

SNEŽANA T. JOVANOVIĆ
MIROLJUB B. BARAĆ
OGNJEN D. MAČEJ

Poljoprivredni fakultet,
Beograd

637.13:637.045

SERUM PROTEINI MLEKA

U ukupnim azotnim materijama mleka, serum proteini učestvuju sa 18–20%. Najvažnije proteine mlečnog seruma čine β -laktoglobulin (β -lg), α -laktalbumin (α -la), goveđi serum albumin (BSA) i imunoglobulini (Ig). Pored ovih proteina, u mlečnom serumu prisutne su u malim količinama i druge azotne materije, kao što su laktoferin, laktolin, glikoprotein, krvni transferin, kao i proteozo-peptonska frakcija (PP).

β -laktoglobulin je najviše zastupljen protein u mlečnom serumu, molekulske mase 18300 po monomeru. Molekul sadrži dva disulfidna mosta i jednu slobodnu sulfhidrilnu grupu na poziciji 121. Pri pH vrednosti blizu izoelektrične tačke, β -laktoglobulin se nalazi u obliku dimera, čija je molekulska masa oko 36000. U pH intervalu 3.5–5.2, β -laktoglobulin reverzibilno obrazuje tetramer/oktamer asocijate, u kojima dominiraju hidrofobne interakcije. U pH intervalu 3.7–6.5, β -laktoglobulin obrazuje oktamere.

α -laktalbumin čini 20% ukupnih serum proteina, ili 2–5% ukupnih azotnih materija mleka. Ima relativno malu molekulsku masu, 14000, i izražen afinitet prema različitim jonima, naročito prema kalcijumu. Primarnu strukturu karakteriše prisustvo 123 aminokiselinska ostatka, visok sadržaj sumpora, prisustvo četiri disulfidna mosta i odsustvo slobodnih tiolnih i fosfornih grupa.

Mehanizam precipitacije serum proteina zavisi od više faktora: pH, visine temperature i dužine njenog delovanja, koncentracije dvovalentnih katjona, pre svega kalcijuma, jonske jačine sredine, sadržaja suve materije i sadržaja laktoze, odnosno šećera. Ovi faktori utiču na obim precipitacije, veličinu obrazovanih agregata, stepen denaturacije između denaturisanih molekula α -laktalbumina i β -laktoglobulina, kao i na karakter obrazovanog koagulum.

Ključne reči: pH • Serum proteini • Termički tretman

UVOD

Serum proteini, ili proteini surutke, čine približno 18–20% ukupnih proteina mleka. To su kompaktni globularni proteini, koji se međusobno razlikuju po strukturi zbog razlika u aminokiselinskom sastavu (13, 16, 70, 72). Najvažniji proteini mlečnog seruma su β -laktoglobulin (β -lg), α -laktalbumin (α -la), goveđi serum albumin (BSA) i imunoglobulini (Ig). Pored ovih proteina, u mlečnom serumu su prisutni i drugi proteini u malim količinama, kao što su laktoferin, laktolin, glikoprotein, krvni transferin, kao i proteozo-peptonska frakcija (PP) (16, 86, 89, 91).

β -laktoglobulin i α -laktalbumin su najvažniji proteini mlečnog seruma, s obzirom na njihovu zastupljenost u ukupnim serum proteinima i značaj u prehrambenoj industriji.

Proteini mlečnog seruma ne koagulišu pod dejstvom himozina i drugih

proteolitičkih enzima, zbog čega se u proizvodnji sireva izdvajaju sa surutkom.

Serum proteini su znatno više hidratizirani u odnosu na kazein. Od ukupne količine adsorpcionno vezane vode u mleku, na albumine i globuline otpada oko 30%, a na kazein oko 50% (16). Međutim, činjenica da serum proteina u mleku ima 5–5.2 puta manje u odnosu na kazein, jasno ukazuje na njihovu veću hidratiziranost u odnosu na kazein. Zbog toga oni, za razliku od kazeina, ne precipitiraju pri svojoj izoelektričnoj tački, jer pri tim uslovima sadrže još uvek dovoljnu količinu solventno vezane vode, čime se održava nivo odbojnih sila, dovoljan da spreči njihovu agregaciju i precipitaciju.

β -laktoglobulin

β -laktoglobulin je najznačajniji protein mlečnog seruma mleka. Nativni β -laktoglobulin je globularni protein molekulske mase 18300 po monomeru (6). Molekul sadrži dva disulfidna mosta i jednu slobodnu sulfhidrilnu grupu na poziciji 121 (25, 83), koja pokazuje povećanu aktivnost oko pH 7.0 (6, 13, 27, 72, 91).

β -laktoglobulin može da se asociira i obrazuje asocijate (agregate) različite veličine u zavisnosti od temperature i pH vrednosti rastvora (6, 21, 27, 65, 86).

U pH intervalu od 5.2 (izoelektrična tačka) do 7.5 (6), i u intervalu 5.0–7.0 na sobnoj temperaturi (13), β -laktoglobulin se nalazi u obliku dimera. Prema Farrell i Thompson-u (21) u širem pH intervalu (3.5–7.5), β -laktoglo-

Adresa autora: Doc. dr Snežana Jovanović, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Institut za prehrambenu tehnologiju i biohemiju, Nemanjina 6, 11080 Zemun

bulin egzistira u obliku dimera, molekulske mase oko 36000. β -Ig se javlja u šest genetskih varijanti (A, B, A_{DR}, B_{DR}, C i D) kod mleka (28, 72), od kojih su varijante A i B najčešće zastupljene, dok Fox (24) navodi da se β -Ig javlja u pet genetskih varijanti (A, B, C, D i D₁).

