

The concentration of proteins in milk is as follows:

	grams/ litre	% of total protein
--	---------------------	---------------------------

Total Protein	33	100
Total Caseins	26	79.5
alpha s1	10	30.6
alpha s2	2.6	8.0
beta	9.3	28.4
kappa	3.3	10.1
Total Whey Proteins	6.3	19.3
alpha lactalbumin	1.2	3.7
beta lactoglobulin	3.2	9.8
BSA	0.4	1.2
Immunoglobulins	0.7	2.1
Proteose peptone	0.8	2.4

The ratio of casein to whey proteins shows large interspecies differences; in human milk, the ratio is ~40:60, in equine (mare's) milk it is 50:50 while in the milk of the cow, goat, sheep and buffalo it is ~80:20.

خصوصیات:

- دارای باند های استری فسفات
- دارای مقادیر بالایی از پرولین، فاقد سیستئین یا خیلی کم (آلفا S1 و کاپا کازئین هر یک دو سیستئین دارند)
- حلالیت کم در $pH = 4,5$ و دارای نقطه ایزو الکتریک در $4,6$ تا $4,7$
- بصورت میسل های کلونیدی – همراه با کلسیم ، فسفات، منیزیم و سیترات
- میسل های کازئینی از اجزا کوچکتري ساخته مي شوند تحت عنوان ساب میسل ها (حاوي ۱۰ تا ۱۰۰ مولکول پروتئین)
- میسلها ذرات کروي با قطر ۳۰ تا ۳۰۰ نانومتر
- ۹۲% میسلها از پروتئین و ۸% مابقي املاح بخصوص فسفات و کلسیم -
- α_s1 ، α_s2 ، β و κ بترتیب هر یک از کازئین ها نسبت به مقدار کل پروتئین های شیر دارای حدود ۳۲، ۸، ۲۶، و ۹/۸ درصد می باشند.

□ میسل‌های کازئین، توده‌های نسبتاً متراکمی با نواحی کوچک فسفات کلسیم هستند که میسل‌ها را به هم متصل می‌کند و به میسل‌ها ساختار متخلخل و باز می‌بخشد.

□ حذف فسفات کلسیم کلوئیدی (Colloidal Calcium Phosphate- **CCP**) ، به عنوان مثال با اسیدی شدن یا افزودن EDTA یا سیترات ، منجر به تجزیه میسل‌ها می‌شود.

□ علاوه بر این زمانی که pH از ۹ بیشتر می‌شود، تجزیه میسل هم اتفاق می‌افتد.

- ساختار داخلی میسل کازئین مدت‌ها مورد بحث بوده و هنوز به طور کامل شناخته نشده است.

- سه مدل اصلی ارائه شده است:

✓ مدل نانو خوشه ،

✓ مدل اتصال دوگانه و

✓ مدل ساب میسل (مدلی که با جزئیات بیشتر در ادامه بحث خواهد شد).

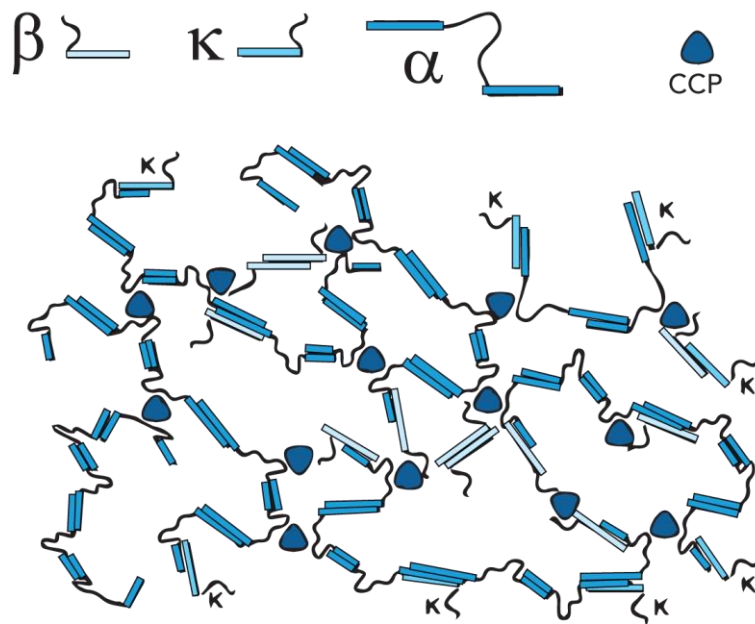
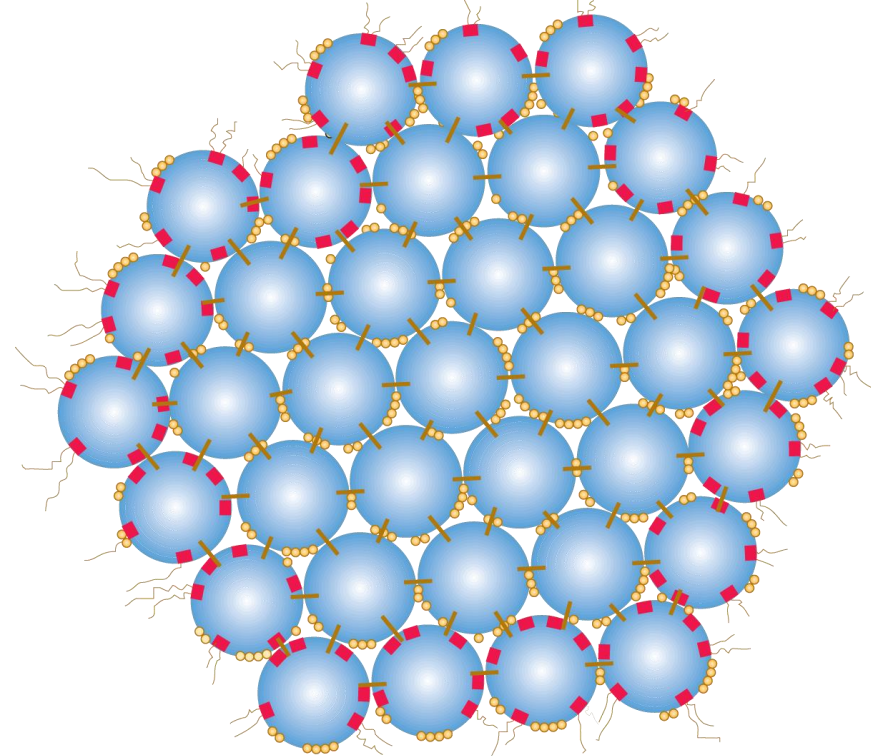


Fig. 2.30 The dual binding model








-  Submicelle
-  Protruding chain
-  Calcium phosphate
-  κ -casein
-  Hydrophobic interactions ($-\text{PO}_4$) groups

Fig. 2 .31 Sub-micelle model of casein micelle.

