

OBRAZOVANJE KOMPLEKSA IZMEĐU KAZEINA I SERUM PROTEINA U TERMIČKI TRETIRANOM MLEKU

Ognjen D. Mačej, Snežana T. Jovanović

Zagrevanjem mleka na temperaturama višim od 80°C obrazuje se hemijski kompleks između kazeina i proteina surutke (β -laktoglobulina i α -laktalbumina), u literaturi poznati kao koagregati proteina mleka. Mleko u kome su obrazovani koagregati znatno sporije koaguliše pod dejstvom proteolitičkih enzima koji se koriste u sirarstvu, pri čemu se obrazuje gruš loših tehnoloških i reoloških osobina nepodesan za dalju obradu i preradu u sir. Kombinacijom faktora koagulacije (pH mleka, temperature koagulacije, koncentracije kazeina i koncentracije jona kalcijuma) mogu se u velikoj meri da poboljšaju tehnološke osobine ovakvog mleka i učine ga podesnim za preradu u sir. Obrazovanje koagregata predstavlja jedan od načina većeg iskorišćenja proteina mleka. Na ovaj način iz mleka u sir može da pređe preko 90% proteina, tako da surutka praktično sadrži neproteinski azot. Surutka koja se dobija prilikom izrade sireva na bazi koagregata proteina mleka sadrži manje od 50% azota i oko 60% manje mlečne masti u odnosu na surutku koja se dobija pri tradicionalnoj proizvodnji ovih sireva.

KLJUČNE REČI: κ -kazein, β -laktoglobulin, α -laktalbumin, koagregati, koprecipitati, surutka

UVOD

U industriji mleka visoke temperature se primenjuju u obradi mleka, sa ciljem da se redukuje ukupan broj mikroorganizama, inaktiviju enzimi, poboljšaju tehnološke osobine mleka i produži njegova trajnost. Primenjuju se u procesima pasterizacije, sterilizacije, u proizvodnji kiselo-mlečnih proizvoda, kondenzovanog zaslađenog i nezaslađenog mleka, koncentrovanih i sušenih mlečnih proizvoda, kao i za povećanje termičke stabilnosti mleka u proizvodnji sterilizovanog i kondenzovanog nezaslađenog mleka.

Visoke temperature prouzrokuju određene promene na sastojcima mleka, a intenzitet tih promena zavisi od visine temperature i dužine njenog delovanja. Najveće promene dešavaju se na proteinima, naročito na proteinima surutke, pri čemu se menjaju i tehnološke osobine, a pri strožijim termičkim režimima u većoj meri i nutritivna vrednost mleka. Zbog toga su stalna nastojanja da se primenjuju više temperature sa kraćim vremenom delovanja, čime se postiže

Dr Ognjen D. Mačej, vanredni profesor, mr Snežana T. Jovanović, asistent, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Institut za prehramb. tehnolog. i biohemiju, 11080 Zemun, Nemanjina 6, Jugoslavija.

bolji efekat u pogledu uništenja mikroorganizama, inaktivacije enzima, očuvanja vitamina i manjih promena senzornih karakteristika mleka.

Poslednjih godina intenzivno se proučava mogućnost primene visokih temperatura u proizvodnji sireva sa ciljem većeg iskorišćenja proteina mleka. Naime, ustanovljeno je da se zagrevanjem mleka iznad 80°C u toku 10 minuta u visokom stepenu obrazuje stabilan hemijski kompleks između kazeina i proteina surutke. Ovo bi bio jedan od načina većeg iskorišćenja proteina mleka, koji ne zahteva posebnu tehnološku opremu, a može da obezbedi veći randman i biološku vrednost sireva. Međutim, proizvodnja sireva, od mleka tretiranog pri strožijim termičkim režimima, povezana je sa nizom tehnoloških problema koji su kompleksne prirode i zahtevaju opsežna istraživanja. Najvažnija pitanja koja treba proučiti odnose se na: a) uslove pri kojima se maksimalno obrazuje kompleks između kazeina i proteina surutke, b) sposobnost takvog mleka da koagulira pod dejstvom proteolitičkih enzima koji se koriste u sirarstvu, c) uslove pri kojima se obrazuje gruša normalnih tehnoloških osobina, d) način obrade gruš da bi se dobilo zrno potrebne veličine, sa optimalnim sadržajem vode i dobrih reoloških osobina, e) proučavanje karakterističnih promena koje se dešavaju u toku zrenja sireva. Današnja istraživanja u svetu uglavnom se odnose na manji broj sireva koji se inače tradicionalno proizvode u tim zemljama, pa su saznanja vezana za ovu problematiku još uvek veoma skromna.

OBRAZOVANJE HEMIJSKOG KOMPLEKSA IZMEĐU KAZEINA I SERUM PROTEINA

Istraživanje Trautmana i Swansona (1), Zittl-a i sar. (2), i Longa i sar. (3) su pokazala da se u toku zagrevanja mleka iznad 70°C sa dužim delovanjem tih temperatura obrazuje hemijski kompleks između κ -kazeina i β -laktoglobulina. Do istih rezultata došli su i drugi autori koji su ustanovili da pri višim temperaturama u reakciji učestvuje i α -laktalbumin (4, 5, 6, 7,8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23). Ovi kompleksi u literaturi su označeni kao koagregati proteina mleka.

