проявяващи флуоресцентни свойства са Trp, Tyr и Phe.

*Фиг.22(*4.24). Изопотенциална карта на флуорофорите в обезмаслени млека*

3.7.1. Флуоресцентна спектроскопия при термо-денатурация, промяна на рН на средата и ензимна хидролиза на млечните протеини

На интензитета, местоположението и броя на максимумите както на спектъра на флуоресценция, така и на вторите производни на спектъра на флуоресценция на млечните белтъци и на техните компоненти, влияние оказват температурата, рН, вида и състава на разтворителя.

Ароматните аминокиселини в свободно състояние съдържат свободни карбоксилни и аминокрупи и затова техните спектри на възбуждане се променят при промяна на рН на средата. При промяна на рН на разтвора, най-съществено се променя спектъра на възбуждане на тирозина. В неутрална среда (при ~ рН 7.0), спектърът на възбуждане на тирозина се измества в диапазона 300÷318 nm с максимум при 308 nm Фиг.20(*4.22). Спектърът на поглъщане на триптофан в неутрална среда (при използване на 0.5M HCl) се променя в диапазона 308÷316 nm с максимум на възбуждане при 310 nm (Фиг.21(*4.23 б), което е резултат на йонизацията на NH химичната група.

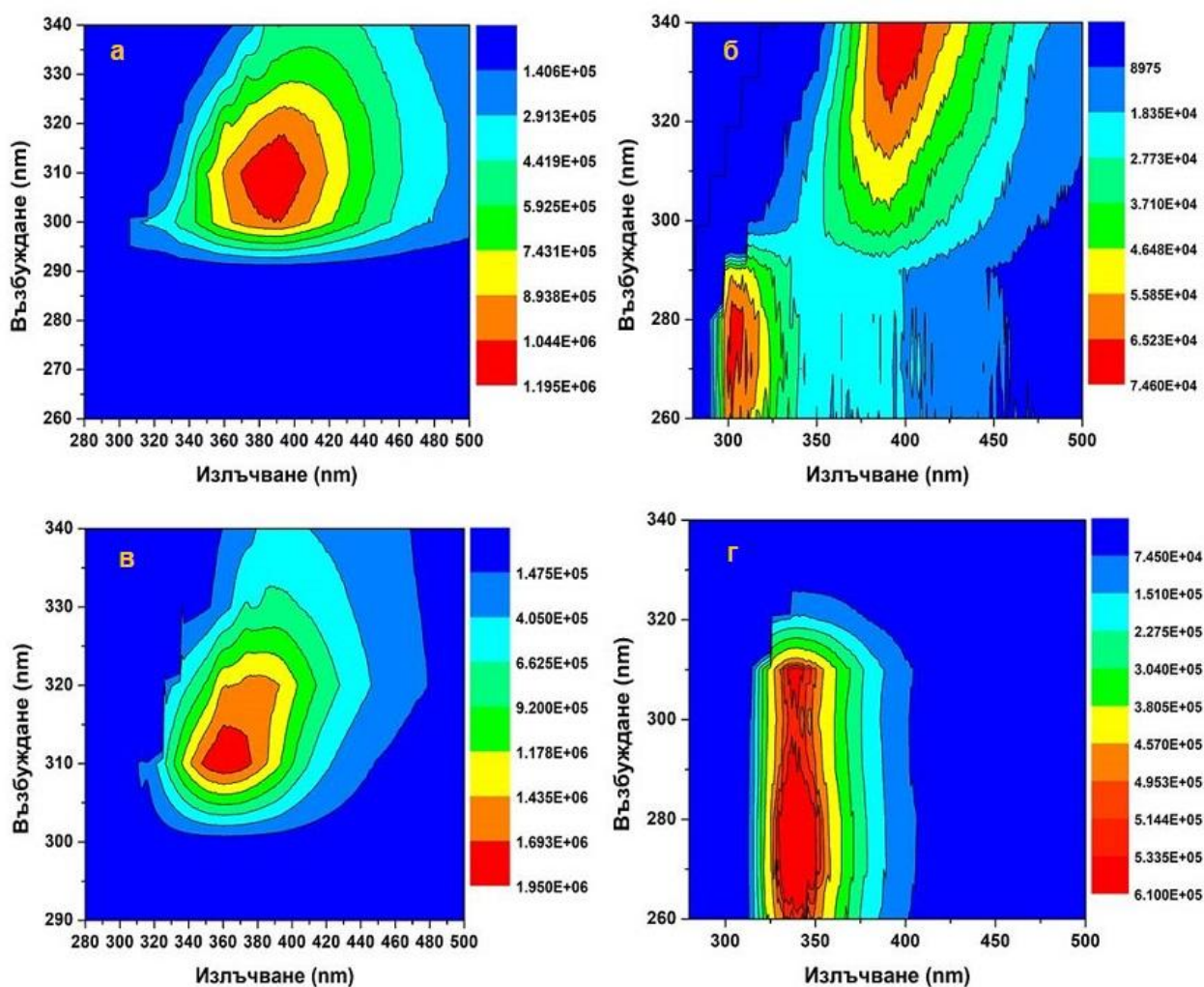
При провеждането на измерванията на зависимостта на интензитета на флуоресценция от температурата на дисперсната среда, от рН и концентрацията на коагулиращ ензим, бе приложено възбуждане с дължина на вълната в диапазона от 260 nm до 500 nm със стъпка 10 nm, а флуоресценцията се регистрира в диапазона от 280 nm до 600 nm.

За изследване влиянието на различни концентрации коагулиращ ензим (химозин) върху степента на денатурация и последващата агрегация на млечните белтъци са използвани същите концентрации коагулиращ ензим, както при експериментите свързани с изучаване на ензимната коагулация на млечни белтъци.

Като доказателство за непълното разрушаване на третичната структура на млечният белтък е фактът, че интензитета на флуоресценция не е равен на нула дори при най-високите стойности на коагулиращия ензим. Това говори само за частично, но не напълно разрушаване на третичната структура, базирайки се на емпирично получените експериментални данни.

Флуоресценцията на белтъците обикновено се възбужда при облъчване с дължина на вълната 280 nm, където те имат максимална абсорбция. Следователно, фенилаланин не се възбужда в повечето експериментални случаи. Абсорбцията на протеини при 280 nm се свързва главно с остатъци от тирозин и триптофан. При дължини на вълните, по-големи от 295 nm основно поглъща триптофан. Следователно се приема, че неговата флуоресценция може да бъде селективно възбудена в диапазона 280 - 310 nm.

Излъчването на тирозин във водна среда се извършва при 303 nm и е относително не чувствително към полярността на разтворителя. При ИВЕМ на разтворените аминокиселини и ИВЕМ на чистите (в твърдо състояние) аминокиселини, се наблюдава изместване на флуоресцентния спектър на излъчване (Фиг.23>(*4.25)).



Фиг.23(*4.25). Изопотенциални възбудно-емисионни матрици на тирозин: в разтвор (а) 33,3 mg в 1 ml 1M HCl; (б) в сухо твърдо състояние на прах и на триптофан: в разтвор (в) 33,3 mg в 1 ml 0,5M HCl; (г) в сухо твърдо състояние на прах

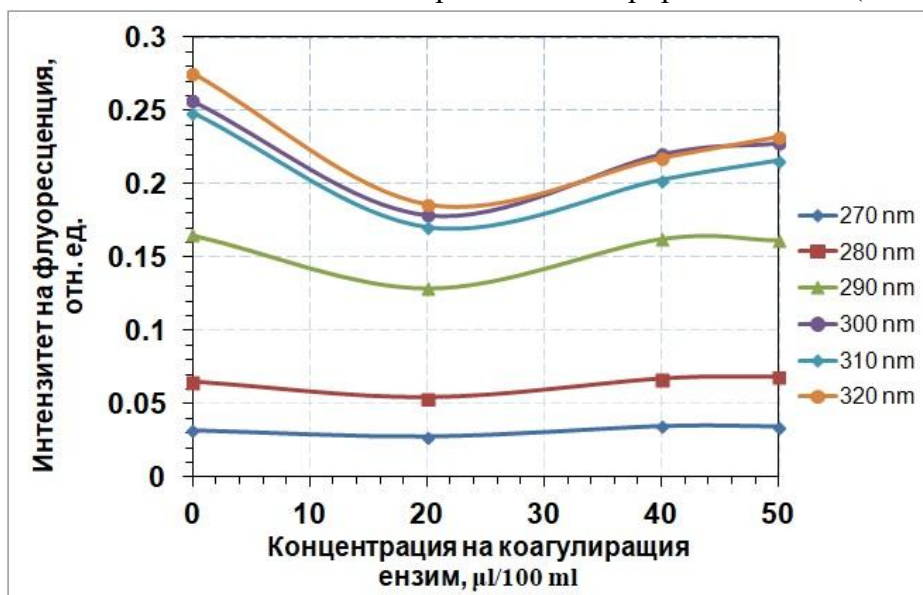
Промяната на интензитета на флуоресценция на дължина на вълната при, която се наблюдава максимум не е мярка за протекъл конформационен преход в структурата на белтъка, ако не е настъпила промяна във формата на спектъра, т.е. батохромно или хипсохромно изместване на емисионния максимум.

Позицията на флуоресцентния максимум на триптофан може да варира при промяна на рН на средата. Когато има намеса на разтворителя, както в случая с използването на разтворен триптофан в 0.5M HCl, флуоресцентната лента се измества батохромно вдясно и регистрираме флуоресцентен максимум при 360÷380 nm при възбуждане с $\lambda = 310$ nm. Това особено добре се вижда от резултатите представени на Фиг.23(*4.25).

1. Триптофанова флуоресценция при изследване на конформационни преходи на НОПМ под действието на коагулиращ ензим

Както е известно, казеиновата молекула притежава грапава повърхност, върху която има множество цепнатини, джобове, сгъвки. Това създава предпоставки коагулиращият ензим първо да атакува не плътно опакованите участъци в протеиновата структура.

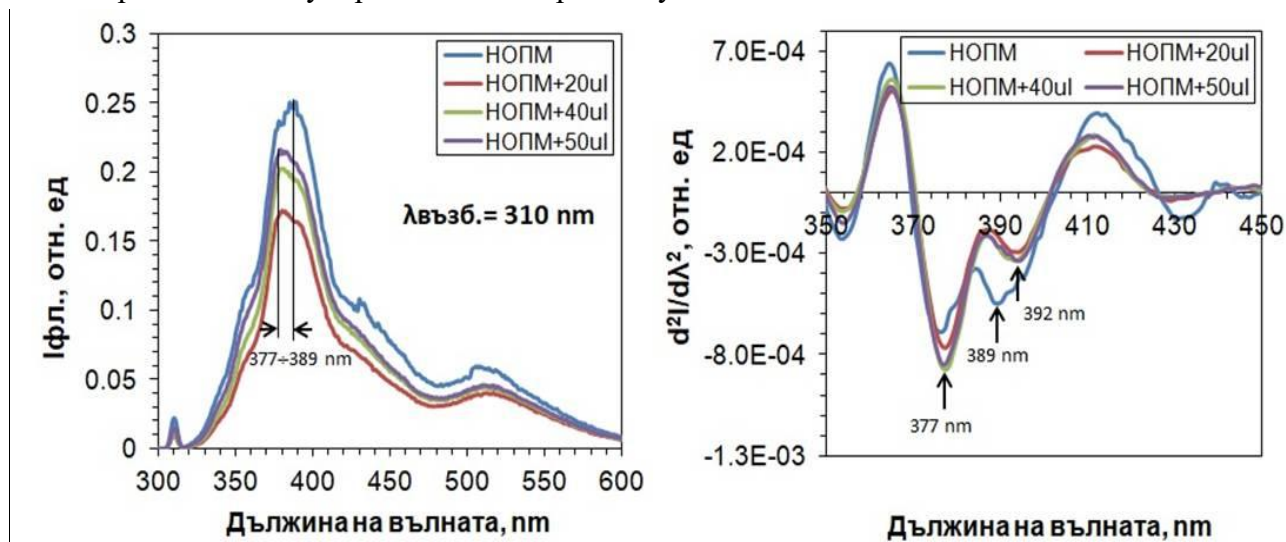
Проникването на вода във вътрешността на молекулата води до флуоресцентно гасене. Тъй като именно триптофановите аминокиселинни остатъци са основната причина за възникване на собствената флуоресценция на белтъците, докато са разположени във вътрешността на протеиновата молекула, собствената флуоресценция на млечните белтъци ще бъде слаба. Когато върху протеиновата молекула се въздейства с по-високо концентриран коагулант и се предизвика разгъване на белтъчната структура, разположеният във вътрешността триптофан ще излезе на повърхността и ще предизвика увеличаване на флуоресценцията на белтъка. Именно този процес е илюстриран на Фиг.24(*4.26).



