Archive of SID

مطالعه میسل های کازئین در شیرخام با مقادیر مختلف سلولهای پیکره ای با استفاده از میکروسکپ الکترونی نگاره ای

مریم مصلحی شاد[1*]، حمید عزت پناه[2]

1- کارشناس ارشد، علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات- باشگاه پژوهشگران جوان
2- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات تهران
(تاریخ دریافت: 87/6/14 تاریخ پذیرش:87/12/11)

چکیده

بیماری ورم پستان موجب افت کیفیت شیرخام می شود و فعالیت پروتئولیتیک بیشتری را در شیر حاصل از دام مبتلا به ورم پستان در پی دارد. تا کنون گزارشی در خصوص تاثیر سلامت دام بر ریزساختار میسل کازئین منتشر نشده است، بنابراین پژوهش حاضر با هدف تعیین تاثیر شمار سلولهای پیکره ای بر ابعاد و ریزساختار میسل های کازئین در شیرخام صورت گرفت. به این منظور نمونه های شیرخام با تعداد سلولهای پیکره ای پائین (کمتر از 200 هزار)، متوسط (بین 200 تا 800 هزار) و بالا (بیش از 800 هزار سلول در میلی لیتر) از کارتیه دامهای شیری تهیه گردید و پس از آماده سازی، به وسیله میکروسکپ الکترونی نگاره ای مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که اندازه میسل کازئین در دام مبتلا به بیماری ورم پستان تغییر می نماید و تفاوت قابل ملاحظه ای بین ریزساختار میسل کازئین در نمونه های شیر با شمار سلولهای پیکره ای بالا و پائین وجود دارد. متوسط قطر میسل ها در نمونه های با سلولهای پیکره ای متوسط و بالا به طور قابل ملاحظه ای کاهش می یابد و تصاویر میکروسکپ الکترونی نگاره ای نشان می دهد که تمایل به متجمع شدن در نمونه های شیر به غیر از نمونه های با تعداد سلول پایین، به خصوص در نمونه شیر با سلولهای پیکره ای بالا به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد. به نظر می رسد مهمترین عامل هیدرولیز کازئین ناشی از افزایش فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک مانند پلاسمین و آنزیم های لیزوزومی نظیر الاستاز، کاتپسین B، کاتپسین D، کاتپسین G به ویژه در شیر با شمار سلولهای پیکره ای بالاست، که می تواند موجب کاهش اندازه و افزایش تمایل به تجمع میسل های کازئین در شیر دام مبتلا به بیماری ورم پستان شود. به علاوه ممکن است به عوامل دیگری همانند توانایی کمتر سنتز شیر و دافعه فضایی و الکترواستاتیک پائین تر بین میسل های کازئین نیز در این زمینه اشاره داشت.

کلید واژگان: سلول پیکره ای، شیرخام، میکروسکپ الکترونی نگاره ای، میسل کازئین

1- مقدمه

بیماری ورم پستان[1] (التهاب غدد پستانی دام) نوعی واکنش التهابی در برابر عفونت است و با هجوم گلبولهای سفید (سلولهای پیکره ای[2]) به غدد پستانی دام بروز می کند. افزایش سلولهای پیکره ای به عنوان شاخص این بیماری محسوب می گردد و از شاخصه های مهم تعیین کیفیت شیر خام نیز به شمار می آید [1].

این بیماری در سراسر جهان خسارات اقتصادی فراوانی را برای دامداران وتولید کنندگان فرآورده های شیری در پی دارد و عمده ترین خسارات ناشی از آن شامل کاهش تولید شیر، افت قیمت شیر، افزایش شیر دور ریز، هزینه های مربوط به جایگزینی دام، هزینه های دارو، درمان وخدمات دامپزشکی و هزینه های مربوط به کار اضافی می باشد. همچنین، بروز این

*مسئول مکاتبات: mmoslehishad@gmail.com

1. Mastitis
2. Somatic cells

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری مشکلات دیگری نظیر افت کیفیت حسی شیر و ارزش تغذیه ای آن، حضور بقایای آنتی بیوتیک، افزایش بار میکروبی شیر، به مخاطره انداختن سلامت مصرف کنندگان و محدودیتهایی در فرآوری فرآورده های تخمیری را به همراه دارد [3،2].

