

مطالعه میسل‌های کازئینی شیرخام 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) شیرخام و شیرپاستوریزه به وسیله میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و گذاره (Transmission Electron Microscope (TEM)) بررسی گردید. به منظور پاستوریزاسیون شیر از روش کند (Low Temperature long Time (L.T.L.T.)) (دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳۰ دقیقه) استفاده شد. نمونه‌های شیرخام و پاستوریزه از پایلوت پژوهشی دانشکده کشاورزی تهیه و هر یک از آنها به دو قسمت تقسیم شدند. بخش نخست به طور مستقیم مراحل آماده سازی برای مطالعه با میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره و گذاره را گذاراند، در حالی که بخش دوم از نمونه‌های شیرخام و شیرپاستوریزه در دمای ۲°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 شیرخام، نشان دادند که در حالت طبیعی میسل‌های کازئینی دارای ساختمانی کروی و منظم با سطحی صاف و به صورت منفرد 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 (Casein β) از ساختمان میسلی و هم چنین بخشی از کلسیم کلونیدی 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 شیرخام بزرگ‌تر نموده است.

واژه‌های کلیدی: میسل کازئینی، شیرخام، شیرپاستوریزه، 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

اطلاعات به دست آمده از ریز ساختار مواد غذایی، درک ویژگی‌های کاری آنها و هم چنین حساسیت یا مقاومت آنها را در برابر عوامل مختلف، آسان‌تر می‌نماید. داده‌های ناشی از این گونه مطالعات راه‌های جدیدی را در تولید مواد غذایی با ویژگی‌های دلخواه باز می‌کند. استفاده از میکروسکوپ الکترونی یکی از طرق فیزیکی مطالعه برخی ترکیبات شیر است. با این روش می‌توان توزیع فضایی ذرات فاز میسلی شیر، که بیشترین اهمیت را در ثبات آن داراست، ارزیابی نمود. لازم به ذکر است که بررسی ذرات کوچکی مانند میسل‌های کازئینی با میکروسکوپ نوری، دارای محدودیت‌های خاص خود است که از آن جمله، محدودیت در دستیابی به عمق، قابل رویت است. با این نوع میکروسکوپ ذراتی با اندازه بیش از ۵۰۰ نانومتر را می‌توان مشاهده نمود و بنابراین مطالعه ذراتی مانند میسل‌های کازئینی به صورت مجزا، غشای گویچه‌های چربی (Fat Globules Membrane) و ذرات کوچک دیگر ممکن نیست (۱۵). در مقابل با میکروسکوپ الکترونی و به ویژه میکروسکوپ الکترونی گذاره با وضوح کافی می‌توان ذراتی به قطر چند ده نانومتر را نیز مشاهده نمود. بررسی ساختمان میسل‌های کازئینی به کمک میکروسکوپ الکترونی، موضوع پژوهش‌های بسیاری بوده است (۱۶ و ۲۵) و به سبب سهولت و سادگی تهیه نمونه برای کار با میکروسکوپ الکترونی نگاره، ابتدا این نوع میکروسکوپ مورد استفاده قرار گرفت و سپس از میکروسکوپ الکترونی گذاره استفاده شد (۱۷، ۱۹).

بررسی ساختمان طبیعی میسل‌های کازئینی در شیرخام، شکل و ابعاد میسل‌ها را در شرایط طبیعی نشان می‌دهد. مطالعه همین ویژگی‌ها در شیری که شرایط پاستوریزاسیون را تحمل کرده است، تغییرات ایجاد شده در شکل میسل‌ها را نمایان می‌سازد. از سوی دیگر، استفاده از مایه پنیر و به عبارت بهتر عمل کیموزین (Chymosin) یا آنزیم اساسی مایه پنیر بر روی کاپاکازئین که منجر به تجزیه این ترکیب و تولید پاراکاپا-کازئین (Para kappa casein) و گلیکوماکروپپتید