Фиг.24(*4.26). Зависимост на интензитета на флуоресценция на НОПМ от концентрацията на коагулиращия ензим при дължина на вълната на възбуждане от 270 nm до 320 nm

От получените резултати, представени на Фиг.24(*4.26) ясно се вижда, че най-високи стойности на интензитета на флуоресценция се наблюдават при възбуждане с дължини на вълните от 320, 310 и 300 nm и в по-малка степен при възбуждане с дължини на вълните от 290, 280 и 270 nm. От друга страна, промяната на интензитета на флуоресценция като функция от концентрацията на коагулиращия ензим има сложен нелинеен характер. В участъците с по-висока концентрация на ензима се отбелязва увеличаване на интензитета. Кривите показващи зависимостта на интензитета на флуоресценция от дължини на вълните на възбуждане 270 и 280 nm имат по-плавен характер.

На Фиг.25(*4.27) са представени спектрите на флуоресценция и вторите производни на флуоресцентния спектър на НОПМ в нативно и в денатурирано състояние при различни концентрации на коагулиращия ензим при възбуждане с $\lambda = 310$ nm.



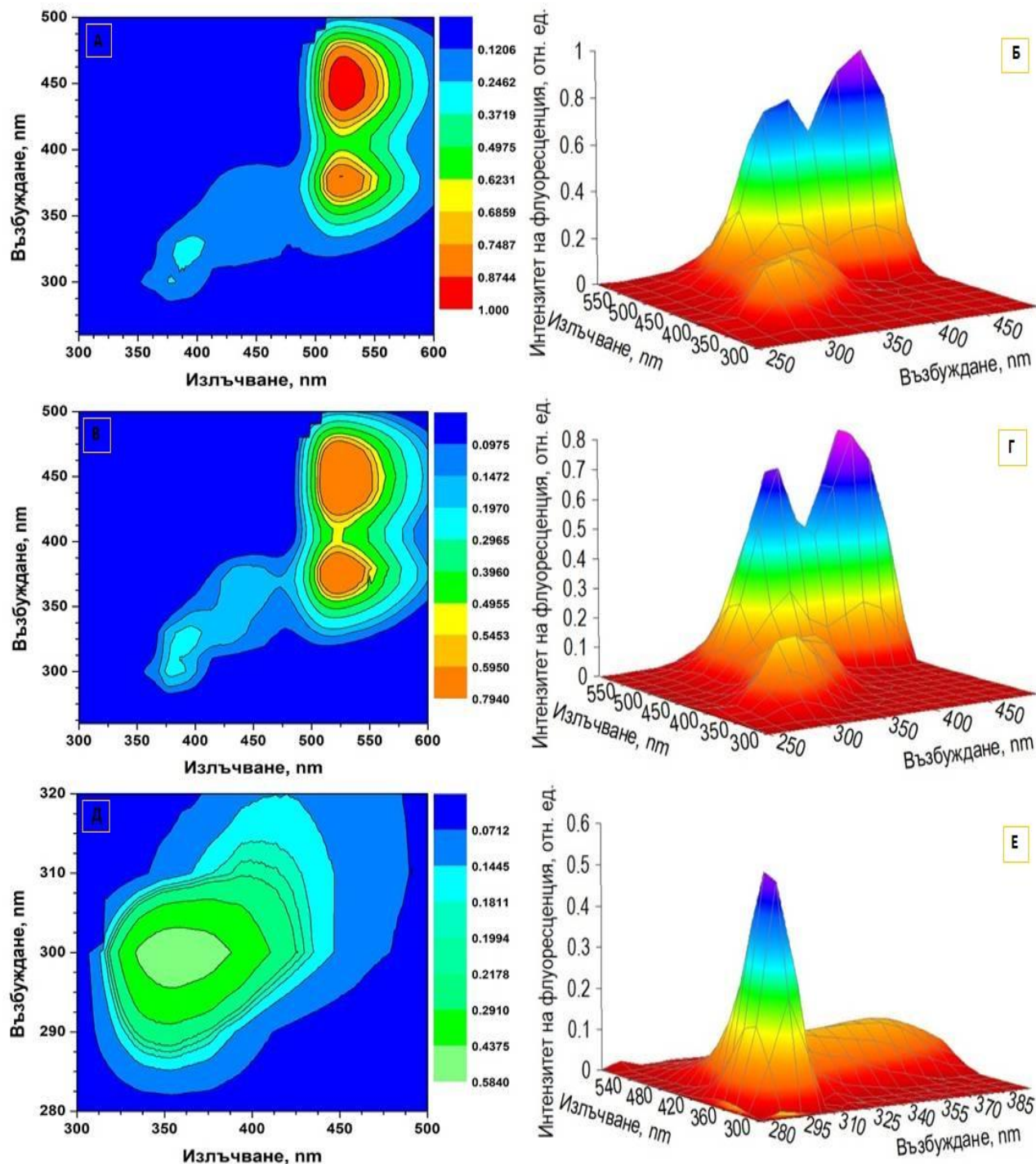
Фиг.25(*4.27) Спектри на флуоресценция и втори производни на флуоресцентния спектър на НОПМ в нативно и в денатурирано състояние при ензимна коагулация

Максималният интензитет на флуоресценция намалява в резултат на действието на коагулиращия ензим (Фиг.25(*4.27)), което може да е резултат от намаляването на триптофановите остатъци в резултат на протеолизата. При гасенето, емисионният спектър при $\lambda = 377$ nm на нативния белтък (НОПМ) батохромно се измества в дълговълновата област при $\lambda = 389$ nm (Фиг.25(*4.27)).

Съгласно хипотезата за двете състояния, триптофановите остатъци намиращи се в контакт с водният разтворител се характеризират с положение на максимумите около 377 nm, а намиращите се вътре във водното обкръжение на разтворителя – при около 389÷392 nm [205]. В съответствие с тази класификация, на Фиг.25(*4.27) положението на първия отрицателен максимум на втората производна на спектъра на флуоресценция може да се отнесе към ролята на триптофановите остатъци контактуващи с водното обкръжение, а третият отрицателен максимум, към повърхностно локализираните триптофанови остатъци, където е регистрирано батохромно изместване на дължината на вълната на флуоресцентното

излъчване от 377 nm на 392 nm, което е признак за осъществена структурна конформация на белтъците.

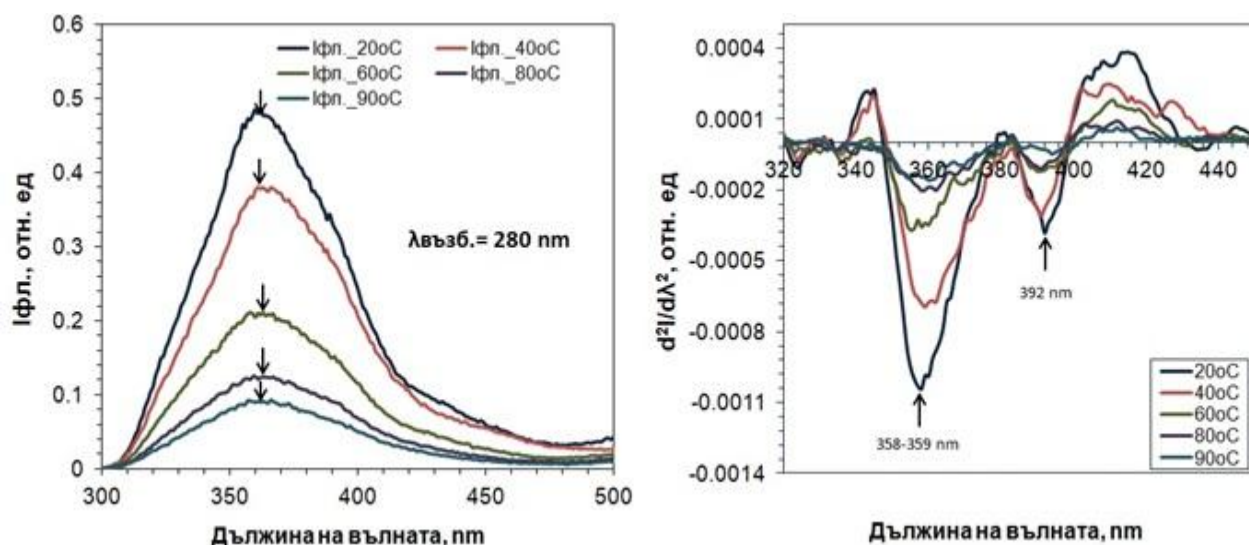
На Фиг.26(*4.28) са представени топографските ИВЕМ и 3D профили на спектъра на флуоресценция на НОПМ в нативно състояние (А, Б), след внасяне на коагулиращ ензим (В,Г) и на коагуланта (Д, Е).



Фиг.26(*4.28) Топографски (ИВЕМ) и 3D профили на спектъра на флуоресценция на НОПМ в нативно състояние (А, Б), след внасяне на коагулиращ ензим (В,Г) и на коагуланта (Д, Е)

2. Триптофанова флуоресценция при изследване на конформационни преходи на НОПМ под действието на температура

При нагряване става „разтопяване” на белтъчната молекула като се осъществява преход в състояние на безпорядъчно кълбо. Това, като правило води след себе си редица други преобразувания, общият резултат от които е състояние наречено термо-денатурация. Температурната денатурация на млечните белтъци предизвиква преход от β – листовата конфигурация на полипептидните вериги към по-разпъната α – спирална конфигурация. Обикновено, повишаването на температурата води до намаляване на интензитета на флуоресценцията (Фиг.27(*4.29)). Причината за това се дължи на увеличаващата се вибрационна енергия на молекулите, нарастването на броя на безизлъчвателните преходи както и на температурната дисоциация на молекулите.

