

Анализ дисперсного состава яичного белка методом микроскопирования

Соколов Сергей Анатольевич

Керченский государственный морской

технологической университет

Адрес: 298309, г. Керчь, ул. Орджоникидзе, д. 82

E-mail: sokoloff1906@mail.ru

Яшонков Александр Анатольевич

Керченский государственный морской

технологической университет

Адрес: 298309, г. Керчь, ул. Орджоникидзе, д. 82

E-mail: jashonkov@rambler.ru

В содержимом куриного яйца находятся в оптимальном соотношении все питательные вещества, необходимые для развития и поддержания жизни организма человека. Однако, даже при сравнительно непродолжительном хранении свойства яиц заметно изменяются в худшую сторону. Применяемая в настоящее время пастеризация, а также наиболее распространенные способы консервирования жидких яйцепродуктов – сушка и замораживание не обеспечивают микробиологическую стабильность и сохранность полезных свойств продукта в течение его длительного хранения. Целью работы являлось совершенствование процесса обработки высоким давлением содержимого куриных яиц на основе экспериментальных исследований позволяющих установить обоснованные значения параметров процесса для повышения технологических и потребительских свойств обрабатываемого яичного сырья. В рамках исследований установлено, что обработка высоким давлением не только инактивирует микроорганизмы, но и придает новые полезные потребительские характеристики пищевым продуктам. В работе рассмотрены вопросы определения дисперсного состава образцов яичного белка методом микроскопирования. Проведен анализ дисперсного состава яичного белка после действия различного фиксированного давления при комнатной температуре. Определены зависимости площади и среднего диаметра частиц в белке от давления. Предложена математическая модель кинетики денатурации и коагуляции частиц яичного белка после его обработки внешним гидростатическим давлением при комнатной температуре. Установлено, что с повышением давления средний эквивалентный диаметр частиц в образце яичного белка после обработки давлением увеличивается. После действия давления 1009,9 МПа средний эквивалентный диаметр частиц образца увеличивается в 3,799 раза, по сравнению со средним эквивалентным диаметром частиц в яичном белке, обработанном давлением 220,4 МПа.

Ключевые слова: куриное яйцо, денатурация белка, микроскопирование, высокое давление

Введение

Куриные яйца как продукт питания

Яйца являются одним из основных продуктов для питания людей. Мировой объем производства куриных яиц за последние 30 лет вырос более чем в 3 раза: с 19,5 до 62 тыс. тонн в год. Лидерами по производству яиц, как в абсолютных величинах, так и по темпам роста их производства являются Япония, Франция, Италия (Виндхорст, 2006). Широкое использование яиц в пищевом производстве обусловлено не только их высокой питательной ценностью и отличными вкусовыми

свойствами, но и технологическими свойствами, способностью образовывать пену при сбивании, эмульгировать жиры, высокой вязкостью. Добавление яиц в тесто способствует образованию и сохранению во время перемешивания, формования и выпечки изделий воздушных пузырьков, обеспечивающих подъем теста. Яйца способствуют получению объемных продуктов с нежной консистенцией, эластичных и сжимаемых, которые после сжатия полностью восстанавливают объем, что особенно ценится потребителями.

Основными компонентами содержимого яиц, имеющими особое значение в питании, являются

белки, липиды и витамины. Белки яиц полностью усваиваются организмом человека. Поэтому аминокислотный состав белков часто выбирают для сравнения в качестве оптимального. По содержанию питательных веществ и вкусовым качествам наиболее важной частью яйца является желток. Он имеет сферическую форму, окрашен в желтый или оранжевый цвет (цвет желтка – важный показатель его качества). Между желтком и наружными оболочками яйца расположена прозрачная вязкая жидкость желтоватого оттенка (белок). По внешнему виду белок однороден, хотя его составные части имеют разную консистенцию: вязкую, полужидкую и желеобразную (Singh et al., 2015).

Белки входят в состав всех частей яйца. В белке яйца, содержатся растворимые белки, образующие в свежем яйце структурированную вязкую желеобразную жидкость. В состав яичного белка входят простые белки: овальбумин (75% всей массы яичного белка), овокональбумин (3%), овоглобулин (2%) и сложные белки-гликопротеиды (мукопротеиды): овомукоид и овомуцин (7%), в состав которых входят углеводные компоненты. В состав желтка входят сложные белки-фосфопротеиды: вителлин, ливитин и фосфофитин. Физические и биологические характеристики всех 40 яичных белков представлены в работах (Li-Chan et al., 1995; Osuga & Feeney, 1977; Mine, 1995).

Большинство технологических (пенообразующая, эмульгирующая, стабилизирующая, желеобразующая) свойств куриных яиц определяются свойствами их белков. Протеины содержатся в каждой частице яйца в разном состоянии. Так, при общей массе яйца до 70г, на одно яйцо приходится до 50% протеинов, которые находятся в растворенном состоянии в белке яйца, около 44,3% - в виде комплексных соединений с липидами – в желтке (Агафоновичев и др., 2012; Штеле & Филатов, 2012; Восканян и др., 2004; Tang et al., 2021; Zhao et al., 2021).

Белок и желток представляют собой концентрированные белковые растворы, которые при тепловой денатурации образуют студни, удерживающие всю содержащуюся в них воду.

Желток начинает загустевать только при 70°C. Температура денатурации яичного белка около 65°C. Величина pH белка свежеснесенных яиц около 7,6; по мере хранения реакция среды приближается к нейтральной. Точка замерзания яичного белка $-0,42 \div -0,46^\circ\text{C}$; в процессе хранения температура начала замерзания понижается в связи с испарением влаги, а следовательно, увеличени-

ем концентрации солей, входящих в состав яичного белка.

Яичный белок в сыром виде переваривается пепсином сравнительно медленно. Денатурированный нагреванием до 70°C яичный белок почти целиком усваивается в желудочно-кишечном тракте.

При смешивании с водой яичный желток образует эмульсию. Вязкость желтка зависит от количества воды в яйце и повышается с понижением температуры. Например, при 0°C вязкость желтка приблизительно в 25 раз больше, чем при 25°C.

Температура денатурации желтка около 70°C. Температура начала замерзания желтка свежего яйца (криоскопическая температура) около $-0,6^\circ\text{C}$. Плотность желтка в среднем составляет 1,029-1,030 кг/м³. Величина pH желтка свежего яйца около 6,0.

Даже при сравнительно непродолжительном хранении свойства яиц заметно изменяются в худшую сторону. Применяемая в настоящее время пастеризация, а также наиболее распространенные способы консервирования жидких яйцепродуктов – сушка и замораживание не обеспечивают микробиологическую стабильность и сохранность полезных свойств продукта в течение его длительного хранения.

Использование ВД в пищевых системах

Удовлетворение возрастающих требований общества к более здоровому образу жизни требует новых экологически чистых технологий, максимально сохраняющих натуральные компоненты и вкусовые свойства продуктов.

Наиболее перспективной и отвечающей запросам современного общества технологией, является обработка пищевых продуктов с использованием высокого давления. Обработка высоким давлением как технологическая ступень может включать в себя консервирование, модификацию или экстракцию пищевого сырья или продуктов, создание их новых форм и технологий. Технология обеззараживания высоким давлением включает в себя все преимущества обычной тепловой обработки горячей водой или паром, однако без связанных с этим явлений выщелачивания, потери питательности и органолептических характеристик пищевых продуктов, а также загрязнения окружающей среды.

Одной из важнейших сфер применения технологии высокого давления является инаktivация

биологических веществ, таких, как ферменты, микроорганизмы, болезнетворные или другие микробиологические загрязнения при низких температурах.