(Glycomacropeptide) در مرحله اول و تشکیل لخته‌های کوچک و سپس بزرگ در مرحله بعد می‌گردد، بر شکل میسل‌های تازه تشکیل شده اثر مشخصی باقی می‌گذارد. اگر کیموزین را در دمای کمتر از ۴ درجه سانتی‌گراد به شیر اضافه شود، بخش اول یعنی آبکافت (Hydrolysis) کاپاکازئین انجام می‌گردد، ولی مرحله دوم یعنی توده‌ای شدن میسل‌های جدید عملی نمی‌شود (۱، ۴، ۱۰، ۲۴). پدیده تجزیه آنزیمی کاپاکازئین موضوع مطالعات گسترده‌ای بوده است (۶، ۹، ۲۳ و ۲۶) ولی آثار این تجزیه در تغییر شکل میسل‌ها موضوع جدیدی است که کیفیت آن به بسیاری از عوامل از جمله اندازه میسل‌ها بستگی دارد که به نوبه خود، اندازه میسل‌ها نیز تابعی از نژاد دام و برخی عوامل دیگر هستند.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

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

مواد

مایه پنیر با منشا قارچی و با قدرت ۱۰۰/۰۰۰ با نام رنی لاز (Rennilase)، محصول شرکت گیسست بروکادس (Gist brocades) هلند.

گلو تار آلدهید (Glutaraldehyde) ۲۵٪، مخصوص میکروسکوپ الکترونی محصول شرکت BDH انگلستان.

کلرور کلسیم بدون آب و خشک، ساخت شرکت مرک (Merck) آلمان.

فسفوتنگستیک اسید (Phosphotungstic acid) خالص و خشک ساخت شرکت مرک آلمان.

وسایل

پولک مسی (Grid) پوشش داده شده با لایه کربن و فرم وار (Formvar)، مخصوص میکروسکوپ الکترونی گذاره.

جایگاه نمونه (Stub) مخصوص میکروسکوپ الکترونی نگاره. خشک کن تصعیدی (Freeze dryer) مدل LY ساخت شرکت

۲ گرم از مایه پنیر خشک در آب جوشیده سرد شده در دمای 25°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 $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ نگهداری شدند. هر چهار نمونه در دمای 2°C ، به مدت ۲۰ دقیقه با سانتریفوژ آزمایشگاهی Beckman مدل JA-21 و با اعمال شتاب 48000 برابر شتاب ثقل ($48000 \times g$)، به مدت ۲۰ دقیقه با هدف تغلیظ میسل‌های کازئینی در رسوب به دست آمده، سانتریفوژ شدند. رسوبات تهیه شده با جدا کردن مایع بخش فوقانی آنها به آرامی جدا شد.

۲. آماده سازی نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ

الکترونی نگاره

نمونه‌های تهیه شده، به مدت ۲۰ دقیقه در گلو تار آلدئید 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 تصعیدی به مدت ۴ ساعت، در دمای 53°C و فشار 0.08 میلی بار، خشک شدند و سپس با استفاده از بخار طلا و تحت خلاء پوششی به ضخامت $2/55$ 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 گلو تار آلدئید ۲۵٪ تثبیت شد. در این مرحله از نسبت ۱ به ۷ گلو تار آلدئید به نمونه استفاده شد. سپس نمونه تثبیت شده با محلول کلرورکلسیم $0.1/0.1$ مولار به نسبت ۵۰ به ۱ مخلوط شد و با روش رنگ آمیزی منفی (Negative staining)

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 انگستان.