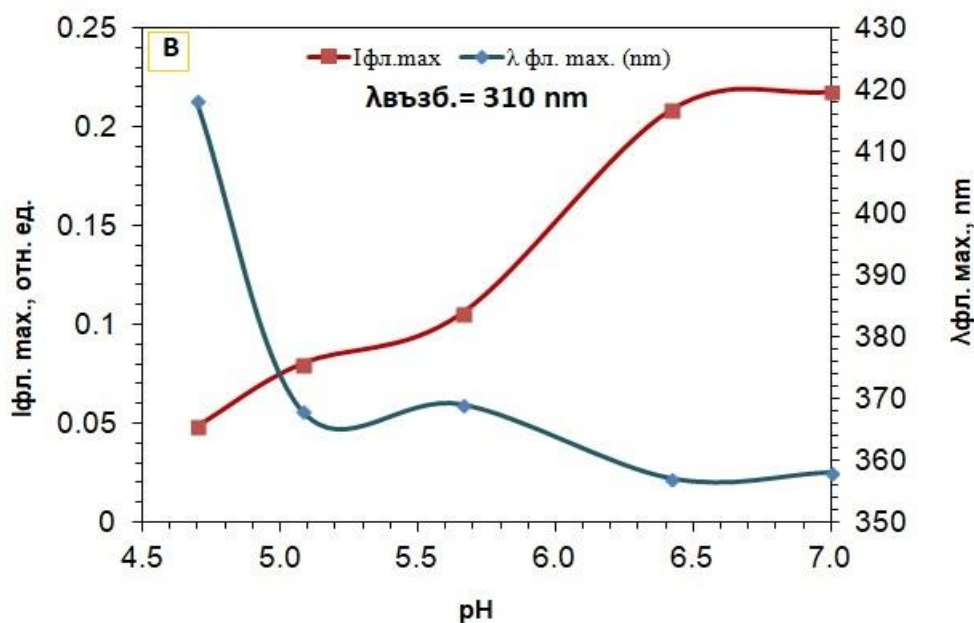


Фиг. 27(*4.29). Спектри на флуоресценция и втори производни на флуоресцентния спектър на НОПМ в нативно и в денатурирано състояние при термо-денатурация

Триптофановите остатъци, намиращи се в контакт с водният разтворител се характеризират с положение на максимумите около 358÷359 nm, а намиращите се вътре във водното обкръжение на разтворителя – при около 392 nm [205]. В съответствие с тази класификация, на Фиг.27(*4.29) положението на първия отрицателен максимум на втората производна на спектъра на флуоресценцията може да се отнесе към ролята на триптофановите остатъци контактуващи с водното обкръжение, а вторият отрицателен максимум, към повърхностно локализираните триптофанови остатъци, където е регистрирано батохромно изместване на дължината на вълната на флуоресцентното излъчване от 358÷359 nm на 392 nm, което е признак за осъществена структурна конформация на белтъците.

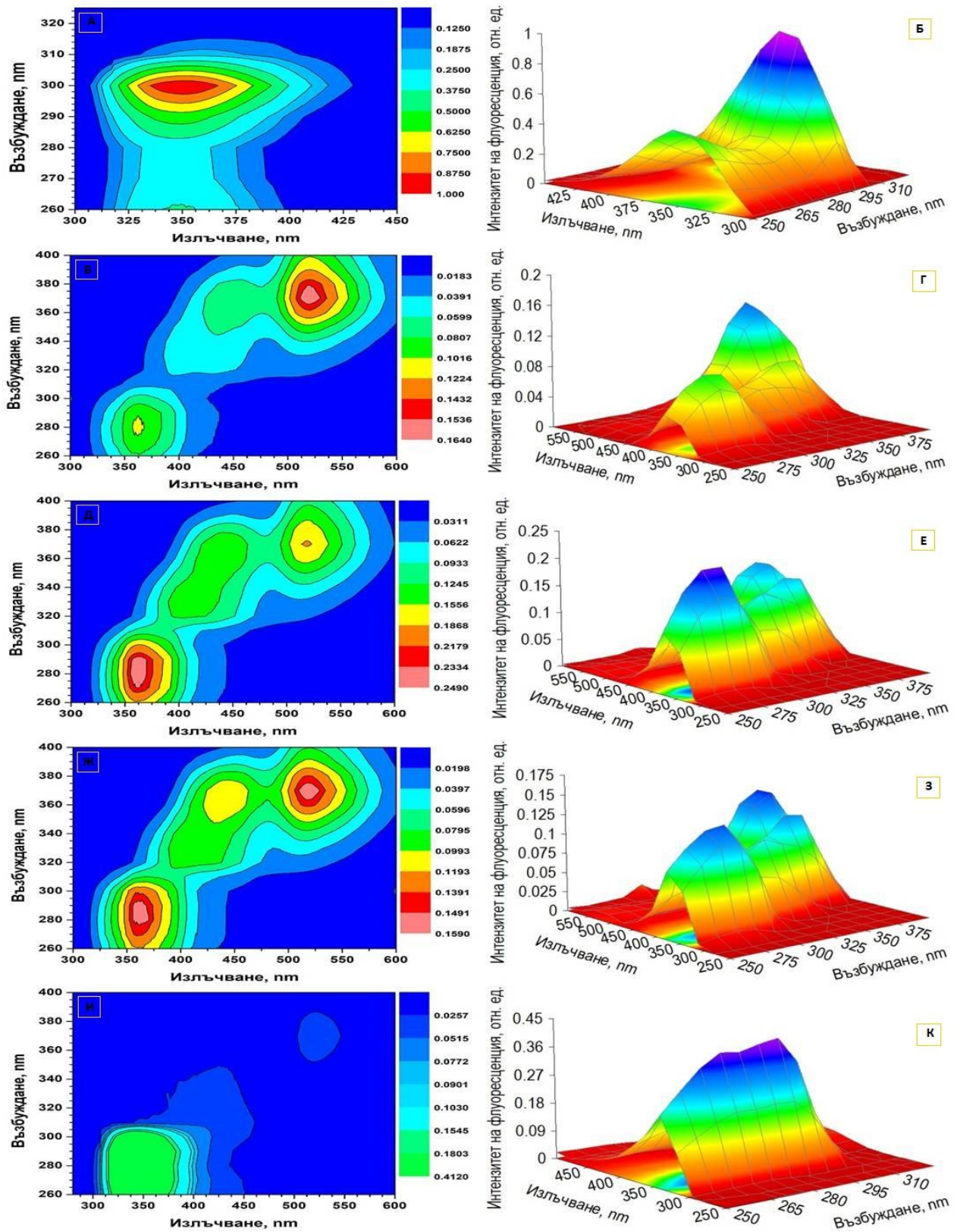
3. Триптофанова флуоресценция при изследване на конформационни преходи на НОПМ под действието на рН

Белтъчните макромолекули могат да претърпят динамични структурни изменения между две функционално активни форми или т.н. функционален преход при промяна на рН. Такива конформации се осъществяват в рамките на нативната структура на белтъка. Проведено е изследване на флуоресцентно-спектралните характеристики на АК остатъци на триптофан в молекулите на НОПМ при различни стойности на рН (4.7; 5.08; 5.66; 6.42 и 7.0). На Фиг.28(*4.30 (В)) са построени зависимостите на максимумите на спектъра на флуоресценция (I_{фл. max.}) и максималните дължини на вълните (λ_{фл. max.}) на НОПМ от рН на разтвора. При увеличаване на рН от 4.7 до 7.0 се наблюдава нарастване на I_{фл. max.} придружено с хипсохромно изместване на дължината на вълната λ_{фл. max.} на флуоресцентното излъчване от дълговълновия диапазон (418 nm) в късовълновия диапазон (358 nm). Това честотно изместване се дължи на конформационният функционален преход на белтъка, а съответното изменение на триптофановата флуоресценция се дължи на протонирането на карбоксилните групи в белтъка.



Фиг. 28(*4.30). Зависимост на максимумите на спектъра на флуоресценция (I_{фл. max.}) и максималните дължини на вълните (λ_{фл. max.}) на НОПМ от рН на разтвора

От Фиг. 28(*4.30), където е представена зависимостта на интензитета на флуоресценция от рН на средата, произтича изводът, че в алкална и неутрална среда интензитетът на флуоресценция на млечните протеини е по-висок, отколкото в кисела среда в близост до изоелектричната точка (рН4.7) на белтъка. Това се дължи на флуоресцентното гасене на триптофана. При намаляване на активната киселинност (рН) на млечно-протеиновата среда от неутрална (~ 7.0) към кисела (~ 4.7), белтъчната молекула на казеина се набраздява, става по-грапава и нацепена, в резултат на което в нейната вътрешност прониква вода и предизвиква флуоресцентно гасене.



Фиг.29(*4.31) Топографски (ИВЕМ) и 3D профили на зависимостта на интензитета на флуоресценция от рН на средата при рН7.0 (А,Б); рН6.42 (В,Г); рН5.66 (Д,Е); рН5.08 (Ж,З); рН4.7 (И,К)

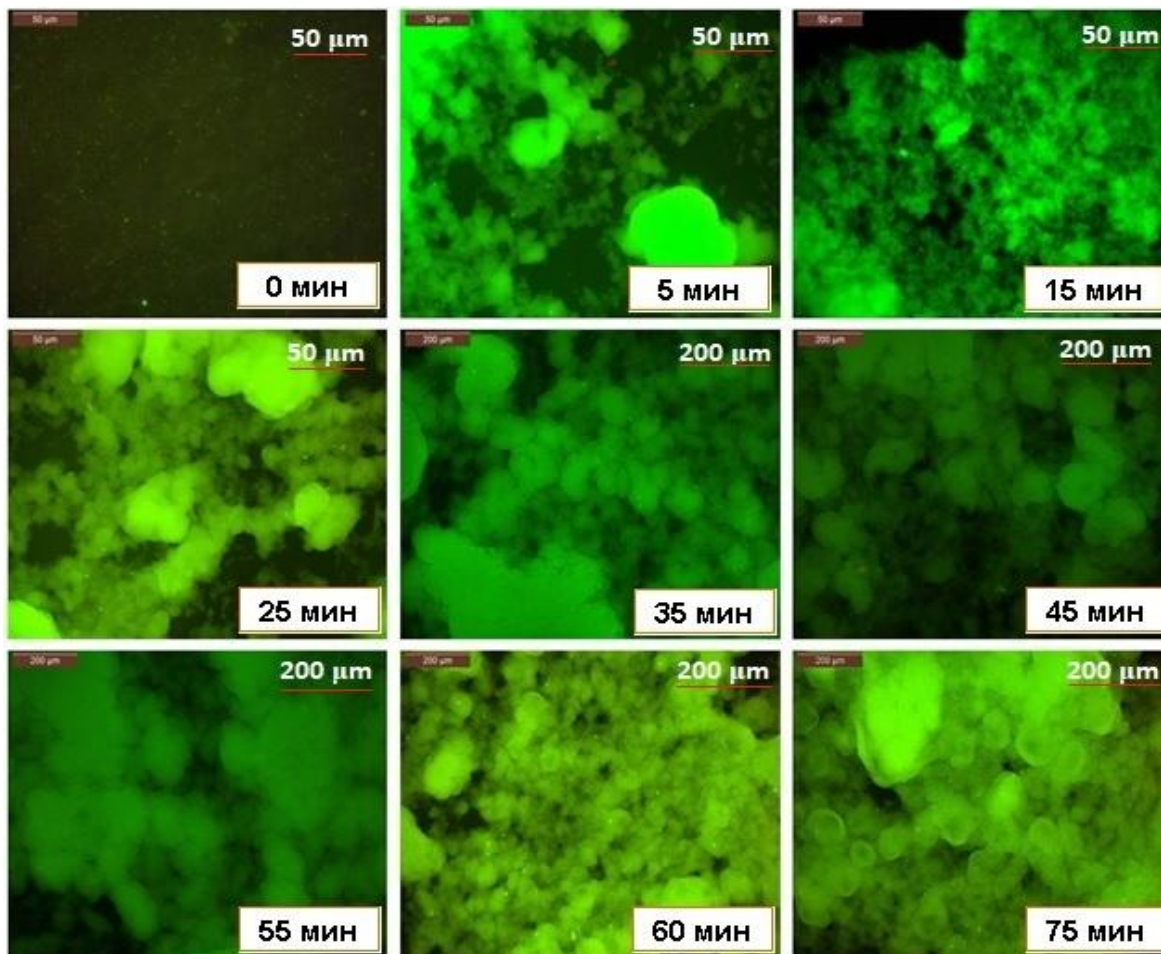
На Фиг.29(*4.31) са представени топографските ИВЕМ и 3D профили на зависимостта на интензитета на флуоресценция от рН на средата при рН7.0; рН6.42; рН5.66; рН5.08; рН4.7

3.8. Методи за изследване на микроструктурата на млечни белтъци

3.8.1. Флуоресцентна микроскопия

Изследвана е промяната на структурата на белтъчната полидисперсна среда през различните етапи на протичане на ензимна коагулация на НОПМ. Определена е топографията, вида на повърхността на формиращият се коагулум, големината на грапавините, диаметра, височината и формата на белтъчните частици в образеца. Извършен е анализ на топографските изображения.