چندین ویژگی مورد قبول اکثر مدل های ارائه شده

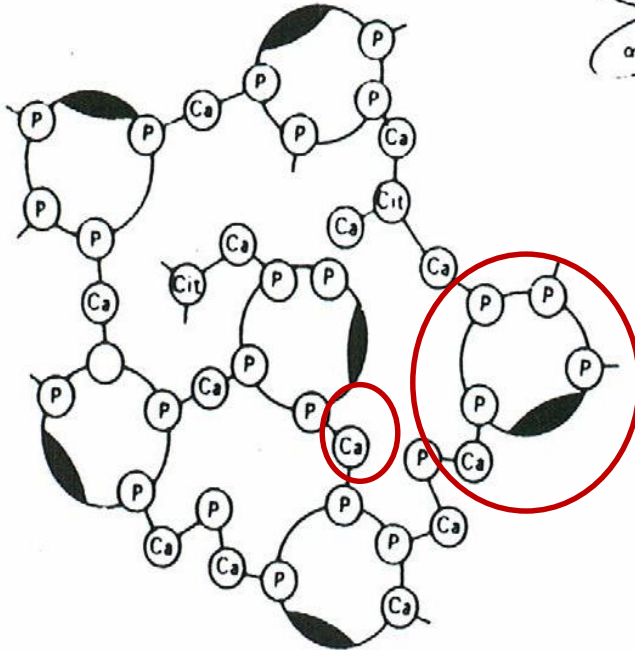
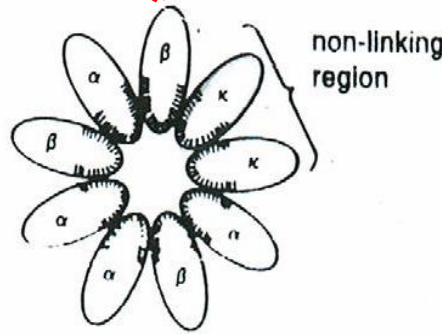
- میسل ها تقریباً ذرات کروی با قطر متوسط حدود ۱۵۰ نانومتر هستند.
- α -s و β - کازئین عمدتاً در وسط میسل متمرکز شده اند، در حالی که K - کازئین بر سطح غالب است.
- یک لایه کرک مانند (مویی) در اطراف میسل وجود دارد که عمدتاً به سر کربوکسیل (انتهایی) K - کازئین متصل است و ۵-۱۰ نانومتر از سطح میسل بیرون زده است.
- این زنجیره مویی K - کازئین بیرون زده، آب دوست و دارای بار منفی است و سهم عمده ای در پایداری استریکی (فضایی) میسل ها دارد.
- اگر لایه مویی برداشته شود به عنوان مثال با افزودن اتانول یا هیدرولیز ناشی از مایه پنیر، ثبات کلوئیدی میسل تغییر کرده و میسل ها تجمع یافته یا رسوب می کنند.
- علاوه بر این، به طور کلی پذیرفته شده است که در ساختار میسل کازئین "نانوخوشه" هایی از فسفات کلسیم وجود دارد که تقریباً ۳ نانومتر قطر دارند و حاوی بیشتر فسفات و کلسیم در میسل هستند.
- نیروهایی که میسل را در کنار هم نگه می دارند، عبارتند از: برهمکنش های آگریز بین گروه های پروتئینی، پیوندهای متقاطع بین زنجیره های پپتیدی توسط نانوخوشه ها و پیوندهای یونی.

Fraction	Molecular Weight^b	Proportion whole casein (%)	Serine-PO4 residues	Calcium Sensitivity	proline	Carbohydrate
Alphas1	23000	38.1	5 - 9	++	17	-
Alphas2	25000	10.2	10 - 13	+++	10	-
Beta	24000	35.7	4 - 5	+	35	-
Gamma	11600-20500	3.2	0 or 1	-	-	-
Kappa	19800	12.8	0	-	20	+

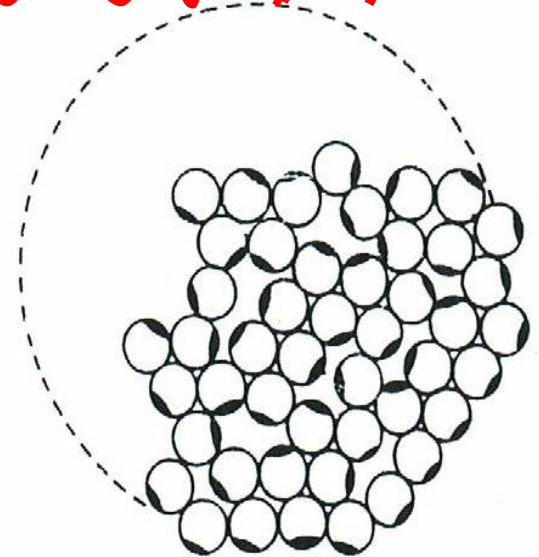
- **alpha(s1)-casein**: (molecular weight 23000 Da.; 199 residues, 17 proline residues, 7-9 Phosphoserin)
- **alpha(s2)-casein**: (molecular weight 25000 Da.; 207 residues, 10 prolines residues, 10 - 13 Phosphoserin)
- **β-casein**: (molecular weight 24000 Da.; 209 residues, 35prolines residues, 4-5 Phosphoserin)
- **kappa-casein** : (molecular weight 19000 Da. ; 169 residues, 20prolines residues, 0 Phosphoserin)

ساب میسلها و نحوه تشکیل میسل های کازئین

(i) Cross section of a typical submicelle showing the distribution of the three types of casein molecules. Predominantly hydrophobic areas are shaded.