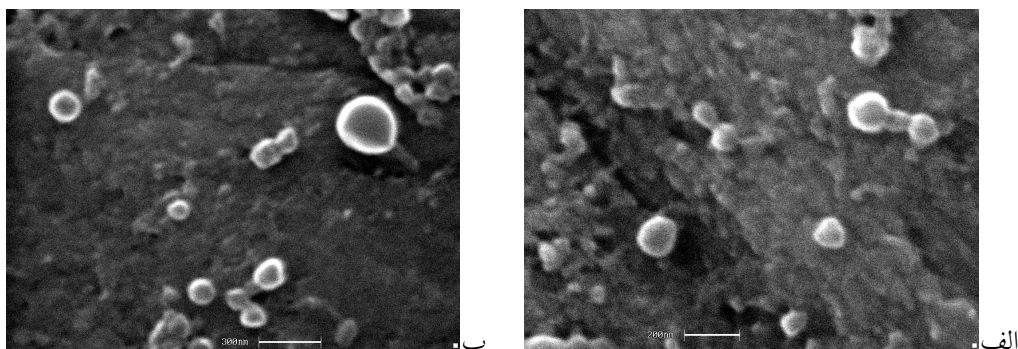
میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل 400-I، ساخت شرکت Leo انگستان با ولتاژ ۵ تا ۲۰ کیلوولت.

روش‌ها

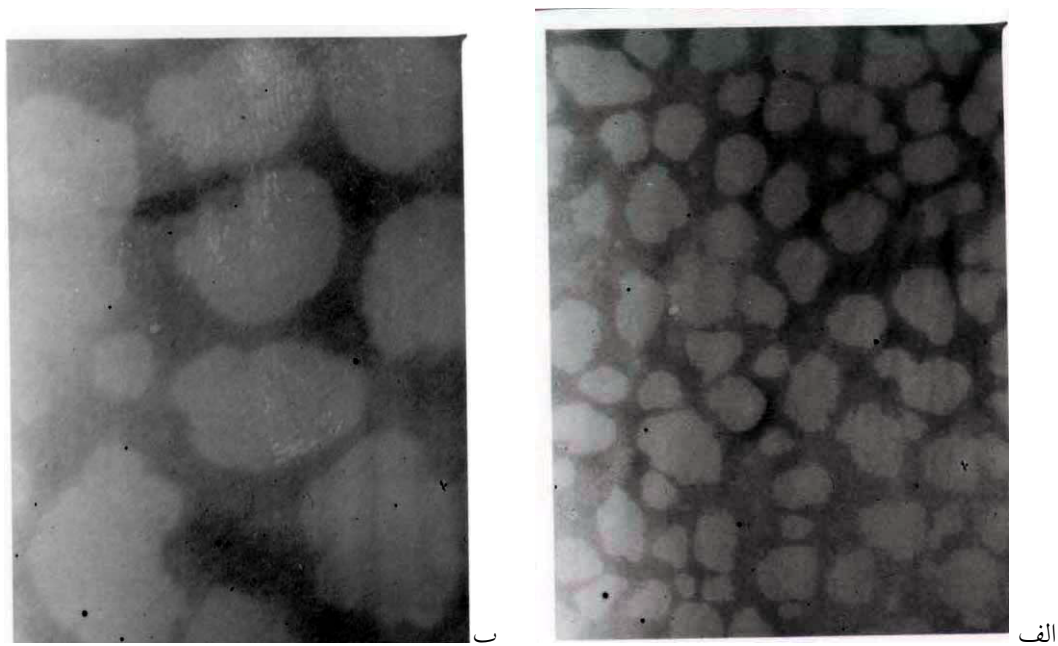
۱. نمونه برداری و آماده سازی نمونه‌ها

شیر خام با چربی ۰/۱ 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 (63°C به مدت ۳۰ دقیقه) پاستوریزه شده و بعد از خنک شدن تا دمای 4°C ، یک لیتر از آن نمونه برداری شد (۱۱).