Несмотря на многочисленные исследования, механизм гибели микроорганизмов при воздействии высокого давления изучен недостаточно. Известно, что изменяется морфология клеток, в частности, происходит их деформация, сжатие наполненных газом вакуолей, отделение клеточных мембран от стенок, модификация ядер и межмолекулярных органелл, выход содержимого клетки, уменьшение синтеза ДНК. Ингибирующий эффект на микроорганизмы может быть вызван инактивацией важнейших ферментов. Нуклеиновые кислоты более устойчивы к изостатическому давлению, чем белки. Протеазы, пероксидаза и липоксидаза при давлении до 600 МПа не теряют своей активности, а некоторые ферменты, например α – амилаза, могут восстанавливать ее. Губительное воздействие на развитие бактерий отмечается уже при 100 МПа, за исключением БГКП (бактерий группы кишечной палочки). Обработка продуктов давлением в пределах 300-900 МПа позволяет обезвредить продукт от *E. Coli* и бактерий группы *Proteus* (Рудакова, 1998). Следует отметить, что циклический характер нагружения в 500 МПа по физико-химическим показателям эффективнее статического в 700 МПа.

Высокое гидростатическое давление вызывает изменения в морфологии, мембранных ячейках и биохимических реакциях, происходящих в микроорганизмах, однако принято считать, что главной причиной, приводящей к инактивации микроорганизмов, является утечка внутриклеточных элементов при нарушении проницаемости мембран. При этом установлено, что если нарушение клеточной мембраны имело место только на внешней мембране, то нарушенная клеточная мембрана быстро восстанавливалась после снятия высокого давления (Hauben et al., 1996; Buzrul, 2021; Németh et al., 2020).

Помимо величины высокого давления, температуры и продолжительности процесса на инактивацию микроорганизмов влияют pH среды, водная активность и ряд других параметров. Обобщение результатов различных исследований позволило сформулировать ряд общих положений: микроорганизмы становятся более восприимчивы к высокому давлению при более низком значении pH среды; сублетально травмированные микроорганизмы после их обработки высоким давлением могут восстановиться в богатой пищевой среде, но

не смогут восстановиться в кислой среде; сокращение водной активности приводит к снижению уровня инактивации микроорганизмов при их обработке высоким давлением; изменение температуры обработки ниже или выше комнатной увеличивает норму инактивации микроорганизмов (Linton et al., 1999; Oxen & Knorr, 1993; Palou et al., 1997; Knorr & Heinz, 1999).

В университетах штатов Вашингтон и Огайо, Национальном центре безопасности и технологий и научной лаборатории Министерства обороны США предложен метод HPTS (High Pressure/Thermal Sterilization) – стерилизация под высоким давлением с целью достижения стабильности в отношении микробиологической безопасности, продления сроков хранения и соответствия требованиям потребителей (Holdsworth & Simpson, 2016).

Влияние ВД на белковые системы.

Процесс денатурации белка имеет огромное значение, как для фундаментальной, так и для прикладной науки. Исследование явления денатурации позволяет установить связь между структурой белка и его стабильностью и выяснить, какие при этом факторы являются определяющими. Изучение механизмов денатурации (разворачивания) белковых молекул представляет также интерес и для выяснения механизмов фолдинга (сворачивания) белка. С точки зрения пищевых технологий важность изучения денатурации белка связана с необходимостью повышения стабильности белковых продуктов при их обработке в технологических процессах.

Впервые денатурация белка в результате его обработки высоким давлением была рассмотрена Бриджменом в 1914 году (Bridgman, 1914). Более системные исследования влияния высокого давления на белок были проведены спустя 50 лет исследуя яичный альбумин (Suzuki et al., 1963), рибонуклеазы (Brandts, et al., 1970), химотрипсин (Hawley, 1971) и метмиоглобулин (Zipp & Kauzmann, 1973).

Окамото и др., (Okamoto et al., 1990) в своих исследованиях показали, что овальбуминовый гель, произведенный под высоким давлением, более эластичен и мягче, чем гели, обработанные нагреванием, хотя гели обычно твердеют и становятся менее вязкими при увеличении давления. Вкус и аромат гелей, обработанных давлением, имели натуральный аромат и вкус, но при этом не было разрушения витаминов и аминокислот.

Также Хаяши и др. (Hayashi, et al., 1989), были проведены исследования влияния давления при различных температурах (10, 25 и 60 °C) и уровнях pH (7,6 и 8,8), на отдельно выбранные растворы яичного белка. При этом наблюдалось, что давление вызывало увеличение помутнения, гидрофобности поверхности, и чувствительности к ферментному гидролизу, причем это вызвало увеличение растворимости белка, энтальпии денатурации и ингибиторной активности трипсина. Более того, сообщалось, что изменения в отдельных свойствах, вызванные давлением, зависели от давления, температуры и уровня pH (Plancken et al., 2005)

При обработке белков высоким давлением существенное влияние оказывается на электростатические и гидрофобные взаимодействия, приводящие к уменьшению объема. Разрушение электростатических и гидрофобных взаимодействий приводит к изменениям гидратации, которые приводят к дальнейшему уменьшения объема (Balny et al., 1992; Gharbi & Labbafi, 2018). Уменьшение объема в результате денатурации белка под действием высокого давления составляет от 30 до 300 мл/моль (Balny et al., 1992; Wong & Heremans, 1988). Изменениям, происходящим в структуре белков и реакциям, происходящим в белках при их обработке высоким давлением, были посвящены целый ряд работ исследователей в ведущих лабораториях мира (Ohmiya et al., 1989; Funtenberger et al., 1995; van Camp & Huyghebaert, 1995; Messens et al., 1997; Gekko & Hasegawa, 1986; Gekko & Yamagami, 1991).

Широкое внедрение в практику технологии обработки жидкого куриного яйца высоким давлением затруднено, в связи с тем, что, в настоящее время в достаточной мере не изучен механизм воздействия высокого давления на белок и микрофлору продукта, не определены области существования продукта с различной степенью денатурации в зависимости от параметров процесса его обработки высоким давлением; отсутствуют реологические и теоретические модели, описывающие данные процессы; не исследованы термодинамические характеристики жидкого куриного яйца при их обработке высоким давлением; не исследованы энергетические аспекты процесса обработки яиц с применением высокого давления; не изучены потребительские свойства продукта, обработанного высоким давлением. Вышеперечисленные обстоятельства и определяют актуальность исследований. Целью нашей работы являлось со-

вершенствование процесса обработки высоким давлением содержимого куриных яиц на основе экспериментальных исследований позволяющих установить обоснованные значения параметров процесса для повышения технологических и потребительских свойств обрабатываемого яичного сырья.

Материалы и методы исследования

Материалы

Для проведения экспериментальных исследований были использованы куриные яйца со сроком хранения до 3 суток, произведенные на Племенном птицеводческом заводе «Лабинский» пос. Прохладный, Краснодарский край, соответствующие ГОСТ 31654-2012 «Яйца куриные пищевые. Технические условия»¹.

Контроль свежести куриных яиц проводился для каждой новой партии с помощью лабораторного pH-метра, значения кислотности находились в интервале от 7,4 до 7,8. Массовые процентные соотношения белка, желтка и скорлупы яиц относились, как 56:32:12. Яйца были промыты водопроводной водой, затем выдержаны в течение 10 мин. в 70% растворе этанола и высушены на воздухе. После дезинфекции, яйца были разбиты вручную, у части яиц было произведено отделение желтка от белка. Из белка формировали плоскопараллельный слой толщиной 0,07 мм между предметными стеклами поляризационного микроскопа «ПОЛАМ Р-312». При помощи многоканального фотоприемника цифрового фотоаппарата «Canon EOS 700D» с использованием устройства механического и оптического сопряжения регистрировали микроизображения 5 различных полей зрения с суммарной площадью 328568 мкм².

