

مطالعه میسل‌های کازئینی شیر خام و پاستوریزه در حالت طبیعی و پس از عمل مایه پنیر در سرما به کمک میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره و گذاره

محمد رضا احسانی^۱، حمید عزت پناه^۲ و حسن لامع^۱

چکیده

در این بررسی تغییرات میکروسکوپی میسل‌های کازئینی (Casein Micelles) شیر خام و شیر پاستوریزه به وسیله میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و گذاره (Scanning Electron Microscope (SEM)) پاسخ داده شد. بررسی این تغییرات با استفاده از پایلوت پژوهشی دانشکده کشاورزی تهران (Low Temperature long Time (L.T.L.T.)) (دما ۶۳ درجه سانتی گراد و زمان ۳۰ دقیقه) انجام شد. نمونه‌های شیر خام و پاستوریزه از پایلوت پژوهشی دانشکده کشاورزی تهران و هر یک از آنها به دو قسم تقسیم شدند. بخش نخست به طور مستقیم مراحل آماده سازی برای مطالعه با میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره و گذاره را گذراند، در حالی که بخش دوم از نمونه‌های شیر خام و شیر پاستوریزه در دما C[°] تحت تأثیر مایه پنیر قرار گرفته و پس از نگهداری در این دما به مدت ۲۴ ساعت، پس از انجام مراحل آماده سازی برای مطالعه با میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره و گذاره، مورد مطالعه و تصویر برداری قرار گرفت. تصاویر تهیه شده نمونه‌های مختلف، به ویژه در نمونه‌های شیر خام، نشان دادند که در حالت طبیعی میسل‌های کازئینی دارای ساختمانی کروی و منظم با سطحی صاف و به صورت متفرد می‌باشند. در حالی که در نمونه‌هایی که در سرما تحت تأثیر مایه پنیر قرار گرفتند، نوعی حالت کشیدگی پدید می‌آید که علت این پدیده را می‌توان با تغییرات ساختاری انجام شده به دنبال عمل آنزیم رنین (Rennin) بر روی پیوند معینی در ساختمان کاپا-کازئین و احتمالاً خارج شدن نسبی بتا-کازئین (β -Casein) از ساختمان میسلی و هم چنین بخشی از کلیسیم کلوئیدی موجود در ساختمان میسل‌های کازئینی مرتبط دانست. شکل‌های مربوط به میسل‌های کازئینی در شیر پاستوریزه نشان می‌دهند که شرایط حرارتی پاستوریزاسیون بر اندازه میسل‌ها تأثیر داشته و ابعاد آنها را در مقایسه با میسل‌های کازئینی در شیر خام بزرگ‌تر نموده است.

واژه‌های کلیدی: میسل کازئینی، شیر خام، شیر پاستوریزه، مایه پنیر، میکروسکوپ الکترونی نگاره، میکروسکوپ الکترونی گذاره

۱. به ترتیب دانشیار و استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۲. استادیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

مقدمه

(Glycomacropeptide) در مرحله اول و تشکیل لخته های کوچک و سپس بزرگ در مرحله بعد می گردد، بر شکل میسل های تازه تشکیل شده اثر مشخصی باقی می گذارد. اگر کیموزین را در دمای کمتر از ۴ درجه سانتی گراد به شیر اضافه شود، بخش اول یعنی آبکافت (Hydrolysis) کاپاکازین انجام می گردد، ولی مرحله دوم یعنی توده ای شدن میسل های جدید عملی نمی شود (۱۰، ۲۴ و ۲۶). پدیده تجزیه آنزیمی کاپاکازین موضوع مطالعات گستره ای بوده است (۹، ۲۳ و ۲۶) ولی آثار این تجزیه در تغییر شکل میسل ها موضوع جدیدی است که کیفیت آن به بسیاری از عوامل از جمله اندازه میسل ها بستگی دارد که به نوبه خود، اندازه میسل ها نیز تابعی از نژاد دام و برخی عوامل دیگر هستند.

مواد و روش ها**نمونه برداری**

نمونه برداری از شیر خام و شیر پاستوریزه به صورت تصادفی انجام شد (۱۱).

مواد

مايه پنير با منشا قارچي و با قدرت ۱۰۰/۰۰۰ با نام رنزي لاز (Rennilase)، محصول شركت گيسن بروکادس (Gist brocades) هلند.

گلوتارالدئيد (Glutaraldehyde) ۲۵٪، مخصوص میکروسکوب الکترونی محصول شركت BDH انگلستان.

كلرور كلسيم بدون آب و خشک، ساخت شركت مرك (Merck) آلمان.