(ii) Cross-link formation between submicelles. The non-linking regions are shown in black: (P) is phosphate, (Ca) is calcium, and (Cit) is citrate.



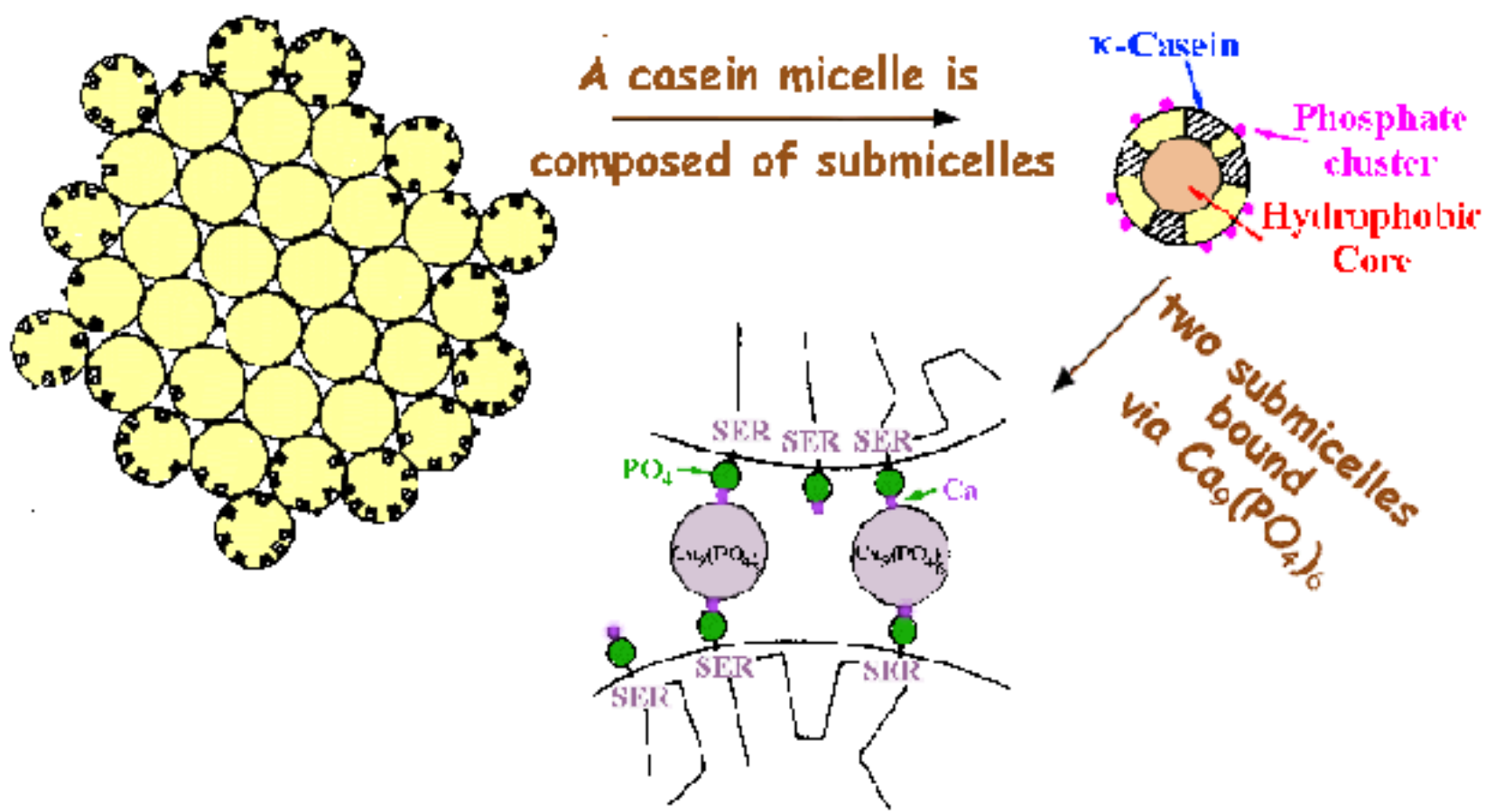
(iii) Formation of a full-sized micelle. As the curvature of the exposed surface decreases, there is less opportunity for the binding of further submicelles.

• زنجیره های پلی پپتیدی هر سه نوع کازئین طوری تا خورده اند که به شکل توپ Rugby در آمده اند

• همواره دارای يك سر با اسید هاي آمین هیدروفوب (مانند پرولین) می باشند.