В работе использована коммерческая компьютерная программа, разработанная в Берлинском техническом университете и адаптированная для решения поставленных задач (Jähne, 2005).

Оборудование

Обработка исследуемых образцов высоким давлением производилась на автоматизированной установке высокого давления (АУВД) (Sokolov et al., 2013), имеющей следующие технико-эксплуатационные параметры:

¹ ГОСТ 31654-2012. (2013). Яйца куриные пищевые. Технические условия. М.: Стандартинформ.

Давление в рабочей камере до 1000 МПа;

Рабочая температура от 10 до + 80°C ;

Максимальное перемещение поршня:

$H_{\max} = 0,03 \text{ м};$

Скорость перемещения поршня прессы:

от $v_{\min} = 67 \cdot 10^{-6} \text{ м/сек}$ до $v_{\max} = 67 \cdot 10^{-5} \text{ м/с}.$

При минимальной скорости перемещения поршня ($v_{\min}$), максимальное время $t_{\max} = 7,46 \text{ мин.}$ При максимальной скорости перемещения поршня прессы ($v_{\max}$) минимальное время $t_{\min} = 0,746 \text{ мин.}$

Общий вид установки приведен на Рисунке 1.



Рисунок 1. Общий вид установки высокого давления второго поколения

Инструменты

- поляризационный микроскоп «ПОЛАМ Р312-»;
- цифровой фотоаппарат «Canon EOS 700D»;
- устройство механического и оптического сопряжения;
- автоматизированная система анализа растровых микроскопических изображений.

Процедура исследования

В общем случае обработка исследуемых образцов продуктов при помощи высокого давления заключается в том, что образец, помещённый в герметически закрытую пластиковую тару, подвергается в течение заданного времени действию высокого давления. Высокое давление поддерживают в течение определённого промежутка времени, затем уравнивают с атмосферным, после чего обработанные ёмкости выгружают из рабочей камеры. Таким образом, основными параметрами, характеризующими процесс обработки, являются давление, которое необходимо поднять и поддержать в рабочей камере, температура и время, в течение которого исследуемый продукт подвергается давлению.

В нашем случае обработка исследуемых образцов белка высоким давлением состояла из следующих этапов:

1. Подготавливали камеру к созданию давления:
 - 1.1. Наполняли камеру полиэтилсилоксановой жидкостью ПЭС-3 на $\frac{1}{4}$ часть высоты рабочего объема камеры высокого давления;
 - 1.2. Устанавливали исследуемый образец;
 - 1.3. Добавляли рабочую жидкость, не доливая 3÷4 мм до верхней кромки камеры. Удаляли пузырьки воздуха, если они присутствовали;
 - 1.4. Визуально убеждались в отсутствии механических включений на поршне, устанавливали его в центральное отверстие камеры и опускали направляющую втулку до упора.
2. Подключали персональный компьютер:
 - 2.1. Запускали программу регистрации параметров эксперимента: p – давления, t – температуры, τ – время выдержки;
 - 2.2. Подготавливали блоки подготовки данных, а именно: (аналогово-цифровой преобразователь) АЦП и блок преобразователей;
 - 2.3. Подключали окно графической регистрации экспериментальных технологических параметров;
 - 2.4. Подключали опцию записи данных регистрации в файл;
3. С помощью насоса поднимали рабочее давление в камере согласно градуировке прессы и фиксировали давление.
4. Разгружали камеру в обратном порядке.
5. Контроль, регистрация и документирование исследуемых параметров в процессе обра-

ботки велись непрерывно с помощью цифрового аналогового преобразователя с выводом информации на персональный компьютер с одновременным созданием файла текущего эксперимента.

После обработки высоким давлением образцы яичного белка извлекались из эластичного контейнера и помещались на предметный столик микроскопа.

Микрофотографии образца яичного белка, обработанного гидростатическим давлением при комнатной температуре, были получены на поляризационном микроскопе проходящего света ПОЛАМ Р-211М с ахроматическим объективом 60^х и окуляром 6,3^х. Использование дистанционной системы визуализации объектов производства CANON позволило получить цифровые изображения глубиной цвета до 24 бит/пиксел (16777216 цветов, по 8 бит на канал в цветовой системе RGB) с разрешением 180 точек на дюйм.

В качестве сравнения образцов обработанных ВД был использован образец белка, прошедший тепловую обработку при атмосферном давлении, температуре 100°C в течении 15 минут.

При микроскопировании контрольного образца яичного белка в белом свете его пространственная структура не проявляется. Это говорит о том, что линейные размеры частиц дисперсной фазы в водном растворе сырого яичного белка меньше, чем средняя длина волны видимого спектрального диапазона, равная 555 нм.

Результаты и их обсуждение

Обработка высоким давлением яичного белка приводит к изменению его структуры (размеры частиц, их конфигурация, взаимное расположение и др.) на клеточном, молекулярном и межмолекулярном уровнях, возникает необходимость анализа данных дисперсных систем.

Установлено, что распределение по площадям частиц дисперсной фазы в контрольном образце яичного желтка представляет собой монотонно убывающую функцию с максимумом в диапазоне площадей от 0.00375 до 0.00875 мкм².

Распределение по площадям частиц дисперсной фазы в образце яичного желтка после обработки ВД 300 МПа в течение 15 минут при температуре

25°C является немонотонной функцией с несколькими максимумами, соответствующими увеличению количества частиц с данной площадью в сравнении с числом таких частиц в контрольном образце.

Данные результаты позволяют сделать вывод, что обработка яичного желтка ВД 300 МПа в течение 15 минут при температуре 25°C приводит к уменьшению полидисперсности системы и увеличению общего числа частиц дисперсной фазы более чем на 17%.

Анализ априорной информации и результаты дисперсного анализа состава яичного белка показали, что с увеличением давления увеличиваются линейные размеры пространственной структуры продукта. Такое состояние структуры продукта является результатом разворачивания молекул яичного белка при денатурации.

На Рисунках 2-6 приведены микрофотографии, полученные на цифровом фотоаппарате «Canon EOS 700D», образцов яичного белка, обработанных давлением 220,4; 393,6; 582,3; 814,2 и 1009,9 МПа.

На Рисунках 2-6 видно, что с повышением давления увеличиваются линейные размеры элементов пространственной структуры яичного белка. Это означает, что под действием внешнего гидростатического давления происходит денатурация (разворачивание) молекул яичного белка, степень которой тем больше, чем выше величина приложенного давления. При этом, по мере увеличения давления, на микрофотографиях более заметным становится результат срастания развернувшихся молекул между собой, а реологические свойства яичного белка приближаются к реологическим свойствам структурированной дисперсной системы с пространственно-связанной сеткой, которыми в пределе обладает яичный белок после полной тепловой денатурации. На рисунке 7 приведена микрофотография яичного белка, обработанного температурой 100°C при атмосферном давлении в течение 15 минут.

Сравнение микрофотографий на рисунках 6 и 7 демонстрирует подобие структур образца яичного белка, обработанного давлением 1009,9 МПа при комнатной температуре и обработанного температурой 100°C при атмосферном давлении. Пространственная сетка яичного белка после тепловой денатурации имеет более разветвленный характер, чем после его денатурации под действием гидростатического давления.