فسفورتنگستيك اسيد (Phosphotungstic acid) خالص و خشک ساخت شركت مرك آلمان.

وسائل

پولک مسى (Grid) پوشش داده شده با لایه کربن و فرم وار (Formvar)، مخصوص میکروسکوب الکترونی گذاره. جايگاه نمونه (Stub) مخصوص میکروسکوب الکترونی نگاره. خشک کن تصعیدی (Freeze dryer) مدل LY ساخت شركت

اطلاعات به دست آمده از ريز ساختار مواد غذائي، درک ويژگي های کاري آنها و هم چنین حساسيت يا مقاومت آنها را در برابر عوامل مختلف، آسان تر می نماید. داده های ناشی از اين گونه مطالعات راه های جديدي را در توليد مواد غذائي با ويژگي های دلخواه باز می کند. استفاده از میکروسکوب الکترونی يكى از طرق فيزيكى مطالعه برخى تركيبات شير است. با اين روش می توان توزيع فضایي ذرات فاز ميسلی شير، که بيشترین اهميت را در ثبات آن داراست، ارزیابي نمود. لازم به ذكر است که بررسی ذرات کوچک مانند میسل های کاژيني با میکروسکوب نوري، داراي محدوديت های خاص خود است که از آن جمله، محدوديت در دست يابي به عمق، قابل رویت است. با اين نوع میکروسکوب ذراتي با اندازه بيش از ۵۰۰ نانومتر را می توان مشاهده نمود و بنابراین مطالعه ذراتي مانند میسل های کاژيني به صورت مجزا، غشای گوچه های چربی (Fat Globules Membrane) و ذرات کوچک دیگر ممکن نیست (۱۵). در مقابل با میکروسکوب الکترونی و به ويژه میکروسکوب الکترونی گذاره با وضوح كافی می توان ذراتي به قطر چند ده نانومتر را نيز مشاهده نمود. بررسی ساختمان میسل های کاژيني به کمک میکروسکوب الکترونی، موضوع پژوهش های بسیاری بوده است (۱۶ و ۲۵) و به سبب سهولت و سادگی تهیه نمونه برای کار با میکروسکوب الکترونی نگاره، ابتدا اين نوع میکروسکوب مورد استفاده قرار گرفت و سپس از میکروسکوب الکترونی گذاره استفاده شد (۱۷ و ۱۹).

بررسی ساختمان طبیعی میسل های کاژيني در شیر خام، شکل و ابعاد میسل ها را در شرایط طبیعی نشان می دهد. مطالعه همين ويژگي ها در شيری که شرایط پاستوريزاسیون را تحمل كرده است، تغييرات ايجاد شده در شکل میسل ها را نمایان می سازد. از سوی دیگر، استفاده از مايه پنير و به عبارت بهتر عمل کیموزین (Chymosin) يا آنزيم اساسی مايه پنير بر روی کاپاکازين که منجر به تجزیه اين تركيب و توليد پاراکاپا-کاژين (Para kappa casein) و گليکوماکروپپتید

۲ گرم از مایه پنیر خشک در آب جوشیده سرد شده در دمای 20°C حل شد. سپس حجم محلول تهیه شده به ۲۰ میلی‌لیتر رسید. به نمونه‌های ۲ و ۴ مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از مایه پنیر تهیه شده، اضافه و با هم زدن سریع در دمای کمتر از 4°C ، مایه پنیر مایع با نمونه‌ها مخلوط شد. این نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در حمام آب سرد، در دمای $4^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ نگهداری شدند.

هر چهار نمونه در دمای 4°C ، به مدت ۲۰ دقیقه با سانتریفوژ آزمایشگاهی Beckman مدل JA-21 و با اعمال شتاب ۴۸۰۰۰ برابر شتاب ثقل ($g \times 48000$)، به مدت ۲۰ دقیقه با هدف تغليظ میسل‌های کازئینی در رسوب به دست آمده، سانتریفوژ شدند. رسوبات تهیه شده با جدا کردن مایع بخش فرقانی آنها به آرامی جدا شد.

۲. آماده سازی نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نگاره

نمونه‌های تهیه شده، به مدت ۲۰ دقیقه در گلوتارآلدئید ۳٪ تثبیت شدند. در مرحله بعد نمونه‌های تثبیت شده بر جایگاه نمونه ویژه میکروسکوپ SEM، به صورت پاششی (Spray) اضافه شدند. نمونه‌ها با قرار گرفتن جایگاه نمونه در دستگاه خشک کن تصحییدی به مدت ۴ ساعت، در دمای 53°C و 0.8 میلی بار ، خشک شدند و سپس با استفاده از بخار طلا و تحت خلاء پوششی به ضخامت ۲/۵۵ نانومتر بر روی آنها تثبیت گردید. نمونه آماده شده در دستگاه میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد بررسی و تصویر برداری قرار گرفت(۵).

