

Whey Proteins

β- لاكتوگلوبولین، α - لاكت آلبومین، BSA، پروتئوز پپتون،
ایمونوگلوبولین ها

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

خصوصیات:

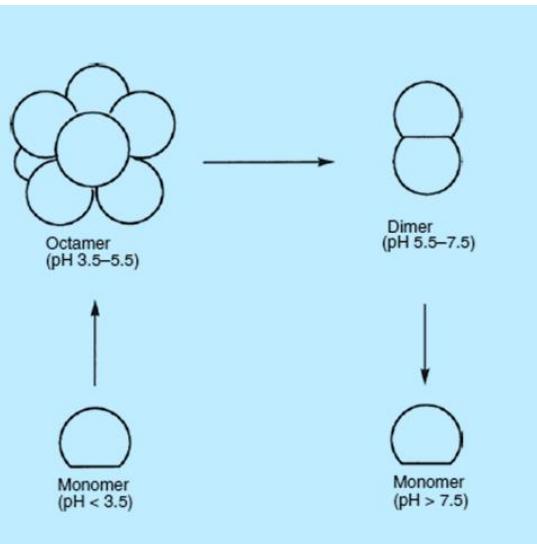
- پروتئین هایی که پس از رسوب شیر در $pH = 4.6$ در سوپرنا坦 (Supernatant) باقی می مانند.
- نسبت به کازئین ها حساسیت بیشتری به حرارت دارد و حلالت بیشتر در آب.
- خواص ژل کنندگی و کف کنندگی خوبی دارند که به آنها خواص عملکردی (Functional Properties) گفته می شود.
- پروتئین هایی کروی - فشرده (Compact globular)
- اکثر استخلاف های آب گریز در داخل مولکول محبوس شده است. لذا در حالت طبیعی با دیگر پروتئین ها وارد واکنش نمی شوند و قادر به تشکیل توده ای قوی و متراکم نیستند.
- بنابراین، تا زمانی که وی پروتئین ها با حرارت دناتوره نشوند، آنها در نقاط ایزووالکتریک خودشان نیز رسوب نمی کنند.

β -Lactoglobulin

دارای ۸ نوع مختلف ژنی است

حدود ۵۰٪ از پروتئین های آب پنیر یا ۱۰٪ از کل پروتئین ها

در $pH = 5.5 - 7.5$ به صورت دایمر و از نظر هندسی به صورت دو دایره متصل به هم می باشند



در $pH = 3.5 - 5.5$ دایمرها به هم دیگر بیشتر می پیوندند و تشکیل اکاتمر (octamer) می دهند.

در $pH < 3.5$ و $pH > 7.5$ به صورت منومر

۵ گروه سولفیدی دارد که ۴ گروه آن باند شده و یک گروه آزاد اما در داخل مولکول است

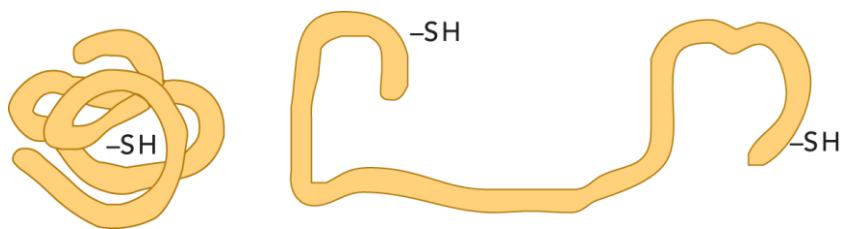


Fig. 2.36 : Part of a whey protein in native (left) and denatured state.

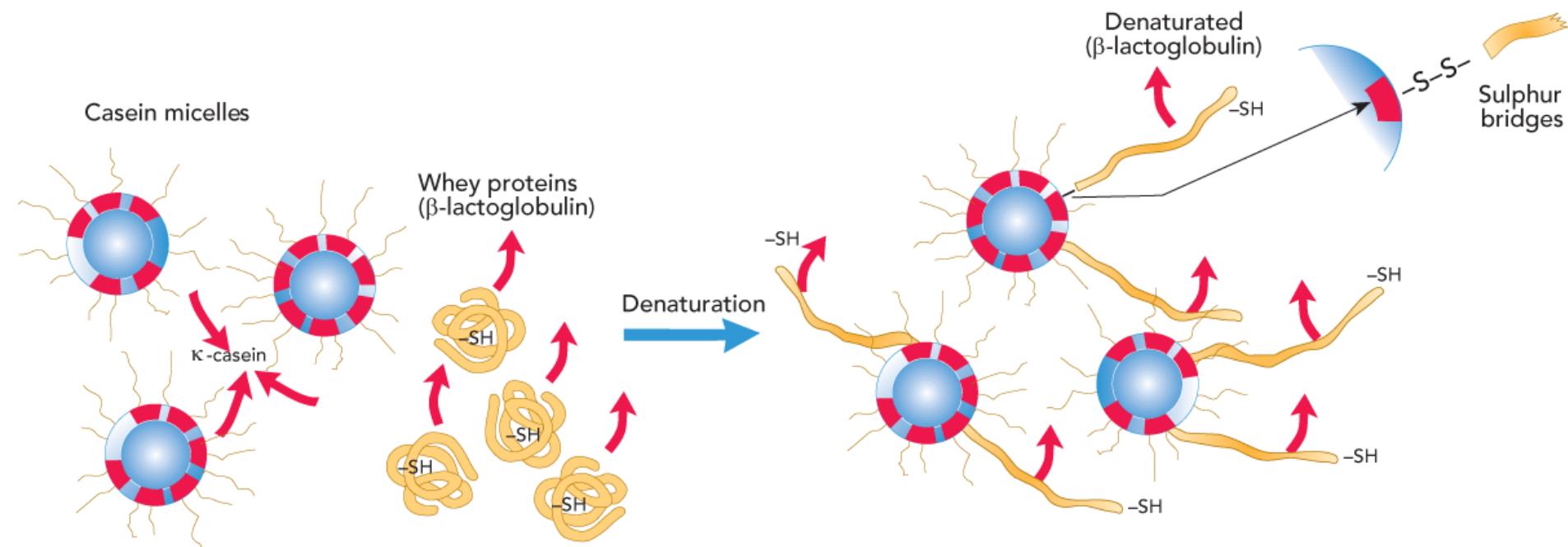


Fig. 2.45 : During denaturation κ -casein adheres to β -lactoglobulin.

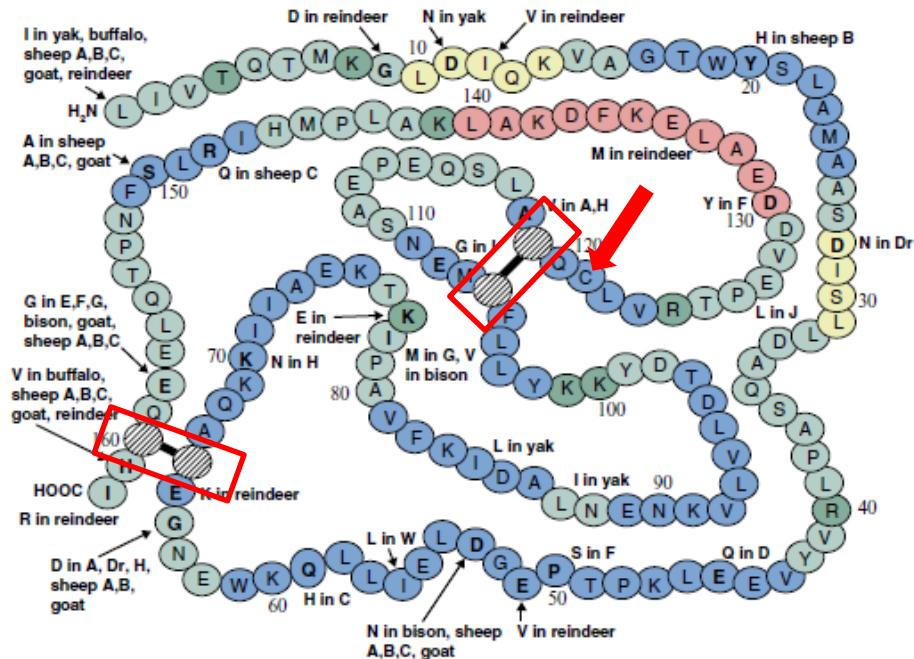


Fig. 4.24 Amino acid sequence variation within ruminant β -lactoglobulins relative to bovine genetic variant B (from Sawyer 2013)