U temperaturnom intervalu od 30–55°C, dimeri β -laktoglobulina disosuju na monomere (6). U jako kiselj sredini, pri pH nižem od 3.5, dimer β -laktoglobulina disosuje usled jakih elektrostatičkih sila odbijanja na monomere (4, 6, 86, 89). U obliku monomera β -laktoglobulin postoji samo pri pH nižem od 3.5 i višem od 7.5 (21). Prema Swaisgoodu (86), pri pH vrednosti blizu izoelektrične tačke i iznad nje, uključujući i pH svežeg mleka, na sobnoj temperaturi svaka genetska varijanta β -laktoglobulina nalazi se u obliku stabilnog dimera molekulske mase 36700. U pH intervalu 3.5–5.2, β -laktoglobulin reverzibilno obrazuje tetramer-/oktamer asocijate, u kojima dominiraju hidrofobne interakcije (6, 86). Prema Boye i sar. (4), u pH intervalu 3.7–6.5, β -laktoglobulin se reverzibilno asocira i obrazuje oktamere. β -laktoglobulin ne denaturiše u kiselj sredini (6) i otporan je na denaturaciju čak i pri pH 2.0 (8). Prilikom njegove denaturacije dolazi do razvijanja polipeptidnog lanca i gubljenja globularne strukture, što se manifestuje povećanjem aktivnosti tiolnih grupa (6, 48, 70).

α -laktalbumin

α -laktalbumin je drugi po značaju serum protein mleka i čini 20% ukupnih serum proteina, ili 2–5% ukupnih azotnih materija mleka (16, 72, 80, 86, 91). Kao i β -laktoglobulin, ima kompaktnu globularnu strukturu, relativno malu molekulsku masu, 14000, pokazuje afinitet prema vezivanju različitih jona, asocijaciji i polimerizaciji i ima dobru rastvorljivost. Ima dve genetske varijante A i B, molekulske mase 14146 i 14174 (2, 13, 17, 28, 86, 91). Međutim, Fox (24) navodi da su u mleku identifikovane tri genetske varijante: A, B i C.

Njegovu primarnu strukturu karakteriše prisustvo 123 aminokiselinske rezidue, visok sadržaj triptofana i asparaginske kiseline, prisustvo jedne rezidue arginina i metionina, četiri disulfidna mosta unutar polipeptidnog lanca i odsustvo slobodnih tiolnih i fosfornih grupa (13, 24, 50, 72, 77).

Hiraoka i sar. (cit. 2) su pomoću EDTA (etilendiamintetraacetat) helirali kalcijum i na osnovu tih rezultata okarakterisali α -laktalbumin kao metaloprotein.

Faktori koji utiču na denaturaciju i precipitaciju serum proteina

Istraživanja su pokazala da mehanizam precipitacije serum proteina zavisi od većeg broja faktora, kao što su: pH vrednost (4, 10, 20, 36, 38, 53, 60, 61, 67, 68, 72, 76, 84, 92), visina temperature i dužina njenog delovanja (12, 13, 15, 18, 19, 33, 37, 38, 51, 57, 59, 63, 92), koncentracija dvovalentnih kationa, pre svega kalcijuma (2, 10, 11, 13, 15, 38, 92), jonska jačina sredine (13, 30, 72, 92), sadržaj suve materije, odnosno proteina (18, 33, 38, 66, 72), i sadržaj laktoze (4, 11, 38, 72). Ovi faktori utiču na obim precipitacije, veličinu obrazovanih agregata, stepen interakcije između denaturisanih molekula α -laktalbumina i β -laktoglobulina, kao i na karakter obrazovanog koagulum.

a) Uticaj visokih temperatura na serum proteina

Serum proteini spadaju u grupu termolabilnih proteina, koji se ireverzibilno denaturišu i koagulišu pod dejstvom visokih temperatura.

Veliki broj autora je proučavao delovanje visokih temperatura na denaturaciju serum proteina u mleku (10, 22, 37, 49, 51, 66), u surutki (13, 14, 29, 33, 38, 45, 67, 71, 73), u proizvodima na bazi surutke (5, 34) i u model sistemima (4, 12, 32, 77, 82, 93). Za razliku od kazeina, serum proteini potpuno denaturišu na 90°C u toku 5 minuta. Pri izoelektričnoj tački njihova rastvorljivost se značajno smanjuje (10, 23).

Prema de Wit i Klarenbeeku (13) srednje temperature, do 60°C, prouzrokuju reverzibilne promene na serum proteinima. Promene u njihovoj strukturi, pod dejstvom srednjih temperatura, nastaju uglavnom kao rezultat hidrofobnih interakcija, čiji se intenzitet povećava sa povećanjem temperature do 60°C, a smanjuje sa njenim snižavanjem. Ove reakcije mogu biti intramolekularne, i/ili intermolekularne. Reverzibilne promene u strukturi serum proteina mogu da izazovu asocijaciju, ili disocijaciju nekih proteina surutke. Ove

promene se često objašnjavaju nekom vrstom „pre-denaturacije“, izazvane delimičnim gubitkom trodimenzionalne strukture i promenama u njihovoj hidratisanosti.

Ireverzibilne promene u strukturi serum proteina mogu da nastanu na temperaturi pri kojoj oni denaturišu, a dalje pod uticajem nekih faktora okolne sredine, kao što su pH, jonska snaga, koncentracija proteina, i dr. Ove ireverzibilne promene najviše se odražavaju na smanjenje njihove rastvorljivosti (13). Delovanje visokih temperatura na serum proteina odvija se u dve faze. Prva faza obuhvata denaturaciju, koja nastaje kao posledica raskidanja vodoničnih, hidrofobnih i drugih nekovalentnih veza u polipeptidnom lancu. U drugoj fazi, koja je posledica prve, dolazi do agregacije proteina, koja u zavisnosti od pH, jonske jačine sredine i koncentracije proteina, može da izazove precipitaciju, ili gelifikaciju (13, 30, 35, 72). Na slici 1 prikazana je denaturacija i agregacija serum proteina pod dejstvom visokih temperatura (70).

U temperaturnom intervalu od 60 do 90°C raste i obim denaturacije serum proteina. Na 60°C u toku 10 minuta denaturiše samo 3% od ukupnih serum proteina, na 70°C 15%, na 80°C oko 66%, a na 90°C oko 85% (15). Proučavajući toplotnu osetljivost serum proteina pomoću elektroforeze, Larson i Roller (49) su ustanovili da na 70°C u vremenu od 30 minuta denaturiše 29% ukupnih serum proteina. Pri ovome, denaturiše 89% imunoglobulina, 52% BSA, 32% β -laktoglobulina i samo 6% α -laktalbumina. Ghosh i sar. (26) su ustanovili da primenom termičkog tretmana mleka na 80°C u trajanju od 2, 3, 5 i 9 minuta, stepen denaturacije serum proteina iznosi 20%, 30%, 50% i 80%. Termički tretman mleka na 90°C/6 minuta, izaziva veći stepen denaturacije, koji za β -Ig iznosi čak više od 99%.