۳. آماده سازی نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ گذاره

رسوب تهیه شده با سانتریفوژ آزمایشگاهی Beckman، به مدت ۲۰ دقیقه در گلوتارآلدئید ۲۵٪ تثبیت شد. در این مرحله از نسبت ۱ به ۷ گلوتارآلدئید به نمونه استفاده شد. سپس نمونه تثبیت شده با محلول کلوروکلسیم 0.1 مولار به نسبت ۵۰ به ۱ مخلوط شد و با روش رنگ آمیزی منفی (Negative staining) (۶)

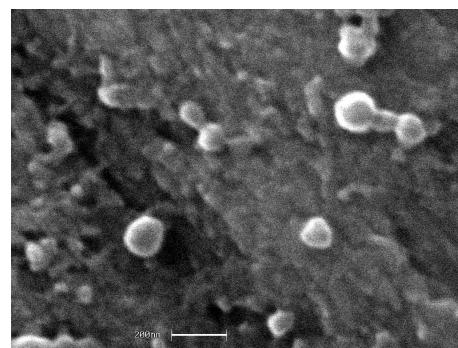
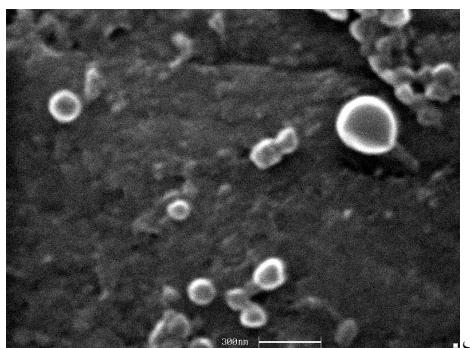
Snijders Scientific هلند. سانتریفوژ آزمایشگاهی از نوع H-200NR ساخت شرکت Kokusan ژاپن. سانتریفوژ آزمایشگاهی از نوع JA-21 ساخت شرکت Beckman امریکا. حمام آب سرد (Cooling Bath). میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل EM-900 ساخت شرکت Zeiss آلمان با ولتاژ ۸۰ کیلوولت. دستگاه پوشش دهنده (Coater) نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی نگاره ساخت شرکت Fisons انگلستان. میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل I-400، ساخت شرکت Leo انگلستان با ولتاژ ۵ تا ۲۰ کیلو ولت.

روش‌ها

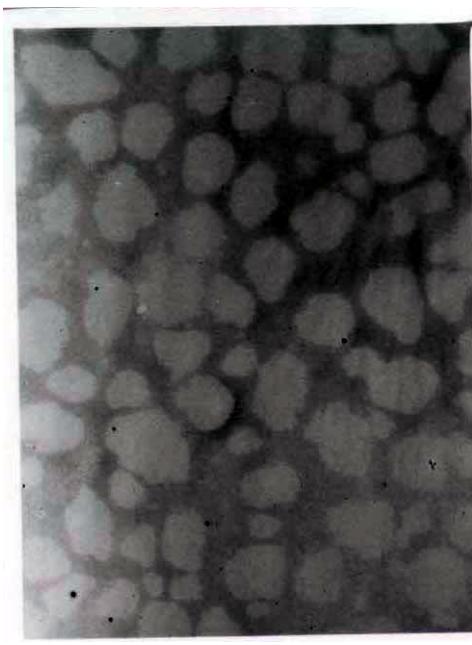
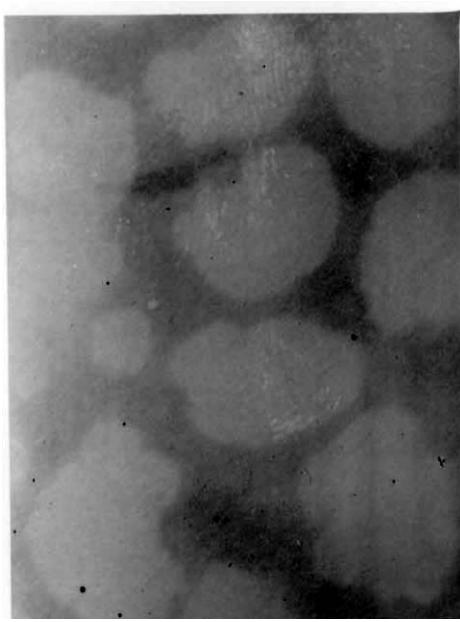
۱. نمونه برداری و آماده سازی نمونه‌ها

شیر خام با چربی ۱٪ درصد در پایلوت پژوهشی دانشکده کشاورزی تهیه شد و یک لیتر از آن، به عنوان شیر خام بی چربی نمونه برداری شد. بخش دیگری از شیر خام بی چربی، در این پایلوت به روش کند $(4^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C})$ پاستوریزه شده و بعد از خنک شدن تا دمای 4°C ، یک لیتر از آن نمونه برداری شد(۱۱).