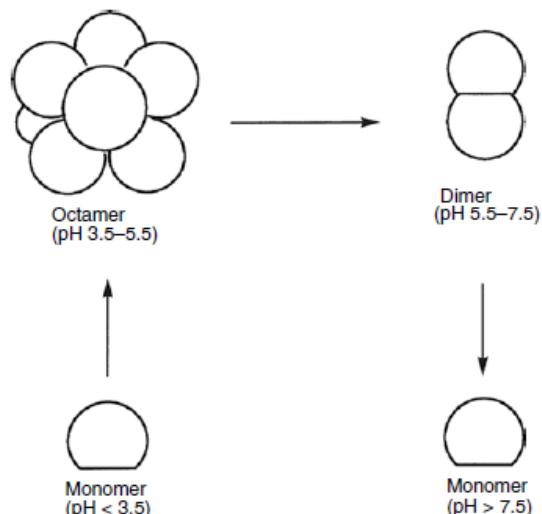


Fig. 4.27 Effect of pH on the quaternary structure of β -lactoglobulin

- Amino Acid Composition of β -lg
- The amino acid composition of some β -lg variants is shown in Fig 4.24.
- It is rich in sulphur-containing amino acids which give it a high biological value of 110.
- It contains 2 mol of cystine and 1 mol of cysteine per monomer of 18 kDa.
- The cysteine is especially important since it reacts, following heat denaturation, with the disulphide of α -casein and significantly affects rennet coagulation and the heat stability properties of milk;
- it is also responsible for the cooked flavour of heated milk.
- Some β -lgs, e.g. porcine, do not contain a free sulphydryl group.
- The isoionic point of bovine β -lg is \sim pH 5.2

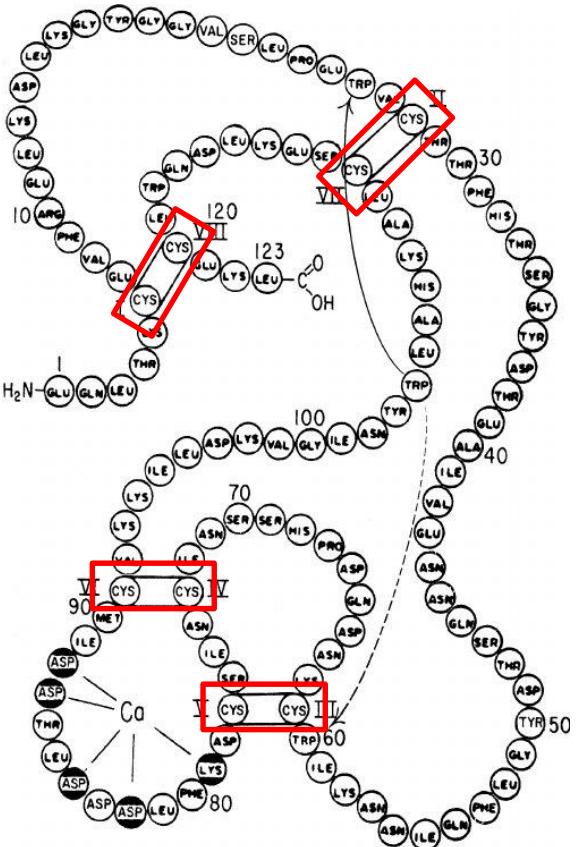
دناوره شدن بتا لاکتو گلوبولین

■ تشکیل پل های گوگردی داخلی مولکول های β -لاکتو گلوبولین:

- بین یک مولکول β -لاکتو گلوبولین و یک مولکول - α -کازئین
- بین β -لاکتو گلوبولین و α -لاکتالبومین شروع به تشکیل می کنند.

■ در دماهای بالا ترکیبات گوگردی مانند سولفید هیدروژن به تدریج آزاد می شوند. این ترکیبات گوگردی مسئول طعم "پخته" شیر تیمار شده با حرارت هستند.

α-لکت آلبومین



■ **α- لکت آلبومین (α -La) حدود ۲۰٪ از پروتئین های آب پنیر و حدود ۴٪ از کل پروتئین شیر را تشکیل می دهد**

■ **α -La پروتئینی با وزن مولکول کم (۱۴۰۰۰ دالتون) می باشد. در بین پروتئین های آب پنیر از همه کوچکتر است.**

■ **نقطه ایزوکتریکش حدود ۴.۸ است برخلاف نامش یک آلبومین حقیقی نیست و دارای ساختمانی مشابه آلبومین لیزوزیم و به صورت کروی کاملًا فشرده است.**

■ **این مولکول مقاومت حرارتی بیشتری نسبت به β -لکتوگلوبولین دارد.**

■ **۸ گروه سیستئین دارد که همه آنها در باندهای دی سولفیدی داخلی درگیرند و باند آزاد ندارند. به دلیل وجود این اسید های آمینه دارای ارزش بیولوژی بالایی می باشند.**

α-لاکت آلبومین

■ -La α یکی از دو پروتئین تشکیل دهنده آنزیم مولد لاکتوز (لاکتوز سنتتاز) می باشد.

■ α-لاکت آلبومین به تنها یی هیچ نقشی در فعل و انفعالات شیمیایی ندارد بلکه به عنوان یک تسريع کننده هماهنگ با آنزیم گالاکتوزیل ترانسفراز عمل می کند

■ α-لاکت آلبومین در شیر تمام گونه هایی که عمدہ ترین قند آنها لاکتوز است مشاهده شده است بر اساس مقایسه ای بر روی نمونه های شیر پستانداران مختلف مشخص شده است مقدار - α لاکت آلبولین به میزان لاکتوز بستگی دارد

■ از جمله شیر انسان و شیر اسب که از جمله شیر های آلبومینی است بترتیب دارای ۱۷٪ و ۱۶.۷٪ - α لاکت آلبولین از کل پروتئین است (در حالیکه در شیر گاو حدود ۰.۴٪ است) و میزان لاکتوز بالایی نیز دارد.

1 Arg (Variant B)
H. Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe- -Glu-Leu-Lys-Asp-Leu-Lys-Gly-Tyr-Gly-Gly-
Gln (Variant A)

21 Val-Ser-Leu-Pro-Glu-Trp-Val-Cys-Thr-Thr-Phe-His-Thr-Ser-Gly-Tyr-Asp-Thr-Glu-Ala-

41 Ile-Val-Gln-Asn-Asn-Asp-Ser-Thr-Glu-Tyr-Glu-Leu-Phe-Gln-Ile-Asn-Asn-Lys-Ile-Try-

61 Cys-Lys-Asp-Asp-Gln-Asn-Pro-His-Ser-Ser-Asn-Ile-Cys-Asn-Ser-Cys-Asp-Lys-Phe-

81 Leu-Asp-Asp-Asp-Leu-Thr-Asp-Asp-Ile-Met-Cys-Val-Lys-Lys-Ile-Leu-Asp-Lys-Val-Gly-

101 Ile-Asn-Tyr-Trp-Leu-Ala-His-Lys-Ala-Leu-Cys-Ser-Glu-Lys-Leu-Asp-Gln-Trp-Leu-Cys-

121 123
Glu-Lys-Leu. OH

Fig. 4.28 Amino acid sequence of α -lactalbumin showing intramolecular disulphide bonds (dashed lines) and amino acid substitutions in genetic polymorphs (from Brew and Grobler 1992)

سرم آلبومین Serum Albumin

- پروتئینی که از سرم خون وارد شیر می شود و گفته می شود.
- شیر گاو حاوی حدود ۴۰ گرم در هر لیتر (۱-۲ درصد) و شیر انسان هم تقریباً حاوی همین مقدار است. حدود ۱۰٪ پروتئین آب پنیر را تشکیل می دهد.
- مقدار BSA خون حدود 50 درصد پروتئین های خون گاو را تشکیل می دهند. محل ورود این پروتئین ها از طریق اتصالات بین سلولی است.
- به علت توانایی BSA در اتصال به اسیدهای چرب، ممکن است در انتقال و فراهم سازی آنها پس از لیپولیز نقش داشته باشد

ایمونو گلوبولین ها Immunoglobulins

- کلسترول گاوی حاوی بیش از ۱۰۰ g/100g ایمونو گلوبولین است اما مقدار آن در عرض یک هفته پس از زایمان به ۱ گرم در لیتر کاهش می یابد.
- دو روز پس از زایمان مقدار آن در شیر انسان حدود ۱۰ گرم در لیتر است که بعد از دو هفته به ۲ گرم در لیتر کاهش می یابد و پس از آن تقریباً در همین حد ثابت می ماند
- وظیفه اصلی Ig ها در شیر ایجاد مصونیت برای نوزادان است. ایمونو گلوبولین ها آنتی بادی هایی هستند که در پاسخ به تحریک توسط آنتی ژن های خاص سنتز می شوند. آنها به طور خاص در خون حضور دارند.
- ایمونو گلوبین ها به چند دسته تقسیم می شوند IgG (شامل زیر گروه های IgG1, IgG2, IgG3, IgA)

کرايو - آگلوتیناسیون Cryo - agglutination

ایمونوگلوبولین ها آنتی بادی هستند که در پاسخ به تحریک توسط آنتی ژن های خاص سنتز می شوند. آنها به طور خاص در خون حضور دارند.