Prema Donovan i Mullvihillu (15), redosled pojedinih serum proteina u pogledu stabilnosti prema visokim temperaturama je sledeći:

PP > α -la > β -Ig > BSA > Ig.

Lyster (51) je izučavao kinetiku procesa denaturacije serum proteina i ustanovio da denaturacija α -laktalbumina podleže kinetici reakcije prvog reda. Za razliku od α -laktalbumina, denaturacija β -laktoglobulina podleže kinetici reakcije drugog reda. Međutim, neki au-

Slika 1. ŠEMATSKI PRIKAZ DENATURACIJE I AGREGACIJE SERUM PROTEINA POD UTICAJEM VISOKIH TEMPERATURA (70)
Figure 1. SCHEME OF DENATURATION AND AGGREGATION OF WHEY PROTEIN DURING HEAT TREATMENT (70)

- A – nedenaturisana molekula serum proteina / undenatured whey protein molecule
 B – denaturisana molekula serum proteina / denatured whey protein molecule
 C – nastajanje agregata / forming aggregate
 – heksagonalni simboli predstavljaju hidrofobne rezidue

tori smatraju da je kinetika denaturacije α -laktalbumina znatno složeniji proces i na temperaturi od 80°C okarakterisali su je kao pseudoreakciju I reda (1, 37).

Stepen denaturacije serum proteina se uglavnom određuje stepenom denaturacije β -laktoglobulina, s obzirom da je on najzastupljeniji protein i čini približno 50% ukupnih proteina surutke (11, 16, 70, 72).

Uticaj visokih temperatura na β -laktoglobulin

Denaturacija β -laktoglobulina, pri termičkom tretmanu, odvija se u dve odvojene grupe reakcija, označene kao tip I i tip II, koje imaju za posledicu obrazovanje malih i velikih agregata sa sedimentacionim koeficijentom 3.75S i 29S (72). Sawyer (82) je ovo nazvao primarnom i sekundarnom fazom denaturacije.

U prvoj fazi se obrazuju mali agregati od četiri monomera pomoću intermolekularnih disulfidnih veza, oksidacijom tiolnih grupa, ili pomoću disulfidne izmene (82). Primarna faza (tip I) počinje na temperaturi oko 65°C i postiže maksimum u temperaturnom intervalu između 75°C i 85°C (19, 72, 90).

Mali agregati mogu međusobno da reaguju i obrazuju veće agregate (reakcije tipa II). Ovaj tip agregacije označen je kao „nespecifičan”, jer u ovim reakcijama ne učestvuju tiolne grupe i odvija se pri temperaturama nižim nego primarna agregacija (82). Suprotno ovome, Elfagm i Whelock (19) smatraju da se obrazovanje krupnih agregata odvija pri višim temperaturama. Treći tip reakcija može da nastane blo-

kiranjem tiolnih grupa pomoću N-etilenmaleimida (NEM) pre zagrevanja, čime se sprečava obrazovanje primarnih agregata (reakcija tipa I) i kao posledica ovoga izostaje i obrazovanje sekundarnih, „nespecifičnih” agregata (72). Prema Mulvihill i Donovanu (72), na nižim temperaturama dolazi do pomeranja dinamičke ravnoteže između dimernog i monomernog oblika β -laktoglobulina u pravcu stvaranja monomera. Nakon ovoga dešavaju se reverzibilne konformacijske promene, koje obuhvataju jonizaciju određenih grupa, jaču ekspoziciju tirozinskih i triptofanskih rezidua prema solventu, pa se na taj način povećava aktivnost tiolnih grupa. Daljim povećanjem temperature dolazi do raskidanja vodoničnih i hidrofobnih veza, demaskiranja tiolnih grupa i gubitka sekundarne i tercijarne strukture β -laktoglobulina. Na temperaturama od 70°C započinje prva faza agregacije denaturisanih molekula β -laktoglobulina i obrazovanje primarnih agregata (48, 70).

Uticaj visokih temperatura na α -laktalbumin

Od serum proteina, ne uzimajući u obzir PP frakciju, α -laktalbumin pokazuje najveću termičku stabilnost (11, 49, 52, 72, 79).

U ranijim radovima jednog broja autora koji su proučavali termičku stabilnost drugih serum proteina, izneta su mišljenja da α -laktalbumin spada u termički najnestabilnije serum proteine, s obzirom na nisku temperaturu denaturacije (2, 3, 13, 81). Prema ovim autorima, denaturacija α -laktalbumina počinje na znatno nižim temperaturama

(već na 62°C) u odnosu na ostale serum proteine, kao i da uklanjanje kalcijuma dodatno snižava temperaturu denaturacije. Isti autori su proučavajući termičku stabilnost α -laktalbumina u model sistemima, ustanovili da α -laktalbumin ima sposobnost da se nakon zagrevanja na 62°C i naknadnog hlađenja rastvora ponovo renaturiše do nivoa od 90%.

Suprotno mišljenje imali su Mulvihill i Donovan (72), koji su merenjem stepena denaturacije α -laktalbumina, na osnovu njegove rastvorljivosti pri pH 4.5, tvrdili da je α -laktalbumin termički najstabilniji serum protein. Fenomen renaturacije, ili reverzibilne denaturacije α -laktalbumina, može da posluži kao objašnjenje za mali stepen denaturacije, određivan na osnovu njegove rastvorljivosti pri pH 4.5. Međutim, renaturacija α -laktalbumina nije ustanovljena kod koncentrata surutkinih proteina (3, 13).

Osobine α -laktalbumina prema dejstvu visokih temperatura uslovljene su postojanjem četiri disulfidna mosta i odsustvom slobodnih sulfhidrilnih grupa u polipeptidnom lancu. Pri termičkom tretmanu na 100°C u trajanju 10–30 minuta, dolazi do raskidanja 12–20% disulfidnih veza i obrazovanja reaktivnih tiolnih grupa (85).