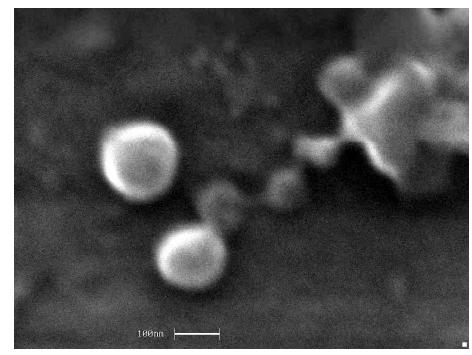
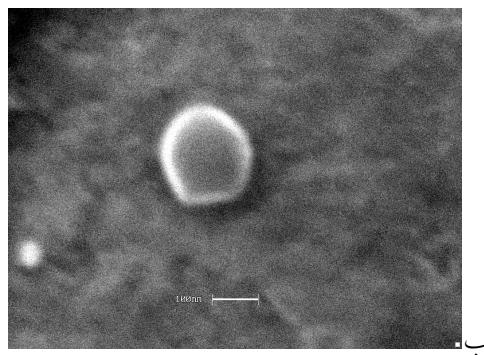
نمونه‌های شیر خام و شیر پاستوریزه در کمترین زمان ممکن و در دمای 4°C به مجتمع آزمایشگاهی منتقل شدند. ابتدا به وسیله سانتریفوژ آزمایشگاهی Kokusan مدل H-200NR و با اعمال شتاب ۶۱۹۰ برابر شتاب ثقل ($g \times 6190$) و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 4°C باقی‌مانده چربی نمونه‌ها جدا شد. از نمونه‌های شیر خام و شیر پاستوریزه بی چربی هر یک دو نمونه، به مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر برداشته شد. هر نمونه به دو قسمت تقسیم شده و شماره گذاری در مورد آنها صورت گرفت. بدین ترتیب که شماره‌های ۱ و ۲ به شیر خام و ۳ و ۴ به شیر پاستوریزه اختصاص یافت.



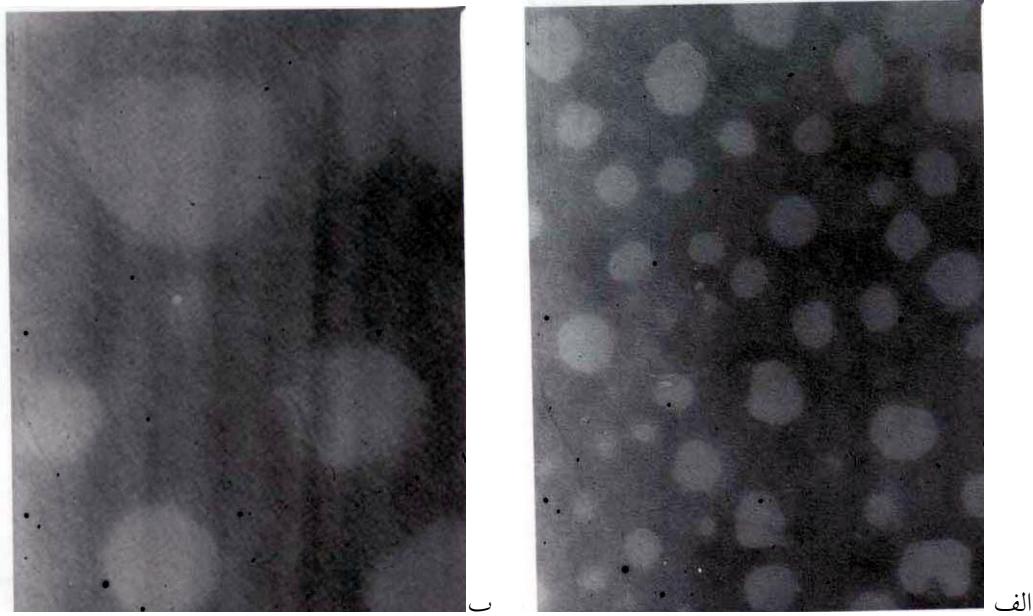
شکل ۱. تصاویر میسل کازئینی در شیرخام با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره
(در شکل الف مقیاس (بار) = ۲۰۰ نانومتر و در شکل ب مقیاس (بار) = ۳۰۰ نانومتر)