На Фиг.30(*4.32). са показани серия от снимки от флуоресцентен микроскоп на микроструктурата на НОПМ през различни етапи от протичането на ензимна коагулация в продължение на 75 минути, с времеви интервали от 5 минути. Направената серия от снимки нагледно илюстрира кинетиката на процеса на образуване на първични клъстери от мицели по време на кинетичната реакция.



Фиг. 30(*4.32). Флуоресцентна микроскопия на казеинови мицели по време на ензимна коагулация на НОПМ с флуоресцентен микроскоп Leica DM1000, оцветител акредин оранж (АО). На снимките е указано времето след внасяне на коагуланта

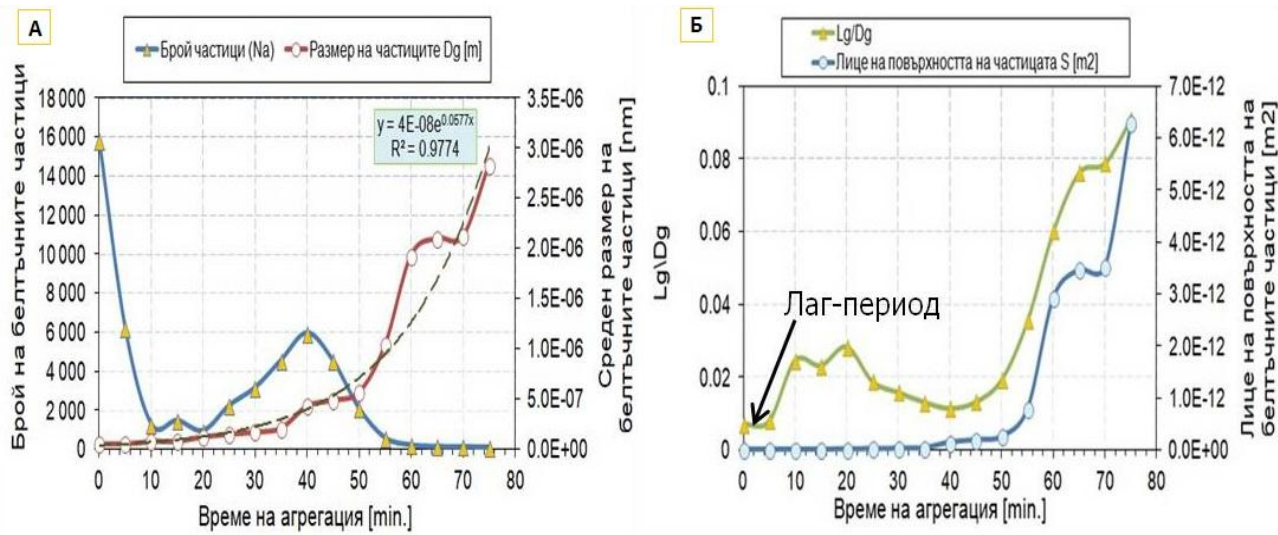
От снетите посредством флуоресцентна микроскопия изображения на НОПМ в началото на ензимната реакция (Фиг.30(*4.32_0 мин.)) се вижда, че е постигнато добро разпределение на частиците в емулсията в резултат на направената хомогенизация. Големите агломерати са сравнително малко, с размери $\approx 300 \div 600 \times 1000$ nm, като останалите наночастици са равномерно разпределени в обема на изследвания образец от НОПМ. Структурата на млечната емулсия се състои от белтъчни частици, които при инокулацията на коагулиращия ензим формират отделни малки агломерати с размери приблизително $280 \div 400$ nm. Преобладаващата част от казеиновите частици са с размери от $60 \div 180 \times 40 \div 100$ nm.

При анализа на флуоресцентните изображения, са определени: броят на съдържащите се в изследвания диапазон белтъчни частици (N_a), техният размер (D_g) и височина (Z_g), обемът (V_g) и лицето на повърхността S , плътността на разпределение на частиците (N_g), средноквадратичната грапавост на формиращият се по време на ензимната реакция профил. От плътността на разпределение на частиците беше изчислено средното разстояние между

$$\text{частиците } L_g = \sqrt{\frac{1}{N_g}}.$$

От направеният анализ на флуоресцентните изображения при изследване на структурните изменения на млечната емулсия на НОПМ по време на ензимна коагулация, се наблюдават няколко характерни времеви участъка разделени със стъпка от 5 минути.

Получените в резултат на направените изчисления зависимости на броя (N_a) и размера (D_g) на белтъчните частици от времето на агрегация, са представени на Фиг. 31(*4.33).



Фиг. 31(*4.33). Зависимост на броя (N_a) и размера (D_g) на белтъчните частици (А); Зависимост на отношението на ср. разстояние между частиците към размера на белтъчните частици L_g/D_g и лицето на повърхността на частиците от времето на агрегация

През първите 5 минути от началото на ензимната реакция, отношението L_g/D_g (Фиг. 31(*4.33) почти не се променя и остава в диапазона $0,007 \div 0,008$ и много прилича на т.н. лаг-

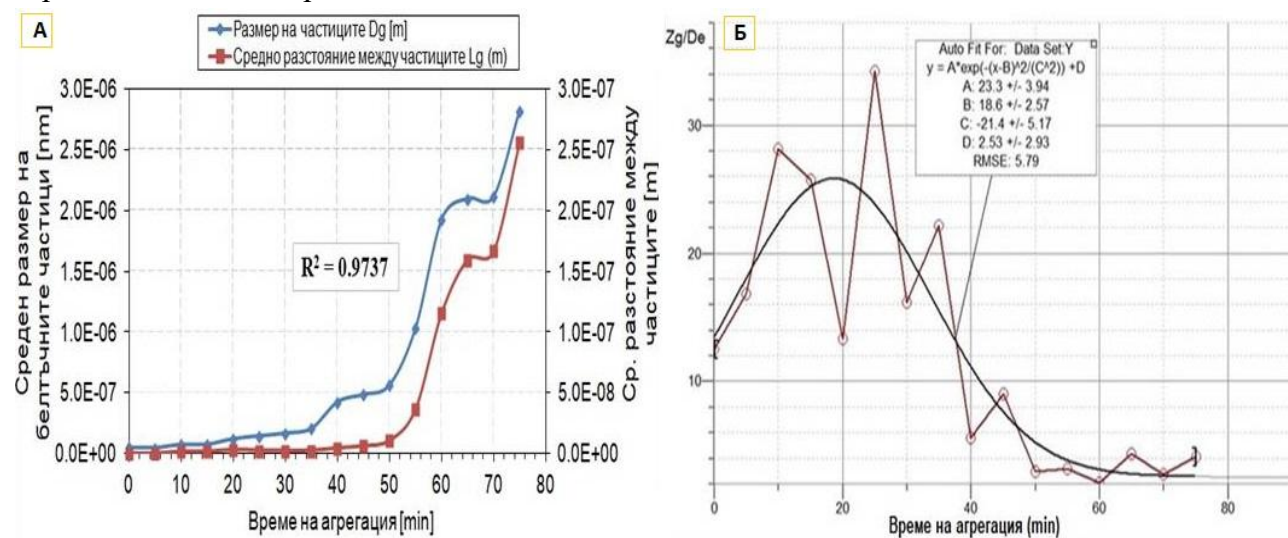
период, който е свързан с подготовката за разгъване на белтъчната молекула и формиране на малки агрегати, които да участват в процеса на явна коагулация.

През следващият времеви интервал между 5-та и 10-та минути това отношение рязко нараства от 0.008 до 0.0246, което е показател за освобождаване на пространство между белтъчните агрегати. През следващите 10 минути няма съществена промяна в отношението, след което монотонно намалява до 40-та минута. От този момент нататък настъпва рязко увеличаване на отношението Lg/Dg , което продължава до края на ензимната реакция.

От графиките се вижда, че през времеви интервал от 0 до 15 минути, в който влиза индукционният период и периода на скритата коагулация, активно намалява плътността на диспергираните в емулсията белтъчни частици (Ng) и тяхното количество (Na), докато размерът им почти не се променя.

През този период, белтъчните частици практически не променят своя размер за сметка на формата, която се променя във височина и достига своя максимум (Фиг.32(*4.34)) около 20-та минута след внасяне на коагулиращия ензим.

На Фиг. 32(*4.34) е показана зависимостта на средния размер на белтъчните частици Dg и средното разстояние между частиците Lg от времето на агрегация. От направения статистически анализ на резултатите от измерването, както и от графиката се вижда високата корелация ($R^2=0.9737$) между тези два динамични параметъра, която се запазва през целия период на ензимната реакция.

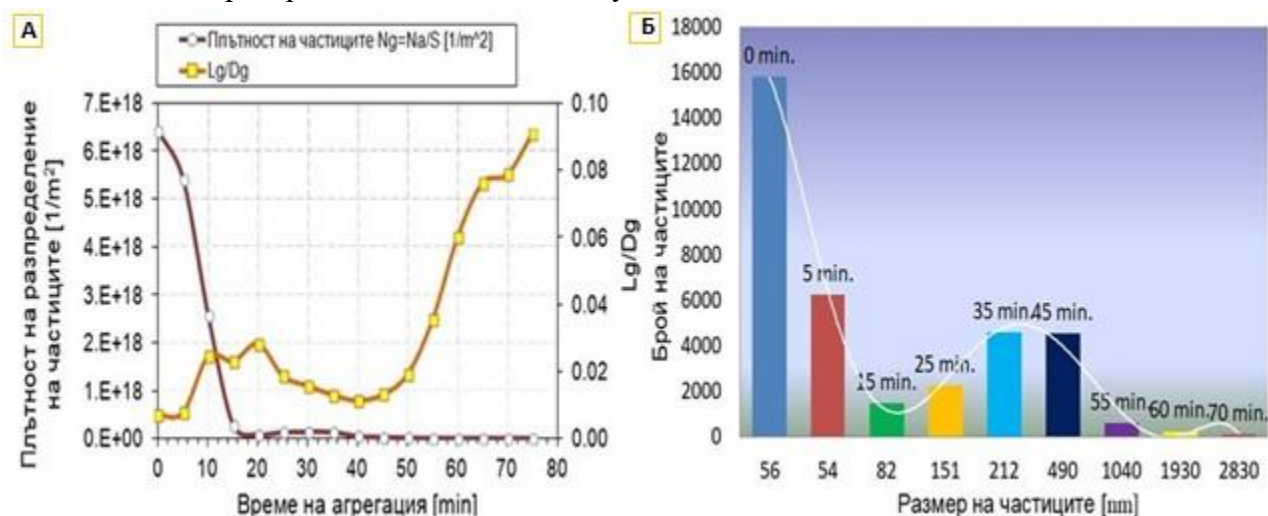


Фиг.32(*4.34). Зависимост на средния размер на белтъчните частици Dg и средното разстояние между частиците Lg от времето на агрегация (А); Зависимост на отношението (форм фактора Zg/Dg) на средната височина на белтъчните частици (Zg) към техния среден диаметър Dg от времето на агрегация (Б)

Зависимостта на отношението (Zg/Dg) на средната височина на белтъчните частици Zg към техния среден диаметър Dg е илюстрирана на Фиг. 32(*4.34). Отношението (Zg/Dg) може да бъде използвано като параметър, характеризиращ промяната на формата на белтъчните частици през различните етапи на ензимната коагулация на НОПМ.

Както се вижда от графиката, още в първите минути след внасяне на коагулиращия ензим, форм-фактора (Zg/Dg) приема стойности от 12,50 до 16,85. Това е показател, че още преди да започне етапа на същинската коагулация, белтъчните частици не са с формата на сфера, а имат издължена по височина форма, която достига своята максимална стойност около 18 – 20 минута след внасянето на коагулиращия ензим. През следващите времеви интервали, тази издълженост на частиците изразена чрез отношението на форм-фактора (Zg/Dg) монотонно намалява и достига стойности ($Zg/Dg = 4,31 \pm 2,07$), като в края на кинетичната реакция, т.е. третия и четвъртия етап на ензимната коагулация, белтъчните частици като част от структурата на новоформирания се млечен гел приемат форма много близка до сферичната. Това се дължи на факта, че през третия период на ензимната коагулация се осъществява уплътняване на гела, а през четвъртия – синерезиса, се извършва отделяне на свързаната с белтъчната молекула вода.