Denaturacija α -laktalbumina je izraženija u prisustvu β -laktoglobulina, i ovaj efekat se povećava sa porastom temperature i pH vrednosti sredine (19). Smanjenje sadržaja α -laktalbumina se ne zapaža na temperaturama do 70°C, ali je značajno u temperaturnom

intervalu od 74–96°C, što navodi na zaključak da pri ovim uslovima, α -laktalbumin reaguje sa obrazovanim agregatima denaturisanog β -laktoglobulina, odnosno da je za interakciju α -laktalbumina i β -laktoglobulina neophodno da se prethodno obrazuju mali agregati denaturisanog β -laktoglobulina (51).

b) Uticaj pH na serum proteine

Precipitacija serum proteina, koja je posledica njihove denaturacije pod dejstvom toplote, takođe zavisi od pH vrednosti. Istraživanja su pokazala da uticaj pH vrednosti na obim denaturacije serum proteina zavisi od visine temperature. Prema Donovan i Mulvihillu (15), u temperaturnom intervalu od 60–70°C, promena pH vrednosti od 4.5–7.0 nije imala uticaja na obim denaturacije serum proteina. Međutim, pri višim temperaturama (80–90°C), sa povećanjem pH vrednosti povećava se i stepen denaturacije serum proteina (3, 12, 13, 15, 81). U pH intervalu 2.5–3.5, uočena je najmanja osetljivost serum proteina prema dejstvu visokih temperatura, pri čemu zadržavaju svoju dobru rastvorljivost (69).

Hillier i sar. (38) su dokazali da α -laktalbumin i β -laktoglobulin u slatkoj surutki pokazuju veću termičku stabilnost pri pH 4.0 (blizu izoelektrične tačke), nego u neutralnoj, ili alkalnoj sredini. Harwalkar (30) je ustanovio da u toku zagrevanja kisele surutke na 90°C u toku 20–30 minuta, pri pH 5.5, serum proteini ostaju rastvorljivi. Međutim, najveći deo serum proteina precipitira pri pH 4.5 i 6.5. Isti autor smatra da je rastvorljivost serum proteina pri pH 2.5 nakon zagrevanja posledica većeg pozitivnog naelektrisanja proteina, kao i zbog činjenice da su pri ovako niskim vrednostima pH, reakcije oksidacije tiolnih grupa i sulfhidril-disulfidne izmene svedene na minimum. Na osnovu ovoga autor je zaključio da serum proteini nakon termičkog tretmana pri pH 2.5 nisu kompletno denaturisani. Harwalkar (31) je zagrevao rastvor β -laktoglobulina u toku 30 minuta pri pH 2.5, 4.5 i 6.5 i dokazao da je pri pH 2.5, β -laktoglobulin potpuno rastvorljiv. Pri pH 4.5, β -laktoglobulin u celosti precipitira, dok je pri pH 6.5 količina precipitiranog β -laktoglobulina zavisila od jonske jačine rastvora. Pri pH 4.5 i 6.5 β -laktoglobulin je bio potpuno denaturisan, dok je pri pH 2.5 ustanovljeno prisustvo dve vrste molekula: jedni slični na-

tivnom, koji su rastvorljivi pri pH 4.5 i drugi, koji se razlikuju od nativnih molekula, i nisu rastvorljivi pri pH 4.5. Drugi oblik je imao karakteristike ireverzibilno denaturisanog molekula koji međutim, nije imao sposobnost da se agregira pri pH 2.5. De Rham i Chanton (10) smatraju da rastvorljivost serum proteina značajno opada prilikom zagrevanja u pH intervalu 4.5–6.0, ali ne i pri pH vrednosti većoj od 6.0. Townend i Gyuricsek (87) su ustanovili da serum proteini kisele surutke imaju najveći obim precipitacije pri pH 6.5. Prema Lysteru (51), promene pH vrednosti sredine ne utiču bitnije na stepen denaturacije α -laktalbumina, ali se u prisustvu β -laktoglobulina stepen denaturacije α -laktalbumina raste sa povećanjem pH. Bernal i Jelen (3) smatraju da termička denaturacija α -laktalbumina zavisi od pH. Prema ovim autorima, on je mnogo osetljiviji pri pH 3.5 nego pri pH 4.5–6.5. Njegova termička stabilnost u velikoj meri zavisi od količine vezanog kalcijuma.

c) Uticaj Ca^{2+} na serum proteine

Generalno posmatrano, na termičku denaturaciju serum proteina, pored značajnog uticaja pH sredine, veliki uticaj ima i prisustvo dvovalentnih katjona, pre svega kalcijumovih jona između kojih postoji određena međuzavisnost.

Još su Zittle i sar., 1957. godine (*cit.* 72) pokazali da se maksimalna precipitacija β -laktoglobulina u odsustvu kalcijumovih jona ostvaruje pri njegovoj izoelektričnoj tački. Oni su istakli značaj kalcijumovih jona i pH na termičku koagulaciju β -laktoglobulina. Prema ovim autorima, obim precipitacije β -laktoglobulina iz rastvora, koji sadrži kalcijumove jone, zavisi od njegovog naelektrisanja, koje je ekvivalentno količini vezanog kalcijuma i analogno je precipitaciji pri izoelektričnoj tački. Oni su ustanovili da se precipitacija β -laktoglobulina može ostvariti u istom obimu, ili sniženjem pH do izoelektrične tačke, ili u alkalnoj sredini u prisustvu kalcijumovih jona. U pH intervalu 6.0–8.0, količina kalcijuma, koja se veže za β -laktoglobulin, ekvivalentna je njegovom negativnom naelektrisanju. Ove rezultate su potvrdili De Wit (11), De Wit i Klarenbeek (13), koji su utvrdili da je količina Ca^{2+} potrebna da izazove agregaciju β -laktoglobulina, zagrevanog u prisustvu CaCl_2 , ekvivalent-