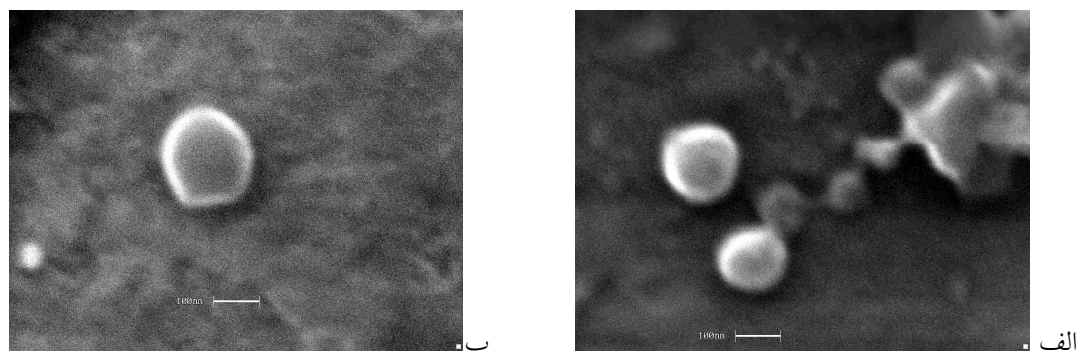
نمونه‌های شیر خام و شیر پاستوریزه در کمترین زمان ممکن و در دمای 4°C به مجتمع آزمایشگاهی منتقل شدند. ابتدا به وسیله سانتریفوژ آزمایشگاهی Kokusan مدل H-200NR و با اعمال شتاب 6190 برابر شتاب ثقل ($6190 \times g$) و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 4°C باقی مانده چربی نمونه‌ها جدا شد. از نمونه‌های شیر خام و شیر پاستوریزه 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.



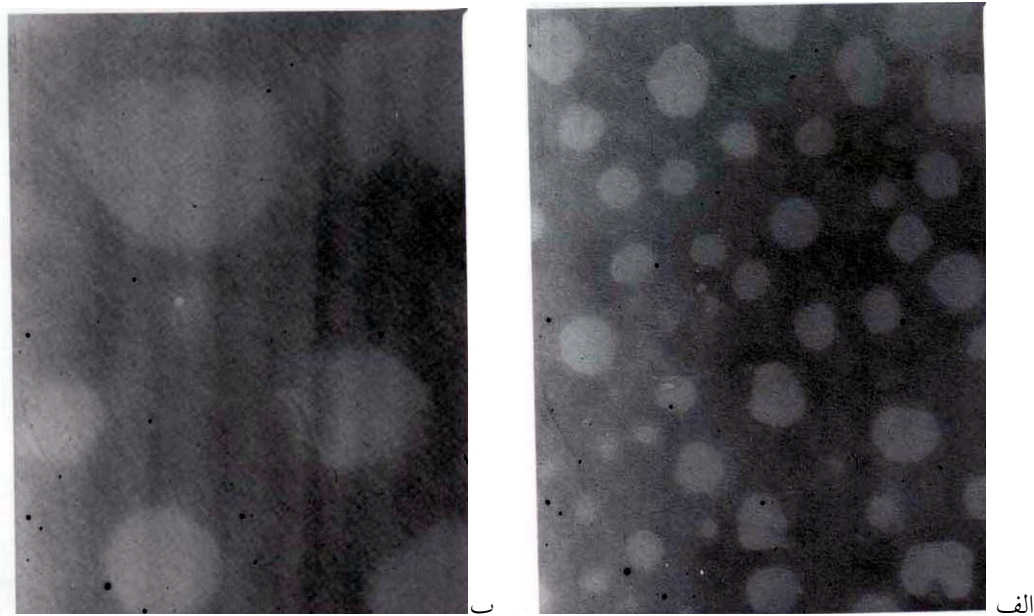
شکل ۱. تصاویر میسل کازئینی در شیر خام با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (در شکل الف مقیاس (بار) = ۲۰۰ نانومتر و در شکل ب مقیاس (بار) = ۳۰۰ نانومتر)