این بیماری با افزایش شمار سلولهای پیکره ای، مقدار pH، کلر، سدیم، پروتئوزپپتون، پروتئین های محلول نشأت گرفته از خون همراه است. در عین حال از میزان کازئین، لاکتوز، چربی، کلسیم و پتاسیم کاسته می شود. در اثر این عارضه مقدار و فعالیت بسیاری از آنزیم ها نظیر پلاسمین[1]، الاستاز[2]، کاتپسین[3] G، کاتپسین B و کاتپسین D و بسیاری از دیگر آنزیم ها افزایش می یابد. نتیجه حضور این آنزیم ها بویژه پروتئازها، اثرات مخرب و جبران ناپذیر بر کیفیت شیر و محصولات آن خواهد بود [4].

با آنکه گزارشات بین المللی قابل توجهی در مورد عوارض و نشانه های این بیماری در دسترس است، اما تا این زمان اطلاعات مستندی دال بر تاثیر سلامت دام بر ویژگیهای میسل های کازئین منتشر نشده است [6، 5]. در این مطالعه، با بررسی اثر بروز این بیماری بر اندازه، شکل و وضعیت ظاهری میسلهای کازئین به عنوان عامل مؤثر بر پایداری کلوئیدی و خصوصیات رئولوژیک فرآورده های شیری سعی می شود اثرات عینی افزایش شمار سلولهای پیکره ای بر میسل کازئین مورد بررسی قرار گیرد.

جهت بررسی اندازه و وضعیت ظاهری میسل های کازئین غالبا از روشهایی مانند پراکنش نور[4] و میکروسکپ الکترونی[5] استفاده می شود. میکروسکپ الکترونی یکی از بهترین روشهایی است که برای تعیین اندازه ذرات کوچک و بررسی مشخصه های ظاهری آنها مورد استفاده قرار می گیرد. مطالعه اندازه ذرات با استفاده از روش پراکنش نور به دلیل حضور بقایای چربی در شیر بدون چربی، به نتایج غیر واقعی خواهد انجامید و ابعاد میسل های کازئین بزرگتر از اندازه حقیقی تعیین خواهد شد. ضمن اینکه حضور لایه آب در اطراف میسل های کازئین نیز موجب بروز خطا می شود. بنابراین میکروسکپ الکترونی روشی کارآمد جهت مطالعه میسل های کازئین محسوب می شود و سایر روشها نظیر روش پراکنش نور، الکتروفوز، اولتراسانتریفوژ جهت فراهم آوردن سایر اطلاعات اهمیت دارند [7].

بر این اساس، در این مطالعه با بهره گیری از میکروسکپ الکترونی نگاره ای[6] به بررسی اندازه و وضعیت ظاهری میسل های کازئین در سطوح مختلف سلولهای پیکره ای پرداخته شد.

2- مواد و روشها

2-1- مواد مصرفی و وسایل

نمونه های شیرخام از یکی از دامداری های صنعتی اطراف تهران تهیه گردید. به منظور تثبیت نمونه ها از گلوتارآلدئید مخصوص میکروسکوپ الکترونی ساخت شرکت TAAB انگلیس استفاده شد. وسایل و دستگاههای مورد استفاده در این تحقیق شامل میکروسکوپ الکترونی نگاره ای مدل XL30 ساخت شرکت فیلیپس کشور هلند؛ جایگاه نمونه[7] مخصوص میکروسکوپ الکترونی نگاره ای؛ دستگاه پوشش دهندهٔ طلا[8] مدل SCDOOS ساخت شرکت BAL-TEC سوئیس؛ خشک کن تصعیدی[9] مدل LY ساخت شرکت Snijders Scientific هلند؛ سانتریفوژ آزمایشگاهی نوع H-200NR ساخت شرکت Kokusan ژاپن؛ اولتراسانتریفوژ آزمایشگاهی نوع JA-21 ساخت شرکت Beckman امریکا و دستگاه فوسوماتیک مدل 5000 ساخت کشور دانمارک بودند.