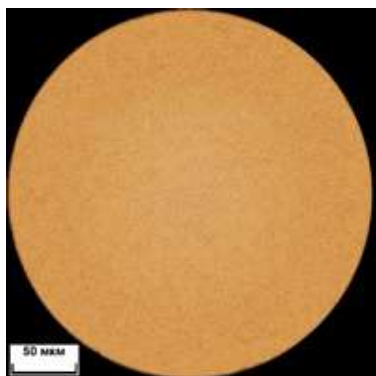


Рисунок 2. Микрофотография яичного белка, обработанного давлением 220,4 МПа

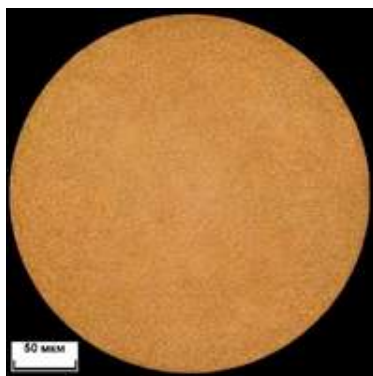


Рисунок 3. Микрофотография яичного белка, обработанного давлением 393,6 МПа

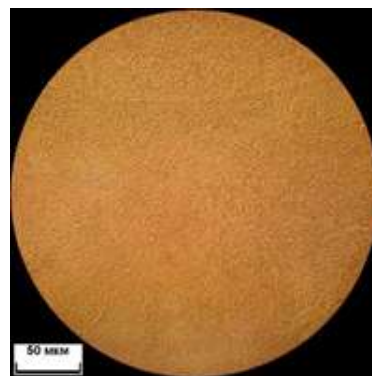


Рисунок 4. Микрофотография яичного белка, обработанного давлением 582,3 МПа

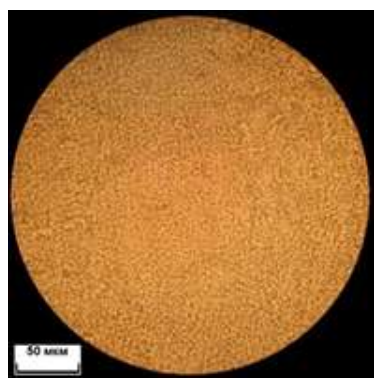


Рисунок 5. Микрофотография яичного белка, обработанного давлением 814,2 МПа

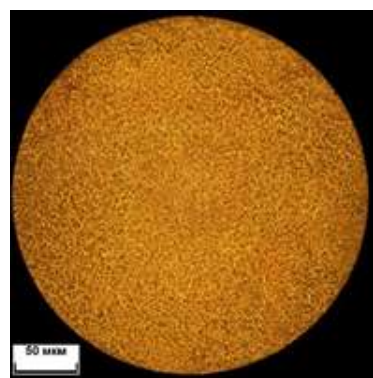


Рисунок 6. Микрофотография яичного белка, обработанного давлением 1009,9 МПа

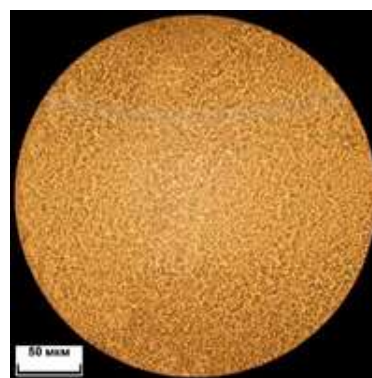


Рисунок 7. Микрофотография яичного белка, обработанного температурой 100°C при атмосферном давлении в течение 15 минут

На Рисунке 7 представлены ложные дифференциальные кривые счетного распределения по площади S частиц в образцах яичного белка после обработки различным фиксированным давлением при комнатной температуре, и после обработки температурой 100°С в течение 15 минут при атмосферном давлении.

Как видно на Рисунке 8, кривые счетного распределения по площади частиц в образцах имеют максимумы. С ростом давления самые интенсивные из них понижаются и площадь наибольшего количества частиц в образцах, обработанных давлением при комнатной температуре, монотонно увеличивается, приближаясь к площади наибольшего количества частиц в образце, обработанного температурой 100°С в течение 15 минут при атмосферном давлении. Действие внешнего гидростатического давления на яичный белок приводит, как к увеличению площади наибольшего количе-

ства частиц в образце, так и к уменьшению их количества.

Считаем, что под действием гидростатического давления увеличение площади сферических частиц в яичном белке происходит за счет двух независимых и одновременно протекающих процессов – коагуляции («слипания», например, за счет адгезионного взаимодействия частиц дисперсной фазы с макроповерхностями) и разворачивания (при денатурации молекул белка). В результате первого процесса увеличение площади происходит с уменьшением количества частиц в геометрической прогрессии. Предполагается, что «слипание» отдельных частиц между собой происходит без нарушения целостности их оболочек. При коагуляции частицы дисперсной фазы могут образовывать объемные структуры с равномерным распределением дисперсионной среды. В результате

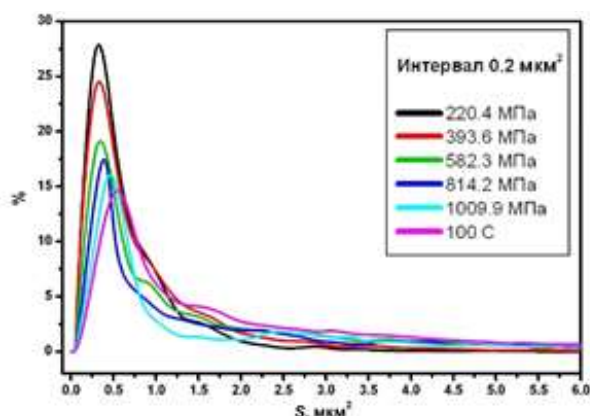


Рисунок 8. Ложные дифференциальные кривые счетного распределения по площади частиц в образцах яичного белка после обработки различным фиксированным давлением при комнатной температуре, и после обработки температурой 100°C в течение 15 минут при атмосферном давлении

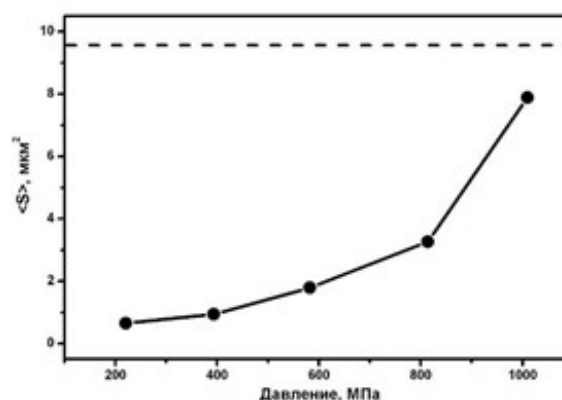


Рисунок 9. Зависимость средней площади частиц в образцах от давления. На рисунке пунктирной линией отмечена величина средней площади частиц в образце, обработанном температурой 100°C в течение 15 минут при атмосферном давлении

второго процесса, увеличение площади частиц происходит без изменения их количества до и после действия давления.

График зависимости средней площади частиц в образцах от давления показан на Рисунке 9.

На Рисунке видно, что средняя площадь частиц в образце яичного белка увеличивается с повышением давления. После обработки образца давлением 1009,9 МПа, средняя площадь частиц в яичном белке становится в 12 раз больше, чем средняя площадь частиц после обработки давлением 220,4 МПа и в 0,822 раза (на 1,7 мкм²) меньше средней площади частиц в образце вареного белка. На основании различия средних площадей частиц вареного яичного белка и обработанного давлением 1009,9 МПа можно предположить, что отличаются и пространственные структуры их молекул.