Najveći broj autora smatra da se kompleks obrazuje između slobodne i reaktivne sulfhidrilne (-SH) grupe prethodno denaturisanog β -laktoglobulina i disulfidne veze u κ -kazeinu (1, 6, 15, 17, 24). U prisustvu agenasa koji blokiraju sulfhidrilne grupe (N-etilmaleimida, 2-merkaptetanola i vodonik peroksida), kompleks između κ -kazeina i β -laktoglobulina neće da se obrazuje (1, 17, 25, 26, 27). U prisustvu 2-merkaptetanola cepa se disulfidna veza između κ -kazeina i β -laktoglobulina zbog čega kompleks disosuje, a iz kazeinske micelle se oslobađa jedan deo κ -kazeina (17). Zagrevanjem mleka pri višim temperaturama dolazi do denaturacije β -laktoglobulina i njegova maskirana sulfhidrilna grupa postaje veoma reaktivna tako da može da reaguje sa drugim disulfidnim vezama (28). Takve veze, kada je u pitanju mleko, postoje i kod β -laktoglobulina, α -laktalbumina, κ -kazeina, serum albumina i imunoglobulina (15, 29, 30, 31).

U okviru svoje primarne strukture β -laktoglobulin sadrži dve disulfidne veze i jednu sulfhidrilnu grupu (28, 32, 33, 34, 35). Ekspozicija sulfhidrilnih grupa počinje već na temperaturi od 72°C, a dostiže maksimum na 95°C (15). Prema Morr-u (36) i Mullvihill-u i Donovan-u (28) mehanizam denaturacije i precipitacije β -laktoglobulina u prvoj fazi ide u pravcu pomeranja dinamičke ravnoteže između dimernog i monomernog oblika u pravcu stvaranja monomera. Ovo se dešava već pri temperaturi od 40°C kada dolazi do disocijacije β -laktoglobulina na monomere. Sa daljim povećanjem temperature dolazi do reverzibilnih reakcija koje se manifestuju ekspozicijom nepolarnih rezidua prema solventu, raskidanjem vodoničnih veza i početkom demaskiranja sulfhidrilnih grupa. Ove transformacije doprinose rušenju sekundarne i terciarne strukture. Na temperaturama od 65°C i višim dolazi do ireverzibilnih

asocijacija denaturisanih molekula β -laktoglobulina u agregate različite veličine. Pretpostavlja se da je on samo u takvom obliku sposoban da se sjedini sa κ -kazeinom. U prisustvu agenasa koji blokiraju sulfhidrilne grupe izostaće i prethodna agregacija β -laktoglobulina, a samim tim i obrazovanje kompleksa između κ -kazeina i β -laktoglobulina (16, 17,25,26,27,29). Pri višim temperaturama α -laktalbumin takođe može da obrazuje intermolekularne veze sa β -laktoglobulinom. To potvrđuje i činjenica da α -laktalbumin neće da stupi u reakciju sa κ -kazeinom bez prisustva agregata denaturisanog β -laktoglobulina (8,18,37, 38).

Interakcija između proteina mlečnog seruma i κ -kazeina odvija se u dve faze. U prvoj fazi promene se dešavaju na serum proteinima i ne uključuju κ -kazein. U drugoj fazi se odvija interakcija između κ -kazeina i denaturisanih agregata serum proteina (8,18).

Prema Mottaru i sar. (11) pod dejstvom visokih temperatura dolazi do denaturacije β -laktoglobulina i njegove interakcije i disulfidnog povezivanja sa κ -kazeinom, pri čemu se molekuli β -laktoglobulina radikalno raspoređuju i najvećim delom prekrivaju kazeinsku micelu. Obrazovani kompleks ima jače izražene hidrofobne osobine. Novonastala površina micelle ima veći broj tankih izbočina koje potiču od β -laktoglobulina lociranog na površini micelle kazeina. Pri višim temperaturama (90°C, 10 min.) dolazi i do denaturacije α -laktalbumina koji se vezuje za isturene delove β -laktoglobulina i popunjava "rupe" na površini micelle, tako da hrapava površina poprima pravilniji sferni oblik. Zbog prisustva α -laktalbumina povećava se i stepen hidrofilnosti obrazovanog kompleksa. Sa većim učešćem α -laktalbumina jače su izražena hidrofilna svojstva koagregata.

I pored toga, što su serum proteini u koagregatima denaturisani, neće doći do precipitacije kompleksa za razliku od čistih proteina mlečnog seruma koji pod dejstvom visokih temperatura brzo denaturišu, agregiraju i precipituju. Koagregati u mleku i dalje čine stabilnu koloidnu fazu što se može objasniti znatno većim masenim udelom kazeina u njima koji je za razliku od serum proteina termostabilan. Veliki broj rezidua prolina koji je raspoređen duž polipeptidnog lanca uslovljava tzv. neorganizovanu prelom konformaciju, zbog čega kazein ima slabo izraženu sekundarnu i tercijarnu strukturu, što ga čini termički stabilnim pa se u literaturi ne retko označava kao prirodno denaturisani protein.