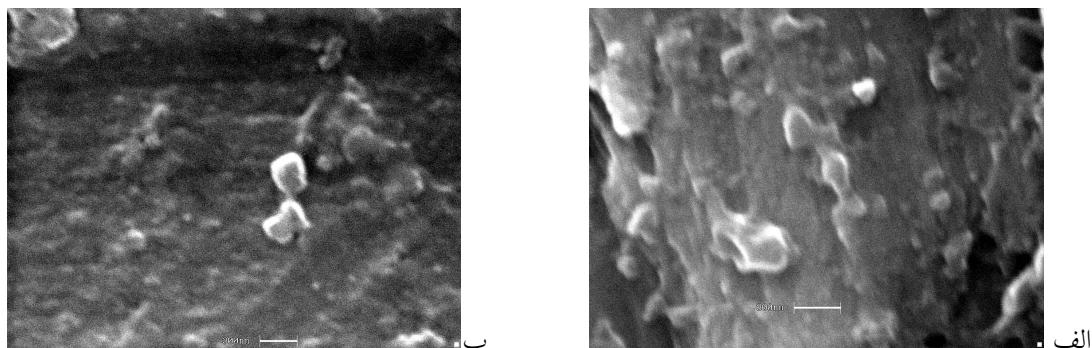
شکل ۲. تصاویر میسل کازئینی در شیرخام، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره
در شکل الف : بزرگنمایی برابر ۱۰۰/۰۰۰ برابر و در شکل ب: بزرگنمایی برابر ۲۸۰/۰۰۰ برابر است.



شکل ۳. تصاویر میسل کازئینی در شیر پاستوریزه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره
(در شکل الف و ب مقیاس (بار) = ۱۰۰ نانومتر)



شکل ۴. تصاویر میسل کازئینی در شیرپاستوریزه، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره در شکل الف: بزرگنمایی برابر $100/000$ برابر و در شکل ب: بزرگنمایی برابر $280/000$ برابر است.



شکل ۵. تصاویر میسل کازئینی در شیر خام مایه پنیر خورده در سرما با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (در شکل الف و ب مقیاس (بار) = 300 نانومتر)

در ولتاژ 80 کیلو ولت، مورد مطالعه و تصویر برداری قرار گرفتند.

برای مطالعه با میکروسکوپ گذاره آماده گردید (۲۰ و ۲۱).

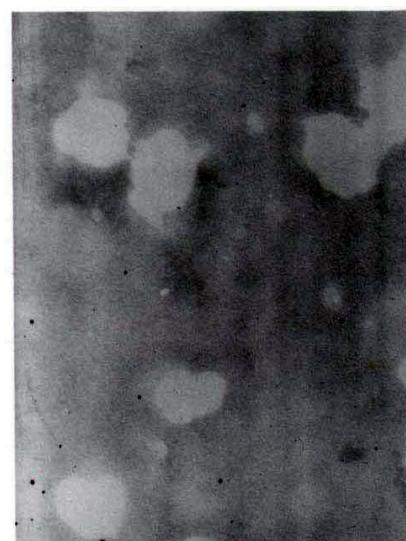
نتایج

۱. نتایج مربوط به تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی از میسل‌های کازئینی در شیر خام و شیرپاستوریزه طبیعی شکل ۱ تصاویر تعدادی از میسل‌های کازئینی را در شیر خام که با میکروسکوپ نگاره تهیه شده‌اند، نشان می‌دهد. در شکل ۲ تصاویر میسل‌های کازئینی در شیر خام که با

قطرهای از نمونه رقیق شده بر سطح پولک مسی ویژه میکروسکوپ الکترونی گذاره، گذاشته شد. پس از یک دقیقه، شیر اضافی به وسیله لبه کاغذ صافی خشک شد. در مرحله بعد یک قطره اسید فسفوتیگستیک 2% بر روی پولک مسی گذاشته شده و باقی مانده اسید پس از ۳۰ دقیقه با استفاده از آب مقطمر، از سطح پولک مسی، شستشو شد. نمونه‌های مورد نظر در دمای محیط خشک شدند و به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره

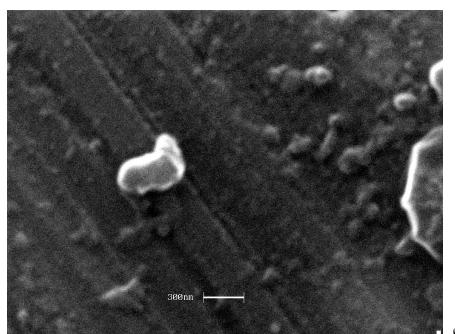


ب

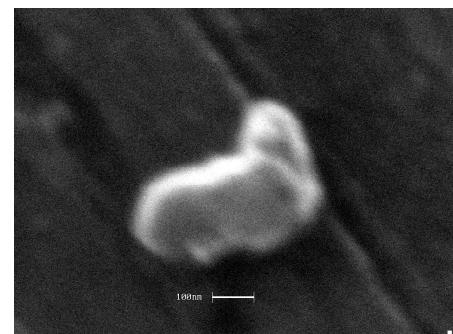


الف

شکل ۶. تصاویر میسل کازئینی در شیر خام مایه پنیر خورده در سرما، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (در شکل الف و ب : بزرگنمایی برابر $100/000$ برابر).

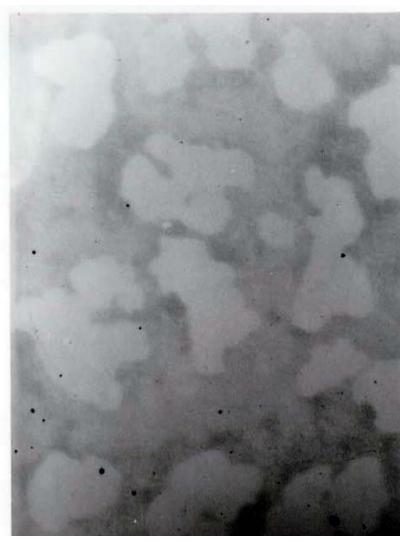


ب

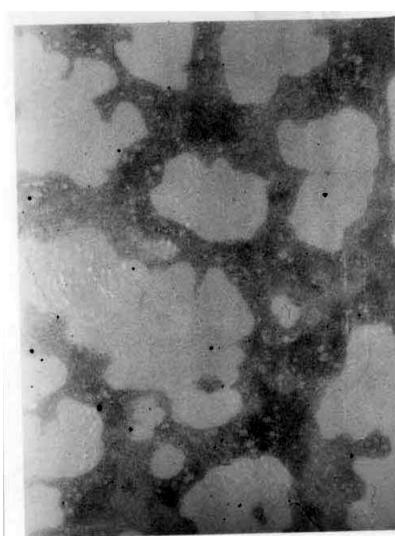


الف

شکل ۷. تصاویر میسل کازئینی در شیر پاستوریزه مایه پنیر خورده در سرما با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (در شکل الف مقیاس (بار) = 100 نانومتر و در شکل ب مقیاس (بار) = 300 نانومتر)



ب



الف

شکل ۸. تصاویر میسل کازئینی در شیر پاستوریزه مایه پنیر خورده در سرما با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (در شکل الف و ب : بزرگنمایی برابر $100/000$ برابر).

است (۹، ۱۴ و ۱۸). هم در شیر خام و هم در شیر پاستوریزه، میسل‌ها دارای سطح یکنواختی هستند و حالت الحاقی که در برخی تصاویر ملاحظه می‌شود، ناشی از تراکم ذرات به دنبال عمل سانتریفوژی است که نیروی ۴۸۰۰۰ برابر شتاب ثقل بر آنها اعمال نموده است (۸ و ۲۰). در تصاویر ۳ و ۴ برخلاف تصاویر ۱ و ۲ نوعی عدم یکنواختی سطحی دیده می‌شود که می‌تواند ناشی از کمپلکس کاپا-کازئین و بتا-لاتکتوگلوبولین به دنبال اعمال پاستوریزاسیون باشد (۲، ۱۲، ۲۲ و ۲۳). در کنار این احتمال، تبدیل بخشی از کلسیم محلول به کلسیم کلوئیدی به علت حرارت، منجر به بزرگ‌تر شدن قطر میسل می‌شود که این تفاوت نیز در قیاس با اندازه میسل‌های شیر خام تا حدی قابل ارزیابی است.