آنها همچنین می توانند علیه "ذرات" مانند باکتری ها، ویروس ها و حتی گلبول های چربی عمل کنند و با آنها وارد واکنشی به نام آگلوتیناسیون شوند

به این ترتیب، باکتری ها نیز می توانند بر روی گلبول های چربی لخته شوند و در لایه چربی تجمع یابند. هنگامی که میکروارگانیسم ها لخته می شوند، رشد و عمل آنها را می توان به طور قابل توجهی مهار کرد.

واکنش آگلوتیناسیون با توجه به نوع آنتی ژن به طور اختصاصی تشکیل می شود .

با همه این وجود، برخی از آگلوتینات ها غیر اختصاصی هستند، به خصوص در مورد کرايو - آگلوتیناسیون که در شیر سرد در دمای کمتر از ۳۷ درجه سانتی گراد اتفاق می افتد. پروتئین های مربوط به این واکنش Cryoglobulins یا آگلوتنین ها نامیده می شوند.

Agglutinins ها با بکارگیری دمای بالا غیر فعال می شود و توانایی آنها در فلوكه کردن ذرات از بین می رود و به همین دلیل، آگلوتیناسیون در شیر پاستوریزه رخ نمی دهد.

ایمونوگلوبولین ها

Immunoglobulins

از Ig های اصلی در شیر گاو و کلستروم است که بترتیب ۸۰ و ۷۳٪ کل IgG1 را تشکیل می دهد در مقابل مقدار آن در سرم **خون حدود ۵۰٪ است** و بنظر می رسد ایمونو گلوبولین ها بطور انتخابی از سرم خون به شیر انتقال می یابد.

از مهمترین ایمنوگلوبولین های موجود در شیر انسان است بنابراین یکی از زمینه های اصلی در جهت غنی سازی شیر گاو وارد کردن IgA در فراورده های غذائی است که برای نوزادان تهیه می شود.

ایمونوگلوبولین ها **دارای ۴ زنجیره پلی پیتیدی** می باشند که ۲ تا سنگین (Heavy) و دو تا سبک (L-light) که با پلهای دی سولفیدی به هم متصلند. تغییر در ویژگیهای زنجیره های سنگین تعیین کننده انواع Ig ها است.

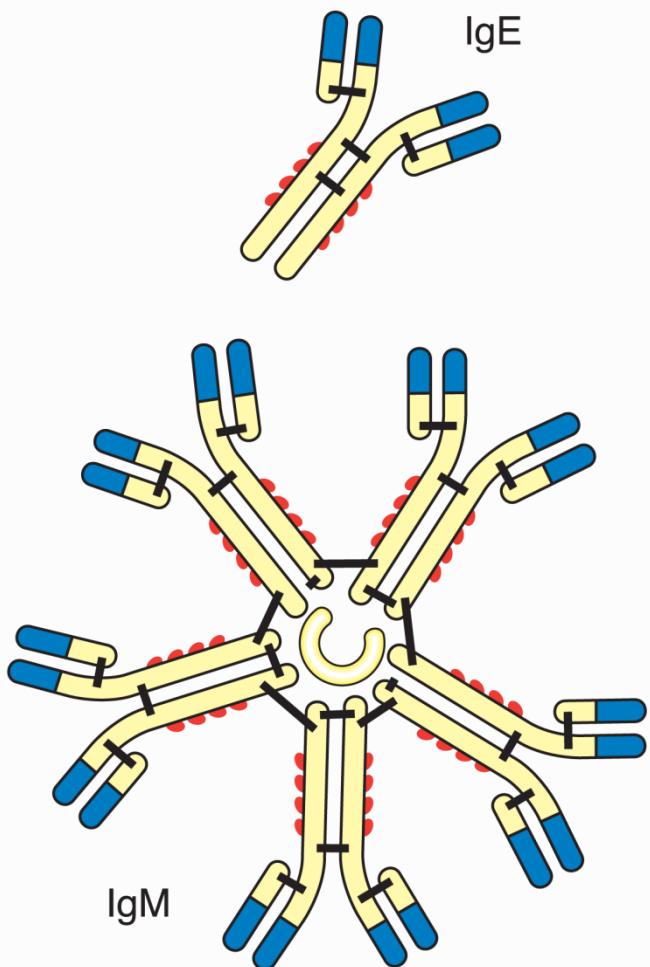


Fig 2.34

Schematic shape of two immunoglobulins. Ref. P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, *Dairy Chemistry and Biochemistry*, 1998.

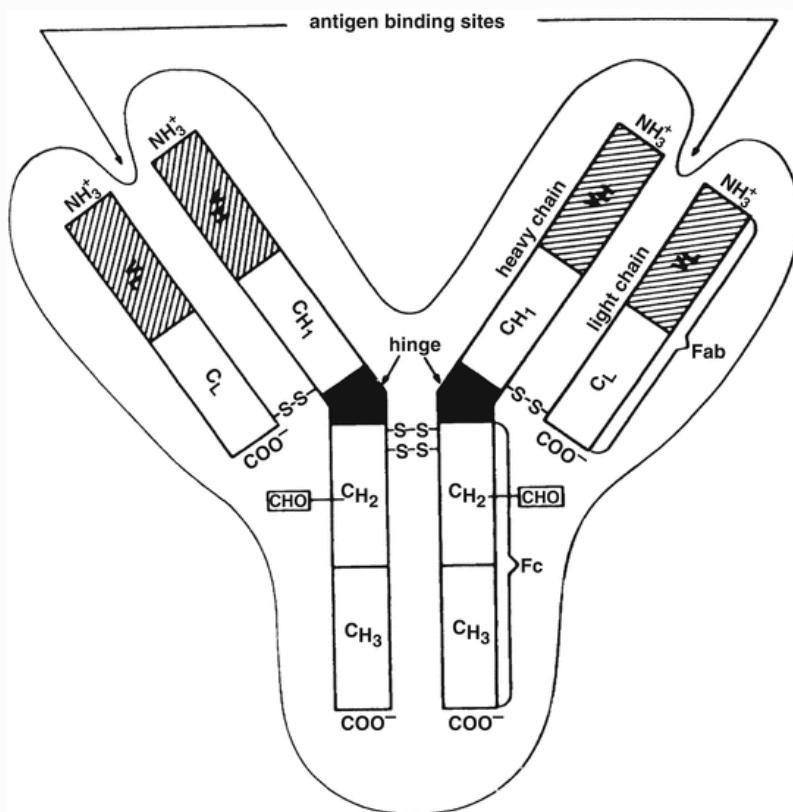


Fig. 4.32 Model of the basic 7S immunoglobulin (Ig) molecule showing two heavy and two light chains joined by disulphide bonds: V variable region, C constant region; L light chain, H heavy chain, 1, 2 and 3 subscripts refer to the three constant regions of the heavy chains, CHO carbohydrate groups, Fab refers to the (top) antigen-specific portion of the Ig molecule, Fc refers to the cell-binding effector portion of the Ig molecule (from Larson 1992)

- در آینده، بسیاری از مواد مهم، احتمالاً در مقیاس تجاری از سرم شیر یا پنیر جدا می شوند.
- مواد دارای قابلیت‌های استفاده ویژه‌ای در صنایع دارویی و مواد غذایی هستند و اکنون از طریق فرآیند تجاری از آب پنیر جدا شده‌اند.
- لاكتوفرین همچنین مهار کننده باکتری‌ها از جمله *B. stearothermophilus* و *B. subtilis* است. مهار ناشی از حذف آهن از سرم آنها است.