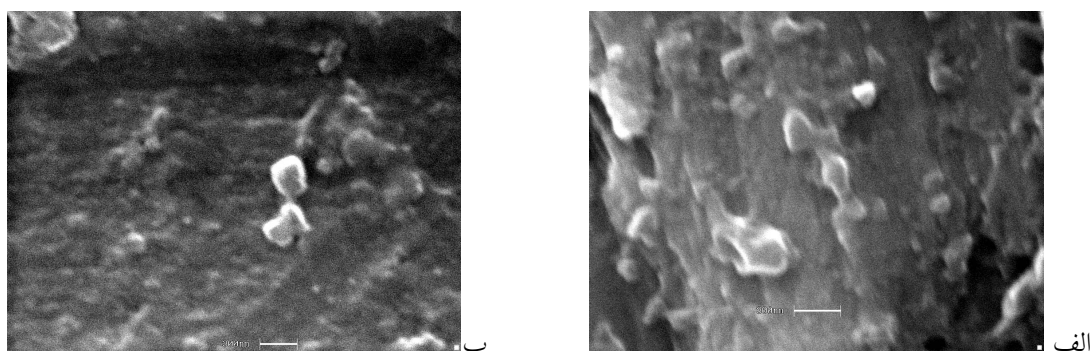
شکل ۲. تصاویر میسل کازئینی در شیر خام، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره در شکل الف: بزرگنمایی برابر ۱۰۰/۰۰۰ برابر و در شکل ب: بزرگنمایی برابر ۲۸۰/۰۰۰ برابر است.



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 شیر پاستوریزه، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره در شکل الف: بزرگنمایی برابر ۱۰۰/۰۰۰ برابر و در شکل ب: بزرگنمایی برابر ۲۸۰/۰۰۰ برابر است.



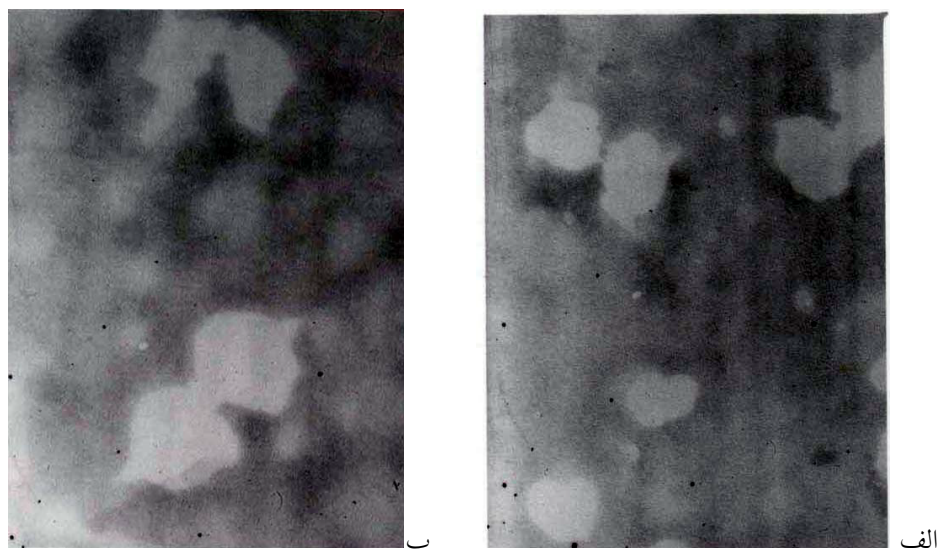
شکل ۵. تصاویر میسل کازئینی در شیر خام مایه پنیر خورده در سرما با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (در شکل الف و ب مقیاس (بار) = ۳۰۰ نانومتر)

در ولتاژ ۸۰ کیلو ولت، مورد مطالعه و تصویر برداری قرار گرفتند.