Зависимостта на плътността на разпределение на белтъчните частици (N_g) и отношението на средното разстояние между частиците и средния размер на частиците Lg/Dg от времето, през което протича ензимната коагулация на НОПМ, е показана на Фиг.33(*4.35). Отношението Lg/Dg може да бъде използвано като параметър, характеризиращ плътността на опаковката на агрегиращите белтъчни молекули в изследвания слой.



Фиг. 33(*4.35). Зависимост на плътността на разпределение на белтъчните частици (N_g) и отношението на средното разстояние между частиците и средния размер на частиците Lg/Dg от времето на агрегация (А); Разпределение на белтъчните частици по размери по време на ензимна коагулация на НОПМ с 32,5 μ l коагулиращ ензим +20 μ l $CaCl_2$ (Б)

На Фиг. 33(*4.35 Б) е показано разпределението на белтъчните частици по размери по време на ензимна коагулация на НОПМ с 32,5 μ l коагулиращ ензим +20 μ l $CaCl_2$.

От направеният анализ на изменението на структурните елементи на млечно-протеиновата дисперсна среда, може да се направи извода, че използваният метод флуоресцентна микроскопия за изследване агрегацията на млечни белтъци по време на ензимна коагулация е удобен, бърз и достатъчно информативен оптичен метод, подходящ за целта.

3.8.2. Атомно-силова микроскопия

Проведена е визуализация и регистрация на млечни белтъчни агрегати на СВОМ и НОПМ с различна концентрация на млечна мазнина.

Всички резултати от направеният анализ на изображенията от атомно-силовата микроскопия (AFM) с помощта на програмен продукт Gwyddion 2.42 и последващи изчисления са представени в Таблица 16 от дисертационният труд.

От направеният анализ на АСМ, средната височина на белтъчните частици Zg при СВОМ намалява с намаляване на тяхната концентрация от 142.5 nm до 27.4 nm, а средният размер на белтъчните частици варира в диапазона от 112 nm до 77 nm. Форм-факторът Zg/Dg , който се явява като показател на формата на белтъчните частици показва, че белтъчните частици не са с формата на сфера, а имат издължена по височина форма (Фиг. 3.15 а) при СВОМ с 0.1% млечна мазнина, което се потвърждава от проведеното изследване с флуоресцентна микроскопия.

4. Основни изводи

4.1. Показано е, че оптичните методи позволяват не инвазивно проследяване на кинетиката на протичане на ензимна коагулация, което благоприятства използването им при научни изследвания и промишлени приложения.

4.2. На база на предсказващия модел е установено, че за изследване на структурните изменения на млечни белтъци най-информативни са източници на светлина с дължина на вълната λ – **650 nm и 550 nm**.

4.3. Флуоресцентната спектроскопия и построяването на изопотенциални възбудно-емисионни матрици (ИВЕМ) са използвани за верификация на предсказващия модел.

4.4. Намаляването на отношението на интензитета на поглъщане при тирозиновия дублет $830.3 \text{ cm}^{-1}/850.6 \text{ cm}^{-1}$ преди и след загряване на средата в продължение на 60 min. е сигурен признак за протичащи структурни изменения в млечно-протеиновата среда на НОПМ по време на термо-денатурация.

4.5. Появата на високо интензивни пикове на честоти 1003 cm^{-1} , 1061 cm^{-1} и 1159 cm^{-1} е признак за настъпили конформации в структурата на казеиновата молекула при химична денатурация, като резултат от разкъсването на съдържащите в състава на дисулфидните мостове, дисулфидни химични връзки.

4.6. Направеният корелационен анализ дава основание да се твърди, че всеки светлинен източник с λ от **650 nm до 850 nm** с достатъчно висока достоверност на резултатите може да се използва за изследване на процеса на термо денатурация на серумни белтъци при натурални обезмаслени пресни млека.

4.7. Изследваните параметри с помощта на флуоресцентна микроскопия: могат да бъдат използвани за определяне както на формата, размера, концентрацията на белтъчните частици, така и на тяхното разпределение по размери по време на протичане на кинетичната реакция.

5. Приноси

5.1. Конструирано, разработено и експериментално тествано влакнесто-оптично измервателно устройство за фотометрични изследвания на течни полидисперсни среди.

5.2. Комплексно изследване на протичането на ензимна коагулация, химична и термо-денатурация на млека с различна концентрация на общ белтък и казеин, като е изследван ефектът на независимите променливи рН, температура, концентрация на коагулиращ ензим (химозин) и концентрация на денатуриращ агент урея с концентрация 8М, 4М и 2М.

5.3. Въз основа на проведените изследвания е предложен предсказващ модел за избор на най-информативна дължина на вълната на светлинния източник.

5.4. Установена е много добра корелация при изследването на термо-денатурация между методите на ДСК и оптична турбидиметрия.

5.5. Показано е, че не само ИЧ диапазон, който класически се използва за изследване на белтъци, но и видимия диапазон, където светлинните източници и детектори са много достъпни, е също така достатъчно подходящ за подобен род изследвания.

6. Заключение

6.1. В дисертационният труд е представено конструирано, разработено и експериментално тествано влакнесто-оптично измервателно устройство, което позволява извършване на изследвания на структурни изменения на белтъчни полидисперсни среди при ензимна коагулация, химична и термо-денатурация.

6.2. Показано е, че оптичните методи работещи с монохроматични източници излъчващи във видимия диапазон са също така достатъчно информативни и подходящи за изследване на структурни изменения на белтъчни полидисперсни среди.

6.3. Всички резултати представени в настоящият дисертационен труд са получени самостоятелно или с личното участие на докторанта.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Dimitrova, T. L., Eftimov, T. A., Kabadzhov, V. G., Panayotov, P. T., & Boyanova, P. B. (2014). Scattering and fluorescence spectra of cow milk, *Bulgarian Chemical Communications*, 46, Special issueB, pp.39-43. **IF-0,32**.
2. В. Кабаджов, „Предимства на спектрофотометричните методи за анализ на мляко и млечни продукти”, ПУ „П. Хилендарски”, Научни трудове том 38, кн. 4, 2013-Физика.
3. V.G.Kabadzhov, T.L.Dimitrova, I.Bodurov, “A Turbidimetric measurement of casein micelles”, IV International Scientific-Practical Conference “Food, Technologies&Health – 2015”, 20 November 2015, Plovdiv, Bulgaria.

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ

Dimitrova, T. L., Eftimov, T. A., Kabadzhov, V. G., Panayotov, P. T., & Boyanova, P. B. (2014). Scattering and fluorescence spectra of cow milk, Bulgarian Chemical Communications, 46, Special issueB, pp.39-43.

[CITATION]

1.Singh-Freeman, K. A. (2016). *SPATIALLY RESOLVED DIFFUSE REFLECTANCE SYSTEM FOR MEASUREMENT OF SUSPENSION PROPERTIES* (Doctoral dissertation, Charles Darwin University).

2.Кръстена Николова, Тинко Ефтимов. (2016). Флуоресцентна спектроскопия. Метод за анализ и оценка на качеството на хранителни продукти. (Монография).

ИСПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Мачкова М., Гургинов А., Колоидна химия, Учебно пособие за студентите на ХТМУ-София, София 2013.
2. Осинцев А.М. Развитие фундаментального подхода к технологии молочных продуктов //Кемеровский технологический институт пищевой промышленности . – Кемерово, 2004, -152 с.
3. David W. Hahn, *Light Scattering Theory*, Department of Mechanical and Aerospace Engineering, University of Florida, July 2009, (dwhahn@ufl.edu).
4. *Structural symmetry and protein function*, David S. Goodsell and Arthur J. Olson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2000. 29:105–53.
5. Goodsell DS, Olson AJ. 1993. Soluble proteins: size, shape and function. *Trends Biochem. Sci.*18:65-68.
6. John Strutt (1871) "On the light from the sky, its polarization and colour," *Philosophical Magazine, series 4*, vol.41, pages 107-120, 274-279.
7. Kenneth P. Murphy, *Protein Structure Stability and Folding*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 168, 2001.
8. W.T.Godbey, *An Introduction to Biotechnology, The Science, Technology and Medical Application*, 2014, p.p. 9 – 33.
9. John Strutt (1871) "On the scattering of light by small particles," *Philosophical Magazine, series 4*, vol. 41, pages 447-454.
10. John Strutt (1881) "On the electromagnetic theory of light," *Philosophical Magazine, series 5*, vol. 12, pages 81-101.
11. John Strutt (1899) "On the transmission of light through an atmosphere containing small particles in suspension, and on the origin of the blue of the sky," *Philosophical Magazine, series 5*, vol. 47, pages 375-394.
12. Landau, L. D., & Lifshits, E. M. (1982) *Rayleigh Scattering in Gas and Liquid. Theoretical Physics. Electrody- namics of Continuous Media. Vol. VIII. Moscow, Nauka*, 582–583.
13. Frolov, Yu. G. (1988) *Course of Colloid Chemistry. Surface Phenomena and Disperse Systems. Moscow, Khimia*. 464 p.
14. Koniukhov, V. Yu., & Popov, K. I. (2001) *Physical and Colloid Chemistry. Part. 2. Moscow: MGUP (Mogilev State University of Food Technologies) Publishing House*. 162 p.
15. Töpel A (2004) *Chemie und Physik der Milch vol 1. . Behr's, Hamburg*.
16. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 2010. -336 с.
17. Тепел А.В. Химия и физика молока. — СПб Професия, 2012-832с.
18. Astrid Jolanda Vasbinder, *Casein - whey protein interactions in heated milk*, 2002, *Doctor Thesis*, University of Utrecht, Netherlands.
19. Jensen, Robert G.: *Handbook of Milk. Composition Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokio, Toronto* (1995).
20. Schlimme E., Buchheim W.: *Wilch und ihre inhaltsstoffe – Chemische und Physicalische Grundlagen. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen* (1995).
21. Swaissgood H.E.: *Chemistry of the caseins. In. Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1. Proteins.*(Fox. P. F., Hrsg. Elsevier Applied science, London, New York, 63-110 (1992).
22. Walstra P., Jenness R.: *Dairy Chemistry and Physics. John Wiley & Sons, New York* (1984).
23. *Dairy Chemistry and Physics.* <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/composition-and-structure-overview>
24. Pulari Krishnankutty Nair, *Colloidal Behaviour of Casein Micelles with concentration*, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 2012.

