

DOKTORSKA DISERTACIJA

MARIJANA Đ. CARIĆ

UNIVERZITET U NOVOM SADU

Tehnološki fakultet

UTICAJ RAZLIČITIH FAKTORA NA FIZIČKO-HEMIJSKE I
TEHNOLOŠKE OSOBINE KAZEINA U MODEL SISTEMIMA

- doktorska disertacija -

Mr Marijana Carić

Novi Sad

1974.

Ova disertacija je radjena na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu i Milchtechnisches Institut-u, Eidgenössische Technische Hochschule u Zürich-u.

Posebno se zahvaljujem prof. dr Jovanu Djordjeviću, pod čijim je rukovodstvom radjen ovaj rad, na brojnim diskusijama i sugestijama.

Takodje se zahvaljujem prof. dr Zdenku Puhanu na pomoći, korisnim savetima i sugestijama, za vreme rada i boravka na Milchtechnisches Institut-u, ETH, Zürich.

Prof. dr Ljubomiru Djakoviću se zahvaljujem na korisnim savetima i diskusijama.

Prof. dr Miroslavu Piletiću se zahvaljujem na korisnim savetima tokom izrade teze i pripremanja rukopisa.

Zahvalnost dugujem i dr Kurt Imhof-u, rukovodiocu istraživačkog centra Ursina-CORECO, na korisnim savetima u toku rada na elektronskom mikroskopu.

Za vreme rada na disertaciji pomogao mi je i mr Petar Dokić, na čemu mu se srdačno zahvaljujem.

Zorki Kosovac, Camilla-i Zbinden, Slobodanu Dikliću i Andreas Hummler-u sam veoma zahvalna na tehničkoj pomoći koju su mi u toku rada na disertaciji pružili.

S a d r ž a j

	Strana
1. U V O D	1
2. PREGLED LITERATURE	5
2.1. UTICAJ POJEDINIH JONA NA STABILNOST KAZEINA	6
2.2. VIZKOZITET KAZEINATNOG RASTVORA	15
2.3. pH KAZEINATNOG RASTVORA	16
2.4. PREČNIK I MICELARNA TEŽINA GLOBULA KAZEINA	17
2.5. UTICAJ ETANOLA NA KAZEIN	23
2.6. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA	25
2.7. KOAGULACIJA KAZEINA HIMOZINOM	31
3. METODIKA ISTRAŽIVANJA	36
3.1. ISPITIVANJE SASTAVA I OSOBINA Na-KAZEINATA	36
3.2. PRIPREMA MODEL SISTEMA	38
3.3. VIZKOZITET MODEL SISTEMA B.1. DO B.8. i C.1. DO C.8.	40
3.4. pH VREDNOST MODEL SISTEMA	41
3.5. ODREĐIVANJE MICELARNE TEŽINE, VELIČINE, RASPODELE VELIČINA I OBLIKA KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMIMA	42

3.5.1. Micelarna težina kazeina u model sistemima B.1. do B.5. i C.1. do C.5.	42
3.5.2. Veličina, raspodela veličina i oblik micela kazeina u izabranim model sistemima	43
3.6. STABILNOST KAZEINA U ODNOSU NA ALKOHOL U MODEL SISTEMIMA	46
3.7. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA	47
3.8. KOAGULACIJA KAZEINA HIMOZINOM U MODEL SISTEMIMA	49
4. REZULTATI I DISKUSIJA	50
4.1. Na-KAZEINAT	50
4.1.1. Sastav Na-kazeinata	50
4.1.2. Osobine Na-kazeinata	51
4.2. VISKOZITET MODEL SISTEMA B.1. DO B.8. i C.1. DO C.8.	54
4.3. pH VREDNOST MODEL SISTEMA	56
4.4. MICELARNA TEŽINA, VELIČINA, RASPODELA VELIČINA I OBLIK KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMIMA	59
4.4.1. Micelarna težina kazeina u model sistemima B.1. do B.5. i C.1. do C.5.	59
4.4.2. Oblik kazeinske micela u izabranim model sistemima	65