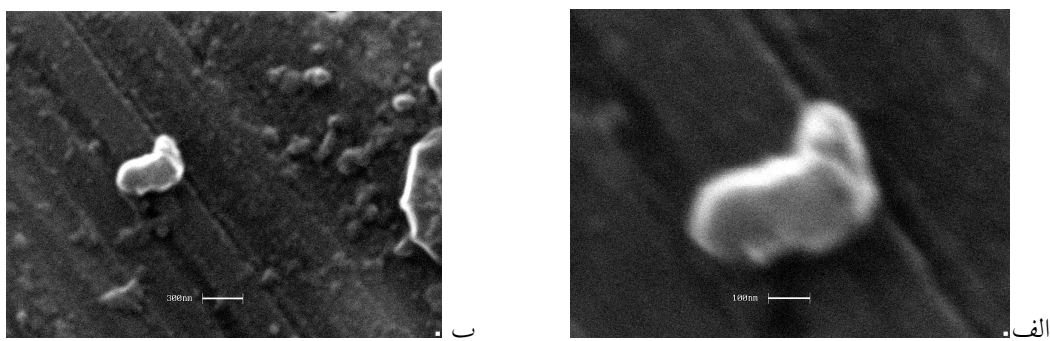
نتایج

۱. نتایج مربوط به تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی از میسل‌های کازئینی در شیر خام و شیر پاستوریزه 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

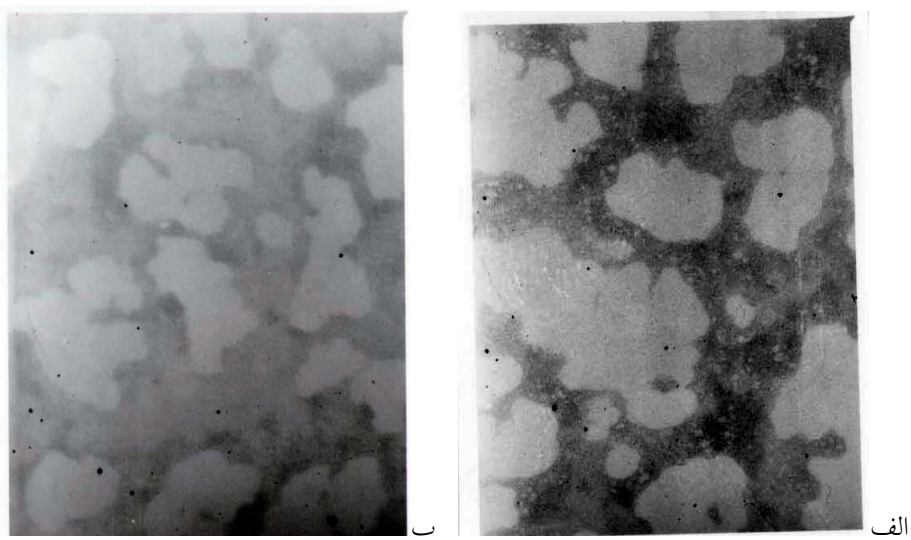
برای مطالعه با میکروسکوپ گذاره آماده گردید (۲۰ و ۲۱). قطره‌ای از نمونه رقیق شده بر سطح پولک مسی ویژه میکروسکوپ الکترونی گذاره، گذاشته شد. پس از یک دقیقه، شیر اضافی به وسیله لبه کاغذ صافی خشک شد. در مرحله بعد یک قطره اسید فسفوتنگستیک ۲٪ بر روی پولک مسی گذاشته شده و باقی‌مانده اسید پس از ۳۰ دقیقه با استفاده از آب مقطر، از سطح پولک مسی، شستشو شد. نمونه‌های مورد نظر در دمای محیط خشک شدند و به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره



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 ۱۰۰/۰۰۰ برابر).