25. Investigation of Casein Micelle Particle Size Distribution in Raw Milk of Estonian Holstein Dairy Cows, H. Mootse*, A. Pisonen, S. Pajumagi, A. Polikarpus, V. Tatar, A. Sats and V. Poikalainen, Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Estonian University of Life Sciences, Kreutzwaldi 56/5, EE51014 Tartu, Estonia.
26. Holt, C. & D. S. Horne. 1996. The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implication for dairy technology. *Neth. Milk Dairy J.* 50: 85-111.
27. Horne, D. S. 1998. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Internat. Dairy J.* 8: 171-177.
28. Walstra, P. 1999. Casein sub-micelles: do they exist? *Internat. Dairy J.* 9: 189-192.
29. Horne, D. S. 2002. Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid and Interface Sci.* 7: 456-461.
30. Dalgleish, D. G. 2011. On the structural models of bovine casein micelles - review and possible improvements. *Soft Matter.* 7: 2265-2272.
31. Dalgleish, Douglas G. and Milena Corredig. 2012. The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. *Annual Reviews Food Sci. Technol.* 3:449–67.
32. de Kruijff, Cornelis G., Thom Huppertz, Volker S. Urban and Andrei V. Petukhov. 2012. Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science* 171–172: 36–52.
33. S. Banon and J. Hardy. (1992) A Colloidal Approach of Milk Acidification by Glucono-Delta-Lactone. *Journal of Dairy Science*, 75(4): 935-941.
34. T. Wade and J. K. Beattie. (1997) Electroacoustic determination of size and zeta potential of fat globules in milk and cream emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 10(2): 73-85.
35. Fox, P.F. and P.L.H. McSweeney. *Advanced Dairy Chemistry. 3rd ed. Vol. 2. Lipids* (2006). Vol (2006). Springer.
36. Бобылин В.В., Буланенко А.М. Исследования особенностей кислотного и сычужного гелеобразования молока в связи с созданием новых видов мягких сыров // *Прогрессивные технологии и оборудование в пищевой промышленности: Международная научн.-техн. конф. - Воронеж, 1997.* — с. 62.
37. De Kruijff, C.G. Casein micelle interactions / C.G. De Kruijff // *Int. Dairy J.*- 1999.- V 9.- P. 183-188.
38. Regnaut, C. Application of the adhesive hard sphere model to the structure of colloidal suspensions / C. Regnaut, J. C. Ravey // *J.Chem. Phys.*- 1989.- V 91.- P. 1211–1221.
39. Bokobza L., Near infrared spectroscopy, *J. Near Infrared Spectroscopy*, 6(1-4), 3-17, 1998.
40. M R SHENOY, Optical fibre probes in the measurement of scattered light: Application for sensing turbidity, *Indian Academy of Sciences, Pramana – J. Phys.*, Vol. 82, No. 1, January 2014.
41. Теплофизические и физико-химические характеристики продуктов микробиологического синтеза. Справочник. Карнов А.М., Саруханов А.В. -М.: Агропромиздат, 1987-224с.
42. Enzymes of arginine metabolism *J Nutr.* 2004 Oct; 134(10 Suppl): 2743S-2747S.
43. П. А. Ребиндер., *Поверхностные явления в дисперсных системах. Коллоидная химия. Избранные труды.*, «Наука», 1978, стр. 368.
44. Ребиндер П.А., Влодавец И.Н., *Проблемы физической химии молока //Молочная промышленность, 1981, - 264 стр.*
45. Г.В. Твердохлеб, Р.И. Раманаускас, *Химия и физика молока и молочных продуктов, Москва, ДеЛи принт, 2006. – 360 с., ISBN 5-94343-114-4.*
46. Doolittle RF (1989). "Redundancies in protein sequences" in *Prediction of Protein Structures and the Principles of Protein Conformation.* (Fasman GD, ed.), pp 599-623, Plenum Press, New York.
47. Parcell A.C., et al. Effects of L-tyrosine and carbohydrate ingestion on performance. *Journal of Applied Physiology* 2002 Nov; 93(5): 1590-97. Abstract.
48. I.Vlaeva, T. Yovcheva, K. Zdravkov, G. Minchev and E. Stoykova, Design and testing of fourwavelength laser micro-refractometer, *Proceedings of SPIE*, 2008, 7027, pp. 70270S-70270S-8.
49. B. Aernouts, I E. Polshin, J. Lammertyn, and W. Saeys, Visible and near-infrared spectroscopic analysis of raw milk for cow health monitoring: Reflectance or transmittance?, *Journal of Dairy Science* Vol. 94 No. 11, 2011.
50. M. Castillo, F.A. Payne, M.B. Lopez, E. Ferrandini, J. Laencina, Optical sensor technology for measuring whey fat concentration in cheese making, *Journal of Food Engineering* 71 (2005) 354–360.

51. Крусъ Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов. / Г.Н. Крусъ. -М.: Колос, 2000. -368 с.
52. Haibo Huang, Haiyan Yu, Huirong Xu, Yibin Ying, *Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review*, *Journal of Food Engineering* 87 (2008) 303–313.
53. Химия пици: Белки: Структура, функции, роль в питании/И.А.Рогов, Л.В. Антипова, Н.И.Дунченко, Н.А.Жеребцов. В 2-х кн. Кн.1-М.:Колос, 2000.-384 с.
54. *Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision*, H. M. Farrell, Jr., R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, L. K. Creamer, C. L. Hicks, C. M. Hollar, K. F. Ng-Kwai-Hang, and H. E. Swaisgood, *J. Dairy Sci.* 87:1641–1674, American Dairy Science Association, 2004.
55. Soliman, T.N., A.F. Farrag; A. Shendy and El-Sayed, M.M., *Denaturation and Viscosity of Whey Proteins Solutions as Affected by Frozen Storage*, *Journal of American Science* 2010;6(12).
56. Molina, I.H; Kramm, J.; Brito, C. et al. *Protein composition of milk from Holstein–Friesian dairy cows and its relationship with the genetic variants A and B of kappa-casein and betalactoglobulin*. *International Journal of Dairy Technology*, v.59, p.183-187, 2006.
57. Dalgleish D. G., Horne D. S., Law A.J.R.. *Size-related differences in bovine casein micelles*// *Biochim. Biophys. Acta* 1989 – V. 991 – p. 383-387. (a)
58. Остроумова Т. А., *Химия и физика молока: Учебное пособие. - Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. Кемерово, 2004.- 196 с.*
59. Hallen, E.; Wedholm, A.; Andren, A. et al. *Effect of betacasein, kappa-casein and beta-lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants*. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v.125, n.2, p.119-129, 2008.
60. Phadungath, C. *Casein micelle structure: a concise review*, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 2005, 27(1) : 201-212
61. Sawyer, L., Barlow, P.N., Boland, M.J., Creamer, L.K., Denton, H., Edwards, P.J.B., Holt, C., Jameson, G.B., Kontopidis, G., Norris, G.E., Uhrinova, S., and Wu, S. 2002. *Milk protein structure – what can it tell the dairy industry?: A Review*. *Int. Dairy J.*, 12: 299-310.
62. de Kruif, C. G., and S.P.F.M. Roefs. 1996. *Skim milk acidification at low temperatures: A model for the stability of casein micelles*. *Neth Milk Dairy J.* 50:113–120.
63. Cornelis G. de Kruif, Thom Huppertz, Volker S. Urban, Andrei V. Petukhov, *Casein micelles and their internal structure*, *Advances in Colloid and Interface Science* 171–172 (2012) 36–52.
64. S.A. Ivanova, *The stochastic model of acid coagulation in disperse systems of skim milk*, *Kemerovo Institute of Food Science and Technology*.
65. Bauer R., Hansen M., Hansen S., Øgendal L., Lomholt S., Qvist K., Horne D. *The structure of casein aggregates during renneting studied by indirect Fourier transformation and inverse Laplace transformation of static and dynamic light scattering data, respectively*// *J. Chem. Phys.* 1995. V. 103, p. 2725-2737.
66. Dalgleish D. G. *A mechanism for the chymosin-induced flocculation of casein micelles*// *Biophysical Chemistry*. 1980, v. 11, p. 147-155.
67. Darling D. F., van Hooydonk A. C. M. *Derivation of a mathematical model for the mechanism of casein micelle coagulation by rennet*// *J Dairy Res.* 1981. V. 48, p. 189-200.
68. Hyslop D. B. *Enzyme-induced coagulation of casein micelles: a number of different kinetic models*//*Journal of Dairy Research.* 1993, v. 60, p. 517-533.
69. Payens T. A. J., Wiersma A.K. , Brinkhuis J. *On enzymatic clotting processes. I. Kinetics of enzyme-triggered coagulation reactions*// *Biophysical Chemistry.* 1977, v. 6, p. 253-262.
70. De Kruif C.G. *Skim milk acidification*// *Journal of Colloid and Interface Science*, 1997 – V.185 – p.19-25.
71. De Kruif C.G. *Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation*// *Journal of Dairy Science*, 1998 – V.81 – p.3019-3028.
72. De Kruif C.G. *The Turbidity of Renneted Skim Milk*. // *Journal of Colloid and Interface Science*, 1993 – V.156 – p.38-42.

73. Л.А. Остроумов, А.М. Осинцев, И.А. Смирнова, М.А. Глушаков, А.Л. Чеботарев, *Феноменологическая модель термокислотной коагуляции белков обезжиренного молока*, *Техника и технология пищевых производств*. 2011. № 1.
74. A. M. Osintsev, E. S. Gromov, and V. I. Braginsky, *A Phenomenological model of milk Coagulation*, *Foods and Raw Materials Vol.1 (No1) 2013*.
75. Lucey J.A., Tamehana M., Singh H., Munro P.A. *Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono- δ -lactone*.// *Journal of Dairy Research*, 2000 – V.67 – p.415-427.
76. Merin V., Talpaz H., Fistman S. *A mathematical model for, the description of chymosin action on casein micelles* // *J. Dairy research*, 1989. — v. 56. - № L-p.31-40.
77. Раманаускас Р. *Исследование кинетики сычужного свертывания молока реологическими методами* // *Труды Литовского филиала ВНИИМС*. 1984 -т. 18-с. 83-89.
78. Раманаускас Р. *Исследование кинетики сычужного свертывания молока реологическими методами*// *Труды Литовского филиала ВНИИМС*. 1984 – т. 18 – с.83-89.
79. Adam Belsom, Michael Schneider, Lutz Fischer, Oliver Brock and Juri Rappsilber, *Serum Albumin Domain Structures in Human Blood Serum by Mass Spectrometry and Computational Biology*, *Molecular & Cellular Proteomics* 15.3, pp.1105–1116, 2016.
80. Kaufman W., Hagemester H.: *Composition of milk*.In:*Dairy Cattle Production*. World Animal Science, Vol. C3 (Gravert H.O., Hrsг.) Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 107-171 (1987).
81. Korhonen H.:*Antibacterial and antiviral activities of Whey proteins*.Inc.: *The Importance of Whey and Whey Components in Food and Nutrition* , Behr’s Verlag. 303-317 (2002).
82. Home, D.S. (2006). *Casein micelle structure: Models and muddles*. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2-3, 148-153.
83. Л.А. Остроумов, А.М. Осинцев, И.А. Смирнова, М.А. Глушаков, А.Л. Чеботарев, *Phenomenological model of thermoacid coagulation of skim milk proteins*, *Техника и технология пищевых производств*. 2011. № 1
84. Eva Cristina Correa a,b, Beatriz Moreno-Lucas b, M^a Concepción Chamorro b, Pilar Barreiro, *Optimization of a portable NIR device for the optical supervision of milk coagulation process*.
85. Novia D. Irianti, Aulia MT. Nasution. *Characterization of spectral absorbance for determining the reduction in protein’s contents due to heating (study case of cow’s milk)*, *Photonics Engineering Laboratory Department of Engineering Physics. FTI – ITS*.
86. Andrey Bogomolov, Stefan Dietrich, Barbara Boldrini, Rudolf W. Kessler, *Quantitative determination of fat and total protein in milk based on visible light scatter*, *Food Chemistry* 134 (2012) 412–418.
87. Wolfram Hergert, Thomas Wriedt, *Mie Theory 1908-2008 Present developments and Interdisciplinary aspects of light scattering*, Martin Luther University Halle-Wittenberg Halle, Germany, 2008.
88. C.L. Crofcheck, F.A. Payne, C.L. Hicks, M.P. Menguc and S.E. Nokes, *Fiber optic sensor response to low levels of fat in skim milk*, *University of Kentucky Lexington*, 2000.
89. Werner Schmidt, *Optical Spectroscopy in Chemistry and Life Sciences, An Introduction*, 2005, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co.kGaA, pp. 373.
90. A. M. Osintsev, E. S. Gromov, and V. I. Braginsky, *A Phenomenological Model of Milk coagulation*, *Foods and Raw Materials Vol.1 (No1) 2013*.
91. Харитонов В.Д, Евдокимов И.А., Алиева Л.Р. *Тенденции развития технологий переработки молока* //:*Молочная промышленность*, 2003; N 10, С. 5-8.
92. Харитонов В.Д. *Проблемы и перспективы молочной промышленности XXI века* // *Хранение и переработка сельхозсырья*. - 2000. -№ 11. - С. 1618.
93. I.A. Smirnova, I.V. Romanovskaya, V.K. Shtrigul, *method of obtaining microparticulated casein and the possibility of its application in the production of nonfat fermented milk products*
94. Майоров А.А., Уманский М.С. *Молокосвертывающие ферменты: критерий - качество и выход сыра* // *Сыростроение и маслоделие*. -2004 - №4 - с.12.
95. Sbodio, O.A.; Revelli, G.R., *Milk’s coagulation. Development of a device for online “monitoring” of the process*. *Progress made in Argentina*, *RIA / Vol. 38 / N.º 3*