2-2- روشها

2-2-1- نمونه گیری، انتقال و آماده سازی نمونه ها

در یک دامداری صنعتی، تعدادی از دامهایی که از نظر سن، نژاد و دوره شیردهی در شرایط مشابه بودند، انتخاب شدند. سپس از شیر هر یک از کارتیه ها نمونه گیری شد و تعداد سلولهای پیکره ای در آنها تعیین گردید، به این ترتیب دامها بر اساس تعداد سلولهای پیکره ای در سه گروه دسته بندی شدند: گروه 1 کمتر از 200 هزار، گروه 2 بین 200 تا 800 هزار و گروه 3 با بیش از 800 هزار سلول پیکره ای در هر میلی لیتر شیر. نمونه گیری براساس استاندارد ISO شماره 707 و AAOC شماره 26-970 انجام شد و سپس نمونه ها بر اساس استاندارد AOAC شماره 12- 968 به سرعت به آزمایشگاه منتقل گردید. در حین انتقال، نمونه ها در دمای $4 \pm 1^{\circ}C$ نگهداری شدند [9،8].

بخشی از نمونه های شیرخام جهت شمارش سلولهای پیکره ای به آزمایشگاه منتقل گردید و بخش دیگری از نمونه ها پس

1. Plasmin
2. Elastase
3. Cathepsin
4. Light Scattering
5. Electron Microscope

6. Scanning Electron Microscope
7. Stub
8. Gold Coater
9. Freeze Dryer

www.SID.ir

Archive of SID

از آماده سازی به وسیله میکروسکپ الکترونی نگاره ای مورد مطالعه قرار گرفتند.

2-2-2- شمارش سلولهای پیکره ای

شمارش سلولهای پیکره ای بر اساس استاندارد AOAC شماره 26- 978 صورت گرفت و تعداد سلولهای پیکره ای به وسیله دستگاه فوسوماتیک5000 دانمارک تعیین شد.

2-2-3- آماده سازی نمونه برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نگاره ای

در این پژوهش ابتدا چربی نمونه های شیرخام به وسیله سانتریفوژ آزمایشگاهی و با نیروی نسبی در حدود 6190 برابر شتاب ثقل به مدت زمان 20 دقیقه در دمای$4^{\circ}C$ جدا شد. نمونه های شیرخام بی چربی به منظور جدا کردن بخش کازئینی در دمای$2^{\circ}C$ به مدت زمان 20 دقیقه بوسیله اولتراسانتریفوژ آزمایشگاهی با نیروی نسبی در حدود 48000 برابر شتاب جاذبه، تحت تاثیر نیروی گریز از مرکز قرار گرفتند و بخش ته نشین شده از سرم فوقانی به آرامی جدا گردید.