Obrazovanje kompleksa između kazeina i serum proteina ima velikog uticaja na termičku stabilnost mleka i izgled HCT/pH krive (HCT/pH-termička stabilnost mleka na određenoj temperaturi u zavisnosti od pH) (39, 40, 41). Mleko termički tretirano na 140°C najbrže koagulira pri pH~6,9, a najsporije pri pH~6,5-6,7 kada se obrazuje stabilan kompleks između κ -kazeina i β -laktoglobulina (41). Zagrevanjem mleka na temperaturama iznad 90°C pri pH 6,5-6,7 obrazuje se stabilan kompleks između kazeina i serum proteina, a micela je više površinski naelektrisana i jače hidratirana. Pri ovim uslovima nema disocijacije κ -kazeina iz micelle, i na taj način postiže se stabilnost kompleksa i veća termička stabilnost mleka (17, 42, 43). Pri pH 6,9 i većem od 6,9, kompleks se ili ne obrazuje ili je on nestabilan i disosuje pri čemu se i redukuje naelektrisanje na površini micelle i smanjuje njena hidratiranost.

Prema Singh-u i Fox-u (43) i prema Harjinder-u i Fox-u (17) u prisustvu agenasa koji imaju sposobnost umrežavanja, kao što su formaldehid i dimetilsuberimidat, sprečava se disocijacija κ -kazeina iz micelle i povećava stabilnost kompleksa i termička stabilnost mleka i eliminiše minimum na HCT/pH krivoj. Agensi koji blokiraju sulfhidrilne grupe kao što su 2-merkaptotanol, ditiotreititol i Na-sulfit menjaju izgled krive termičke stabilnosti mleka pri pH < 7,1, pri čemu prvobitna kriva gubi svoj minimum i maksimum, a termička stabilnost mleka se povećava sa povećanjem pH vrednosti (17). To znači da pri ovim uslovima maksimum na HCT/pH krivoj prelazi u svoj minimum, što potvrđuje činjenicu da oblik HCT/pH krive zavisi od sulfhidrilnih-disulfidnih interakcija između β -laktoglobulina i κ -kazeina, odnosno od stabilnosti obrazovanih koagregata (17).

U prisustvu oksidacionih sredstava kao što su KBrO_3 , i jodbenzoat, u koncentraciji 5mM,

gubi se minimum na HCT/pH krivoj obranog mleka i uočava veliko smanjenje termičke stabilnosti u području maksimuma krive. Međutim, sa dodatkom KJO_3 u koncentraciji od 5mM uočava se izražen uticaj KJO_3 na povećanje termičke stabilnosti u intervalu pH 6,4-7,3 pri čemu se na HCT/pH krivoj u potpunosti gubi minimum (17). Pretpostavlja se da KJO_3 u ovoj koncentraciji oksiduje šećere u κ -kazeinu i sprečava disocijaciju κ -kazeina iz micelle. Vodoni peroksid tek pri većim koncentracijama od 10mM može da ima uticaja na promenu profila HCT/pH krive (17).

Elektroforetska ispitivanja su pokazala da se pri odnosu κ -kazeina i β -laktoglobulina 1:1, koagregati maksimalno obrazuju na temperaturi od 85°C i 99°C u toku 20 minuta (3). Interakcija između β -laktoglobulina i κ -kazeina brža je na 99°C nego na 85°C. Međutim, zagrevanjem mleka na 99°C obim obrazovanih koagregata bio je manji nego na 85°C za isto vreme. Ove razlike su verovatno posledica degradacije cisteina pri višim temperaturama, različitih tipova mogućih interakcija, kao i promena u strukturi jednog ili oba proteina (3, 44). Kada se smeša κ -kazeina i β -laktoglobulina u odnosu 1:1 zagreva u toku 20 minuta pri pH 6,5 količina β -laktoglobulina koja izreaguje sa κ -kazeinom na 65°C iznosi 3,4%, na 70°C 15,4%, na 75°C 48,8%, na 80°C 67,8%, na 85°C 82,9% i na 99°C 76,7% (3, 45). Zagrevanjem β -laktoglobulina i κ -kazeina u različitim masenim odnosima može se zaključiti da d (d=g b-Ig/g k-kazein) raste sa povećanjem učešća b-laktoglobulina u reakciji i ima veću vrednost na 85°C nego na 99°C kada se smeša zagreva u toku 20 minuta (3). Istraživanja su pokazala da na 85°C u toku 20 minuta reaguje približno 2,2 g β -laktoglobulina sa 1 g κ -kazeina, dok na 99°C za isto vreme približno sa 1 g κ -kazeina izreaguje 1,4 g β -laktoglobulina (3, 5).

Stepen denaturacije surutkinih proteina kao i stepen njihove interakcije sa kazeinom zavisi od primenjenog termičkog režima. Primenom HTST termičkog režima (visoka pasterizacija) α -laktalbumin reaguje sporije i maseno manje učestvuje u obrazovanju kompleksa nego β -laktoglobulin (46). Značajne razlike se javljaju i u zavisnosti od toga da li se primenjuje UHT (indirektna) ili DSI (direktna) sterilizacija. Primenom direktne sterilizacije (DSI) manji je stepen denaturacije serum proteina i manji stepen interakcije α -laktalbumina i β -laktoglobulina sa κ -kazeinom, što nije slučaj kod primene indirektna (UHT) sterilizacije, gde je učešće serum proteina u koagregatima znatno veće (46).