na njegovom naelektrisanju. Isti autori su ustanovili da, ukoliko se rastvor β -laktoglobulina zagreva bez prisustva Ca^{2+} i nakon toga ohladi, za njegovu agregaciju je potrebno dodati 4 puta veću količinu Ca^{2+} u odnosu na rastvor, koji je zagrevan u prisustvu kalcijumovih jona. Takođe su ustanovili da je osetljivost denaturisanog β -laktoglobulina da se agregira u prisustvu Ca^{2+} veća oko pH 6.5, jer se povećava i reaktivnost tiolnih grupa pri ovoj pH vrednosti. Mulvihill i Donovan (72) su takođe potvrdili ulogu kalcijumovih jona i njihovu vezu sa pH pri agregaciji surutkinih proteina. Oni su ustanovili da dodavanje Ca^{2+} nije imalo uticaja na obim agregacije pri zagrevanju slatke surutke u pH intervalu 5.0–6.0. Međutim, pri pH vrednostima 6.5 i 7.0, dodavanje Ca^{2+} je uticalo na značajno povećanje obima agregacije proteina slatke surutke. Obim agregacije mogao je da se uporedi sa onim koji se pri istom pH ostvaruje kod kisele surutke. Za razliku od kisele surutke, najveći obim precipitacije proteina kod slatke surutke bio je pri pH 4.5 (65). Ove razlike mogu da se objasne različitim sadržajem kalcijuma u kiseloj i slatkoj surutki, s obzirom da kiselina surutka ima 2.5–3 puta veći sadržaj kalcijuma.

De Rham i Chanton (10) smatraju da na rastvorljivost serum proteina primarno utiče jonska sredina. Njihova rastvorljivost značajno opada prilikom zagrevanja u pH intervalu 4.5–6.0, a ne i za vreme zagrevanja pri pH većem od 6.0, dok se ne postigne kritična koncentracija kalcijumovih jona, koja zavisi od pH sredine. De Wit i Klarenbeek (13) su proučavali ulogu kalcijumovih jona na agregaciju serum proteina i ustanovili da se proteini iz desalinizovane (deminerilizovane) surutke brže izdvajaju u prisustvu Ca^{2+} nego iz normalne surutke. De Wit (11) i Klarenbeek (13) su ustanovili da se proteini iz desalinizovane surutke brže izdvajaju u prisustvu Ca^{2+} nego iz normalne surutke koja sadrži citrate i fosfate. Pri termičkom tretmanu fosfati obrazuju slabo disosovani Ca-fosfat, čija se koncentracija povećava sa porastom pH vrednosti, a fosfati ispoljavaju veći afinitet prema jonima kalcijuma nego proteini surutke. Ovo se odražava na bolju rastvorljivost proteina surutke. Prema De Wit i Klarenbeeku (13) stabilnost denaturisanog β -laktoglobulina se povećava sa porastom pH, ali se brzo smanjuje

povećanjem koncentracije Ca^{2+} pri istoj pH vrednosti.

Kronman i sar. (cit. 2) su ustanovili dva mesta vezivanja kalcijumovih jona u α -laktalbuminu. Jedno mesto obezbeđuje jaku vezu ($K_a=2.7 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$), a drugo slabiju ($K_a=3.1 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}$). Zagrevanjem koncentrata proteina surutke (WPC) može da dođe do obrazovanja agregata α -laktalbumina (dimera), ili agregata α -laktalbumin/ β -laktoglobulin, koji su međusobno povezani preko disulfidnih veza (33). Za obrazovanje agregata važnu ulogu imaju i joni kalcijuma. Smanjenjem koncentracije kalcijumovih jona u rastvoru koncentrata serum proteina, obrazuju se agregati veće rastvorljivosti i povećava količina α -laktalbumina, koja stupa u reakciju sa β -laktoglobulinom (75). Sulfhidrilne grupe β -laktoglobulina igraju značajnu ulogu u denaturaciji kako β -laktoglobulina, tako i α -laktalbumina. Obrazovani agregati, koji se formiraju preko disulfidne izmene, u sebe mogu da uključe i druge proteine koji sadrže disulfidne veze (51).

d) Uticaj suve materije

McKenna i O'Sullivan (66) su dokazali da denaturacija serum proteina u koncentrovanom obranom mleku opada sa povećanjem suve materije i da mnogo više zavisi od suve materije nego od promene temperature u intervalu od 75–80°C. Povećanje suve materije surutke usporava denaturaciju β -laktoglobulina, ali se ubrzava denaturacija α -laktalbumina (29, 38, 73). Maksimalna termička stabilnost serum proteina ostvarena je pri suvoj materiji surutke od 20% (29).

e) Uticaj šećera

Povećanje sadržaja laktoze inhibirano deluje na denaturaciju β -laktoglobulina A i B, ali ubrzava denaturaciju α -laktalbumina. To se objašnjava time da laktoza sprečava obrazovanje proteinskog kompleksa indukovano delovanjem visokih temperatura (38). U prisustvu laktoze, β -laktoglobulin denaturiše u manjem obimu u odnosu na koncentrat dobijen ultrafiltracijom, koji ne sadrži laktozu. Termička denaturacija β -laktoglobulina se povećava sa povećanjem sadržaja κ -kazeina u rastvoru (74).

Yamauchi (cit. 72) je ustanovio da se u prisustvu šećera obrazuje manja

količina kompleksa između β -laktoglobulina i α -laktalbumina za vreme zagrevanja. Stabilizujući efekat šećera i polihidroksilnih alkohola ispitivalo je više autora (11, 13, 74). Dodavanje 4% laktoze ili 30% sorbitola u 10% rastvor β -laktoglobulina, povećava temperaturu denaturacije za 2°C odnosno 12°C (11).

f) Interakcija serum proteina sa adsorpcionim slojem kapljica mlečne masti

Istraživanja većeg broja autora su pokazala da delovanjem visokih temperatura na mleko ne dolazi samo do promena na serum proteinima i kazeinu, ili samo do interakcije između α -laktalbumina i β -laktoglobulina, već i do interakcije između denaturisanih serum proteina i kazeina, i da se pri tome obrazuje stabilan kompleks između ovih proteina, koji su u literaturi označeni kao koagregati proteina mleka. Najnovija istraživanja su pokazala, da osim ovih proteinskih interakcija, pod uticajem visokih temperatura, dolazi i do interakcije između serum proteina i adsorpcionog sloja masnih kapljica.