پروتئین‌پیتون

- پروتئینی است که در اثر پروتولیز β-کازئین ها ایجاد می‌شوند.
- این جزء با حرارت دادن شیر در دمای ۹۰°C تا ۱۰۰°C به مدت ۲۰ دقیقه و کاهش pH تا ۴,۶ رسوب نمی‌نماید ولی در مجاورت محلول ۱۲٪ اسید تری کلرواستیک ته نشین می‌شود.
- پروتئوز پیتون خود از چهار ترکیب اصلی تشکیل شده است: PP3، PP5، PP8 کند، PP8 سریع ()
- PP3 بزرگترین این اجزاء بوده و گلیکوپروتئینی است که منحصراً از سرم شیر جدا می‌شود.
- PP5 و PP8 - سریع قسمتهاي N - انتهايی بتا کازئین می‌باشد که در اثر پروتولیز درون مولکولی حاصل می‌گردد.
- PP8 سریع → پیتیدی است که در الکتروفورز سریع‌تر حرکت می‌کند.
- PP8 کند → همان نوع پیتید است اما با بار یا اندازه متفاوت، و بنابراین کندتر حرکت می‌کند.

پروتئین های باند کننده فلزات

- ترانسفرین ها گروهی از پروتئین های باند کننده آهن که شاخص ترین آنها عبارتند از:
سروترانسفرین { در پلاسمای خون و مایعات خارج سلولی(اشک و بزاق و عرق و...) موجود است} لاكتوترانسفرین (در شیر، اشک، گویچه های سفید خون موجود است) اووترانسفرین (کن آلبومین موجود در تخ مرغ)
- لاكتوترانسفرین کلستروم و شیر گاو پر ترتیب حدود ۱ و ۰/۰۲ تا ۳۵/۰ میلی گرم در میلی لیتر است.
- دو نقش برای این پروتئین در نظر می گیرند: جذب آهن و دیگری محافظت در برابر عوامل آلوده کننده روده ای در نوزادان
- مقدار این ترکیب در شیر و کلستروم انسان به ترتیب ۲ تا ۴ و ۶ تا ۸ میلی گرم در هر میلی لیتر است.

پروتئین های دیگر:

- پروتئوز پپتون ۳، (pp3) - پک فسفوگلیکوپروتئین مقاوم به حرارت، ابتدا در بخش پروتئوز پپتونها شناسایی شد اما اکنون مشخص شده که از فراورده های ژنی است.
- دارای ۱۳۵ اسید آمینه، ۵ جایگاه فسفوریلاسیون و ۳ محل گلیکوزیلاسیون است تغییر نام آن به لاكتوفورین یا لاكتوگلیکوفورین پیشنهاد شده است. lactophorin یا lactoglycophorin
- دارای خاصیت امولسیون کنندگی و کف زایی خیلی خوبی می باشد. بدلیل اینکه از تماس لیپاز با سوبسترا جلوگیری می کند لذا از لیپولیز خودبخود جلوگیری می کند.
- فعالیت بیولوژیکی آن بخوبی شناخته نشده است اما بنظر موجب تقویت رشد بیفیدوباکتریوم ها و باند کردن یون کلسیم از طریق N- انتهایی فسفوریله مولکول می شود.
- β - میکروگلوبولین (β m - β ۲- ۲) - Microglobulin از نظر ساختاری شبیه ایمونوگلوبولین - از نظر تکنولوژیکی اهمیتی در شیر ندارد.

پروتئین های دیگر

سایر گلیکوپروتئین ها

- برخی از گلیکوپروتئین ها به گروهی از گلیکوپروتئین های شدیداً اسیدی تعلق دارند که به گلیکوپروتئین های M-1 معروفند. متوسط وزن مولکولی آنها حدود ۱۰۰۰۰ دالتون است.
- آنها (M-1) دارای لاکتوز، گلوکزآمین، گالاكتوز آمین، سیالیک اسید و دیگر قندها بوده و موجب تقویت رشد بیفیوباکتریوم ها می شوند. احتمالاً به دلیل قند های آمینی است.
- ❖ یکی از M-1-گلیکوپروتئین ها α -اوروسموکونید (Orosomucoid) در کلسترول است. تصور می شود سیستم ایمنی بدن را تقویت می کند و در بعضی از شرایط (وجود التهاب، غدد و حاملگی دام) مقدار آن در خون زیاد می شود.
- ❖ پروسایوسین (Prosaposin) نیز یکی دیگر از M-1-گلیکوپروتئین ها است که در شیر وجود دارد موجب تقویت، ترمیم و حفظ سیستم عصبی در بدن می شوند.

NPN - Non protein nitrogen

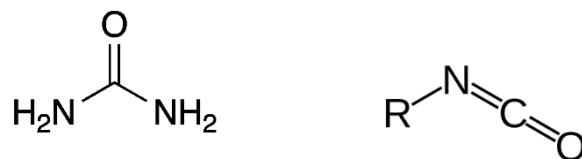
■ %۲۰ کل نیتروژن های شیر را در برمی گیرد. %۵ نیتروژن شیر مادر

اوره- باعث افزایش مقاومت حرارتی پروتئین های شیر می شود زیرا اعمال حرارت موجب تشکیل ایزو تیوسیانات از اوره شده که قدرت واکنش خوبی با گروهها سولفیدریل آزاد کاپا کازئین دارد

لذا در صورت دناتوره شدن بتالاکتوگلوبولین این ترکیب دیگر قادر به اتصال به کاپا کازئین نیست
لذا از این حیث اوره موجب افزایش مقاومت حرارتی می شود. دارند.

■ اسید های آمینه آزاد - موجب تقویت رشد باکتری ها (استارترها)

■ حداکثر مقدار ازت های غیر پروتئینی در ماههای اول شیر دهی است. در صنایع لبنی حائز اهمیت نبوده و از دسترس خارج می شوند.



Principal non protein nitrogenous compounds in milk

Constituent	Concentration (mg N/kg milk)
Urea	84-280
Cratine	6-25
Cratinine	2-12
Uric acid	5-8
Orotic acid	12-15
Hippuric acid	4
Peptides	32
Ammonia	3-14
Amino acid	29-51

اثر حرارت روی پروتئین های شیر

- بالا رفتن حرارت موجب کاهش حلایت املاح کلسیم (کاهش کلسیم یونی) و افزایش کلسیم کلوئیدی می شود. افزایش کلسیم کلوئیدی نیز موجب افزایش پلهای کلسیم - فسفات درنتیجه بزرگتر شدن میسلها می گردد.
- کاهش دما بخصوص در زیر ۵ درجه سانتیگراد موجب حل شدن میسلها بخصوص β -کازئین می شود بالا رفتن دما موجب برگشت کازئین ها به میسل می شود. بطوریکه وقتی دما به 37°C می رسد $90\%-80\%$ کازئین ها بر می گردند.
- دناتوره شدن بتا- لاکتوگلوبولین موجب می شود تا با باند دی سولفیدی با Hg -کازئین وارد واکنش شود درنتیجه منجر به : ۱) افزایش استحکام پروتئین ها در محصولات تغییظ شده شیر شود ۲) اختلال در فرایند تولید پنیر و کاهش بازدهی می شود. بدلیل پوشیده شدن محل اثر آنزیم با باند دی سولفیدی.
- ادامه حرارت در دماهای بالاتر از 100°C موجب پروتولیز پروتئین، تشکیل لایزینو-آلانین، قهوه ای شدن مایلارد و تشکیل ژل است.
- از بین رفتن میسل های کازئین وقتی که در دمای 140°C بمدت بیش از ۲۰ دقیقه حرارت داده شود.