4.4.3. Veličina i raspodela veličina kazeinskih micela u izabranim model sistemima	71
4.5. STABILNOST KAZEINA U ODNOSU NA ALKOHOL U MODEL SISTEMIMA	89
4.6. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA	96
4.7. KOAGULACIJA KAZEINA HIMOZINOM U MODEL SISTEMIMA	112
5. ZAKLJUČCI	126
6. LITERATURA	135

1. U V O D

Proteini, kao prirodni makromolekuli, već odavno privlače pažnju i interesovanje istraživača različitog profila - biohemičara, biologa, lekara i tehnologa. Zahvaljujući primeni savremenih naučno-istraživačkih metoda, kao što su elektronska mikroskopija, "light scattering", difrakcija X-zraka, spektrofotometrija, elektroforeza i dr., osobine, osnovne karakteristike strukture i ponašanje proteina su, može se reći, uglavnom poznati. Medjutim, kada je u pitanju kazein, opšta saznanja o proteinima moraju biti dopunjena. Delimično je to i učinjeno, što će se videti iz daljeg izlaganja, ali mogućnost i potreba istraživanja kazeina su još uvek takve da im se ne sagledava kraj. Obrnuto posmatrano, rezultati proučavanja kazeina predstavljaju važan doprinos fundamentalnom saznanju u oblasti hemije proteina.

Poznato je da se kazein u mleku nalazi u obliku Ca-kazeinatno-Ca-fosfatnog kompleksa, micele u čiji sastav ulaze proteinske frakcije kazeina različite elektroforetske pokretljivosti, koje grade kopolimere, zatim kalcijum i fosfat. Intra i inter micelarne veze su kovalentnog tipa, jonske, vodonični mostovi i hidrofobne. Na stanje pomenutih veza u miceli, što znači i

na stabilnost micele, utiče veliki broj spoljnih faktora kao što su: prisustvo i koncentracija različitih organskih i neorganskih jona i molekula u sistemu (Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$, laktoalbumini, laktoglobulini, laktoza, i dr.), posebno koncentracija H^+ , zatim pritisak, temperatura i sl. Da bi u našim ispitivanjima izbegli istovremeni uticaj svih faktora koji postoji u biološkom sistemu, i pri čemu je vrlo teško ili praktično nemoguće tačno ustanoviti uzrok primećenog efekta, s obzirom da navedeni parametri variraju od uzorka do uzorka i deluju u istom ili suprotnom smeru, posmatrali smo kazein u model sistemima. Prednost ovakvog načina rada je očigledna: sastav sistema je uvek poznat i konstantan, sa variranjem onog parametra ili parametara čiji se efekat odnosno korelacija želi da ustanovi. U model sistemima koje smo konstruisali, ispitivan je uticaj pojedinih jona, jonskih grupa i njihovih kombinacija na micelarnu težinu, oblik, veličinu i raspodelu veličina kazeinske micele, stabilnost kazeina prema alkoholu, njegovu termičku stabilnost, kao i osetljivost kazeina na koagulaciju himozinom.

Pored naučnog značaja ovih rezultata, koji treba da doprinesu mogućem objašnjenju koloidnog stanja kazeina, želi se istaći široka mogućnost njihove praktične primene. Retki su procesi u tehnologiji prerade mleka gde ponašanje kazeina nije od značaja. Kod proizvodnje kiselomlečnih proizvoda, sira, kazeina, njegovih

koprecipitata i kazeinata, kazeinskih lepkova, i dr. suština procesa je baš u promenama koje nastaju na kazeinu pod uticajem različitih agenasa. U izvesnim tehnološkim procesima se još uvek nailazi na teškoće u pogledu ponašanja kazeina koga je potrebno stabilizovati, dodavanjem pojedinih soli sa stabilizujućim dejstvom (npr. evaporirano mleko). Dalja važna primena dobijenih rezultata je u budućnosti pri razvijanju novih tehnoloških postupaka proizvodnje mlečnih proizvoda obogaćenih proteinima. Već danas se na tržištu pojavljuju proizvodi tipa pasterizovanog ili uperizovanog mleka, i neke vrste kiselomlečnih proizvoda sa povećanim sadržajem proteina i relativno manjom količinom masti. Najpogodniji oblik kazeina za ovu svrhu s obzirom na rastvorljivost je Na-kazeinat, supstanca koju smo mi ispitivali. Proteinima obogaćeni proizvodi postaju u poslednje vreme naročito aktuelni jer savremeni čovek, preplašen holesterolom i bolestima kardiovaskularnog trakta, vodi računa sve više o kvalitetu hrane koju uzima.