Таким образом, результаты проведенного анализа дисперсного состава яичного белка после действия внешнего гидростатического давления и температуры 100°C качественно подобны, но не одинаковы количественно.

Количественная теория кинетики коагуляции для сферических частиц была развита М. Смолуховским (Эйнштейн & Смолуховский, 1936), согласно которой частицы сталкиваются между собой в результате броуновского движения, при чем, все столкновения приводят к агрегации. Это справедливо тогда, когда энергия соударения частиц пре-

вышает среднюю энергию ΔE , необходимую для слипания. Отсюда следует, что эффективность и скорость соударений пропорциональна фактору Больцмана $\sim \exp \exp [-\Delta E / (k_B \cdot T)]$. При сжатии системы величина энергетического барьера зависит не только от температуры, но и от приложенного внешнего давления. Проводя аналогию с теорией активных столкновений, необходимо еще учитывать и пространственное расположение частиц при столкновении, их концентрацию, форму, размеры и расстояние между ними, коэффициент диффузии. Тогда скорость коагуляции будет пропорциональна $\sim A \exp \exp [-\Delta E / (k_B \cdot T)]$, где множитель A учитывает влияние перечисленных факторов.

Считаем скорость изменения площади частиц яичного белка после денатурации под действием давления пропорциональной его величине. Тогда, скорость изменения средней площади частиц в образцах при постоянной температуре T и изменении давления P опишем выражением в виде:

$$(d\langle S \rangle) / dP = S(P) + R(P), \quad (1)$$

где $S(P)$ и $R(P)$ – соответственно, скорости денатурации и коагуляции частиц яичного белка после действия внешнего давления.

Для математического моделирования экспериментальных значений скорости изменения средней площади частиц в образцах при изменении давления, представим функции $S(P)$ и $R(P)$ в виде:

$$(P) \equiv y_1(x) = A + B \cdot x, \quad (2)$$

$$R(P) \equiv y_2(x) = C \cdot \exp \exp(D \cdot x), \quad (3)$$

где A, B, C и D – числовые коэффициенты.

Тогда выражение (1) будет:

$$(d(<S>)) / dP = S(P) + R(P) = y_1(x) + y_2(x) = (A+B \cdot x) + (C \exp \exp(D \cdot x)). \quad (4)$$

В Таблице приведены рассчитанные методом наименьших квадратов числовые значения коэффициентов интерполяционного выражения (4).

Таблица 1

Значения коэффициентов интерполяционного выражения (4)

Коэффициент	Числовое значение
A	-0.47188
B	0.00432
C	0.00085
D	0.0108

На Рисунке 10 показаны графики функций (2) и (3) с найденными коэффициентами и приведены экспериментальные значения скорости изменения средней площади частиц в образцах при изменении давления.

Как видно на рисунке, скорость изменения средней площади частиц в образцах при изменении давления имеет нелинейный монотонный характер. До давления около 400 МПа скорость изменения площади частиц яичного белка при повышении давления достаточно точно описывается функцией S(P). На этом основании можно предположить, что в яичном белке при давлениях от атмосферного до 400 МПа денатурация является основной причиной изменения площади частиц. С уменьшением объема образца при изотермическом сжатии увеличивается количество столкновений частиц и уменьшается величина энергетического барьера для их коагуляции. При давлениях больших 400 МПа коагуляция частиц проявляется более отчетливо и с давления около 750 МПа ее скорость начинает уже преобладать над скоростью денатурации.

Как отмечалось ранее, форма молекул яичного белка после разворачивания является лентоподобной, т.е. несферической. В качестве величины, характеризующей размер развернутой молекулы белка,

выберем эквивалентный диаметр $d_{\text{экв}}$, равный диаметру такой условной сферической молекулы, которая имеет с ней одинаковую площадь. Эквивалентные диаметры рассчитывали по формуле:

$$d_{\text{экв}} = (d_{\text{макс}} + d_{\text{мин}}) / 2, \quad (5)$$

где $d_{\text{макс}}$ и $d_{\text{мин}}$ – соответственно видимый наибольший и наименьший размер профиля несферической развернутой молекулы яичного белка.

На Рисунке 11 приведены ложные дифференциальные кривые счетного распределения по эквивалентному диаметру частиц в образцах яичного белка после обработки различным фиксирован-

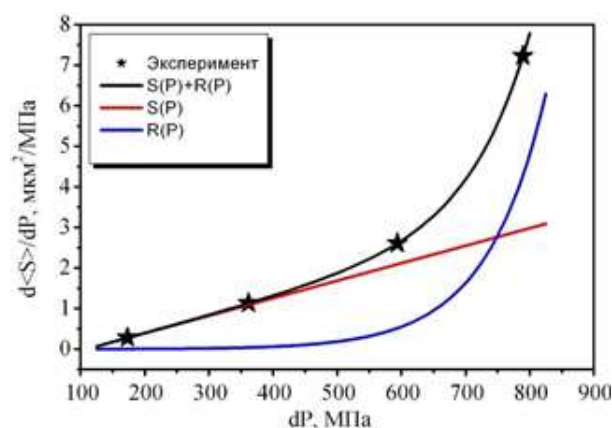


Рисунок 10. Графики функций (2), (3) и экспериментальные значения скорости изменения средней площади частиц в образцах при изменении давления

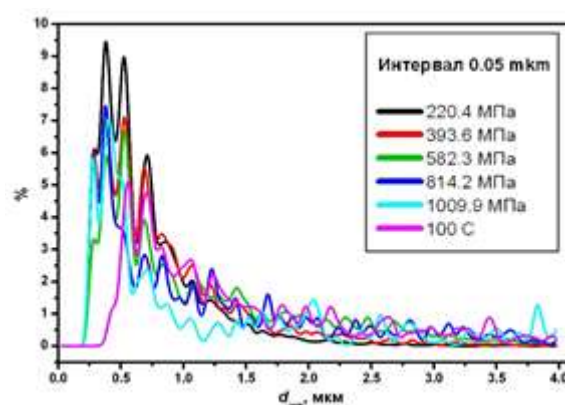


Рисунок 11. Ложные дифференциальные кривые счетного распределения по эквивалентному диаметру частиц в образцах яичного белка после обработки различным фиксированным давлением при комнатной температуре, и после обработки температурой 100°C в течение 15 минут при атмосферном давлении

ным давлением при комнатной температуре, и после обработки температурой 100°C в течение 15 минут при атмосферном давлении.

На Рисунке 10 хорошо видно, что кривые счетного распределения по эквивалентному диаметру частиц обработанных образцов яичного белка являются немонотонными зависимостями от давления.

График зависимости среднего эквивалентного диаметра частиц в обработанных образцах от давления показан на Рисунке 12.

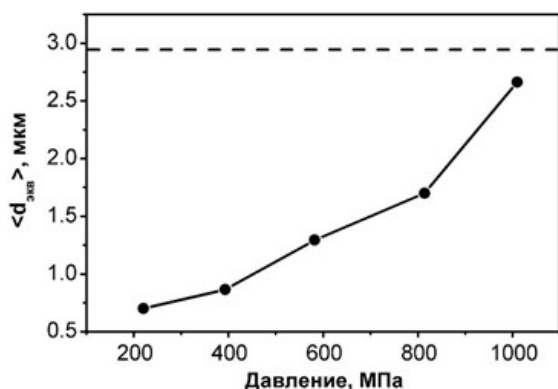


Рисунок 12. Зависимость среднего эквивалентного диаметра частиц в образцах от давления. На рисунке пунктирной линией отмечена величина среднего эквивалентного диаметра частиц в образце, обработанном температурой 100°C в течение 15 минут при атмосферном давлении

Обсуждение полученных результатов

Анализ результатов микроскопирования явно показал зависимость линейных размеров элементов пространственной структуры яичного белка от приложенного давления. Это означает, что под действием внешнего гидростатического давления происходит денатурация (разворачивание) молекул яичного белка, степень которой тем больше, чем выше величина приложенного давления. При этом, по мере увеличения давления, на микрофотографиях более заметным становится результат срастания развернувшихся молекул между собой, а реологические свойства яичного белка приближаются к реологическим свойствам структурированной дисперсной системы с пространственно-связанной сеткой, которыми в пределе обладает яичный белок после полной тепловой денатурации.