Istraživanja su pokazala da u toku zagrevanja mleka, β -laktoglobulin i α -laktalbumin reaguju sa proteinima membrane masnih kapljica. Interakcija se odvija vrlo sporo na 72°C, ali je intenzivirana na temperaturi 87°C (47). Prema van Boekel i Folkertsu (88), maksimalna asocijacija serum proteina sa membranom masnih kapljica primećena je pri zagrevanju mleka na 85°C u toku 4 minuta. Dalgleish i Banks (9) smatraju da se ova interakcija odvija obrazovanjem disulfidnih veza, dok su Fink i Kessler (cit. 7) ustanovili da zagrevanjem mleka iznad 120°C, denaturisani serum proteini migriraju ka površini razdvajanja i povećavaju gustinu membrane masnih kapljica. Kim i Jimenez-Flores (47) objašnjavaju da se serum proteini u toku zagrevanja mleka adsorbuju na površini membrane masnih kapljica, uz istovremeno premeštanje proteina membrane masnih kapljica molekulske mase od 49000 u unutrašnjost masne kapljice. Prema istraživanjima Corredig i Dalgleisha (7), količina vezanog β -laktoglobulina i α -laktalbumina je u funkciji vremena i visine temperature na koju se mleko zagreva. Osim toga, zapaženo je da se interakcija β -laktoglobulina sa membranom masne kapljice završava mnogo pre

vremena koje je potrebno da se desi potpuna denaturacija serum proteina. Termički tretman mleka na 85°C u toku 20 minuta izaziva vezivanje oko 0.22 mg α -laktalbumina/g masti i 0.7 mg β -laktoglobulina/g masti, što znači da se manje od 1% serum proteina vezuje za membranu masne kapljice.

Kalab (46) je metodom elektron-mikroskopije ustanovio da masne kapljice u jogurtu proizvedenom od celog, homogenizovanog mleka nisu slobodno dispergovane, nego su asocirane (koagregirane) sa aglomeratima proteinskih čestica.

Jovanović (39, 40), Jovanović i sar. (41, 42, 43, 44), Mačej (54, 55, 56), Mačej i sar. (58, 62, 64), Puđa i sar. (78) su ustanovili da se pri izradi sireva od mleka termički tretiranog na 87°C iskoristi oko 50% ukupnih proteina mleka i više od 60% mlečne masti, nego pri proizvodnji ovih sireva na tradicionalan način, što je za posledicu imalo znatno veći randman sireva. Dobijeni rezultati navode na zaključak da masne kapljice nisu samo fizički uklopljene u proteinski matriks, već verovatno postoji i jedan vid njihove hemijske interakcije sa proteinima, i na taj način je znatno manji prelazak masti u surutku za vreme obrade grušā.

LITERATURA

1. Baer, A., Oroz, M. and Blanc, B. (1976): J. Dairy Res. 43 (3), 419–432.
2. Bernal, V. and Jelen, P. (1984): J. Dairy Sci. 67 (10), 2452–2454.
3. Bernal, V. and Jelen, P. (1985): J. Dairy Sci. 68 (11), 2847–2852.
4. Boye, J. I., Ismail, A. A. and Alli, I. (1996): J. Dairy Res. 63 (1), 97–109.
5. Buchheim, W. and Jelen, P. (1976): Milchwissenschaft 31 (10), 589–592.
6. Caessens, P. W. J. R., Visser, S., and Gruppen, H. (1997): Int. Dairy J. 7 (4), 229–235.
7. Corredig, M. and Dalgleish, D. G. (1996): J. Dairy Res. 63 (3), 441–449.
8. Dalgarrondo, M., Chobert, J. M., Dufour, E., Bertrand-Harb, C., Dumont, J. P. and Haertle, T. (1990): Milchwissenschaft 45 (4), 212–216.
9. Dalgleish, D. G. and Banks, J. M. (1991): Milchwissenschaft 46 (2), 75–78.
10. De Rham, O. and Chanton, S. (1984): J. Dairy Sci. 67 (5), 939–949.
11. De Wit, J. N. (1981): Neth. Milk Dairy J. 35 (1), 47–64.
12. De Wit, J. N. and Klarenbeek, G. (1981): J. Dairy Res. 48 (2), 293–302.