96. Donald J. McMahon 2 and Rodney J. Brown, *Enzymic Coagulation of Casein Micelles: A Review*, *Journal of Dairy Science* Vol. 67, No. 5, 1984.
97. Крись Г.Н. Концепция сычужной коагуляции казеина // *Молочная промышленность*, 1990. - № 6. - с.43 - 45.
98. A.I. Nar jera, M. de Renobales, L.J.R. Barron, *Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study*, *Food Chemistry* 80 (2003) 345–352
99. И.В. Балалаева, Е.А. Сергеева, А.Р. Катичев, *Оптическая микроскопия в исследовании структуры и функций биологических объектов*, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Методическое руководство, 2012.
100. Стефан Кръстев, *Атомно-силова микроскопия: физични основи на метода и един учебен физичен модел*, НАУЧНИ ТРУДОВЕ НА РУСЕНСКИЯ УНИВЕРСИТЕТ - 2012, том 51, серия 6.1.
101. De Kruif C.G. *Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation*. // *Journal of Dairy Science*, 1998 — V.81 - p.3019-3028.
102. Jaime A. Rincón Cardona, Cristián Huck Iriart and María Lidia Herrera, *Applications of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) in Foods*, Chapter 11, <http://dx.doi.org/10.5772/55653>.
103. Low A. J. R., Leaver J. *Effect of pH on the Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk*.// *J. Agric. Food Chem.*, 2000 — V.48 - p. 672-679.
104. Low A. J. R., Leaver J. *Effect of Protein Concentrations on Rates of Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk*.// *J. Agric. Food Chem.*, 1997 — V.45 - p. 4255-4261.
105. A.M. Osintsev, V.I. Braginsky, O.Yu. Lapshakova, A.L. Chebotaryov. *Role of calcium ions in colloid stability of casein micelles*, Kemerovo Institute of Food Science and Technology, Russia.
106. *Atomic Force Microscopy Investigations into Biology – From Cell to Protein*, Edited by Christopher L. Frewin, Published by InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, Copyright © 2012 InTech.
107. Andreás F. Zuluaga, Urs Utzinger, Anthony Durkin, Holger Fuchs, Ann Gillenwater, Rhonda Jacob, Bonnie Kemp, James Fan, and Rebecca Richards-Kortum, *Fluorescence Excitation Emission Matrices of Human Tissue: A System for in Vivo Measurement and Method of Data Analysis*, *APPLIED SPECTROSCOPY*, Volume 53, Number 3, 1999, p. 302-311.
108. Ts. Genova, E. Borisova, L. Angelova, Al. Zhelyazkova, M. Keremedchiev, N. Penkov, B. Vladimirov, L. Avramov, *Excitation-emission matrices for detection of colorectal tumors –initial investigations*, *Bulgarian Chemical Communications*, Volume 47, Special Issue B (pp. 464–468) 2015.
109. Marije Akkerman, *The effect of heating processes on milk whey protein denaturation and rennet coagulation properties*, Department of Food Science, Aarhus University, Master Thesis.
110. Lomholt S. B., Qvist K. B. *Relationship between rheological properties and degree of α -casein proteolysis during renneting of milk*// *Journal of Dairy Research*. 1997 – V.64 – p.541-549.
111. Éric Dufour, *Principles of Infrared Spectroscopy*, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2009, p. 415.
112. Shmidt V., *Optical spectroscopy for chemists and biologists*, Moscow, Tekhnosfera, 2007, 363 p.
113. Vincent Baeten and Pierre Dardenne, *Spectroscopy: Developments in Instrumentation and Analysis*, *Grasas y Aceites* Vol. 53. Fasc. 1 (2002), 45-63.
114. Акоюн В.Б., Еришов Ю.А. *Основы взаимодействия ультразвука с веществом*. М.: Издательство МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2005. 223 с.
115. Bernard Lorber, Frederic Fischer, Marc Bailly, Herve' Roy, and Daniel Kern, *Protein Analysis by Dynamic Light Scattering: Methods and Techniques for Students*, *BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY EDUCATION*, Vol. 40, No. 6, pp. 372–382, 2012.
116. Mariana C.M., P. Brandgo, Alexandre P. Carmo, Maria Josü V. Bell, Virgilio C. *Characterization of Milk by Infrared spectroscopy*. *Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"*, Mar/Abr, ne 373, 65: 30-33, 2010.
117. Bruce J. Berne, Robert Pecora, *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, Courier Corporation, 2013, p.384.
118. Katsumoto, Y., Jang, J. H., Berry, R. J. and Ozaki, Y., **2001**. *Modern pretreatment methods in NIR spectroscopy*. *Near Infrared Analysis* 2: 29-36.
119. Knappik A., Pluckthun A.// *Protein Eng.* 1995. Vol. 8. P. 81-89.

120. Горбатова К.К. *Физико-химические и биохимические основы производства молочных продуктов* /К.К. Горбатова.-М.: ГИОРД, 2003.-352 с.
121. Bittanea G., Contierob B., Cecchinato A. *Prolonged observation and modelling of milk coagulation, curd firming and syneresis. International Dairy Journal*, 2013, vol. 29, no. 2, pp.115-123.
122. Osintsev A. *Theoretical and practical aspects of the thermographic method for milk coagulation research. Food and Raw Materials*, 2014, vol. 2, no. 2, pp. 147-155. DOI:10.12737/547.
123. de Kruif C.G. *Supra-agregates of casein micelles as a prelude to coagulation. Journal of Dairy Science*, 1998, vol. 81, pp. 3019-3028.
124. Lomholt S.B., Worning P., Ogedal L., Qvist K.B., Hyslop D.B., Bauer R.. *Kinetics of the renneting reaction followed by measurement of turbidity as a function of wavelength . Journal of Dairy Research* , 1998, v. 65, pp. 545-554.
125. Jaenicke R. //*Phil. Trans. R. Soc. (London) B*. 1995. Vol. 348. P.97-105.
- 126.Курганов Б.И. *Кинетика агрегации белков. Количественная оценка шаперонной активности в тестах, основанных на подавлении агрегации белков. Успехи биологической химии. Том. 42, 2002, с. 89-132.*
- 127.Mtiller, H. 1926. *Die Theorie der Koagulation polydisperser Systeme. Kolloid-Z.* 1-2.
- 128.B. Chaplin and M. L. Green, *Neth. Milk Dairy J.*, 35,377 (1981).
- 129.B. Foltmann, *Proc. 15th Int. Dairy Cong. Lond.*, 2,655 (1959).
- 130.A. Carlson, C. G. Hill, Jr., and N. F. Olson, *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 582 (1987).
- 131.D. G. Dalgleish, *J. Dairy Res.*, 46, 653 (1979).
- 132.M. von Smoluchowski, *Z. Phys. Chem.*, 92, 129 (1917).
- 133.Mellema, M. *Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry / M. Mellema, J.W.M. Heesackers, J.H.J. van Opheusden, T. van Vliet // Langmuir. – 2000. – Vol. 16. – P. 6847–6854.*
- 134.Polyansky, O.L. *On equilibrium structures of the water molecule / O.L. Polyansky // J. Chem. Phys. – 2005. – Vol. 122. – P. 214-305.*
- 135.Chaplin, M.F. *The water molecule, liquid water, hydrogen bonds and water networks /Chaplin, M.F. In: Water The forgotten biological molecule (D. Le Bihan and H. Fukuyama, Ed.). – Singapore: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2011. – P. 3-19.*
- 136.Finney, J.L. *The water molecule and its interactions: the interaction between theory, modelling and experiment / J.L. Finney // J. Mol. Liq. – 2001. – Vol. 90. – P. 303-312.*
- 137.Arunan, E. *Hydrogen bonding and other molecular interactions / E. Arunan // Curr. Sci. – 2007. – Vol. 92. – P. 18.*
- 138.Buckingham, A.D. *The hydrogen bond / A.D. Buckingham, J.E. Del Bene, S.A.C.McDowell // Chem. Phys. Lett. – 2008. – Vol. 463. – P. 1-10.*
- 139.Zhang, L. *Mapping hydration dynamics around a protein surface / L. Zhang, L. Wang, Y.-T.Kao, W. Qiu, Y. Yang, O. Okobiah, D. Zhong // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2007. – Vol.104. – P. 18461-18466.*
- 140.Ebbinghaus, S. *An extended dynamical hydration shell around proteins / S. Ebbinghaus,S.J. Kim, M. Heyden, X. Yu, U. Heugen, M. Gruebele, D. M. Leitner, M. Havenith // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2007. – Vol. 104. – P. 20749-20752.*
- 141.Horne, D.S. *Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products / D.S. Horne // Int. Dairy J. – 1998. – Vol. 8. – P. 171–177.*
- 142.Dalgleish, D.G. *Measurement of electrophoretic mobilities and zeta potentials of particles from milk using laser Doppler electrophoresis / D.G. Dalgleish // J. Dairy Res. – 1984. – Vol. 51. – P. 425–438.*
- 143.ISO 25178-2:2012 *Geometrical product specifications (GPS)—surface texture: areal: Part 2. Terms, definitions and surface texture parameters.*
- 144.Blunt L., Jiang X. *Advanced techniques for assessment surface topography: development of a basis for 3D surface texture standards “surfstand”. London: Kogan Page Science, 2003. 355 p.*
- 145.Deng Zhao, Valentin Lulevich, Fu-tong Liu and Gang-yu Liu: *Applications of Atomic Force Microscopy in Biophysical Chemistry of Cells, J. Phys. Chem. B, 2010, 114.*