شکل ۷. تصاویر میسل کازئینی در شیر پاستوریزه مایه پنیر خورده در سرما با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (در شکل الف مقیاس (بار) = ۱۰۰ نانومتر و در شکل ب مقیاس (بار) = ۳۰۰ نانومتر)



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 ۱۰۰/۰۰۰ برابر).

است (۹، ۱۴ و ۱۸). هم در شیرخام و هم در شیرپاستوریزه، میسل‌ها دارای سطح یک‌نواختی هستند و حالت الحاقی که در برخی تصاویر ملاحظه می‌شود، ناشی از تراکم ذرات به دنبال عمل سانتریفوژی است که نیرویی ۴۸۰۰۰ برابر شتاب ثقل بر آنها اعمال نموده است (۸ و ۲۰). در تصاویر ۳ و ۴ بر خلاف تصاویر ۱ و ۲ نوعی عدم یک‌نواختی سطحی دیده می‌شود که می‌تواند ناشی از کمپلکس کاپا-کازئین و بتا-لاکتوگلوبولین 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، ۷ و ۸ 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 حلالیت 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 ماکروپپتید محلول که از نظر بار الکتریکی منفی غنی است، پارا-کازئین باقی مانده 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 شیرخام 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 شیرخام، قابل رویت است و با مقایسه ابعاد میسل‌ها، خصوصاً در تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره مشخص می‌شود که در شیرپاستوریزه، ابعاد میسل کازئینی تا حدی بزرگ‌تر از همان ذرات در شیرخام 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 شیرخام و شیر پاستوریزه مایه پنیر خورده در سرما

در شکل‌های ۵ و ۶ به ترتیب تصاویر میکروسکوپی میسل‌های کازئینی شیرخام مایه پنیرخورده 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 پنیرخورده 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 شیرخام 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 شیرخام حدود ۱۰۰-۸۰ نانومتر

بر تغییرات اندازه میسل‌ها بررسی نمود و تغییرات شکل و اندازه میسل‌ها 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

۱. احسانی، م. و م. رجائی. ۱۳۶۸. مکانیزم‌ها و عوامل انعقاد شیر. کتاب علمی-فنی، شماره ۴۱، انتشارات مؤسسه تحقیقات دام‌پروری، کرج، ایران.
۲. آنکوژل ا.، تکنولوژی شیر و فرآورده‌های لبنی (ترجمه مرتضوی، ع.، م. قدس روحانی، و ح. جوینده). ۱۳۷۴. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.
3. Alais, C. 1984. Science du lait. Sep. Paris.
4. Anon. 1995. Dairy processing handbook. Tetra pak processing systems AB, S-221, 86. Lund, Sweden.
5. 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.
6. 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.
7. Dagleish, D. G. 1998. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. J. Dairy Sci. 81: 3013-3018.
8. 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.
9. De Kruif, C. G. 1998. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. J. Dairy Sci. 81: 3019-3028.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Kalab, M. 1977. Electron microscopy in dairy research. MSC-SMC Bulletin, 4-10.
14. Kalab, M. 1979. Microstructure of dairy foods. 1. Milk products based on proteins. J. Dairy Sci. 62: 1352-1364.
15. Kalab, M. 1985. Microstructure of dairy foods: 2. Milk products based on fat. J. Dairy Sci. 68: 3234-3248.
16. Kalab, M. 1993. Practical aspects of electron microscopy in dairy research. Food structure 12: 95-114.
17. 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.
18. Knoop, E. 1972. Strukturaufklarungen durch elektroenmikroskopische Untersuchungen an Eiweiss und Milchwelt. Milchwissenschaft 27: 364-371.
19. Mc Mahon, D. J. and W. R. Mc Mannus. 1998. Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. J. Dairy Sci. 81: 2985-2993.
20. 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. Macdougall 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 on 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 cows milk. *Netherlands Milk and Dairy J.* 27: 128.
26. Scott, R. 1986. *Cheese Making Practice*. PP: 129-331. Elsevier Applied Science Pub., London, England.