13. De Wit, J. N. and Klarenbeek, G. (1984): *J. Dairy Sci.* 67 (11), 2701–2710.
14. Della Monica, E. S., Custer, J. H. and Zittle, C. A. (1958): *J. Dairy Sci.* 41 (3), 465–471.
15. Donovan, M. and Mulvihill, D. M. (1987): *Irish J. Food Sci. Technol.* 11, 87–100.
16. Dorđević, J. (1987): *Mleko. Naučna knjiga, Beograd.*
17. Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrell, H. M. Jr, Harwalkar, V. R., Jenness, R. and Whitney, R. McL. (1984): *J. Dairy Sci.* 67 (8), 1599–1631.
18. Elfagm, A. A. and Wheelock, J. V. (1977): *J. Dairy Res.* 44 (2), 367–371.
19. Elfagm, A. A. and Wheelock, J. V. (1978): *J. Dairy Sci.* 61 (1), 28–32.
20. Elofsson, C., Dejmek, P., Paulsson, M. and Burling, H. (1997): *Int. Dairy J.* 7 (8/9), 601–608.
21. Farrell, H. M. Jr and Thompson, M. P. (1974): *Physical equilibria: Proteins in Fundamentals of dairy chemistry*. Chapter 9, 442–473. Second edition. Ed. Webb, B. H., Johnson, A. H., Alford, J. A., The AVI Publishing company, Inc., Westport, Connecticut.
22. Fetahagić, S., Maćeđ, O., Denin Djurdjević, J. i Jovanović, S. (2001): *J. of Agricult. Sci., Vol. 47 (2)*, 205–218.
23. Fox, P. F. (1986): *Heat-induced coagulation of milk in Developments of dairy chemistry – 1*. Chapter 6, 189–228. Ed. Fox, P. F., Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London and New York.
24. Fox, P. F. (1989): *The milk protein system in Developments in Dairy Chemistry–4. Functional milk proteins*. Chapter 1, 1–53. Ed. Fox, P. F. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London and New York.
25. Galani, D. and Aparenten, R. K. O. (1999): *Int. J. Food Sci. Technol.* 34, 467–476.
26. Ghosh, B. C., Steffi, A., and Kessler, H.-G. (1996): *Milchwissenschaft* 51 (1), 28–31.
27. Godovac-Zimmermann, J. and Braunitzer, G. (1987): *Milchwissenschaft* 42 (5), 294–297.
28. Gordon, W. G. and Kalan, E. B. (1974): *Proteins of milk in Fundamentals of dairy chemistry*. Chapter 3, 87–124. Second edition. Ed. Webb, B. H., Johnson, A. H., Alford, J. A., The AVI Publishing company, Inc., Westport, Connecticut.
29. Guy, E. J., Vettel, H. E. and Pallansch, M. J. (1967): *J. Dairy Sci.* 50 (6), 828–832.
30. Harwalkar, V. R. (1979): *Milchwissenschaft* 34 (7), 419–422.
31. Harwalkar, V. R. (1980): *J. Dairy Sci.* 63 (7), 1043–1051.
32. Harwalkar, V. R. and Kalab, M. (1985): *Milchwissenschaft* 40 (2), 65–68.
33. Havea, P., Singh, H., Creamer, L. K. and Campanella, O. H. (1998): *J. Dairy Res.* 65 (1), 79–91.
34. Hidalgo, J. and Gamper, E. (1977): *J. Dairy Sci.* 60 (10), 1515–1518.
35. Hill, A. R. (1988): *Milchwissenschaft* 43 (9), 565–567.
36. Hill, A. R. and Irvine, D. M. (1990): *Dairy Sci. Abs.* 52 (6), 499.
37. Hillier, R. M. and Lyster, R. L. J. (1979): *J. Dairy Res.* 46 (1), 95–102.
38. Hillier, R. M., Lyster, R. L. J. and Cheeseman, G. C. (1979): *J. Dairy Res.* 46 (1), 103–111.
39. Jovanović, S. (1994): *Uticaj pojedinih faktora i tehnoloških operacija u proizvodnji kiselinskih sireva*. Magistarski rad, Univerzitet u Banjoj Luci.
40. Jovanović, S. (2001): *Uticaj obrazovanja koagregata proteina mleka na veće iskorišćenje ukupnih proteina pri proizvodnji polutvrdih sireva*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
41. Jovanović, S. i Maćeđ, O. (1999): *Book of abstracts 2nd Slovenian Congress Milk and dairy products*, Portorož, 46.
42. Jovanović, S., Stanišić, M. i Maćeđ, O. (1994): *Zbornik izvoda radova X jubilarnog savetovanja "Aditivi u tehnologiji mleka"*, Novi Sad, 33.
43. Jovanović, S., Stanišić, M. i Maćeđ, O. (1994): *Zbornik radova III Međunarodnog simpozijuma "Savremeni trendovi u mlekarstvu"*. Ur. Krunić, M. i Čurić, M., Kopaonik, 44–47.
44. Jovanović, S., Maćeđ, O. i Mikuljanac, A. (1996): *Zbornik radova V međunarodnog simpozijuma "Savremeni trendovi u proizvodnji mleka"*. Ur. Obrenović, S., Kopaonik, 94–100.
45. Ju, Z. Y., Otte, J., Zakora, M. and Qvist, K. B. (1997): *Int. Dairy J.* 7 (1), 71–78.
46. Kalab, M. (1993): *Food structure*. 12, 95–114.
47. Kim, H.-H.Y. and Jimenez-Flores, R. (1995): *J. Dairy Sci.* 78 (1), 24–35.
48. Kirchmeier, O., Kamal, N. M. and Klostermeyer, H. (1985): *Milchwissenschaft* 40 (12), 722–723.
49. Larson, B. L. and Roller, G. D. (1955): *J. Dairy Sci.* 38 (4), 351–360.
50. Lesley, C. C. and Richard, L. J. (1986): *J. Dairy Res.* 53 (2), 249–258.
51. Lyster, R. L. J. (1970): *J. Dairy Res.* 37 (2), 233–243.
52. Lyster, R. L. J. (1972): *J. Dairy Res.* 39 (2), 279–318–252
53. Maćeđ, O. (1983): *Prilog proučavanju kopcipitata radi potpunijeg iskorišćavanja belančevina mleka*. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu.
54. Maćeđ, O. (1989): *Proučavanje mogućnosti izrade mekih sireva na bazi koagregata belančevina mleka*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
55. Maćeđ, O. (1992): *Zbornik radova I međunarodni simpozijum "Savremeni trendovi u mlekarstvu"*. Ur. Maćeđ, O., Kopaonik, 54–59.
56. Maćeđ, O. (1994): *Zbornik radova III međunarodni simpozijum "Savremeni trendovi u mlekarstvu"*. Ur. Krunić, M. i Čurić, M., Kopaonik, 47–51.
57. Maćeđ, O. i Jovanović, S. (1998): *Prehramb. Ind. Mleko i mlečni proizvodi* 9 (3–4), 46–50.
58. Maćeđ, O. i Jovanović, S. (1999): *Book of abstracts 2nd Slovenian Congress "Milk and dairy products"*, Portorož, 45.
59. Maćeđ, O. D. i Jovanović, S. T. (2000): *Acta Periodica Technologica* 31 (A), 83–93
60. Maćeđ, O. D., Đorđević, J. Đ. i Jovanović, S. T. (1998): *Prehramb. ind. Mleko i mlečni proizvodi* 9 (1–2), 24–28.
61. Maćeđ, O., Jovanović, S. i Denin, J. (2000): *J. Agric. Sci.* 45 (2), 111–119.
62. Maćeđ, O., Jovanović, S. i Denin, J. (2001): *J. of Agricult. Sci.*, 46 (1), 57–69.
63. Maćeđ, O., Jovanović, S. i Denin Djurdjević, J. (2002): *Chem. ind.* 56 (3), 123–132.
64. Maćeđ, O., Jovanović, S., Mikuljanac, A., Niketić, G. (1996): *Zbornik radova V međunarodni simpozijum "Savremeni trendovi u proizvodnji mleka"*. Ur. Obrenović, S., Kopaonik, 67–71.
65. Marshall, K. R. (1986): *Industrial isolation of milk proteins: Whey proteins in Developments in Dairy Chemistry – 1*. Chapter 11, 339–374. Ed. Fox, P. F., Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London and New York.
66. McKenna, B. M. and O'Sullivan, A. C. (1971): *J. Dairy Sci.* 54 (7), 1075–1077.
67. Milčić, M. (1992): *Mogućnost iskorišćavanja surutke u proizvodnji albuminskog sira sa plesnima vrste Penicillium candidum*. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu.
68. Milčić, M. S., Mišić, D. M., Maćeđ, O. D., Puđa, P. D. (1993): *Preh. ind. Mleko i mlečni proizvodi* 4 (1–2), 6–9.
69. Modler, H.W. and Emmons, D. B. (1977): *J. Dairy Sci.* 60 (2), 177–184.
70. Morr, C. V. (1985): *J. Dairy Sci.* 68 (10), 2773–2781.
71. Morr, C. V. and Josephson, R. V. (1968): *J. Dairy Sci.* 51 (9), 1349–1355.
72. Mulvihill, D. M. and Donovan, M. (1987): *Irish J. Food Sci. Technol.* 11 (1), 43–75.
73. Nielsen, M. A., Coulter, S. T., Morr, C. V. and Rosenau, J. R. (1973): *J. Dairy Sci.* 56 (1), 76–83.
74. Park, K. H. and Lund, D. B. (1984): *J. Dairy Sci.* 67 (8), 1699–1706.
75. Parris, N., Hollar, C. M., Hsieh, A. and Cockley, K. D. (1997): *J. Dairy Sci.* 80 (1), 19–28.
76. Patočka, J., Drathen, M. and Jelen, P. (1987): *Milchwissenschaft* 42 (11), 700–705.
77. Paulsson, M. and Dejmek, P. (1990): *J. Dairy Sci.* 73 (3), 590–600.
78. Puđa, P., Maćeđ, O., Jovanović, S., Milčić, M. i Mikuljanac, A. (1995): *Monografija "Osnovna istraživanja u prehrambenoj tehnologiji"*, Ur: Radovanović, R. M. Beograd, 192–215.
79. Rojas, S. A., Goff, H. D., Senaratne, V., Dalgleish, D. G. and Flores, A. (1997): *Int. Dairy J.* 7 (1), 79–85.