ENZIMSKA KOAGULACIJA MLEKA

Iz literature je poznato da na proces koagulacije mleka pomoću proteolitičkih enzima utiče veći broj faktora od kojih su najznačajniji: vrsta enzima, koncentracija enzima, koncentracija kazeina, pH mleka, temperatura koagulacije, koncentracija kalcijumovih jona i režim prethodne termičke obrade mleka (13, 14, 30, 34, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55).

Ispitivanja Kannan i Jenness-a (56) su pokazala da mleko u kome su obrazovani koagregati sporije koaguliše pod dejstvom proteolitičkih enzima. Međutim, ukoliko se mleko zagreva u prisustvu agenasa koji blokiraju sulfhidrilne grupe, čime se sprečava obrazovanje koagregata, vreme koagulacije se skraćuje za 75%. Mačej (13,14), Mačej i sar. (54) i Jovanović (55) su ispitivali uticaj važnijih faktora na brzinu koagulacije mleka pri različitim temperaturama i zaključili da na brzinu koagulacije najviše utiče pH, zatim koncentracija kalcijumovih jona u mleku, a najmanji uticaj ima temperatura koagulacije. Puda (57) i Guinee i sar. (58) su ustanovili da na brzinu koagulacije mleka u kome su obrazovani koagregati najveći uticaj ima koncentracija proteina i pH mleka. Marshall (59), Singh i Fox (60) su izneli pretpostavku da strožiji režimi termičke obrade mleka imaju veći uticaj na sekundarnu ili fizičko-hemijsku, nego na primarnu ili biohemijsku fazu koagulacije. Za razliku od njih, Reddy i Kinsella (61) smatraju da je Phe₁₀₅-Met₁₀₆ peptidna veza sa obrazovanjem koagregata dublje smeštena u hidrofobnu unutrašnjost micelle i manje pristupačna i osetljiva prema himozinu, što ima uticaja

na produženje vremena koagulacije.

Prema nekim autorima do inhibicije primarne faze koagulacije može da dođe i usled prisustva α -laktalbumina, koji pri višim temperaturama takođe postaje sastavni deo koagregata. Ustanovljeno je da je uticaj α -laktalbumina i β -laktoglobulina isti na primarnu fazu koagulacije (62).

Sve ovo ukazuje na potrebu da treba korigovati mišljenje prema kome je produženo vreme koagulacije mleka u kome su obrazovani koagregati isključivo posledica smanjenja koncentracije kalcijumovih jona pod dejstvom visokih temperatura. Sa dodatkom kalcijuma u količini koja obezbeđuje njegovu koncentraciju kao i u sirovom mleku i veću, nije moguće da se ponovo postigne osetljivost himozina prema kazeinu kao kod sirovog mleka. Čak i sa povećanjem kiselosti mleka do pH 6,0 radi prevođenja jednog dela kalcijuma u rastvorljivi oblik ne regeneriše se u potpunosti osetljivost kazeina prema himozinu, (30, 52, 54, 55). Prema istraživanjima Maćeja (13, 14, 63, 64), Maćeja i sar. (53, 54) i Jovanović (55) termičkom obradom mleka pri višim temperaturama produžava se i vreme obrazovanja gruš. Dobije se gruš znatno lošijih tehnoloških i reoloških karakteristika u odnosu na gruš dobijen koagulacijom sirovog ili nisko pasterizovanog mleka. Gruš je mekan, rastresit, nepovezan, teško izdvaja vodu i nije podesan za dalju obradu i preradu u sir. Snižanjem pH, povećanjem koncentracije proteina, kalcijumovih jona i temperature koagulacije u velikoj meri se poboljšavaju reološke osobine gruš. Ovo su potvrdila istraživanja Maćeja (13, 63, 64), Pude (57, 65) i Jovanović (55).

PROIZVODNJA SIREVA NA BAZI KOAGREGATA I KOPRECIPITATA PROTEINA MLEKA

Kod tradicionalne proizvodnje sireva više od 50% suve materije mleka odlazi sa surutkom, što neposredno utiče na manji randman sireva. Sa surutkom, pored laktoze koja čini najveći deo suve materije mleka, odlazi i oko 20% proteina velike biološke vrednosti.

Bolje iskorišćenje proteina mleka, postizanje većeg randmana i veće biološke vrednosti sireva, može da se postigne iskorišćenjem proteina surutke obrazovanjem koagregata proteina mleka. Od mleka u kome su obrazovani koagregati mogu da se proizvedu kiselokoagulišući sirevi na bazi koprecipitata i slatkokoagulišući sirevi primenom proteolitičkih enzima za koagulaciju mleka.