Primena rezultata naših istraživanja je i u razvoju tehnološkog procesa proizvodnje tečne hrane tipa mleka, koja bi sadržala kazein dodat u obliku rastvorljivog kazeinata, stabilizovan dodatkom ispitivanih jona u pogodnom odnosu. Istovremeno bi druge komponente mleka mogle da budu zamenjene odgovarajućim jeftinijim sastojcima: npr. da se u sistem umesto mlečne, uključi biljna mast.

Prezentirani rezultati mogu da budu interesantni i za klaničnu industriju, koja upotrebljava Na-kazeinat (od kako je proizveden, 50-tih godina o.v.) kao sredstvo za vezivanje vode kod jednog dela svojih proizvoda. U pekarskoj industriji se razmatra mogućnost dodavanja Na-kazeinata ne samo kao stabilizatora, nego i u cilju obogaćenja proizvoda prerade brašna proteinima animalnog porekla.

2. PREGLED LITERATURE

U ovom pregledu literature o kazeinu zadržaćemo se uglavnom na prikazu najnovijih shvatanja i rezultata iz oblasti problematike koju tretira ova disertacija, a to je uticaj pojedinih jona: na stabilnost kazeina, na oblik i veličinu prečnika, raspodelu prečnika, kao i micelarnu težinu kazeinskih globula; na stabilnost kazeina prema etanolu; na termičku stabilnost kazeina; i na osetljivost kazeina prema himozinu.

2.1. UTICAJ POJEDINIH JONA NA STABILNOST KAZEINA

Redosled razmatranja uticaja pojedinih jona i jonskih grupa na stabilnost kazeina je sledeći: dvovalentni katjoni (Ca^{2+} , Mg^{2+}), monovalentni katjoni (Na^+ , K^+), i na kraju anjoni fosfat $/(\text{PO}_4)^{3-}/$ i citrat $/(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{-3}/$.

Od svih jona i jonskih grupa najviše su proučavani joni Ca^{2+} , zbog njihovog neospornog uticaja na stabilnost kazeinske micelle i uloge koju ovi joni imaju u velikom broju tehnoloških procesa. Uzrok neopravdanog zapostavljanja istraživanja uticaja ostalih vrsta dvovalentnih jona verovatno bi se mogao tražiti u znatno manjoj količini kojom su oni zastupljeni u mleku (Ca: 123,0 mg%, Mg: 12,0 mg%, Ba: u tragovima, Sr: u tragovima (117)). Zna se da katjoni zemnoalkalnih metala u mleku ulaze u Ca-kazeinatno-Ca-fosfatni kompleks vezujući se primarno za slobodne jonizovane karboksilne grupe asparaginske (7,1% od ukupnih aminokiselina) i glutaminske kiseline (22,4% od ukupnih aminokiselina) (117), i za monoester fosforne kiseline kovalentno vezane za serin i treonin. Za elektrostatičku interakciju pri vezivanju kalcijumovih jona za fosfatne, odnosno karboksilne grupe važi sledeća relacija (66):

$$\bar{v}_i = \sum_{j=1}^n \frac{k_{ij}^0 a_i \exp /-\phi_{i,j}(\bar{Z})/}{1 + \sum_{q=1}^m k_{q,j}^0 a_q \exp /-\phi_{q,j}(\bar{Z})/} \quad /1/$$

gde je:

\bar{v}_i - ukupno vezivanje jonske vrste tipa i u molovima jona na mol proteina

n - ukupan broj položaja (mesta) za vezivanje

m - broj raznih jonskih vrsta koji mogu da se vežu na te položaje

a_i - aktivnost jonske vrste tipa i

a_q - aktivnost jonske vrste tipa q

$k_{q,j}^0$ - konstante vezivanja jonske vrste tipa q na položaj j

$\phi_{i,j}(\bar{Z})$ - promena u molarnoj elektrostatičkoj slobodnoj energiji, koju prouzrokuje promena naboja na položaju j, pri nepromenjenim ostalim naelektrisanjima.