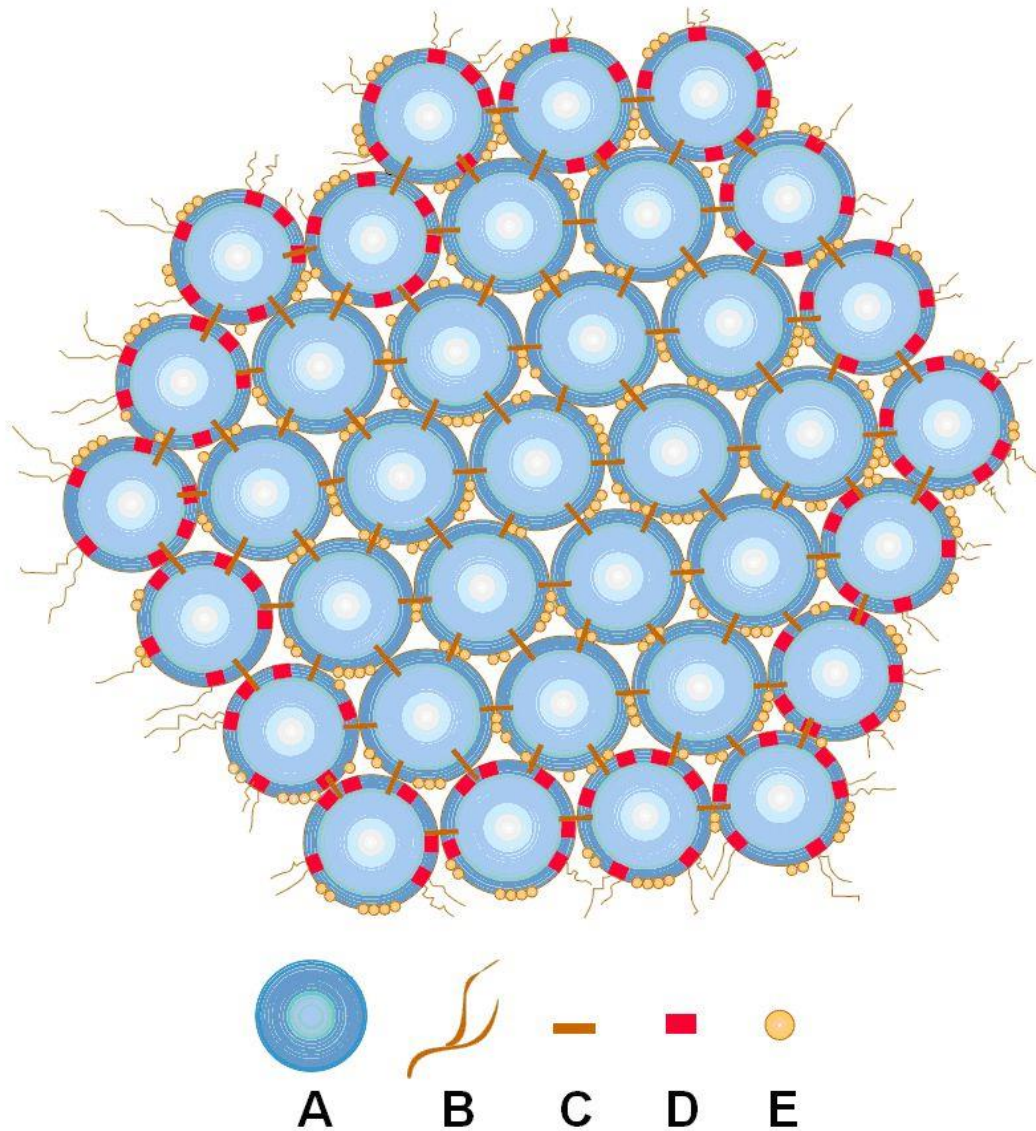
• مانند لیپیدها بعلت پراکنده بودن بار منفی در سر قطبی و ایجاد نیروی دافعه الکتروستاتیکی سرهای هیدروفوب بطرف هم کشیده شده و در نتیجه شکل کرویی را با مرکز هیدروفوب تسکیل می دهند.

• کاپا کازئین دارای هیچ استخلاف فسفات در سر قطبی خود نیست اما دارای يك مولکول الیگوساکاریدی که معمولا تری ساکارید است که به ترئونین متصل است. یکی از قندهای این بخش سالیسیلیک اسد است که دارای بار منفی است و در ایجاد دافعه الکتروستاتیکی لایه مویی کمک کننده است.



■ Schmidt ، ۱۹۸۲: میسلها از ساب میسل (۱۰ تا ۱۵ نانومتر) - ساختمانی شبیه تمشک ، ۲۵۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰۰ دالتون وزن مولکولی ساب میسل ، حاوی ۱۵ تا ۲۵ مولکول پروتئین کازئین، ساب میسل دارای یک هسته هیدروفوب که توسط یک پوشش هیدروفیل پوشیده شده است.

■ پوشش هیدروفیل تا حدی واجد بخش قطبی کاپاکازئین می باشد. بعضی از ساب میسلها غنی از کاپاکازئین ولی برخی دیگر دارای مقدار کمی از کاپا کازئین هستند.



Casein micelles, shown in figure 1, consist of a complex of sub-micelles, of a diameter of 10 to 15 nm (1 nanometer = 10^{-9} m).

A medium-sized micelle consists of about 400 to 500 sub-micelles and may be as large as 0.4μ microns (0.0004 mm).

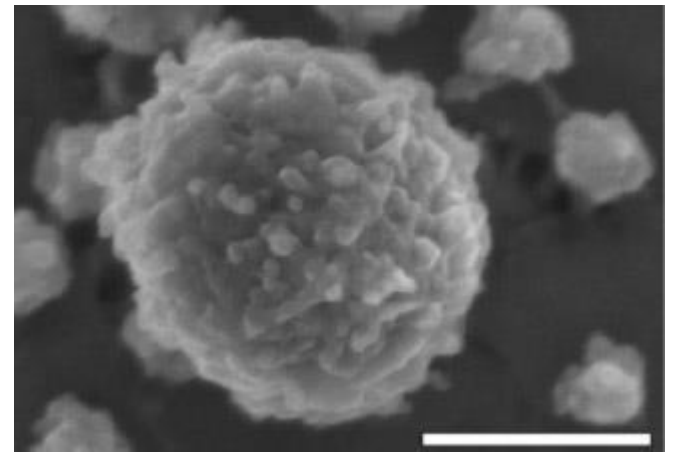


Figure 1 : A casein micelle; A: a submicelle; B: protruding chain; C: Calcium phosphate; D: κ -casein; E: phosphate groups

عوامل Aggregation میسل‌های کازئین :