Table 4.8 Some important differences between bovine and human milk proteins

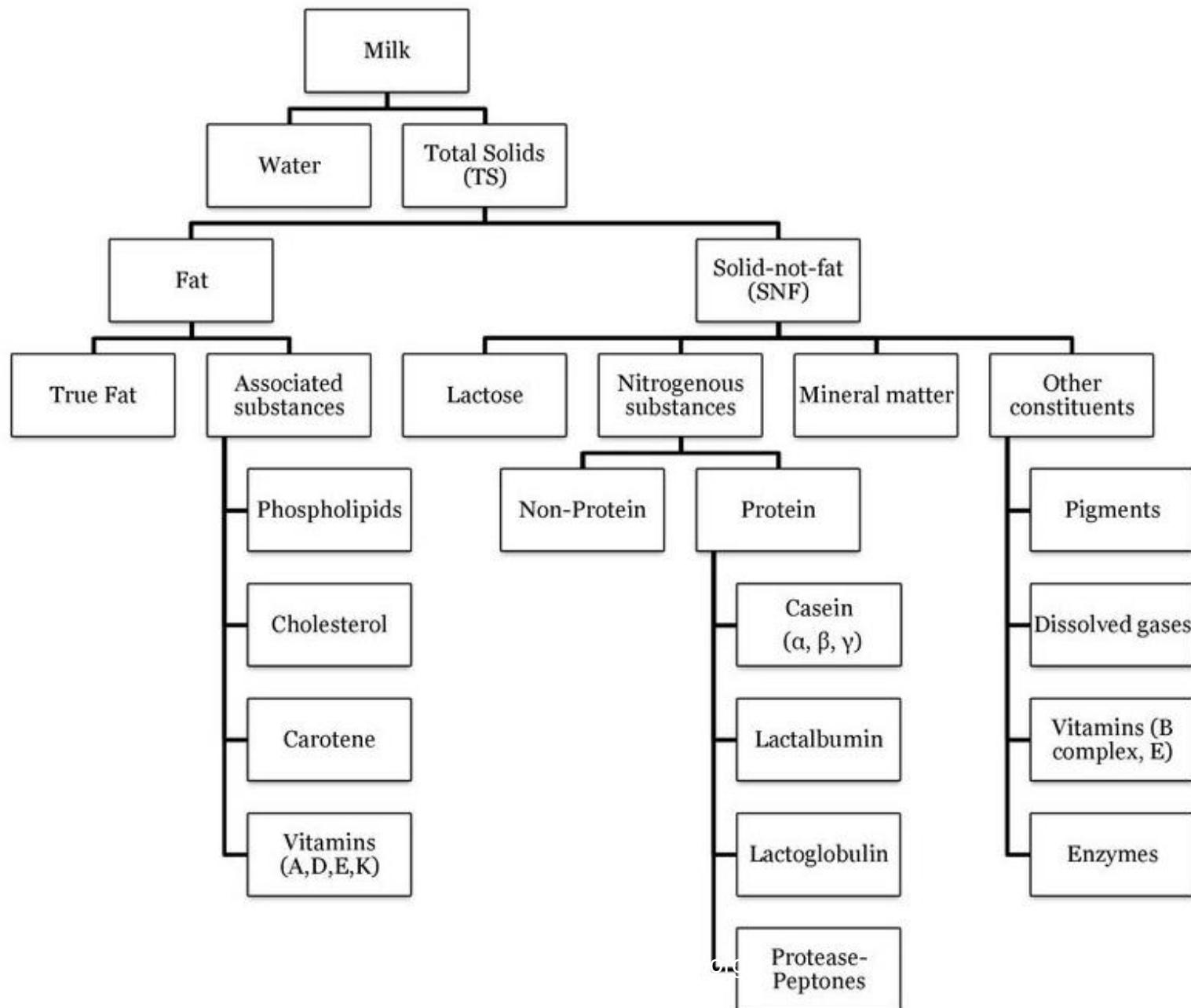
Constituent	Bovine	Human
Protein concentration (%)	3.5	1.0
Casein:NCN	80:20	40:60
Casein types ^a	$\alpha_{s1} = \beta > \alpha_{s2} = \kappa$	$\beta > \kappa$; no α_{s1}
β -Lactoglobulin	50 % of NCN	None
Lactoferrin	Trace	20 % of total N
Lysozyme	Trace	Very high (6 % TN; 3,000×bovine)
Glycopeptides	Trace	High
NPN (as % TN)	3	20
Taurine	Trace	High
Lactoperoxidase	High	Low
Immunoglobulins (Ig) (colostrum)	Very high	Lower
Ig type	$IgG_1 > IgG_2 > IgA$	$IgA > IgG > IgG_2$

NCN non-casein nitrogen, NPN non-protein nitrogen, TN total nitrogen

^aA low level of α_{s1} -casein was reported by (Martin et al. 1996) in human milk