Koprecipitati se dobijaju precipitacijom kompleksa između kazeina i serum proteina pomoću organskih i mineralnih kiselina, CaCl_2 ili njihovom kombinacijom. Postoji značajan broj radova u kojima su koprecipitati detaljno izučavani (2, 3, 28, 66, 67, 68, 69, 70, 71). Prema Southward-u i sar. (68) iskorišćenje ukupnih azotnih materija mleka u obliku koprecipitata u proseku iznosi 92,7-95,8%, što je znatno više nego kod pasterizovanog mleka. Do skoro identičnih rezultata došao je Maćej (14) i Maćej i sar. (69). Prema Maćeju (14) preko koprecipitata se u proseku izdvoji 94,70%, a iz pasterizovanog mleka samo 83,88% ukupnih azotnih materija mleka. Jovanović (72, 73, 74) je u mleku pod dejstvom visokih temperatura obrazovala koagregate i precipitacijom pomoću mlečne, limunske i sirćetne kiseline proizvela kiselokoagulišuće sireve u tipu polutvrdih. Najbolji rezultati su postignuti sa mlečnom kiselinom, a prelaz azotnih materija iz mleka u sir iznosio je 87,59%.

Mali broj autora kod nas proučavao je mogućnost izrade slatkokoagulišućih sireva na bazi koagregata, tako da su saznanja još uvek veoma skromna (13,57,63,64,65,75,76).

U našoj zemlji, Maćej (13,63,64) je proizveo meke sireve na bazi koagregata (sveži sir, Beli sir u salamuri i sir u tipu Kamamera) i ustanovio da je iz mleka u sir u proseku prešlo preko 90% ukupnih azotnih materija. Surutka je imala 56% manje azota i oko 60% manje mlečne masti u odnosu na surutku koja se dobija pri tradicionalnoj proizvodnji ovih sireva. Marshall (77) je od mleka zagrevanog na 97°C u toku 15 sekundi proizveo sir Češir. Ogladni sirevi su

imali oko 4,5% više suve materije, 6,7% više proteina i 0,7% više mlečne masti. Banks i sar. (78) su na bazi koagregata proizveli Čedar. Surutka je imala 50% manje azotnih materija u poređenju sa tradicionalnim načinom izrade. Do sličnih rezultata došli su Kirchmeier i sar. (79). Oni su ustanovili da se koagregati u najvećem obimu obrazuju na 90°C u toku 10 minuta, a surutka je imala 60% manje azota. Puda (57,65) je proučavao tehnološke parametre proizvodnje i biohemijske promene u toku zrenja polutvrđih i tvrdih sireva izrađenih od UF mleka (ultrafiltriranog mleka), kod koga su pre koncentrisanja obrazovani koagregati. Autor je ustanovio da ove sireve karakteriše razvijen ukus i miris neposredno nakon proizvodnje, pa se oštiri termički tretmani mleka mogu da primene ukoliko se želi da skрати proces zrenja. Autor je takođe ustanovio veći stepen distribucije azotnih materija iz mleka u sir. Najnovija istraživanja Jovanović (55) i Maćeja (80) su pokazala da se na bazi koagregata proteina mleka mogu da izrade kvalitetni sirevi u tipu polutvrđih i tvrdih. Autori su ustanovili da je stepen distribucije azotnih materija iz mleka u sir iznosio preko 90%. Surutka je imala 50% manje azota u odnosu na surutku koja se dobija tradicionalnim načinom izrade ove grupe sireva. Za 1 kg polutvrđog sira tokom oglеda utrošeno je manje od 8,5 litara mleka.

ZAKLJUČAK

- Zagrevanjem mleka pri temperaturama višim od 80°C obrazuje se hemijski kompleks između kazeina i serum proteina, u literaturi poznati kao koagregati proteina mleka.
- Obrazovani kompleks lako precipituje pomoću organskih i mineralnih kiselina, CaCl₂ ili njihovom smešom. Takvi precipitati u svetskoj i domaćoj literaturi nazivaju se koprecipitati. Preko koprecipitata iskoristi se i do 95% ukupnih azotnih materija mleka, tako da surutka praktično sadrži samo neproteinski azot.
- Mleko u kome su obrazovani koagregati znatno sporije koaguliše pod dejstvom proteolitičkih enzima. Snižanjem pH, povećanjem koncentracije kalcijumovih jona i temperature koagulacije u velikoj meri se skraćuju vreme koagulacije i može da se dobije gruđ dobrih reoloških i tehnoloških osobina pogodan za obradu i preradu u sir.
- Na bazi koprecipitata i koagregata mogu se proizvesti različite vrste sireva. Na taj način postiže se veći randman sireva preko proteina surutke i veća biološka vrednost. Surutka ima 50% manje azota i do 60% manje mlečne masti u odnosu na surutku koja se dobija pri tradicionalnoj izradi ovih sireva. Stepен distribucije azotnih materija iz mleka u sir iznosi preko 90%.

LITERATURA

1. Trautman, J. C. and A. M. Swanson: Additional evidence of a stable complex between β -lactoglobulin and κ -casein. *J. Dairy Sci.* **41** (1959), 715-719.
2. Zittle, C. A., Thompson, M. P., Custer, J. H. and J. Cerbulis: κ -casein- β -lactoglobulin interaction in solution when heated. *J. Dairy Sci.* **45** (1962), 807-810.
3. Long, J.E., Winkle, Q. van and I. A. Gould: Heat-induced interaction between crude κ -casein and β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **46** (1963), 1329-1334.
4. Morr, C.V., Winkle, Q. van and I. A. Gould: Application of polarization of fluorescence technique to protein studies. III. The interaction between κ -casein and β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **45** (1962), 817-822.