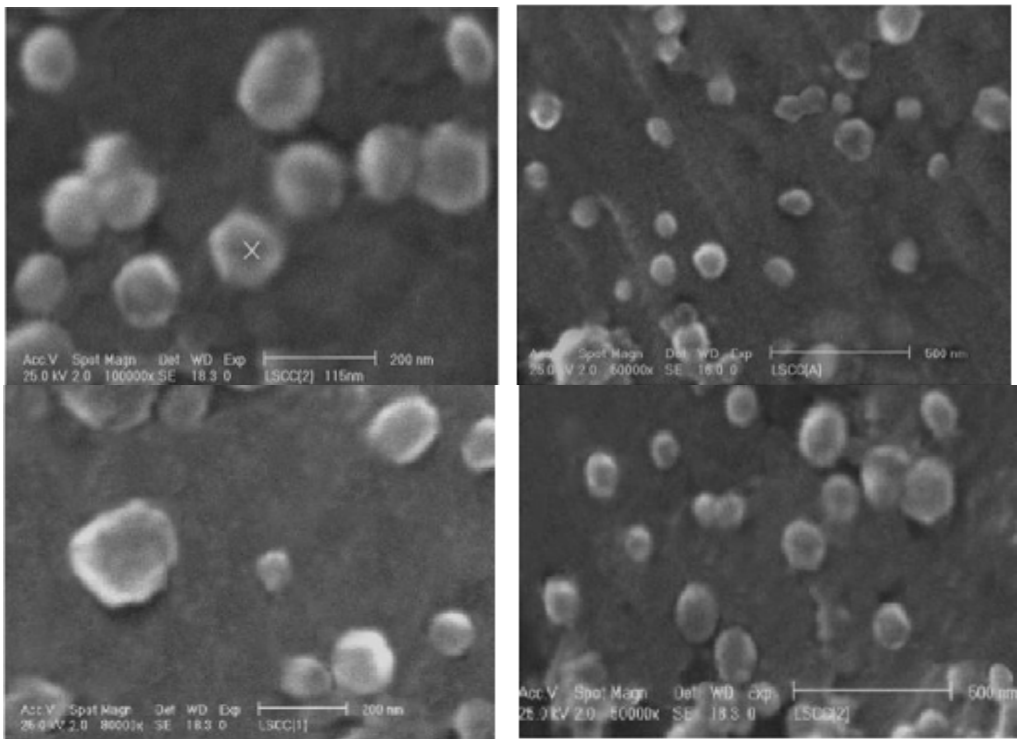
سپس نمونه ها در گلوتارآلدئید 3 درصد، به مدت 20 دقیقه تثبیت شدند و در مرحلهٔ بعد نمونه های تثبیت شده روی جایگاه نمونه ویژه میکروسکوپ الکترونی نگاره ای افشانده شدند. پس از آن نمونه ها به مدت 4 ساعت در دستگاه خشک کن تصعیدی قرار گرفتند. بر نمونه های خشک شده لایه ای از طلا به ضخامت 5 نانومتر نشانده شد، این کار به وسیله دستگاه پوشش دهندهٔ طلا صورت گرفت و سپس این جایگاه در محل مخصوص، در میکروسکپ قرار داده شد. مطالعه و تصویر برداری به کمک میکروسکپ الکترونی نگاره ای صورت گرفت و اندازه شماری از میسل های کازئین منفرد با استفاده از میکروسکپ سنجیده شد [10].

2-3- روش تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از جداول تجزیه و تحلیل واریانس(ANOVA) استفاده شد و در صورت معنی دار بودن داده ها، آزمون مقایسه میانگین LSD به کار رفت. به این منظور، از نرم افزارهای آماری SPSS استفاده شد.

3- نتایج و بحث

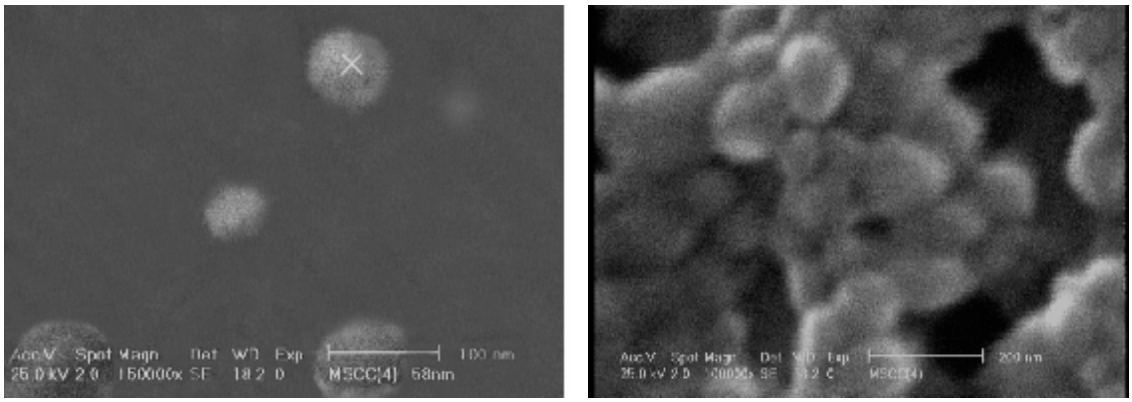
تصاویر حاصل از مطالعه به وسیله میکروسکپ الکترونی نگاره ای در نمونه های شیرخام با سطوح سلولهای پیکره ای پائین، متوسط و بالا به ترتیب در شکل های 1، 2 و 3 نشان داده شده است.