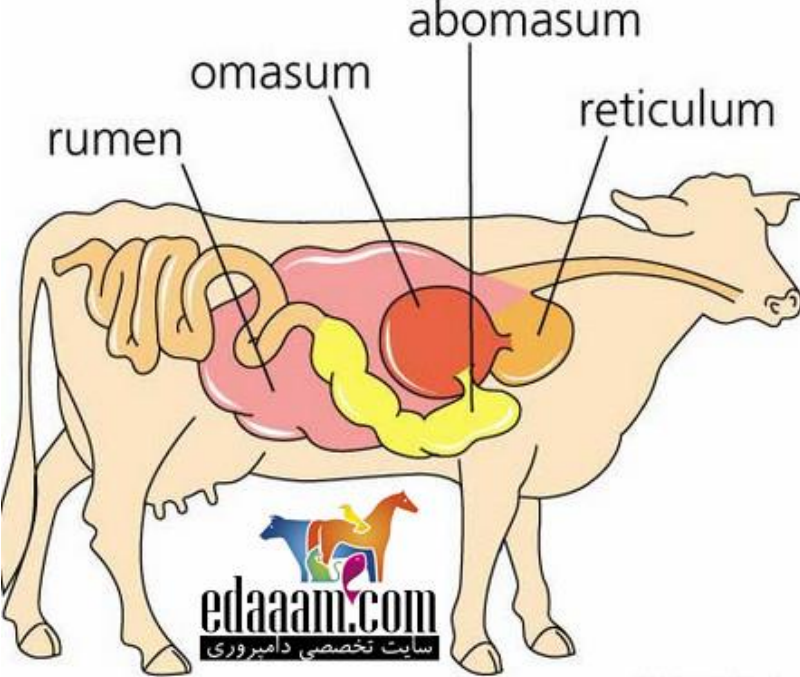
■ گرچه میسل‌های کازئین نسبتاً مقاوم است اما چهار عامل اصلی زیر موجب Aggregation آنها می‌شوند.

■ ۱- آنزیم کیموزین یا رنت در صنعت پنیر سازی

■ ۲- اسید

■ ۳- حرارت

■ ۴- ژلاسیون حاصل از کهنگی



پستاندارانی مانند گاو، بز، گوسفند، آهو و غزال از جمله نشخوارکنندگان هستند. این جانوران پستاندارانی با معده چهار قسمتی که در آن مواد گیاهی به کمک باکتری ها به پروتئین و چربی هایی تبدیل می شود که حیوان قادر به گوارش آنهاست.





One stomach bag can be used for cheese production for the whole year.

Production of natural rennet

- Rennet is extracted from the inner mucosa of the fourth stomach chamber (the abomasum) of young, unweaned ruminant mammals. If rennet is extracted from older animals (grass-fed or grain-fed), the rennet contains less or no chymosin, but a high level of pepsin and can only be used for special types of milk and cheeses.
- As each ruminant produces a special kind of rennet to digest the milk of its own species, milk-specific rennets are available, such as kid goat rennet for goat's milk and lamb rennet for sheep's milk.

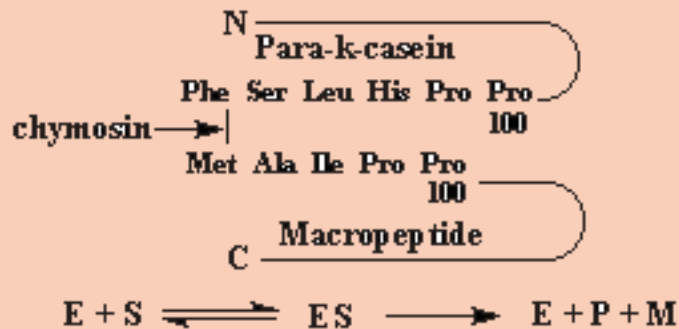
Traditional method

Dried and cleaned stomachs of young unweaned ruminant mammals are sliced into small pieces and then put into salt water or whey, together with some vinegar or wine to lower the pH of the solution. After some time (overnight or several days), the solution is filtered. The crude rennet that remains in the filtered solution can then be used to coagulate milk. About 1 g of this solution can normally coagulate 2 to 4 L of milk.

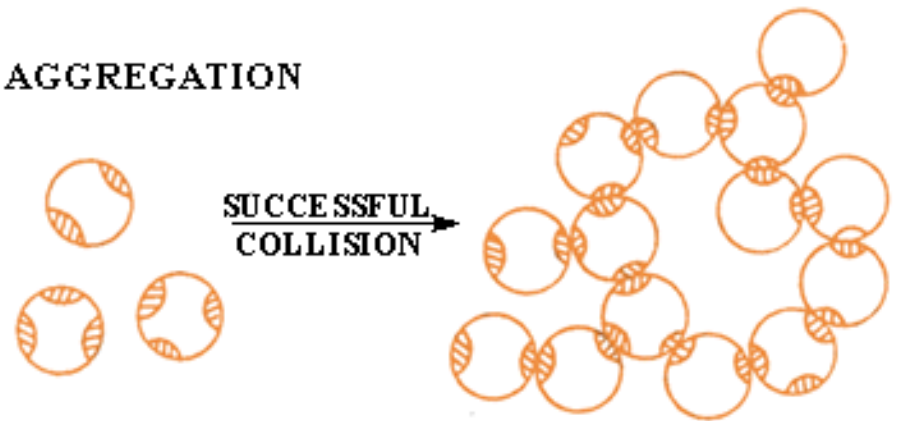
کوآگولاسیون Coagulation آنزیمی:

- primary stage, rennet cleaves the **Phe(105)-Met(106)** linkage of kappa-casein resulting in the formation of the **soluble CMP** which diffuses away from the micelle and **para-kappa Casein**
- secondary stage, the micelles aggregate
- tertiary stage of coagulation involves the rearrangement of micelles after a gel has formed

PROTEOLYSIS



AGGREGATION



کوآگولاسیون اسیدی :

■ کاهش بار الکتریکی تا نقطه ایزوالکتریک

■ با افزایش اسیدیته محیط ، حلالیت املاح زیاد شده بنابراین کلسیم و فسفر آلی از میسلها خارج می شوند و بتدریج در فاز آبی حل می شوند.

■ مولکولهای کازئین از هم پاشیده شده و رسوب می کنند . توده ای شدن در این روش بدلیل از بین رفتن شکل و کیفیت ظاهری مولکول پروتئین است.