5. Sawyer, W. H.: Complex between β -lactoglobulin and κ -casein. *J. Dairy Sci.* **52** (1969), 1347-1355.
6. Haque, Z. and J. E. Kinsella: Interaction between heated κ -casein and β -lactoglobulin: predominance of hydrophobic interactions in the initial stages of complex formation. *J. Dairy Res.* **55** (1988), 67-80.
7. Hartman, G. H. and A. M. Swanson: Changes in mixtures of whey protein and κ -casein due to heat treatments. *J. Dairy Sci.* **48** (1965), 1161-1167.
8. Elfagm, A.A. and J. V. Wheelock: Heat interactions between α -lactalbumin, β -lactoglobulin and casein in bovine milk. *J. Dairy Sci.* **61** (1978), 159-163.
9. Jang, D. H. and H. E. Swaisgood: Disulphide bond formation between thermally denaturated β -lactoglobulin and κ -casein micelle. *J. Dairy Sci.* **73** (1990), 900-904.
10. Smits, P. and J. H. van Brouwershaven: Heat induced association of β -lactoglobulin and casein micelles. *J. Dairy Res.* **47** (1980), 313-325.
11. Mottar, J., Bassier, A., Joniau, M. and J. Baert: Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yoghurt texture. *J. Dairy Sci.* **72** (1989), 2247-2256.
12. Carić, M.: Tehnologija koncentrovanih i sušenih mlečnih proizvoda. Naučna knjiga, Beograd, 1990.
13. Maćej, O.: Proučavanje mogućnosti izrade mekih sireva na bazi koagregata belančevina mleka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 1989.
14. Maćej, O.: Prilog proučavanju koprecipitata radi potpunijeg iskorišćavanja belančevina mleka. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu, 1983.
15. Kirchmeier, O. von, Kamal, N. M. und H. Klostmeyer: Milcherhitzung und SH-Gruppenentwicklung. II *Milchwissenschaft* **40** (1985), 722-724.
16. Purkayastha, R., Tessier, H. and D. Rose: Thiol disulphide inter change in formation of β -lactoglobulin- κ -casein complex. *J. Dairy Sci.* **50** (1967), 764-766.
17. Harjinder, S. and F. F. Patrick: Heat stability of milk: influence of modifying sulphhydryl-disulphide interactions on the heat coagulation time-pH profile. *J. Dairy Res.* **54** (1987), 347-359.
18. Elfagm, A. A. and J. V. Wheelock: Interaction of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin during heating. *J. Dairy Sci.* **61** (1978) 28-32.
19. Puda, P., Maćej, O., Jovanović, S., Milčić, M. i A. Mikuljanac: Iskorišćenje proteina mlečnog seruma u proizvodnji sireva primenom visokih temperatura. Monografija "Osnovna istraživanja u prehrambenoj tehnologiji", Ur: Radovanović, R. M., Beograd (1995), 192-214.
20. Đorđević, J., Maćej, O. i M. Milčić: Uticaj termičke obrade na stepen iskorišćenja azotnih materija mleka. *Mljekarstvo* **37** (1987), 305-309.
21. Maćej, O. i S. Jovanović: Uticaj različitih režima termičke obrade na iskorišćenje suve materije mleka. *Prehramb. Ind. Mleko i mlečni proizvodi* **9** (1998), 46-50.
22. McKenzie, G. H., Norton, R. S. and W. H. Sawyer: Heat-induced interaction of β -lactoglobulin and casein in bovine milk. *J. Dairy Sci.* **61** (1978), 159-169.
23. Euber, J.R and J. R. Brunner: Interaction of κ -casein with immobilized β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **65** (1982), 2384-2387.
24. Sawyer, W. H., Coulter, S. C. and R. Jenness: Role of the sulphuric groups in the interaction of κ -casein and β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **46** (1963), 564-565.