На Рисунке 12 видно, что с повышением давления средний эквивалентный диаметр частиц в образце яичного белка после обработки давле-

нием увеличивается. После действия давления 1009,9 МПа средний эквивалентный диаметр частиц образца увеличивается в 3,799 раза, по сравнению со средним эквивалентным диаметром частиц в яичном белке, обработанном давлением 220,4 МПа. При 582,3 МПа на графике нарушается монотонность функциональной зависимости среднего эквивалентного диаметра частиц яичного белка от давления, что можно объяснить, например, многоступенчатостью механизма разворачивания его молекул. Как известно (Pico, 1997), тепловая денатурация альбумина имеет обратимую и необратимую стадии. Первая – превращение «нативный белок – обратимое развернутое состояние» (63,2°C), вторая – необратимая денатурация (74,3°C). На процесс разворачивания белка оказывают влияние как растворитель (межмолекулярные взаимодействия определяются его свойствами, составом, структурой), так и вид денатурации (нагревание, охлаждение, влияние давления). В зависимости от физико-химических условий могут существовать и промежуточные формы развернутого белка (Muzammil et al., 1999).

Наблюдается отличие средних диаметров частиц, в яичном белке полученных методами светорассеяния и микроскопирования (Рисунок 12). С одной стороны, средний диаметр в первом методе определяется светорассеиванием на всех оптических неоднородностях дисперсной фазы, в число которых входят и неоднородности тонкой структуры слипшихся и развернувшихся молекул белка с широким диапазоном размеров. С другой стороны, светорассеяние происходит на сжатых молекулах белка, имеющих меньшие размеры, по сравнению с их размерами при атмосферном давлении. В методе микроскопирования проявляются все структурные элементы несжатых молекул яичного белка, позволенные разрешающей способностью микроскопа.

Выводы

1. Методом микроскопирования проведен анализ дисперсного состава яичного белка после действия различного фиксированного давления при комнатной температуре. Определены зависимости площади и среднего диаметра частиц в белке от давления.
2. На основе результатов микроскопирования предложена математическая модель кинетики денатурации и коагуляции частиц яичного белка после его обработки внешним гидростатическим давлением при комнатной температуре.

3. Полученные спектры образца яичного белка под давлением при температуре 23°C, не совпадают со спектром белка после его тепловой денатурации при атмосферном давлении и 100°C. Из этого следует, что при температуре 23°C действие гидростатического давления в диапазоне от атмосферного до 1009,9 МПа не приводит к полной денатурации молекул яичного белка.
4. С повышением давления увеличиваются линейные размеры элементов пространственной структуры яичного белка. Это означает, что под действием внешнего гидростатического давления происходит денатурация (разворачивание) молекул яичного белка, степень которой тем больше, чем выше величина приложенного давления
5. Действие внешнего гидростатического давления на яичный белок приводит, как к увеличению площади наибольшего количества частиц в образце, так и к уменьшению их количества.
6. Результаты проведенного анализа дисперсного состава яичного белка после действия внешнего гидростатического давления и температуры 100°C качественно подобны, но не одинаковы количественно.
7. В яичном белке при давлениях от атмосферного до 400 МПа денатурация является основной причиной изменения площади частиц. С уменьшением объема образца при изотермическом сжатии увеличивается количество столкновений частиц и уменьшается величина энергетического барьера для их коагуляции. При давлениях больших 400 МПа коагуляция частиц проявляется более отчетливо и с давления около 750 МПа ее скорость начинает уже преобладать над скоростью денатурации.

Для более точного математического моделирования коагуляции и денатурации молекул яичного белка под действием внешнего гидростатического давления необходимо проводить более подробный анализ дисперсного состава, при котором на микрофотографиях измерять и другие геометрические параметры частиц, такие, как периметр, округлость и продолговатость. Это позволит получить новую важную информацию о преобразованиях структуры и конформационных перестройках, которые происходят в яичном белке при действии внешнего гидростатического давления.

Литература

Агафонов, В. П., Петрова, Т. И., & Кругалев, С. С. (2012). К вопросу оценки потребительских

свойств куриных яиц разной категории. *Птица и птицепродукты*, 2, 12-17.

Виндхорст, Г. В. (2006). Изменение тенденций на яичном рынке. *Яичный мир: приложение к журналу «Птица и птицепродукты»*, 2, 28-33.

Восканян, О. С., Паронян, В. Х., Шленская, Т. В. (2004). Исследование структурно-реологических свойств эмульсионных продуктов нового поколения. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 10, 39-40

Рудакова, Т. (1998). Консервирование продуктов высоким давлением. *Рыбное хозяйство*, 5-6, 59-60.

Штеле, А. Л., & Филатов, А. И. (2012). Оценка качества пищевых яиц и моделирование их энергетической ценности. *Достижения науки и техники АПК*, 9, 64-66.

Эйнштейн, А., & Смолуховский, М. (1936). Доступные наблюдению молекулярные явления, противоречащие обычной термодинамике. В *Броуновское движение* (с. 197). Ленинград: ОНТИ.

Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., & Masson, P. (1992). From living systems to biomolecules. In *High Pressure and Biotechnology* (pp. 37-44). Montrouge: John Libbey Eurotext Ltd.

Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., & Masson, P. (1992). Pressure denaturation of proteins. In *High Pressure and Biotechnology* (pp. 89-99). Montrouge: John Libbey Eurotext Ltd.

Brandts, J. F., Oliveira, R. J., & Westort, C. (1970). Thermodynamics of protein denaturation effect of pressure on the denaturation of ribonuclease. *Biochemistry*, 9, 1038-1047. <https://doi.org/10.1021/bi00806a045>

Bridgman, P. W. (1914). The coagulation of albumen by pressure. *The Journal of Biological Chemistry*, 19, 511-512.

Buzrul, S. (2021). High hydrostatic pressure applications on liquid whole egg. *World's Poultry Science Journal*, 77(1), 71-90. <https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1866963>

Funtenberger, S., Dumay, E., & Cheftel, J. C. (1995). Pressure-induced aggregation of B-Lactoglobulin in pH 7.0 buffers. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 410-418. [https://doi.org/10.1016/0023-6438\(95\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0023-6438(95)90025-X)

Gekko, K., & Hasegawa, Y. (1986). Compressibility-structure relationship of globular proteins. *Biochemistry*, 25, 6563-6571. <https://doi.org/10.1021/bi00369a034>

Gekko, K., & Yamagami, K. (1991). Flexibility of food proteins as revealed by compressibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 57-62. <https://doi.org/10.1021/jf00001a010>

Gharbi, N., & Labbafi, M. (2018). Effect of processing on aggregation mechanism of egg white proteins. *Food Chemistry*, 252, 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.088>