اشکال و جداول برای مطالعه بیشتر

Milk Constituents



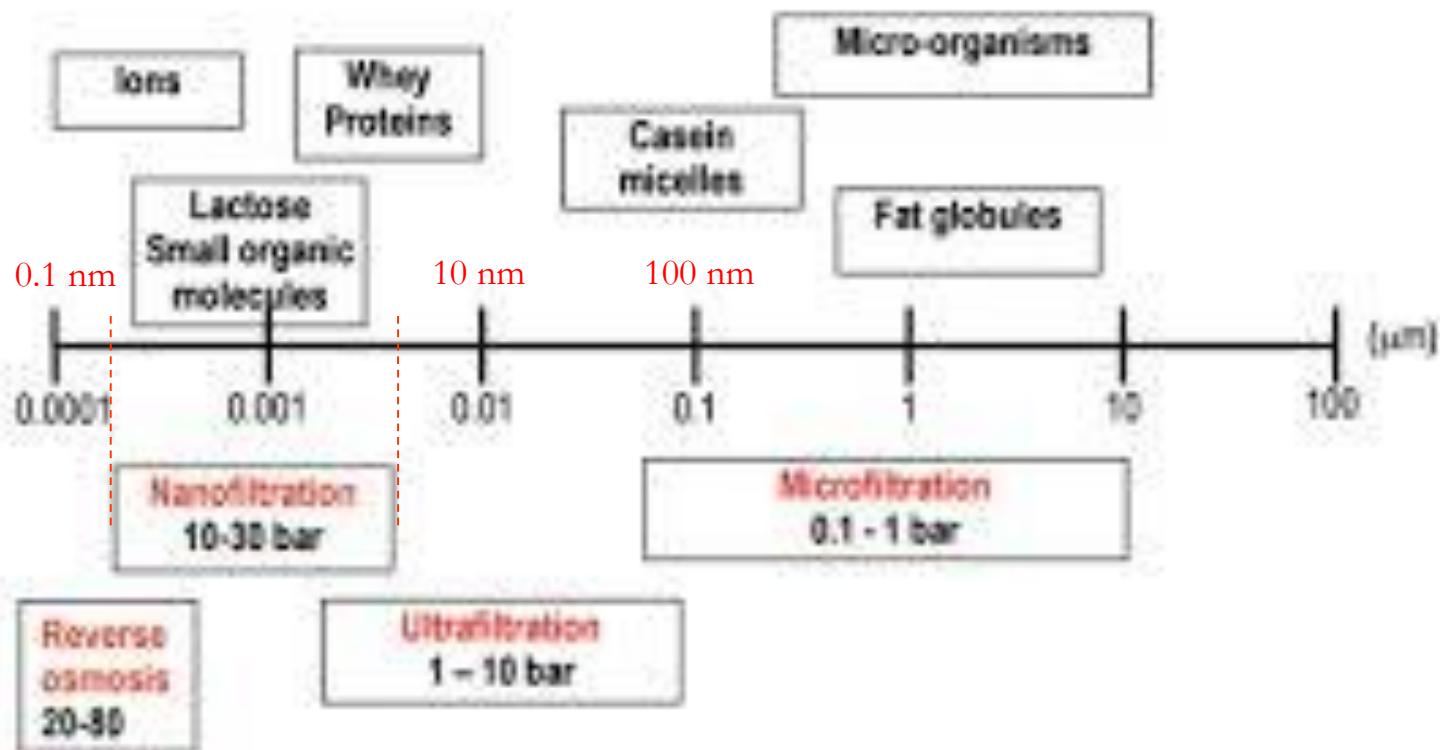
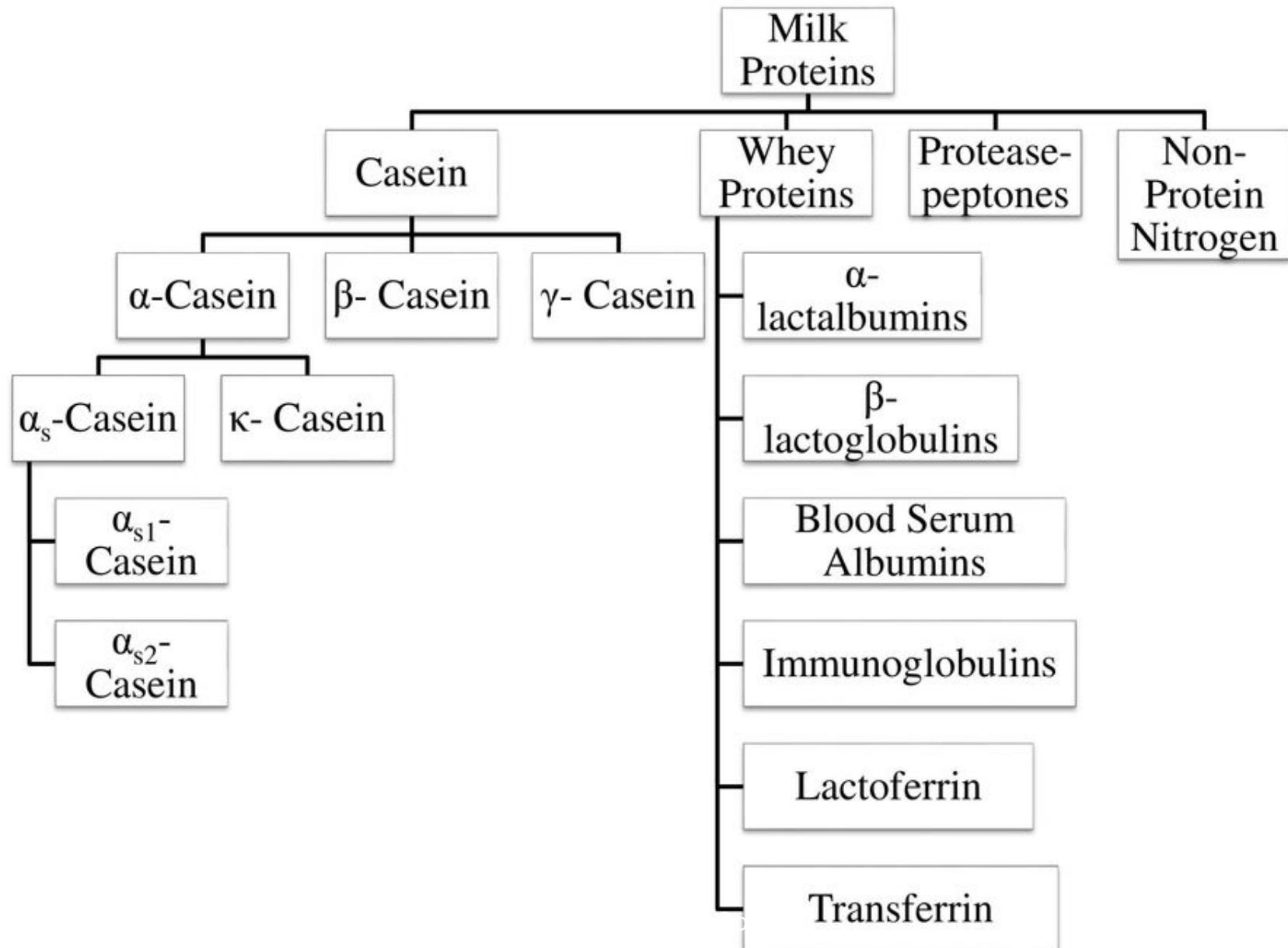


Figure 1: Relative milk components sizes in comparison with membrane pore size range