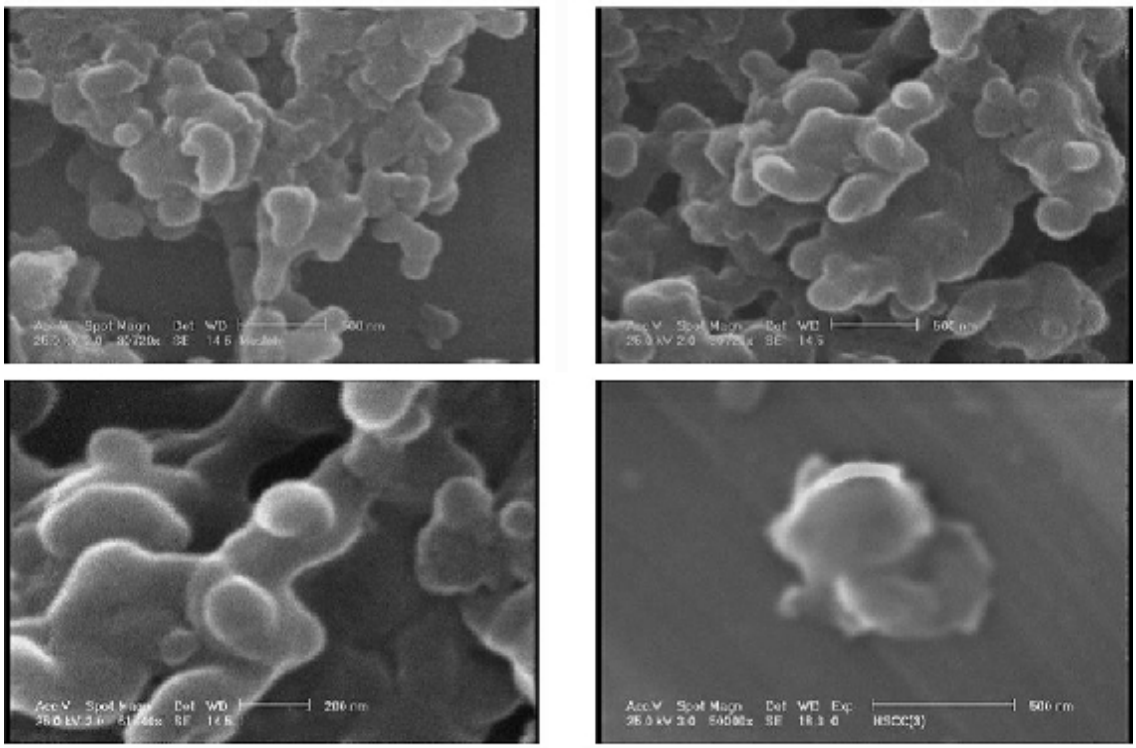
شکل 1 تصاویر حاصل از میسلهای کازئین شیرخام با تعداد سلولهای پیکره ای پائین (کمتر از 200 هزار سلول در میلی لیتر) به وسیله میکروسکپ الکترونی نگاره ای با ولتاژ 25 کیلو ولت و نمایش قطر یکی از میسل های کازئین که معادل 115 نانومتر می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 2 تصاویر میسلهای کازئین شیرخام با تعداد سلولهای پیکره ای متوسط (بین 200 هزار تا 800 هزار سلول در میلی لیتر) با میکروسکپ الکترونی نگاره ای با ولتاژ 25 کیلو ولت و نمایش قطر یکی از میسل های کازئین.



شکل 3 تصاویر میسل های کازئین شیرخام با تعداد سلولهای پیکره ای بالا (بیش از 800 هزار سلول در میلی لیتر) به وسیله میکروسکپ الکترونی نگاره ای با ولتاژ 25 کیلو ولت.