80. Rose, D., Brunner, J. R., Kalan, E. B., Larson, B. L., Melnychyn, P., Swaisgood, H. E. and Waugh, D. F. (1970): *J. Dairy Sci.* 53 (1), 1-17.
81. Rüegg, M., Moor, U. and Blanc, B. (1977): *J. Dairy Res.* 44 (3), 509-520.
82. Sawyer, W. H. (1968): *J. Dairy Sci.* 51 (3), 323-329.
83. Sawyer, L., Kontopidis, G. and Wu, S.-Y. (1999): *Int. J. Food Sci. Technol.* 34, 409-418.
84. Schmidt, R.H., Packard, V.S. and Morris, H.A. (1984): *J. Dairy Sci.* 67 (11), 2723-2733.
85. Schnack, U. and Klostermeyer, H. (1980): *Milchwissenschaft* 35 (4), 206-208.
86. Swaisgood, H. E. (1986): *Chemistry of milk protein in Developments in Dairy Chemistry - 1*. Chapter 1, 1-60. Ed. Fox, P. F., Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London and New York.
87. Townend, R. and Gyuricsek, D. M. (1974): *J. Dairy Sci.* 57 (10), 1152-1158.
88. Van Boekel, M. A. J. S. and Folkerts, T. (1991): *Milchwissenschaft* 46 (12), 758-765.
89. Walstra, P. and Jenness, P. (1984): *Dairy chemistry and physics*. Ed. by: John Willey & Sons, New York.
90. Watanabe, K. and Klostermeyer, H. (1976): *J. Dairy Res.* 43 (3), 411-418.
91. Whitney, R. McL., Brunner, J. R., Ebner, K. E., Farrell, H. M. Jr., Josephson, R. V., Morr, C. V. and Swaisgood, H. E. (1976): *J. Dairy Sci.* 59 (5), 795-815.
92. Xiong, Y. L., Dawson, K. A. and Wan, L. (1993): *J. Dairy Sci.* 76 (1), 70-77.
93. Zittle, C. A. and Dellamonica, E. S. (1956): *J. Dairy Sci.* 39 (5), 514-521.

SUMMARY

THE WHEY PROTEINS

Snežana T. Jovanović, Miroljub B. Barać and Ognjen D. Maćej

Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Department for food technology and biochemistry

Serum proteins present 18-20% of total milk nitrogen components. β -lactoglobulin (β -lg), α -lactalbumin (α -la), bovine serum albumin (BSA) and immunoglobulins (Ig) are the most important milk serum proteins. Also, milk serum contains low percent of other nitrogen components such as lactoferrin, lactolin, glycoprotein, blood transferrin and proteose-peptone fraction (PP).

β -lactoglobulin is the major milk serum protein. It is composed of 18300 Da molecular weight monomers. Molecule of β -lactoglobulin has two disulfide bonds and free -SH group at 121 position. At pH near isoelectric point exists as a dimer (M.W. about 36000). At pH 3.5-5.2 β -lactoglobulin expresses reversible tetramer-octamer association. These aggregates are based on hydrophobic interaction. At pH 3.7-6.5, these molecules aggregate as octamer.

α -lactalbumin presents 20% of serum proteins or 2-5% of total milk nitrogen components. Molecular weight of α -lactalbumin is relatively small (14000). α -lactalbumin expresses high affinity to different ions, especially to Ca²⁺ ions. The primary structure is characterized with 121 amino acid residues, high content of sulphur, and four disulphide bonds. There are no free -SH groups and phosphoric groups.

The mechanism of serum protein precipitation depends on several factors: pH, temperature level, ionic strength, dry matter and lactose content. These factors influence the degree of precipitation, weight of aggregates, the degree of major proteins denaturation as well as the nature of coagulum.

Key words: Heat treatment • pH • Whey proteins