Classification of Milk Proteins



Fractionation of Milk Proteins

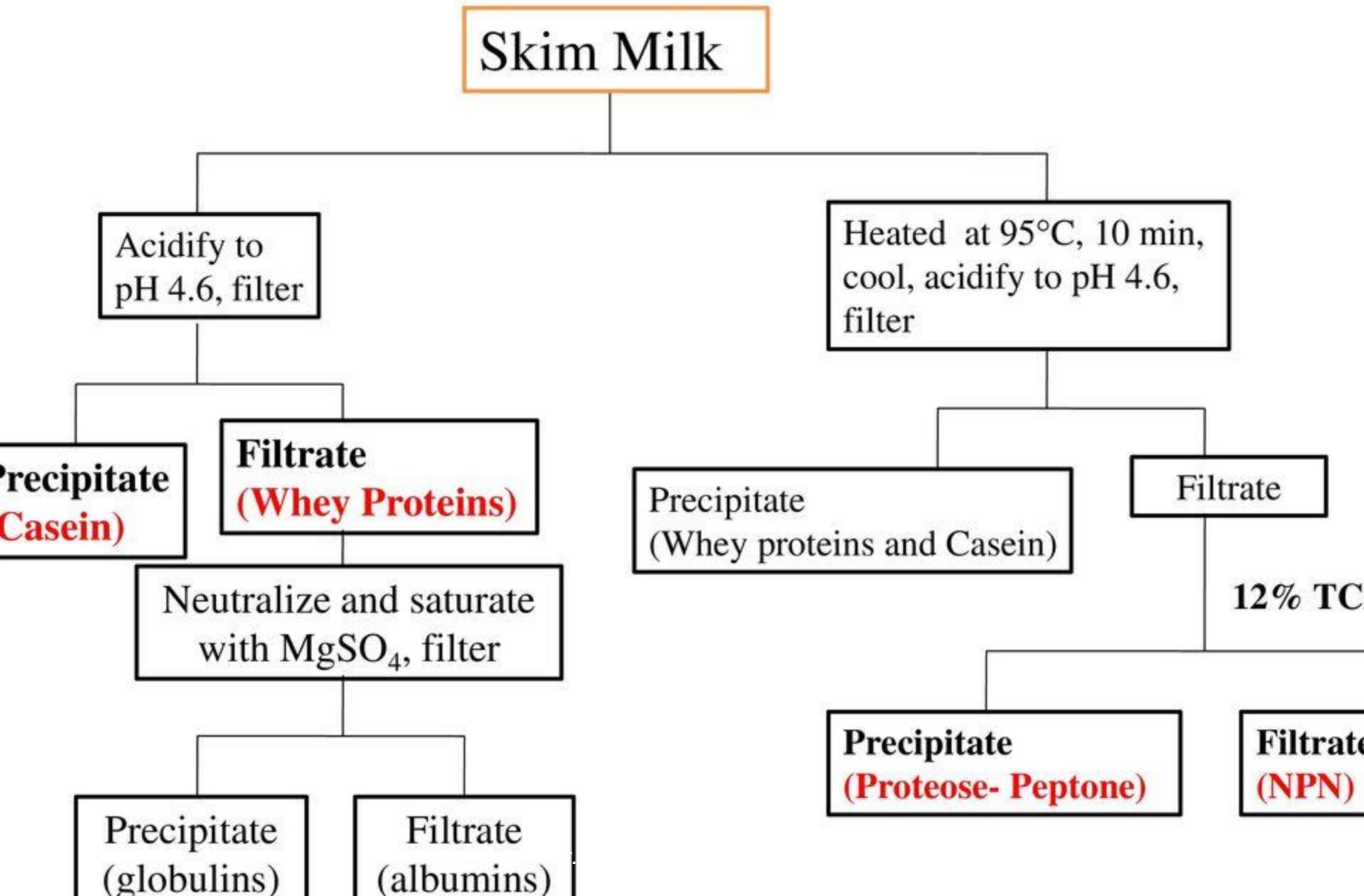
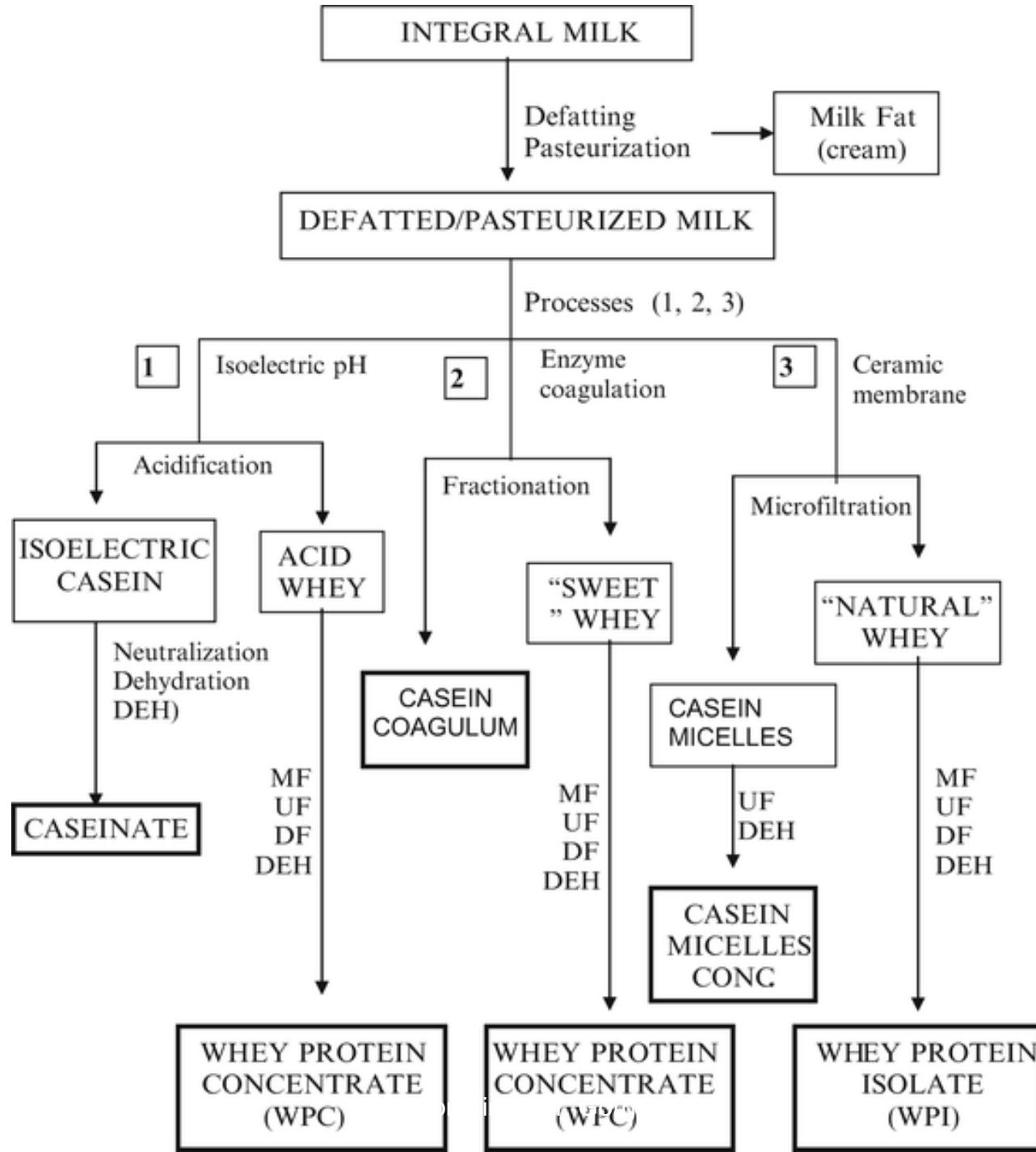
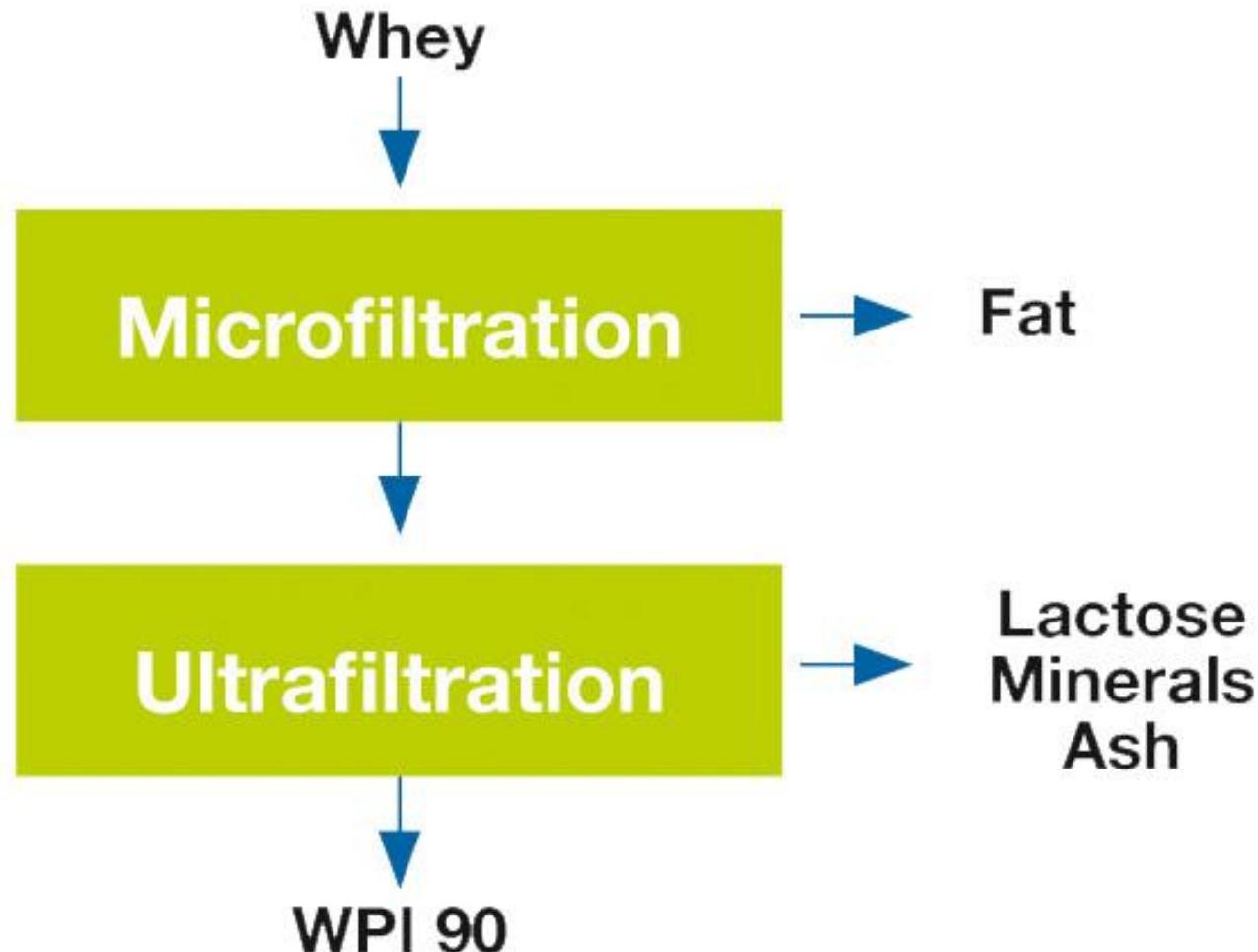
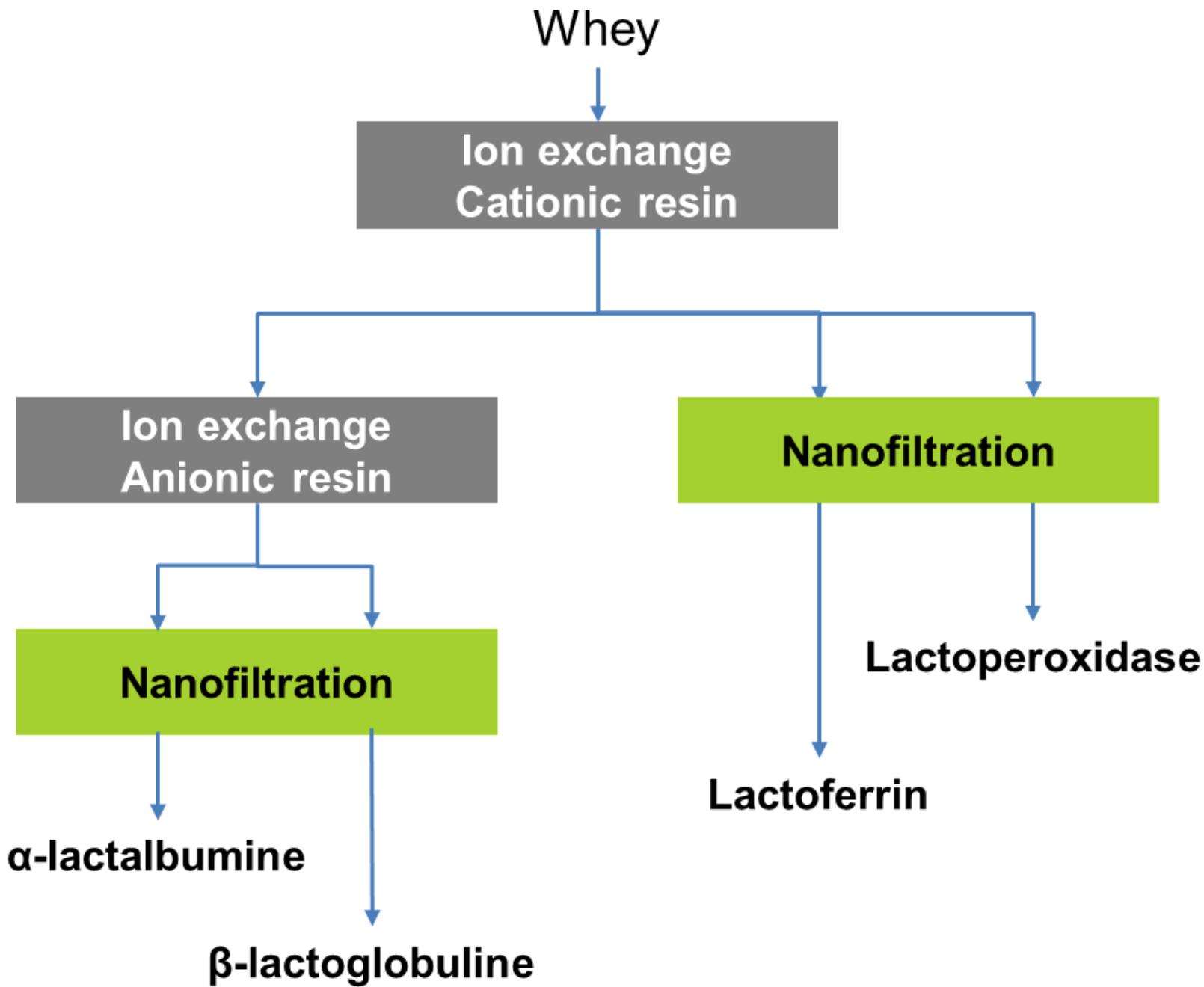