- pH طبیعی شیر بین ۶.۶ تا ۶.۸ است که پروتئین کازئین در این pH حالت پایداری در برابر ترسیب دارد اما با کاهش pH رسیدن به نقطه ایزوالکتریک، اندازه ذرات بزرگ تر می شود، کلسیم از کمپلکس کازئین جدا شده و میسل کازئین ناپایدار می شود در این حالت کازئینات به شکل سدیم کازئینات رسوب می نماید.

- اما با ادامه مرحله کاهش pH کازئینات ها مجدد با آب گیری محلول می شوند و اندازه ذرات کوچک شده و کازئینات ها به طور نسبی محلول می گردند. میسل ها مجددا پایدار شده و در این حال محلول کازئین به شکل نمکش بخصوص کازئین کلراید در می آید.

- در صورتی مجدد به این شیر دارای pH کاملاً اسیدی، قلیا اضافه شود پروتئین کازئین با جذب آب و افزایش اندازه ذرات ناپایدار شده بطوریکه پس از رسیدن به نقطه ایزوالکتریک مانند مرحله قبل به کمترین حلالیت خود رسیده و رسوب می نماید.

- افزایش بیشتر pH، مجدد موجب آبگیری پروتئین، کاهش اندازه ذرات میسل های کازئینی و پایدار شدن آنها می شود.

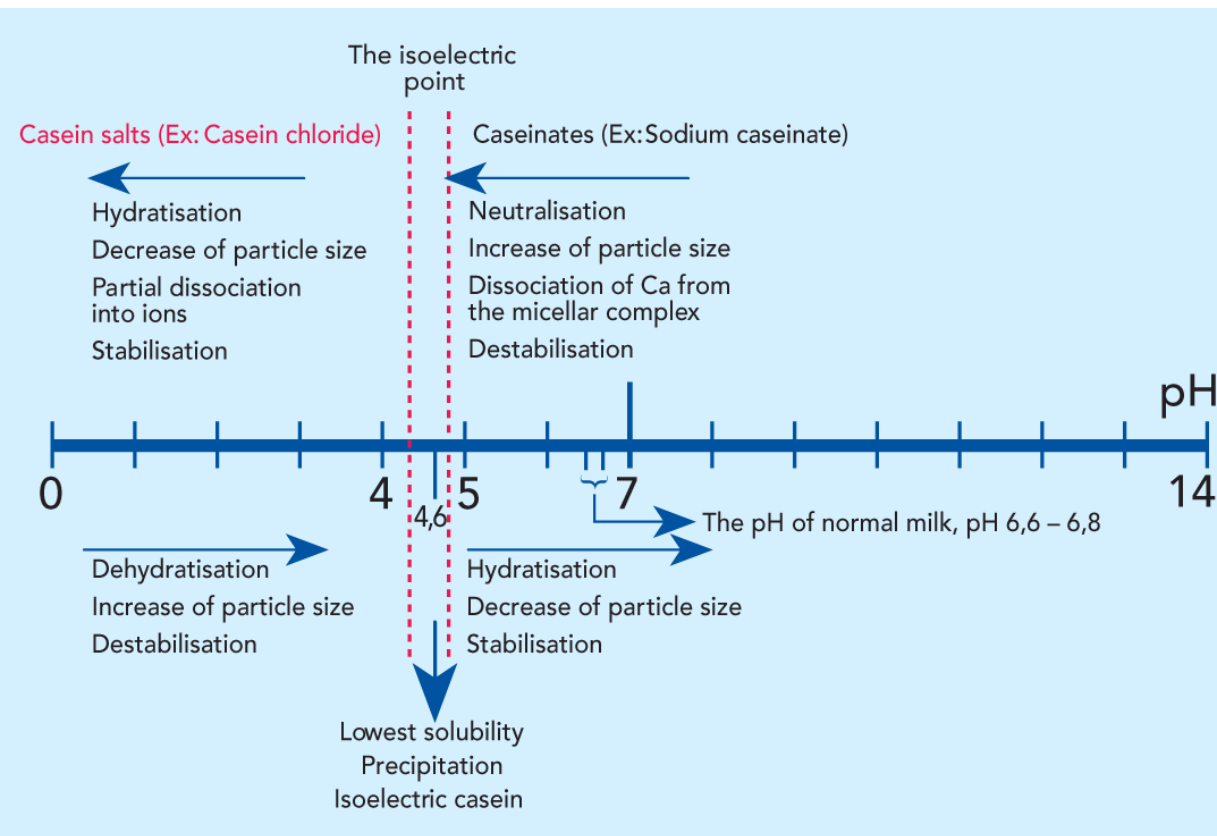


Fig 2.33 Three simplified stages of influence on casein by an acid and alkali respectively.

■ با کاهش pH و رسیدن به نقطه ایزوالکتریک، اولاً هیدروکسی فسفات کلسیم کلونیدی موجود در میسل کازئین، حل می شود و کلسیم یونیزه را تشکیل می دهد که به ساختار میسل نفوذ کرده و پیوندهای کلسیمی داخلی قوی ایجاد می کند. ثانیاً pH محلول به نقاط ایزوالکتریک هر گونه کازئین نزدیک می شود. هر دو روش عمل باعث ایجاد تغییر در میسل ها می شود که با رشد میسل ها از طریق تجمع شروع می شود و با تشکیل یک دلمه کم و بیش متراکم خاتمه می یابد.

■ مقدار عملی pH برای رسوب کازئین شیر 4.6 pH است.

■ اگر مقدار زیادی هیدروکسید سدیم به کازئین ایزوالکتریک رسوب داده شده اضافه شود، کازئین حل شده مجدداً به کازئینات سدیم تبدیل می شود که تا حدی به یون تجزیه می شود.

■ pH محصولات شیری کشت شده معمولاً در محدوده ۳/۹ تا ۴/۵ است که در سمت اسیدی نقاط ایزوالکتریک است.

■ برای تولید کازئین از شیر بدون چربی با افزودن اسید سولفوریک یا هیدروکلریک، در pH اغلب ۴/۶ استفاده می شود.