25. Chandry, S. S. and E. S. Humbert: Effect of N-ethylmaleimide, etilendiaminetetraacetate and dipicolinate on heat denaturation of milk serum proteins. *J. Dairy Sci.* **51** (1968), 941.
26. Fish, N.L. and R. Mickelson: Effect of hydrogenperoxide treatment on heat-induced interaction of κ -casein and β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **50** (1967), 1360-1362.
27. Grindrod, J. and T. A. Nickerson: Changes in milk proteins treated with hydrogenperoxide. *J. Dairy Sci.* **50** (1967), 142-146.
28. Mullvihill, D. M. and M. Donovan: Whey proteins and their thermal denaturation-A Review. *Irish J. Food Sci. Technol.* **11** (1987), 43-75.
29. Lyster, R. L. J.: The denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in heated milk. *J. Dairy Res.* **37** (1970), 233-243.
30. Đorđević, J.: Mleko. Naučna knjiga, Beograd, 1987.
31. Fox, P. F.: Developments in Dairy Chemistry-1, Department of Dairy and Food Chemistry, University College, Cork, 1982.
32. Kinsella, J. E.: Milk proteins: physicochemical and functional properties *CRC Crit. Review Food Sci. Nutrition* **21** (1984), 197-262.
33. Park, K. H. and D. B. Lund: Calorimetric study of thermal denaturation of β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **67** (1984), 1699-1706.
34. Webb, B. H., Johnson, A. H. and J. A. Alford: Fundamentals of dairy chemistry. The AVI Publishing Co., Inc. Westport, 1974.
35. Zimmermann, J.G. and G. Braunnitzer: Modern aspects of the primary structure and function of β -lactoglobulins. *Milchwissenschaft* **42** (1987), 294-297.
36. Morr, C. V.: Funcionalidad of heated milk proteins in dairy and related foods. *J. Dairy Sci.* **68** (1985), 2773-2781.
37. Elfagm, A. A. and J. V. Wheelock: Effect of heat on α -lactalbumin and β -lactoglobulin in bovine milk. *J. Dairy Res.* **44** (1977), 367-371.
38. Mutilangi, W. A. M. and A. Kilara: Functional properties of heat-denaturated whey protein. I. Solubility. *Milchwissenschaft* **40** (1985), 338-341.
39. Fox, P. F. and M. C. T. Hoynes: Heat stability of milk: influence of colloidal calcium phosphate and β -lactoglobulin. *J. Dairy Res.* **42** (1975), 427-435.
40. Tessier, H. and D. Rose: Influence of κ -casein and β -lactoglobulin on the heat stability of skim milk. *J. Dairy Sci.* **47** (1964), 1047-1051.
41. Fox, P. F. and P. A. Morrissey: Review of the progress of dairy science: the heat stability of milk. *J. Dairy Res.* **44** (1977), 627-646.
42. Singh, H. and P. F. Fox: Heat stability of milk: pH dependent dissociation of micellar κ -casein on heating milk at ultra high temperatures. *J. Dairy Res.* **52** (1985), 529-538.
43. Singh, H. and P. F. Fox: Heat stability of milk: the mechanism of stabilization by formaldehyde. *J. Dairy Res.* **52** (1985), 65-76.
44. Hindle, E. J. and J. V. Wheelock: The primary phase of rennin action in heat-sterilized milk. *J. Dairy Res.* **37** (1970), 389-396.
45. Hindle, E. J. and J. V. Wheelock: The release of peptides and glycopeptides by the action of heat on cow's milk. *J. Dairy Res.* **37** (1970), 397-405.
46. Corredig, M. and D. G. Dalgleish: The binding of α -lactalbumin and β -lactoglobulin to casein micelles in milk treated by different heating systems. *Milchwissenschaft* **51** (1996), 123-127.

47. Bringe, N. A. and J. E. Kinsella: Influence of calcium chloride on the chymosin-initiated coagulation of casein micelles. *J. Dairy Res.* **53** (1986), 371-379.
48. Bringe, N. A. and J. E. Kinsella: Use of plateled aggregometer to monitor the chymosin-initiated coagulation of casein micelles. *J. Dairy Res.* **53** (1986), 359-370.
49. Dalgleish, D. G.: Coagulation of renneted bovine casein micelles: Dependence of temperature, calcium ion concentration and ionic strenght. *J. Dairy Res.* **50** (1983), 331-340.
50. Đorđević, J. i M. Carić: Uticaj KNa-tartarata na koagulaciju mleka himozinom. Zbornik radova Tehnološki fakultet Novi Sad, br. 2 (1970), 153-161.
51. Đorđević, J. i M. Carić: Koagulaciju kazeina himozinom pri raznim koncentracijma Ca^{2+} i Mg^{2+} u model sistemima. Zbornik radova Tehnološki fakultet Novi Sad, br. 5 (1974), 43-51.
52. Maćej, O. i S. Jovanović: Uticaj različitih režima termičke obrade na aktivnost sirišnog enzima i iskorišćenje azotnih materija. *Prehramb. ind. Mleko i mlečni proizvodi* **8** (1997), 35-40.
53. Maćej, O. D., Jovanović, S. T. i A. M. Mikuljanac: Enzimaska koagulacija mleka. Monografija "Sirevi parenog testa", Ur: Niketić, G., Puda, P., Milanović, S., Sekulović, N., Beograd (1998), 63-87.
54. Maćej, O., Mikuljanac, A. i D. Petrović: Uticaj nekih faktora na vreme koagulacije mleka tretiranog na visokoj temperaturi. *Arhiv za polj. nauke* **50** (1989), 251-257.
55. Jovanović, S.: Nepublikovani podaci.
56. Kannan, A. and R. Jenness: Relation of milk serum proteins and milk salts to the effects of heat treatment on rennet clotting. *J. Dairy Sci.* **44** (1961), 808-812.
57. Puda, P.: Karakteristike tvrdih sireva izrađenih od mleka koncentrovanog ultrafiltracijom u zavisnosti od termičke obrade mleka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 1992.
58. Guinee, T. P., Puda, D. P., Mulholland, E. O. and W. J. Reville: Ultrafiltration in cheesemaking, 3rd Cheese Symposium, Moorepark, Fermoy, Ireland, 28-29 October 1992, 49-59.
59. Marshall, R. J.: Increasing cheese yield by high treatment of milk. *J. Dairy Res.* **53** (1986), 313-322.
60. Singh, H. and P. F. Fox: Heat induced changes in casein. *IDF bulletin No.* 238 (1988), 24-30.
61. Reddy, I. M. and J. E. Kinsella: Interaction of β -lactoglobulin with κ -casein in micelles assessed by chymosin hydrolysis: effect of temperature, heating time, β -lactoglobulin concentration and pH. *J. Agricul. Food Chem.* **38** (1990), 50-58.
62. Shalabi, S. I. and J. V. Wheelock: The role of α -lactalbumin in primary phase of chymosin action on heated cesein micelles. *J. Dairy Res.* **43** (1976), 331-335.
63. Maćej, O.: Proizvodnja mekih sireva na bazi koagregata proteina mleka, I Medunarodni simpozijum Savremeni trendovi u mlekarstvu, Kopaonik, 1992, Zbornik radova, 54-59.
64. Maćej, O.: Proizvodnja kamambra na bazi koagregata proteina mleka, III Medunarodni simpozijum Savremeni trendovi u mlekarstvu, Kopaonik, 11-15. maj 1994, Zbornik radova, 47-51.
65. Puda, P.: Proučavanje proizvodnje polutvrdih sireva primenom postupka ultrafiltracije. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu, 1989.