146. Scheuring S, Fotiadis D, Moller C, Muller SA, Engel A and Muller DJ: *Single Proteins Observed by Atomic Force Microscopy*, *Single Mol.* 2 (2001) 2, 59-67.
146. Yang R, Xi N, Fung CKM, Seiffert-Sinha K, Lai KWC, Sinha AA: *The Emergence of AFM Applications to Cell Biology: How new technologies are facilitating investigation of human cells in health and disease at the*, *Journal of Nanoscience Letters*, Volume 1, Issue 2 (2011):87-101.
147. Tirado-Miranda, M. *The aggregation behaviour of protein-coated particles: a light scattering study* / M. Tirado-Miranda, A. Schmitt, J. Callejas-Fernandez, A. Fernandez-Barbero // *European Biophysics Journal*. – 2003. – Vol. 32. – P. 128–136.
148. Найденова П., (2000). *Бизнес статистика. Университетски курс*, С.
149. Ghofraniha, N. *Assembly Kinetics in Binary Mixtures of Strongly Attractive Colloids* / N. Ghofraniha, P. Andreozzi, J. Russo, C. La Mesa, F. Sciortino // *J. Phys. Chem. B*. – 2009. – Vol. 113. – P. 6775–6781.
150. Walstra P., Wouters J.T.M., Geurts T.J. *Dairy Science and Technology*, 2nd ed. –CRC Press: Boca Raton, 2006.
151. B. Ingham, G. D. Erlangga, A. Smialowska, N. M. Kirby, C. Wang, L. Matia-Merino, R. G. Haverkamp and A. J. Carr. *The Royal Society of Chemistry 2015, Soft Matter*, 2015, 11, 2723–2725.
152. А.Д. Алехин, Л.А. Булавин, В.И. Костенко, С.Д. Остапченко, Ю.И. Посудин. *Турбидиметрические методы определения состава молока. Украинская сельскохозяйственная академия, Известия вузов, Пищевая технология*, No: 3-4, 1993.
153. Simon, R. *Protein purification techniques* /Roe Simon . – Oxford University Press, 2001. – P.244.
154. Todinova S., Krumova S., Kurtev P., Dimitrov V., Djongov L., Dudunkov Z., Taneva S. G. (2012) *Calorimetry-based profiling of blood plasma from colorectal cancer patients*. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1879–1885.
155. Makhatadze and Privalov, 1995; Murphy and Freire, 1992; Spolar et al., 1992.
156. Bruylants G., Wouters J., Michaux C. (2005) *Differential scanning calorimetry in life science: Thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design*. *Curr. Med. Chem.* 12, 2011–2020.
157. Финкельштейн, А.В. *Физика белка: Курс лекций. 3-е изд.*, /А.В. Финкельштейн, О.Б. Птицын. – М.: КДУ, 2005. – 455 с.
158. Oldfield, D.J., H. Singh, M.W. Taylor, K.N. Pearce. 2000. *Heat-induced interactions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with the casein micelle in pH-adjusted skim milk*, *Int. Dairy J.* 10: 509.
159. Горбатова К.К. *Химия и физика белков молока*. – М.: Колос, 1993. – 192 с.
160. Renner E. *Chemical and physico-chemical aspects. New monograph on UHT-milk*. // *Bulletin IDF*, 1981. – Doc.133.-P.49-64.
161. Hafiz, A. *Principles and reactions of protein extraction, purification and characterization*/Ahmed Hafiz. – CRC Press LLC, 2005. – P.389.
162. Смыков И.Т. *Исследования структурирования белковых частиц в молоке* / И.Т. Смыков, Д.С. Мяконосов, В.В. Смирнов // *Молочная промышленность* . – 2004. – No:9. – С. 58-60.
163. Jagannadham, M.V. *The molten globular intermediate form in the folding pathway of human carbonic anhydrase B* / M.V. Jagannadham, D. Balasubramanian // *FEBS*. – 1985. – Vol. 188. – P. 326-330.
164. Уверский, В.Н. *Разворачивание расплавленной глобулы сильными денатурантами протекает по правилу "все-или-ничего"* / В.Н. Уверский, Г.В. Семисотнов, О.Б. Птицын // *Биофизика*. – 1993. – Т. 38. – С. 37-46.
165. Dobson, C.M. *Solid evidence for molten globules* / C.M. Dobson // *Curr Biol*. – 1994. – Vol. 4. –P. 636–40.
166. Шульц Г., Ширмер Р. *Принципы структурной организации белков*. Москва: "Мир," 1982.
167. Cantor, C.R. *Biophysical chemistry* / C.R. Cantor, P.R. Schimmel. – San Francisco: W.H. Freeman & Co, 1980. – 503 p.
168. Zangi R., Zhou R., Berne B.J. *Urea's Action on Hydrophobic Interactions* // *JACS*. 2009. Vol. 131, № 21. P. 1535–1541.
169. Canchi D., Paschek D., Garc a A. *Equilibrium study of protein denaturation by urea* // *JACS*. 2010. Vol. 132, № 22. P. 2338–2344.
170. England J., Haran G. *Role of solvation effects in protein denaturation: from thermodynamics to single molecules and back* // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2011. Vol. 62, № 11. P. 257–277.

171. Stumpe M.C., Grubmüller H. Interaction of urea with amino acids: Implications for urea-induced protein denaturation // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Vol. 129, № 26. P. 16126–16131.
172. Rezus Y.L.A., Bakker H.J. Effect of urea on the structural dynamics of water. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103, № 49. P. 18417–18420.
173. Smith J.S., Scholtz J.M. Guanidine hydrochloride unfolding of peptide helices: Separation of denaturant and salt effects // *Biochemistry.* 1996. Vol. 35, № 96. P. 7292–7297.
174. Soper A.K., Castner E.W., Luzar A. Impact of urea on water structure: a clue to its properties as a denaturant? // *Biophys. Chem.* 2003. Vol. 105, № 2-3. P. 649–666.
175. Tanford C. Isothermal Unfolding of Globular Proteins in Aqueous Urea Solutions // *J. Am. Chem. Soc.* 1964. Vol. 86, № 3. P. 2050–2059.
176. Makhatadze G., Privalov P. Protein interactions with urea and guanidinium chloride: a calorimetric study // *J. Mol. Biol.* 1992. Vol. 226, № 15. P. 491–505.
177. Zou Q., Bennion B.J., Daggett V., et al. The Molecular Mechanism of Stabilization of Proteins by TMAO and Its Ability to Counteract the Effects of Urea // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. Vol. 124, № 7. P. 1192–1202.
178. Bennion B.J., Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. Vol. 100, № 9. P. 5142–5147.
179. Dunbar J., Yennawar H.P., Banerjee S., et al. The effect of denaturants on protein structure. // *Protein Sci.* 1997. Vol. 6, № 8. P. 1727–1733.
180. Hédoux A., Krenzlín S., Paccou L. Influence of urea and guanidine hydrochloride on lysozyme stability and thermal denaturation; a correlation between activity, protein dynamics and conformational changes // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. Vol. 12. P. 13189–13196.
181. Santra M.K., Banerjee A., Krishnakumar S.S., et al. Multiple-probe analysis of folding and unfolding pathways of human serum albumin. Evidence for a framework mechanism of folding. // *Eur. J. Biochem.* 2004. Vol. 271, № 9. P. 1789–1797.
182. Chodankar S., Aswal V., Kohlbrecher J., et al. Structural evolution during protein denaturation as induced by different methods // *Phys. Rev. E.* 2008. Vol. 77, № 3. P. 031901.
183. Ma B., Tie Z., Zou D., et al. Urea- and Thermal-Induced Unfolding of Bovine Serum Albumin // *Mod. Phys. Lett. B.* 2006. Vol. 20, № 29. P. 1909–1916.
184. Aswal V., Chodankar S., Kohlbrecher J., et al. Small-angle neutron scattering study of protein unfolding and refolding // *Phys. Rev. E.* 2009. Vol. 80, № 1. P. 011924.
185. De Young L.R., Dill K.A., Fink A.L. // *Biochemistry.* 1993. Vol. 32. P. 3877–3886.
186. Khanova, H.A., Markossian, K.A., Kurganov, B.I., Samoilov, A.M., Kleimenov, S.Y., Levitsky, D.I., Yudin, I.K., Timofeeva, A.C., Muranov, K.O., Ostrovsky, M.A. (2005) Mechanism of chaperone-like activity. Suppression of thermal aggregation of β L-crystallin by α -crystallin. *Biochemistry*, 44, 15480 – 15487. -
187. Golub, N., Meremyanin, A., Markossian, K., Eronina, T., Chebotareva, N., Asryants, R., Muronets, V., Kurganov, B. (2007) Evidence of the formation of start aggregates as an initial stage of protein aggregation. *FEBS Lett.*, 581, 4223 – 4227.
188. Gallier S., Gordon K.C., Jiménez-Flores R., Everett D.W. Composition of bovine milk fat globules by confocal Raman microscopy // *International Dairy Journal.* 2011, Vol. 21, № 6, P. 402-412.
189. Пентин Ю.А., Вилков Л.В. Физические методы исследования в химии. Москва: Мир, 2003.
190. Nakamura K., Era S., Ozaki Y., Sogami M., Hayashi T., Murakami M. Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. *FEBS Letters*, 1997, v. 417, p. 375-378.
191. Fabian H. Ribonuclease A Revisited: Infrared Spectroscopic Evidence for Lack of Native-like Secondary Structures in the Thermally Denatured State / H. Fabian and H.H. Mantsch // *Biochemistry* – 1995. – T. 34 - № 41 – C. 13651 – 13655.
192. Henry A. Havel, Robert S. Chao, Royal J. Haskell, and Thomas J. Thamann, Investigations of Protein Structure with Optical Spectroscopy: Bovine Growth Hormone, *Anal. Chem.* 1989, 61, 642-650.
193. Peticolas W. L. Raman Spectroscopy of DNA and Proteins // *Methods Enzymol.* 1995. Vol. 246. P. 389–416.

194. Eunice C. Y. Li-Chan. *Vibrational spectroscopy applied to the study of milk proteins. Le Lait, INRA Editions*, 2007, 87 (4-5), pp.443-458.
195. Lefevre T., Subirade M., *Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by Fourier transform infrared spectroscopy: model studies on β -lactoglobulin*, *Food Hydrocoll.* 15 (2001) 365–376.
196. Савушкин Р.В. Дисс. ... канд. хим. наук. -Воронеж, 2006.
197. Weinryb I., Steiner R.F. // *Excited states of proteins and nucleic acids / Plenum. New York. 1971.*
198. Creed D. // *Photochem. Photobiol.* 1984. V.39. P.537 - 375.
199. Ren H., Biggs J.D., Mukamel S. // *J.Raman Spectrosc.* 2013. V.44.P.544 - 559. 8.
200. Lakowicz J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, NY.: Plenum Press, 1999. 954 p.
201. Restall C.J., Coke M., Phillips E., Chapman D. *Derivative spectroscopy of tryptophan fluorescence used to study conformational transitions in the (Ca²⁺Mg²⁺)-adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum //Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – Vol.874, №3. – P. 305–311.*
202. Демченко А.П. *Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. – Киев: Наук. думка, 1981. – 208с.*
203. Демченко А.П. *Люминесценция и динамика структуры белков. – Киев: Наук. думка, 1988. – 277с.*
204. Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. *Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules // Photochem. and Photobiol. – 1973. – Vol.18, №1. – P. 263–279.*
205. Dufour, E.; Mazerolles, G.; Devaux, M. F.; Duboz, G.; Duployer, M. H.; Mouhous Riou, N. *Phase transition of triglycerides during semi-hard cheese ripening. Int. Dairy J.* 2000, 10, 81-93.
206. E. Sikorska, T. Gorecki, I. V. Khmelinskii, M. Sikorski, D. De Keukeleire, *Fluorescence spectroscopy for characterization and differentiation of beers, J. Inst. Brewing* 110(4), 267-275, (2004).
207. V.V. Krasnikov, E.I. Timoshkin. *Luminescenciya pishchevih productov, M., Legkaja i pishchevaija promishlenost, (1983).*
208. J. Christensen , L. Norgaard, R. Bro, S.B. Engelsen: *Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems, Chem. Rev.* 106 (2006) 1979-1994.
209. H. Du, R.A. Fuh, J. Li, L. A. Corkan, J.S. Lindsey (1998) *PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry. Photochem Photobiol* 68: 141-142., DOI:); www.spectra.arizona.edu (Oct. 2013).
211. Т.С. Дюбко. *О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. 1. Собственная флуоресценция белков. «Вестник Харьковского университета. Серия биология», 2006, Вып. 3, №:729, с.221-231.*
212. Демченко А.П., *Ультрафиолетовая спектрометрия и структура белков, Наукова думка, 1981.-208 с.*
213. Т.С. Серченя, О.В. Свиридов. *Особенности микроокружения остатков триптофана в третичной структуре альфа-1-микроглобулина человека. Вестник Фонда фундаментальных исследований, 2010, № 1. с. 6-14.*
214. Fei Geng, Liqiang Zheng, Li Yu, Ganzuo Li, Chenho Tung. *Interaction of bovine serum albumin and long-chain imidazolium ionic liquid measured by fluorescence spectra and surface tension. Process Biochemistry*, 2010, v. 45, p. 306–311.
215. Jun Zhanga, Lingnan Chenb, Birong Zengb, Qilong Kangb, Lizong Daib. *Study on the binding of chloroamphenicol with bovine serum albumin by fluorescence and UV-vis spectroscopy. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, v. 105, p. 74–79.
216. Ремизов, А.Н. *Медицинская и биологическая физика: Учеб. для вузов. – 4-е изд., перераб. и дополн. / А.Н. Ремизов, А.Г. Максина, А.Я. Потапенко. – М.: Дрофа, 2003. – 560 с.*