Fig. 8.1 Industrial processes for production of caseins and whey proteins concentrates:
 MF=microfiltration; UF=ultrafiltration; DF=diafiltration; DEH=dehydration. Adapted from
 Zinsly et al. (2001), Roman and Sgarbieri (2005b)



Whey Proteins Recovery





Difference between CASEIN and WHEY proteins

Casein

- Casein precipitate at pH 4.6.
- Casein is very stable to high temperature. Ex- Milk heated at its natural pH at 100°C for 24 h without any coagulation.
- Casein are phosphoproteins, on average : 0.85% phosphorous.
- Casein is low in sulphur (0.8%)
- Casein is synthesized in mammary glands.
- Casein exist in milk as large colloidal aggregates.

Whey Protein

- Whey protein do not precipitate at pH 4.6.
- Whey proteins are heat labile, completely denatured by heating at 90°C for 10 min.
- Whey proteins contains no phosphorus.
- Whey proteins are relatively rich in sulphur (1.7%).
- Whey proteins is synthesized in mammary gland and some are derived from blood.
- Whey proteins molecularly dispersed in solution.

Proteins (30–35 g/l)

Minor proteins

Enzymes

Caseins
(76–86%)

Whey proteins
(14–24%)

α -Caseins (60%)

β -Lactoglobulin
(7–12%)

α_s -Caseins (45–55%)

α -Lactalbumin
(2–5%)

κ -Caseins (8–15%)

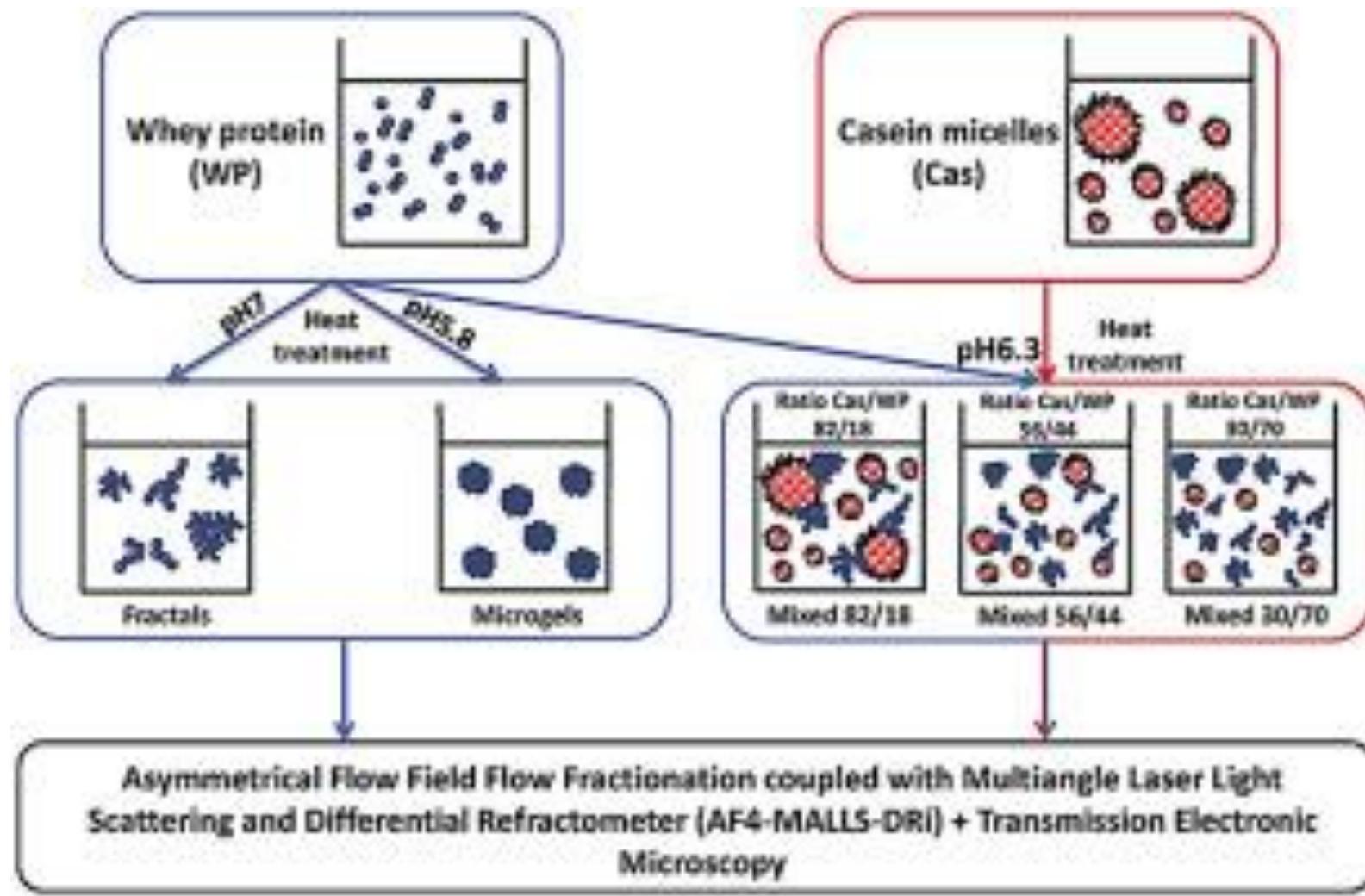
β -Caseins (25–35%)

Immunoglobulins
(1.3–2.7%)

γ -Caseins (3–7%)

Blood serum
albumin
(0.7–1.3%)

Proteose-
Peptones
(2–6%)



PROTEIN FRACTIONATION & SEPARATION