بررسی تصاویر فوق نشان داد که میانگین قطر میسل های کازئین در نمونه های شیرخام با افزایش تعداد سلولهای پیکره ای کاهش می یابد و پس از محاسبه ابعاد میسل مشخص شد که این ابعاد در شیرخام با شمار سلولهای پیکره ای پائین، متوسط و بالا به ترتیب معادل: 5/156 ± 834 /117، 4/705 ± 92/8464 و 4/729 ± 70/7143 نانومتر است. تجزیه و تحلیل آماری مقایسه میانگین قطر میسل ها نشان می دهد که بین گروه یک و گروه 2 و 3 سلولهای پیکره ای در سطح $p < 0/01$ از نظر قطر اختلاف معنی دار وجود دارد، همچنین بین گروه 2 و 3 تفاوت معنی دار در سطح $p < 0/05$ مشاهده شد.

علاوه بر تفاوت بالا، به نظر می رسد با افزایش شمار سلولهای پیکره ای تمایل بیشتری به متجمع شدن میسل های کازئین وجود دارد، بطوریکه در نمونه های حاوی سلولهای پیکره ای بالا تجمع میسل های کازئین کاملا مشهود بوده و این پدیده در حد کمتری در نمونه های دارای 200 تا 800 هزار

www.SID.ir

Archive of SID

سلول پیکره ای دیده می شود، به گونه ای که یافتن میسل های کازئین منفرد به هنگام تصویربرداری در نمونه های شیرخام دارای سلولهای پیکره ای متوسط و به ویژه بالا بسیار مشکل بود. در شیرخام حاصل از دام سالم با شمار سلولهای پیکره ای پائین، تجمع میسل ها چندان مشهود نبوده و بر خلاف نمونه های دارای حد متوسط سلولهای پیکره ای و به خصوص نمونه های شیرخام دام کاملا بیمار، میسل های منفرد کازئین به سهولت یافت شد.

تغییرات رویت شده در وضعیت ظاهری و اندازه میسلهای کازئین می توانند دلایل گوناگون داشته باشند.

از یک سو، اختلال در سنتز کازئین بر اثر بیماری از جمله عوامل تاثیرگذار بر شکل، ابعاد و وضعیت هندسی آن محسوب می شود [11]. از سوی دیگر، این پدیده موجب افزایش فعالیت پروتئازهای مختلف در شیرخام می شود و احتمال دارد تاثیر این پروتئازها بر کازئین منجر به ایجاد تغییر در ساختار و وضعیت میسل های کازئین گردد. پلاسمین از مهمترین پروتئازهایی است که کازئین را در پیوندهای Arg -x و Lys-x هیدرولیز می کند و b - کازئین حساس‌ترین پروتئین شیر نسبت به پلاسمین محسوب می شود. به علاوه a_{s1} و a_{s2} - کازئین نیز به تجزیه شدن با پلاسمین حساسند، اما κ - کازئین نسبت به پلاسمین مقاوم تر است و تصور می‌شود، این مقاومت به علت ساختار آن باشد. پروتئین‌های آب پنیر نیز از جمله بخش های پروتئینی مقاوم به پلاسمین محسوب می شوند که این موضوع نیز احتمالاً به ساختار متراکم آنها بر می گردد [12].

کاتپسین B نیز آنزیم دیگری است که a_{s1} و b -کازئین را هیدرولیز می کند. این آنزیم b - کازئین را در 32 محل و a_{s1} - کازئین را در 35 محل می شکند [13]. پروتئاز دیگر کاتپسین G است که می تواند a_{s1} - کازئین را حداقل در 16 محل و β- کازئین را در 21 محل هیدرولیز کند [14]. پروتئاز دیگری که می تواند بر ساختار میسل کازئین اثر کند، پروتئاز اسیدی تحت عنوان کاتپسین D است [15]. این آنزیم می‌تواند عامل هیدرولیز b - کازئین، a_{s1} - کازئین و κ- کازئین شود به عبارت دیگر بر تمام پروتئین‌ها بجز b - لاکتوگلوبولین اثر می کند. κ - کازئین به طور نسبی توسط کاتپسین D هیدرولیز می شود که حاصل آن اساسا پاراکاپا- کازئین است، البته علاوه بر پیوند 105 و 106 در κ- کازئین پیوندهای Leu_{79}-Ser_{80}، Leu_{32}-Ser_{33} نیز تخریب خواهند شد.