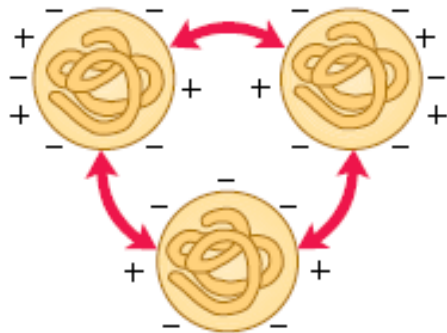


Fig 2.25 A protein molecule at pH 6.6 has a net negative charge.

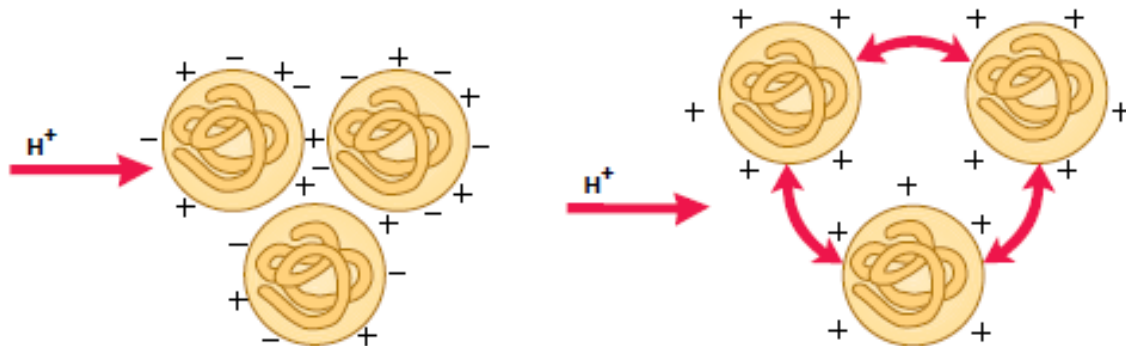


Fig 2.26 Protein molecules at pH \approx 4.7, the isoelectric point.

Fig 2.27 Protein molecules at pH \approx 1

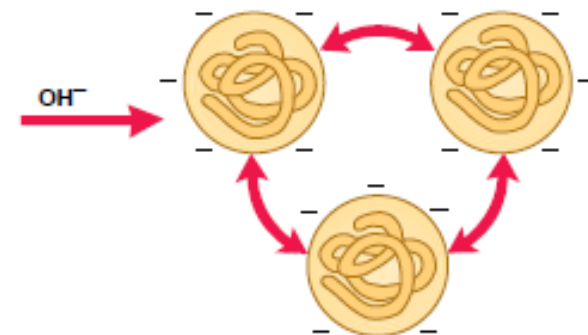


Fig 2.28 Protein molecules at pH \approx 14

حرارت :

■ در دمای بالای نقطه جوش، میسل‌های کازئین بطور برگشت ناپذیری متراکم و توده ای خواهد شد.

■ حرارت دادن موجب تغییر در ظرفیت بافری املاح شیر خواهد شد،

■ دی اکسید کربن آزاد می شود،

■ اسید های آلی تولید می شوند،

■ تری کلسیم فسفات و کازئین فسفات ممکن است با آزاد شدن یون های هیدروژن رسوب کنند.

■ میسل‌ها تحت تأثیر دمای پایین قرار می‌گیرند، که در آن زنجیره‌های بتا کازئین شروع به جدا شدن می‌کنند و CCP از ساختار میسل، جایی که به شکل کلونیدی وجود داشت، خارج می‌شود و به محلول می‌رود. توضیح این پدیده این است که β -کازئین آبگریزترین کازئین است و با کاهش دما، برهمکنش های آبگریز ضعیف می شود. به نظر می رسد که میسل ها متلاشی می شوند و حجم میسل های کازئین افزایش می یابد این به دلیل (۱) خروج بتا کازئین است که دارای خاصیت آبگریزی بالاتر از سایر کازئینها است (۲) به دلیل خروج نانو خوشه های فسفات کلسیمی یا همان CCP است که باعث جذب ضعیف‌تر بین مولکول‌های کازئین می شود، موجب افزایش فضاهای خالی در میسل کازئین و افزایش آب در آن می‌شود که در نتیجه حجم افزایش می یابد. این تغییرات باعث می شود شیر برای تهیه پنیر کمتر مناسب باشد در نتیجه آنها منجر به طولانی تر شدن زمان تولید پنیر و تشکیل دلمه نرم تر می شوند.

■ سپس بتا کازئین نیز پس از خروج از میسل به راحتی توسط پروتئازهای مختلف در شیر هیدرولیز می شود. هیدرولیز - β کازئین به - γ کازئین و پروتئوز پپتون ها به معنای بازده کمتر در تولیداز پنیر است زیرا بخش های پروتئوز - پپتون در آب پنیر از بین می روند. تجزیه بتا کازئین همچنین ممکن است منجر به تشکیل پپتیدهای تلخ شود که باعث ایجاد مشکلات بی‌طعم در محصولات لبنی می‌شود.

ژلاسیون در اثر ماندن

■ پدیده ای که در حین نگهداری برخی از فراورده های استریل (مانند شیرهای تغلیظ شده و UHT) بروز می کند.

■ بعد از هفته ها یا ماه ها نگهداری این فراورده ها تغییری ناگهانی در ویسکوزیته همراه با ژل شدن قابل مشاهده و توده ای شدن برگشت ناپذیر در کازئین می شود. در این حالت میسل های کازئین به صورت زنجیرهای بلندی یک شبکه سه بعدی را تشکیل می دهد.