در تصاویر ۵، ۶ و ۷ علت ایجاد حالت کشیده یا غیر کروی را می‌توان به تجزیه کاپا-کازئین در اثر عمل مایه پنیر، خروج نسبی بتا کازئین از ساختمان میسلی در سرما و نیز حلایت بیشتر فسفات کلسیم کلوئیدی در سرما و خروج از میسل کازئینی، مرتبط دانست (۴، ۶ و ۷). در مجموع تحولات مذکور اثر خود را در شکل میسل‌ها باقی گذاشته‌اند. اصولاً بعد از تکمیل فاز اول عمل مایه پنیر و خروج ماکروپیپید محلول که از نظر بار الکتریکی منفی غنی است، پارا-کازئین باقی‌مانده با سایر کازئین‌ها، اشکال جدید میسلی را پدید می‌آورد که به علت کاهش بار منفی، حالت دافعه چندانی نداشته و می‌توانند به هم متصل شوند. این اتصالات زمینه انعقاد را فراهم می‌نمایند که البته پدیده انعقاد بدون تأثیر کلسیم یونیزه و در سرما به معنی واقعی رخ نمی‌دهد. ولی به هر حال تمایل به الحاق ذرات میسلی در حالت ابتدایی به وضوح قابل مشاهده است (۳). با توجه به این اشکال، بسیار دشوار است که آثار پاستوریزاسیون را در نمونه‌های مایه پنیر خورده، تشخیص داد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که شکل میسل کازئینی شیر خام کروی یا بیضوی است، ولی تیمار حرارتی پاستوریزاسیون،

میکروسکوپ گذاره تهیه شده‌اند، نشان داده شده است. همچنان که این تصاویر نشان می‌دهند، سطح میسل کازئینی یکنواخت بوده و برخی از میسل‌های کازئینی به صورت مجتمع دیده می‌شوند، این تصاویر با یافته‌های دیگر پژوهشگران هم خوانی دارد (۸، ۱۸، ۲۰ و ۲۱).

در شکل‌های ۳ و ۴، به ترتیب تصاویر میکروسکوپی میسل‌های کازئینی شیر پاستوریزه ملاحظه می‌شوند. در این تصاویر حالت عدم یکنواختی بیشتری نسبت به تصاویر میسل کازئینی شیر خام، قابل رویت است و با مقایسه ابعاد میسل‌ها، خصوصاً در تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره مشخص می‌شود که در شیر پاستوریزه، ابعاد میسل کازئینی تا حدی بزرگ‌تر از همان ذرات در شیر خام است. در این تصاویر نیز می‌توان برخی کازئین‌ها را به صورت توده‌ای یافت.

۲. نتایج مربوط به تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی از میسل‌های کازئینی در شیر خام و شیر پاستوریزه مایه پنیر خورده در سرما

در شکل‌های ۵ و ۶ به ترتیب تصاویر میکروسکوپی میسل‌های کازئینی شیر خام مایه پنیر خورده در سرما ملاحظه می‌شود. همان طور که ملاحظه می‌شود ذرات حالت کشیدگی پیدا کرده و ساختمان طبیعی آنها تغییر نموده است.

در شکل‌های ۷ و ۸ به ترتیب تصاویر میکروسکوپی میسل‌های کازئینی شیر پاستوریزه مایه پنیر خورده در سرما نشان داده شده است. تغییر شکل میسلی در قیاس با شکل‌های ۵ و ۶ به وضوح قابل مشاهده است و حالت مدور و یکنواخت جای خود را به اشکال کشیده یا فاقد شکل هندسی مشخص داده است.

بحث

قطر متوسط میسل‌های کازئینی در شیر خام کمتر از قطر متوسط این ذرات در شیر پاستوریزه است به گونه‌ای که این یافته‌ها با اطلاعات ارائه شده در تجربیات مشابه، مطابقت دارد و قطر متوسط میسل‌های کازئینی در شیر خام حدود ۸۰–۱۰۰ نانومتر

بر تغییرات اندازه میسل‌ها بررسی نمود و تغییرات شکل و اندازه مسیل‌ها را به دنبال عمل مایه پنیر در دماهای مختلف، ارزیابی کرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، به علت فراهم نمودن شرایط انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

اندکی عدم یکنواختی را بر سطح میسل کازئینی ایجاد می‌کند. در ضمن با کامل شدن فاز اول عمل مایه پنیر بر روی کاپا-کازئین توأم با نگهداری شیرمایه خورده در سرما، حالت کروی و یکنواختی میسل زایل شده و جای خود را به کشیدگی و بی‌شکلی می‌دهد. تصاویر تهیه شده با هر دو میکروسکوپ نشان می‌دهند که به دنبال عمل مایه پنیر، الحاق ذرات تغییر یافته به صورت ابتدایی شروع می‌شود، ولی در سرما هرگز به پدیده انعقاد شیر، منجر نمی‌شود. امید است که در تکمیل این پژوهش بتوان آثار تیمارهای حرارتی مختلف را