الاستاز آنزیم پروتئولیتیک دیگری است که عمدتاً در لکوسیت های پلی‌مورفونوکلئر[1] وجود دارد و به عنوان یکی از آنزیم های اصلی آنها به شمار می آید. کازئین توسط این پروتئازها تحت تاثیر قرار می گیرد و ترتیب میزان حساسیت کازئین ها به این آنزیم عبارتست از: $\alpha > \beta >> \kappa$- کازئین [14،16]. لازم به توضیح است که بررسی های صورت گرفته با استفاده از الکتروفورز و تعیین مقدار نیتروژن غیر کازئینی در همین نمونه ها، نشان از کاهش توانایی سنتز کازئین و پیدایش تحولات پروتئولیتیک عمیق در نمونه های شیرخام با شمار سلولهای پیکره ای متوسط و به ویژه بالا بوده اند [17].

بنظر می رسد، افزایش حضور آنزیم های بالا در شیر و تاثیر بیشتر آنها بر پیوندهای ذکر شده (از طریق پروتئولیز) بر اندازه و وضعیت هندسی میسلهای کازئین موثرند. به علاوه، تغییر در ترکیب کازئین و مواد معدنی به ویژه کلسیم و فسفر به سبب بروز بیماری ورم پستان نیز احتمالا بر اندازه میسل ها تاثیر گذار است. در ضمن همانطور که تصاویر حاصل از میسلهای کازئین نشان می دهند، با افزایش شمار سلولهای پیکره ای شاهد تجمع میسل های کازئین هستیم. علت این امر احتمالا به سبب اثر پروتئازها به ویژه پلاسمین بر میسل کازئین است. از آنجا که پلاسمین نمی تواند κ- کازئین را بشکند، غیرمحتمل است که بتواند لایه مو مانند سطحی را جدا کند، اما می تواند سایر کازئین های سطحی را هیدرولیز کند (تنها یک سوم سطح میسل را κ- کازئین تشکیل می دهد). به این ترتیب این احتمال پدید می آید که پپتیدهایی با بار منفی آزاد شوند و با کاهش نیروی دافعه الکترواستاتیک و پتانسیل زتا[2] بین میسل ها پایداری آنها کاهش یافته و امکان تجمع میسل های کازئین را فراهم شود. از سوی دیگر هیدرولیز κ- کازئین توسط سایر پروتئازها نظیر الاستاز نیز روی می دهد که نتیجه آن کاهش بار منفی میسل کازئین، کاهش اندازه هیدرودینامیک[3] و آبگرایی[4] میسلی است [18،19].

کاهش ابعاد میسل را می توان از دیگر دلایل احتمالی پدیده متجمع شدن برشمرد زیرا میسل های کوچکتر پتانسیل زتای کمتری دارند و در نتیجه سریعتر از میسل های بزرگ تجمع می یابند [20].

1. Polymorphonuclear
2. Zeta Potential
3. Hydrodynamic
4. Hydration

www.SID.ir

Archive of SID

4- نتیجه گیری

با افزایش شمار سلولهای پیکره ای شیرخام علاوه بر کاهش ابعاد میسل های کازئین، تمایل به تجمع در آنها افزایش می یابد. این پدیده می تواند این احتمال را مطرح نماید که افزایش سلولهای پیکره ای و بیماری ورم پستان با تاثیر بر ساختار میسل های کازئین قادر است خصوصیات رئولوژیک و پایداری کلوئیدی فرآورده های شیری را تحت تاثیر قرار دهد، به گونه ای که اندازه و تمایل به متجمع شدن میسل های کازئینی در شیر دام مبتلا به بیماری ورم پستان با شیر دام سالم کاملا متفاوت است و می توان اینگونه نتیجه گیری نمود که جهت دستیابی به فرآورده های شیری با کیفیت مناسب مسئله سلامت دام باید بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد و این مهم بی شک در سایه برقراری زیرساختهای مناسب در دامداریها و آموزشهای لازم به دامداران و نظارت موثر بر عملکرد آنان امکان پذیر است.

5- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه کارشناس محترم بخش میکروسکپ الکترونی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی به عمل می آید. همچنین از شرکت سهامی شیر ایران به سبب حمایتهای مالی این پژوهش سپاسگزاری می شود.

6- منابع

[1] Bradly, A. J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. Veterinary Journal, 164: 116-128.
[2] Considine, T., Healy, A., Kelly, A. L., and McSweeney, P. L. H. 2000. Proteolytic specificity of elastase on bovine α-casein. Food Chemistry, 69: 19-26.
[3] Garcia, A. D. 2004. Somatic cells and high bacteria counts: How to deal with them. Dairy Science Department. College of agriculture & biological sciences/ South Dakota state university / USDA, 1-4.
[4] Roux, Y. LE., Laurent, F., and Moussaoui, F. 2003. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. Journal of Veterinary Research, 34: 629-645.
[5] Smit, G. 2003. Dairy processing: improving quality. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 25-26.
[6] Srilaorkul, S., Ozimek, L., Ooraikul, B., Hadziyev, D., and Wolfe, F. 1999. Effect of ultrafiltration of skim milk on casein micelle size distribution in retentate. Journal of Dairy Science, 74: 50-57.
[7] Ruettimann. K. W., Ladisch M. R., 1989. Casein micelles: structure, properties and enzymatic coagulation. Enzyme and Microbial Technology, 9: 578-589.
[8] Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official methods of analysis of the AOAC. (15th ed). Arlington, USA.
[9] ISO 707. 1997. Milk and milk products - Guidance on sampling.
[10] Brooker, B. E., and K. Wells. 1984. Preparation of dairy products for scanning electron microscopy: etching of epoxy resin-embedded material. Journal of Dairy Research, 51: 605-613.
[11] Schroeder, J. W. 1997. Bovine mastitis and milking management. North Dakota State University. Online available: http://www.ext.nodak.edu/extpubs/ansci/dairy/as 1129 w. htm.
[12] Whitaker, J. R.,Wong ,W. S., and Voragen, G. J. 2003. Hand book of food enzymology, 257-262.
[13] Considine, T., Healy, A., Kelly, A. L., and McSweeney, P. L. H. 2004. Hydrolysis of bovine caseins by cathepsin B, a cysteine proteinase indigenous to milk. International Dairy Journal, 14: 117–124.
[14] Considine, T., Healy, A., Kelly, A. L., and McSweene, P. L. H. 2002. Proteolytic specifity of cathepsin G on bovine α- and β-caseins. Food Chemistry, 79: 59-67.
[15] Hurley, M. J., Larsen, L. B., Kelly, A. L., and McSweeney, P. L. H. 2000. The milk acid proteinase cathepsin D: a review. International Dairy Journal, 10: 673-681.
[16] Considine, T., Healy, A., Kelly, A. L., and McSweeney, P. L. H. 1999. Proteolytic specificity of elastase on bovine β-casein. Food Chemistry, 66: 463-470.
[17] Moslehishad, M., and Ezzatpanah, H., Aminafshar, M. 2010. Chemical and electrophoretic properties of Holstein cow milk as affected by somatic cell count. International Journal of Dairy Technology, in press.
[18] Crudden, A., Afoufa-Bastien, D., Fox, F. P., Brisson, G., and Kelly, A. L. 2004. Effect of hydrolysis of casein by plasmin on the heat stability of milk. International Dairy Journal, 1-8.
[19] Walstra, P. 1990. On the stability of casein micelles. Journal of Dairy Science, 73: 1965-1979.
[20] Park, S,Y., Niki, R., Sano, Y. 1999. Size effects of casein micelles on rennet gels in the presence of β-lactoglobulin. International Dairy Journal, 9: 379-38

www.SID.ir