■ مکانیسم واقعی هنوز مشخص نشده است اما تئوری هایی ارائه شده است :

۱- تجزیه پروتئولیتیکی کازئین : بوسیله آنزیم های طبیعی (پلاسمین) یا باکتریایی که به حرارت مقاومند

۲- پلی مریزاسیون کازئین ها و وی پروتئین ها بعلت واکنشهای از نوع مایلارد یا دیگر واکنش های شیمیایی

۳- تشکیل کمپلکس کاپاکازئین- بتا- لاکتوگلوبولین

چرا کازئین ها مقاوم به دمای بالا هستند؟

۱- نبود ساختار سوم و چهارم منظم

- پروتئین های سرمی مثل- β لاکتوگلوبولین (دارای ساختار سوم) پایدار هستند که توسط پیوندهای هیدروژنی و پیوندهای دی سولفیدی نگه داشته می شود.
- حرارت باعث شکستن این پیوندها و دناتوراسیون سریع می شود.

- کازئین ها برعکس، ساختار مرتب و فشرده ندارند لذا به شکل random coil یا ساختارهای باز و انعطاف پذیر هستند. بنابراین چیزی برای "باز شدن" یا از دست رفتن پیکربندی وجود ندارد → در برابر حرارت پایدارترند.

۲- وجود مقدار زیاد پرولین

- کازئین ها غنی از پرولین هستند.
- پرولین باعث ایجاد شکستگی در زنجیره و جلوگیری از تشکیل ساختار- α هلیکس یا- β شیت پایدار می شود.
- این ویژگی جلوی تشکیل تاخوردگی های حساس به حرارت را می گیرد.

۳- فقدان پیوند دی سولفیدی

- در پروتئین های آب پنیر، پیوندهای دی سولفیدی (S-S) زیاد وجود دارد.
- گرما این پیوندها را می شکند و باعث تجمع (aggregation) می شود.
- کازئین ها تقریباً پیوند دی سولفیدی ندارند → یکی از دلایل پایداری حرارتی آنها

۴- وجود میسل کازئین

- کازئین ها در شیر به صورت میسل همراه با فسفات کلسیم کلونیدی (CCP) سازمان یافته اند.
- این ساختار کلونیدی پایداری فیزیکی ایجاد می کند و مانع دناتوراسیون حرارتی می شود.
- در واقع، گرما نمی تواند پیوندهای ضعیف و دینامیک موجود در میسل را مثل پیوندهای منظم در پروتئین های سرمی تخریب کند.

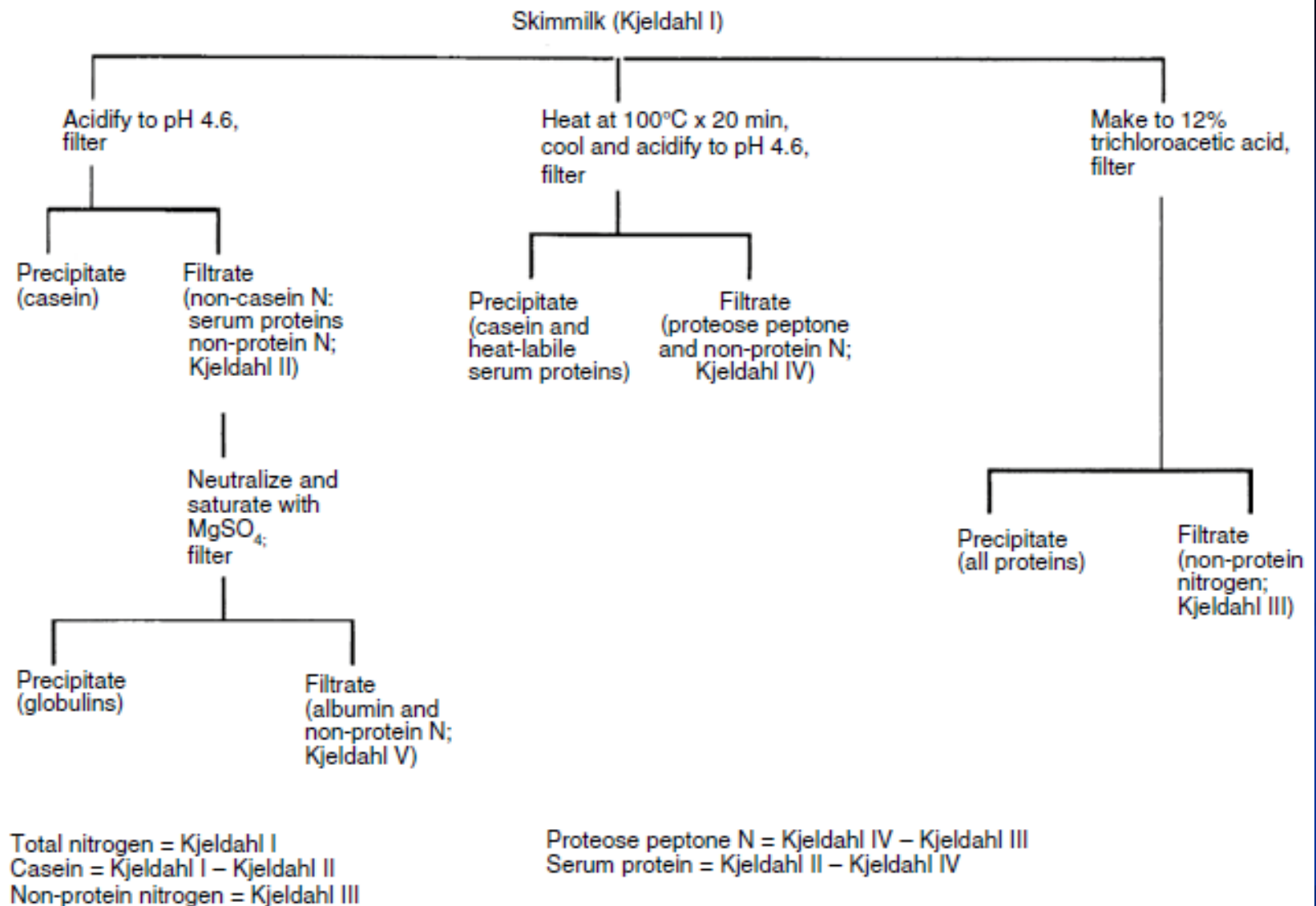


Fig. 4.4 Scheme for quantifying the principal protein fractions in milk