منابع مورد استفاده

- احسانی، م. و م. رجائی. ۱۳۶۸. مکانیزم‌ها و عوامل انعقاد شیر. کتاب علمی- فنی، شماره ۴۱، انتشارات مؤسسه تحقیقات دامپروری، کرج، ایران.
- آنکوژل ا.، تکنولوژی شیر و فرآورده‌های لبنی (ترجمه مرتضوی، ع.، م. قدس روحانی، و ح. جوینده). ۱۳۷۴. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.
- Alais, C. 1984. Science du lait. Sep. Paris.
- Anon. 1995. Dairy processing handbook. Tetra pak processing systems AB, S-221, 86. Lund, Sweden.
- Brooker, B. E. and K. Wells. 1984. Preparation of dairy products for scanning electron microscopy: etching of epoxy resin-embedded material. J. Dairy Res. 51: 605-613.
- Creamer, L. K., J. E. Plowman, M. J. Liddell, M. H. Smith and J. P. Hill. 1998. Micelle stability: *k*-casein structure and function. J. Dairy Sci. 81: 3004-3012.
- Dagleish, D. G. 1998. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. J. Dairy Sci. 81: 3013-3018.
- Davies, F. L., P. A. Shankar, B. E. Brooker and D. G. Hobbs. 1978. A heat-induced change in the ultrastructure of milk and its effect on gel formation in yoghurt. J. Dairy Res. 54: 53-58.
- De Kruif, C. G. 1998. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. J. Dairy Sci. 81: 3019-3028.
- Farrell, H. M., Jr., E. D. Wickham and M. L. Groves. 1998. Environmental influences on purified *k*-casein: disulfide interactions. J. Dairy Sci. 81: 2974-2984.
- Grace, V., G. A. Houghtby, H. Rudnick, K. Whaley and J. Lindamood. 1992. Sampling Dairy and Related Products. PP. 59-84. In: R. T. Marshal (Ed.), Standard Methods for The Examination of Dairy Products. American Public Health Association, Washington D.C.
- Heertje, I. and M. Paques. 1995. Advances in electron microscopy. PP. 1-52. In: E. Dickinson (Ed.), New Physico-Chemical techniques for the characterization of complex food systems. Chapman and Hall Pub., London, England.
- Kalab, M. 1977. Electron microscopy in dairy research. MSC-SMC Bulletin, 4-10.
- Kalab, M. 1979. Microstructure of dairy foods. 1. Milk products based on proteins. J. Dairy Sci. 62: 1352-1364.
- Kalab, M. 1985. Microstructure of dairy foods: 2. Milk products based on fat. J. Dairy Sci. 68: 3234-3248.
- Kalab, M. 1993. Practical aspects of electron microscopy in dairy research. Food structure 12: 95-114.
- Kalab, M. and V. R. Harwalkar. 1972. Milk gel structure. I. Application of scanning electron microscopy to milk and other food gels. J. Dairy Sci. 56: 835-842.
- Knoop, E. 1972. Strukturaufklärungen durch elektroenmikroskopische Untersuchungen an Eiweiss und Milchfett. Milchwissenschaft 27: 364-371.
- Mc Mahon, D. J. and W. R. Mc Mannus. 1998. Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. J. Dairy Sci. 81: 2985-2993.
- Morr, C. V. 1967. Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. J. Dairy Sci. 50: 1744-1749.

- 21.Needs, E. C., M. Capellas, A. Patricia Bland, P. Manoj, D. Macdougal and G. Paul. 2000. Comparison of heat and pressure treatment of skim milk, fortified with whey protein concentrate, for set yogurt preparation: effect on milk proteins and gel structure. *J. Dairy Res.* 67: 329-348.
- 22.Needs, E. C., R. A. Stenning, A. L. Gill, V. Ferragut and G. T. Rich. 2000. High-pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *J. Dairy Res.* 67: 31-42.
- 23.Park, S. Y., K. Nakamura and R. Niki. 1996. Effect of B-Lactoglobulin the rheological properties of casein micelle rennet gels. *J. Dairy Sci.* 79: 2137-2145.
- 24.Renault, C., E. Gastaldi, L. Cuq and de La Fuente Tarodo. 2000. Effect of temperature of milk acidification on rennet gel properties. *J. Food Sci.* 65: 630-634.
- 25.Schmidt, D. G., P. Walstra and W.Buchheim. 1973. The size distribution of casein micelles in caws milk. *Netherlands Milk and Dairy J.* 27: 128.
- 26.Scott, R. 1986. Cheese Making Practice. PP: 129-331. Elsevier Applied Science Pub., London, England.