66. Kožev, K.S.I.A., Račev, R., V. Pavova: Fiziko-himični i tehnološki proučavanja vlrhu polučavaneto na vodnoraztvorimi i neraztvorimi Ko-precipitati na mlečnite beltljčni. Naučnoizsledovatel'ski Institut po mlečna promišlenost-Vidin, tom IV (1970), 145-153.
67. Mann, E. J.: Coprecipitates. A review. *Dairy Ind.* **36** (1971), 470-471.
68. Southward, C.R.: La fabrication du co-précipité, ²⁰congrés international de laiterie, Paris, France, 26-30 juin 1978, Brèves communications, 914-915.
69. Mačej, O., Jovanović, S., Mikuljanac, A. i G. Niketić: Primena koprecipitata u proizvodnji kiselokoagulišućih sireva, V Međunarodni simpozijum Savremeni trendovi u proizvodnji mleka, Kopaonik, 3-6. april 1996, Zbornik radova, 67-71.
70. Mačej, O. D., Đorđević, J. Đ. i S. T. Jovanović: Uticaj pH i polifosfata na rastvorljivost koprecipitata. *Prehramb. ind. Mleko i mlečni proizvodi* **9** (1998), 24-28.
71. Muller, L.L.: Manufacture and uses of casein and co-precipitate. *Dairy Sci. Abs.* **33** (1971), 659-674.
72. Jovanović, S.: Uticaj pojedinih faktora i tehnoloških operacija u proizvodnji kiselinskih sireva. Magistarski rad, Univerzitet u Sarajevu, 1994.
73. Jovanović, S., Stanišić, M. i O. Mačej: Stepem iskorišćenja N-materija mlijeka u proizvodnji kiselokoagulišućih sireva, III Međunarodni simpozijum Savremeni trendovi u mlekarsvu, Kopaonik, 11-15. maj 1994, Zbornik radova, 44-47.
74. Jovanović, S., Stanišić, M. i O. Mačej: Mogućnost upotrebe organskih kiselina kao koagulanasa u proizvodnji kiselokoagulišućih sireva, X jubilarno savetovanje "Aditivi u tehnologiji mleka", Novi Sad, 8.12. 1994, Zbornik izvoda radova, 33.
75. Jovanović, S., Mačej, O. i A. Mikuljanac: Primjena koagregata proteina mlijeka u proizvodnji mekih, polutvrdih i tvrdih sireva, V Međunarodni simpozijum Savremeni trendovi u proizvodnji mleka, Kopaonik, 3-6. april 1996, Zbornik radova, 94-100.
76. Mačej, O., Mikuljanac, A., Puda, P. i S. Jovanović: Uticaj različitih preparata sirila i organskih kiselina na ukupno iskorišćenje azotnih materija mleka, IV Međunarodni simpozijum Savremeni trendovi u proizvodnji mleka, Kopaonik, 3-7. april 1995, Zbornik radova, 42-44.
77. Marshall, R.J.: Increasing cheese yield by high heat treatment of milk. *J. Dairy Res.* **53** (1986), 313-322.
78. Banks, J. M., Stewart, G., Muir, D. D. and I. G. West: Increasing the yield of Cheddar cheese by the acidification of milk containing heat-denaturated whey protein. *Milchwissenschaft* **42** (1987), 212-215.
79. Kirchmeier, O., El-Shoobery, M. and D. Kirchmeier: Heat-induced transition of whey proteins into the casein fraction. *Milchwissenschaft* **39** (1984), 588-591.
80. Mačej, O.: Nepublikovani podaci.

COMPLEX FORMATION BETWEEN CASEIN AND WHEY PROTEIN IN HEAT TREATED MILK

Ognjen D. Maćej, Snežana T. Jovanović

When milk is heated at temperatures higher than 80°C the complex of casein and whey proteins is formed, well known as milk protein coaggregates. The high temperatures markedly reduce casein sensitivity for rennet. Curd made from milk treated at the temperature higher than 80°C, was too soft, weak and had bad rheological and technological properties. By lower pH, higher concentration of Ca^{2+} , proteins and temperature coagulation, rate of coagulation of milk was reduced and could give curd with good rheological properties, acceptable for cheese production. Our results show that whey, obtained from milk treated at different high temperatures, had less than 50% of nitrogen and by 60% less milk fat than whey obtained from the raw milk or milk pasteurized at lower temperature.

Prispeo 28. januara 2000.
Prihvaćen 10. maja 2000.