- Hauben, K. J. A., Wuytack, E. Y., Soontjens, C. C. F., & Michiels, C. W. (1996). High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. *Journal of Food Protection*, 59(4), 350-355. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.4.350>
- Hawley, S. A. (1971). Reversible pressure-temperature denaturation of chymo-trypsinigen. *Biochemistry*, 10, 2436-2442. <https://doi.org/10.1021/bi00789a002>
- Hayashi, R., Kawamura, Y., Nakasa, T., & Okinaka, O. (1989). Application of high pressure to food processing. *Pressurization of Egg White and Yolk, and Properties of Gels Formed*, 53(11), 2935-2939. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.53.2935>
- Holdsworth, D. & Simpson, R. (2016). *Thermal Processing of Packaged Foods*. Cham: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24904-9>
- Jähne, B. (2005). *Digital Image Processing*. Berlin: Springer. <https://doi.org/10.1007/3-540-27563-0>
- Knorr, D., & Heinz, V. (1999). Recent advances in high pressure processing of foods. *New Food*, 2, 15-19.
- Li-Chan, E. C. Y., Powrie, W. D., & Nakai, A. S. (1995). The chemistry of eggs and egg products. In *Egg Science and Technology* (pp. 105-114). New York: Food Products Press.
- Linton, M., McClements, J. M. J., & Patterson, M. F. (1999). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice using a combination of high pressure and mild heat. *Journal of Food Protection*, 62(3), 277-279. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.3.277>
- Messens, W., van Camp J., & Huyghebaert, A. (1997). The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 107-112. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01015-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01015-7)
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 225-232. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89083-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89083-4)
- Muzammil, S., Kumar, Y., & Tayyab, S. (1999). Molten globule-like state of human serum albumin at low pH. *European Journal of Biochemistry*, 266(1), 26-32. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00810.x>
- Németh, C., Tóth, A., Hidas, K., Surányi, J., & Friedrich, L. (2020). High hydrostatic pressure treatment of liquid egg products. *Journal of Physics: Conference Series*, 1609, Article 012012. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1609/1/012012>
- Ohmiya, K., Kajino, T., Shimizu, S., & Gekko, K. (1989). Effect of pressure on the association states of enzyme-treated casein. *Agricultural Biological Chemistry*, 53(1), 1-7. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869259>
- Okamoto, M., Kawamura, Y., & Hayashi, R. (1990). Application of high pressure to food processing: Textural comparison of pressure- and heat-induced gels of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 183-189. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.54.183>
- Osuga, D. T., & Feeney, R. E. (1977). Egg proteins. In *Food Proteins* (pp.209-266). Westport: Avi Publishing Co.
- Oxen, P., & Knorr, D. (1993). Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 26(3), 220-223. <https://doi.org/10.1006/fstl.1993.1048>
- Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G. V., Welti-Chanes, J., & Swanson, B. G. (1997). Kinetic analysis of *Zygosaccharomyces baili* inactivation by high hydrostatic pressure. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 30(7), 703-708. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0261>
- Pico, G. A. (1997). Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20(1), 63-73. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(96\)01153-1](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(96)01153-1)
- Der Plancken, I. V., Loey, A. V., & Hendrickx, M. E. (2005). Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(1), 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.10.002>
- Singh, A., Sharma, M., & Ramaswamy, H. S. (2015). Effect of high pressure treatment on rheological characteristics of egg components. *International Journal of Food Properties*, 18(3), 558-571. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.837063>
- Sokolov, S., Sevatorov, N., & Selezneva, I. K. (2013). Development of the module for determining the temperature field in the high pressure chamber. *Journal of EcoAgriTourism*, 1(26), 51-54.
- Suzuki, K., Miyosawa, Y., & Suzuki, C. (1963). Protein denaturation by high pressure. Measurement of turbidity of isoelectric ovalbumin and horse serum albumin under high pressure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 101, 225-228.
- Tang, T., Du, H., Tang, S., Jiang, Y., Tu, Y., Hu, M., & Xu, M. (2021). Effects of incorporating different kinds of peptides on the foaming properties of egg white powder. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 72, Article 102742. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102742>
- Van Camp, J., & Huyghebaert, A. (1995). High pressure-induced gel formation of a whey protein and haemoglobin protein concentrate. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28(1), 111-117. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80021-2](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80021-2)
- Wong, P. T. T., & Heremans, K. (1988). Pressure effects on protein secondary structure and hydrogen

- deuterium exchange in chymotrypsinogen: Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochemica et Biophysica Acta*, 956(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(88\)90291-9](https://doi.org/10.1016/0167-4838(88)90291-9)
- Zhao, Y., Feng, F., Yang, Y., Xiong, C., Xu, M., & Tu, Y. (2021). Gelation behavior of egg yolk under physical and chemical induction: A review. *Food Chemistry*, 355, Article 129569. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129569>
- Zipp, A., & Kauzmann, W. (1973), Pressure denaturation of metmyoglobin. *Biochemistry*, 12(21), 4217-4228. <https://doi.org/10.1021/bi00745a028>

Analysis of the Dispersed Composition of Egg White by Microscopy

Sergey A. Sokolov

Kerch State Maritime Technological University
82, Ordzhonikidze str., Kerch, 298309, Russian Federation
E-mail: sokoloff1906@mail.ru

Aleksander A. Yashonkov

Kerch State Maritime Technological University
82, Ordzhonikidze str., Kerch, 298309, Russian Federation
E-mail: jashonkov@rambler.ru

The contents of a chicken egg contain in an optimal ratio all the nutrients necessary for the development and maintenance of the life of the human body. However, even with relatively short storage, the properties of eggs change noticeably for the worse. Currently used pasteurization, as well as the most common methods of preserving liquid egg products – drying and freezing do not provide microbiological sterility and stability of the properties of the product during its long-term storage. The aim of the work was to improve the process of high-pressure processing of the contents of chicken eggs on the basis of experimental studies allowing to establish reasonable values of process parameters to improve the technological and consumer properties of processed egg raw materials. As part of the research, it was found that high-pressure treatment not only inactivates microorganisms, but also gives new useful consumer characteristics to food products. The paper considers the issues of determining the dispersed composition of egg white samples by microscopy. The analysis of the dispersed composition of egg white after the action of various fixed pressure at room temperature was carried out. The dependences of the area and the average diameter of the particles in the protein on the pressure are determined. A mathematical model of the kinetics of denaturation and coagulation of egg white particles after its treatment with external hydrostatic pressure at room temperature is proposed. It was found that with increasing pressure, the average equivalent particle diameter in an egg white sample increases after pressure treatment. After the action of a pressure of 1009.9 MPa, the average equivalent diameter of the sample particles increases by 3.799 times, compared with the average equivalent diameter of the particles in egg white treated with a pressure of 220.4 MPa.

Keywords: chicken egg, protein denaturation, microscopy, high pressure.

References

- Agafonychev, V. P., Petrova, T. I., & Krugalev, S. S. (2012). K voprosu otsenki potrebitel'skikh svoystv kurinykh yait raznoi kategorii [On the issue of evaluating the consumer properties of chicken eggs of different categories]. *Ptitsa i ptitseprodukty* [Poultry and Poultry Products], 2, 12-17.
- Einshtein, A., & Smolukhovskii, M. (1936). Dostupnye nablyudeniya molekulyarnye yavleniya, protivorechashchie obychnoi termodinamike [Observable molecular phenomena that contradict conventional thermodynamics]. In *Brounovskoe dvizhenie* [Brownian motion] (p. 197). Leningrad: ONTI.
- Rudakova, T. (1998). Konservirovanie produktov vysokim davleniem [High pressure canning]. *Rybnoe khozyaistvo* [Fishery], 5-6, 59-60.
- Shtele, A. L., & Filatov, A. I. (2012). Otsenka kachestva pishchevykh yait i modelirovanie ikh energicheskoi tsennosti [Evaluation of the quality of edible eggs and modeling of their energy value]. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK* [Achievements of Science and Technology of the Agro-Industrial Complex], 9, 64-66.
- Vindkhorst, G. V. (2006). Izmenenie tendentsii na yaichnom rynke [Changing trends in the egg market]. *Yaichnyi mir: prilozhenie k zhurnalu "Ptitsa i ptitseprodukty"* [Egg World: Supplement to the journal "Poultry Products magazine"], 2, 28-33.
- Voskanyan, O. S., Paronyan, V. Kh., Shlenskaya, T. V. (2004). Issledovanie strukturno-reologicheskikh svoystv emul'sionnykh produktov novogo pokoleniya [Investigation of the structural and rheological properties of new generation emulsion products]. *Khranenie i pererabotka sel'khozsyrya* [Storage and processing of Farm Products], 10, 39-40.
- Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., & Masson, P. (1992). From living systems to biomolecules. In *High Pressure and Biotechnology* (pp. 37-44). Montrouge: John Libbey Eurotext Ltd.

- Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., & Masson, P. (1992). Pressure denaturation of proteins. In *High Pressure and Biotechnology* (pp. 89-99). Montrouge: John Libbey Eurotext Ltd.
- Brandts, J. F., Oliveira, R. J., & Westort, C. (1970). Thermodynamics of protein denaturation effect of pressure on the denaturation of ribonuclease. *Biochemistry*, 9, 1038-1047. <https://doi.org/10.1021/bi00806a045>
- Bridgman, P. W. (1914). The coagulation of albumen by pressure. *The Journal of Biological Chemistry*, 19, 511-512.
- Buzrul, S. (2021). High hydrostatic pressure applications on liquid whole egg. *World's Poultry Science Journal*, 77(1), 71-90. <https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1866963>
- Funtenberger, S., Dumay, E., & Cheftel, J. C. (1995). Pressure-induced aggregation of B-Lactoglobulin in pH 7.0 buffers. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]*, 28, 410-418. [https://doi.org/10.1016/0023-6438\(95\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0023-6438(95)90025-X)
- Gekko, K., & Hasegawa, Y. (1986). Compressibility-structure relationship of globular proteins. *Biochemistry*, 25, 6563-6571. <https://doi.org/10.1021/bi00369a034>
- Gekko, K., & Yamagami, K. (1991). Flexibility of food proteins as revealed by compressibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 57-62. <https://doi.org/10.1021/jf00001a010>
- Gharbi, N., & Labbafi, M. (2018). Effect of processing on aggregation mechanism of egg white proteins. *Food Chemistry*, 252, 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.088>
- Hauben, K. J. A., Wuytack, E. Y., Soontjens, C. C. F., & Michiels, C. W. (1996). High pressure transient sensitization of Escherichia coli to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. *Journal of Food Protection*, 59(4), 350-355. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.4.350>
- Hawley, S. A. (1971). Reversible pressure-temperature denaturation of chymo-trypsinigen. *Biochemistry*, 10, 2436-2442. <https://doi.org/10.1021/bi00789a002>
- Hayashi, R., Kawamura, Y., Nakasa, T., & Okinaka, O. (1989). Application of high pressure to food processing. *Pressurization of Egg White and Yolk, and Properties of Gels Formed*, 53(11), 2935-2939. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.53.2935>
- Holdsworth, D. & Simpson, R. (2016). *Thermal Processing of Packaged Foods*. Cham: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24904-9>
- Jähne, B. (2005). *Digital Image Processing*. Berlin: Springer. <https://doi.org/10.1007/3-540-27563-0>
- Knorr, D., & Heinz, V. (1999). Recent advances in high pressure processing of foods. *New Food*, 2, 15-19.
- Li-Chan, E. C. Y., Powrie, W. D., & Nakai, A. S. (1995). The chemistry of eggs and egg products. In *Egg Science and Technology* (pp. 105-114). New York: Food Products Press.
- Linton, M., McClements, J. M. J., & Patterson, M. F. (1999). Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in orange juice using a combination of high pressure and mild heat. *Journal of Food Protection*, 62(3), 277-279. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.3.277>
- Messens, W., van Camp J., & Huyghebaert, A. (1997). The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 107-112. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01015-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01015-7)
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 225-232. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89083-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89083-4)
- Muzammil, S., Kumar, Y., & Tayyab, S. (1999). Molten globule-like state of human serum albumin at low pH. *European Journal of Biochemistry*, 266(1), 26-32. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00810.x>
- Németh, C., Tóth, A., Hidas, K., Surányi, J., & Friedrich, L. (2020). High hydrostatic pressure treatment of liquid egg products. *Journal of Physics: Conference Series*, 1609, Article 012012. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1609/1/012012>
- Ohmiya, K., Kajino, T., Shimizu, S., & Gekko, K. (1989). Effect of pressure on the association states of enzyme-treated casein. *Agricultural Biological Chemistry*, 53(1), 1-7. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869259>
- Okamoto, M., Kawamura, Y., & Hayashi, R. (1990). Application of high pressure to food processing: Textural comparison of pressure- and heat-induced gels of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 183-189. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.54.183>
- Osuga, D. T., & Feeney, R. E. (1977). Egg proteins. In *Food Proteins* (pp.209-266). Westport: Avi Publishing Co.
- Oxen, P., & Knorr, D. (1993). Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of Rhodotorula rubra. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]*, 26(3), 220-223. <https://doi.org/10.1006/fstl.1993.1048>
- Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G. V., Welti-Chanes, J., & Swanson, B. G. (1997). Kinetic analysis of Zygosaccharomyces baili inactivation by high hydrostatic pressure. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]*, 30(7), 703-708. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0261>
- Pico, G. A. (1997). Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20(1), 63-73. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(96\)01153-1](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(96)01153-1)

- Der Plancken, I. V., Loey, A. V., & Hendrickx, M. E. (2005). Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(1), 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.10.002>
- Singh, A., Sharma, M., & Ramaswamy, H. S. (2015). Effect of high pressure treatment on rheological characteristics of egg components. *International Journal of Food Properties*, 18(3), 558-571. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.837063>
- Sokolov, S., Sevatorov, N., & Selezneva, I. K. (2013). Development of the module for determining the temperature field in the high pressure chamber. *Journal of EcoAgriTourism*, 1(26), 51-54.
- Suzuki, K., Miyosawa, Y., & Suzuki, C. (1963). Protein denaturation by high pressure. Measurement of turbidity of isoelectric ovalbumin and horse serum albumin under high pressure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 101, 225-228.
- Tang, T., Du, H., Tang, S., Jiang, Y., Tu, Y., Hu, M., & Xu, M. (2021). Effects of incorporating different kinds of peptides on the foaming properties of egg white powder. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 72, Article 102742. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102742>
- Van Camp, J., & Huyghebaert, A. (1995). High pressure-induced gel formation of a whey protein and haemoglobin protein concentrate. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28(1), 111-117. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80021-2](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80021-2)
- Wong, P. T. T., & Heremans, K. (1988). Pressure effects on protein secondary structure and hydrogen deuterium exchange in chymotrypsinogen: Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 956(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(88\)90291-9](https://doi.org/10.1016/0167-4838(88)90291-9)
- Zhao, Y., Feng, F., Yang, Y., Xiong, C., Xu, M., & Tu, Y. (2021). Gelation behavior of egg yolk under physical and chemical induction: A review. *Food Chemistry*, 355, Article 129569. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129569>
- Zipp, A., & Kauzmann, W. (1973), Pressure denaturation of metmyoglobin. *Biochemistry*, 12(21), 4217-4228. <https://doi.org/10.1021/bi00745a028>