Za konstante vezivanja Ca^{2+} nadjeno je da iznose:

$k_{\text{Ca},\text{C}}^0 = 5,6$ i $k_{\text{Ca},\text{P}}^0 = 72$. Radi uporedjenja citiramo odmah i analogne konstante za vodonik: $k_{\text{H},\text{C}}^0 = 7 \times 10^4$ i $k_{\text{H},\text{P}}^0 = 9 \times 10^5$, odnosno Na: $k_{\text{Na},\text{C}}^0$ je praktično zanemarljiva i $k_{\text{Na},\text{P}}^0 = 1$, koje su ustanovili isti autori.

Grupa autora (64) je ispitujući uticaj Ca^{2+} na strukturu kazeinske micele, ustanovila da uklanjanje odredjenih količina Ca^{2+} iz kazeina dodatkom EDTA

(dinatrijumova so etilen-diamin-tetrasirćetne kiseline) dovodi do dezagregacije i nastajanja tzv. rastvorljivog kazeina i progresivnog smanjenja brzine sedimentacije micela bez menjanja njihovog hidrodinamičnog prečnika, što znači da uklanjanjem Ca^{2+} disocira samo slabo vezani kazein u miceli (uglavnom β - i κ -kazein) dok onaj koji odredjuje veličinu ostaje nepromenjen (α_s). Kod opadanja aktivnosti Ca^{2+} ispod odredjenog nivoa dolazi do potpune disocijacije micela. Hongo i Ohtaka (44) su ispitivali brzinu sedimentacije uzorka (i) normalnog mleka, (ii) mleka kome je sadržaj Ca^{2+} smanjen za 10% jonoizmenjivačem i (iii) mleka kome je dodato 0,2% kalijum citrata. Redosled brzina sedimentacije bio je sledeći: (i) < (ii) < (iii). Druga grupa japanskih autora (56) je ispitujući vezivanje Ca za α_s - i κ -kazein ravnotežnom dijalizom, Sephadex gel filtracijom i centrifugovanjem, ustanovila da kako navedena reakcija napreduje, raste stepen polimerizacije proteina i količina Ca^{2+} vezana za α_s -kazein, što je u skladu sa do sada poznatim činjenicama.

Zittle i njegovi saradnici su prvi počeli da izvode zaključke o kazeinu posmatrajući ga u model sistemima. U jednom njihovom radu (129) je, merenjem ekstinkcije pri talasnoj dužini od 600 m μ , pokazano da sa povećanjem koncentracije CaCl_2 raste stepen agregacije kazeinskih micela u 1% rastvoru Na-kazeinata.

U pogledu stabilizujućeg delovanja κ -kazeina na α_s -kazein u prisustvu kalcijumovih jona Pepper, Hipp i Gordon (82) su isključili uticaj ϵ -amino grupe κ -kazeina.

Prema podacima Dickson-a i Perkins-a (21) redosled po sposobnosti vezivanja zemnoalkalnih metala za kazein je sledeći: $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+}$; odnosno za prečišćene kazeinske komponente: α_{s1} -kazein $>$ β -kazein $>$ κ -kazein. Redosled afiniteta dvovalentnih jona metala prema vezivanju za α_s -kazein je prema drugom izvoru (107) ovakav: $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$, dakle delimično u koliziji sa prethodnim. Joni bakra i cinka su izrazito najjači precipitanti, tako da su autori došli do pretpostavke da postoji određena inverzna zavisnost između rastvorljivosti kazeina i atomskog broja proučavanih dvovalentnih katjona. To su ujedno i jedini nama poznati literaturni podaci koji govore o interakciji kazeina i drugih zemnoalkalnih metala pored kalcijuma.

Od jona alkalnih metala u mleku su prisutni Na: 58 mg%, K: 141 mg% i Li: u tragovima (117). U pogledu dejstva na stabilnost kazeina ispitan je bolje Na^+ , iako je K^+ oko 2,4 puta više zastupljen. Zittle i saradnici su u već pomenutom radu (129) turbidimetrijskim merenjima ustanovili da Na^+ izrazito inhibira agregaciju kazeina sa Ca^{2+} u 1% rastvoru Na-kazeinata, i da ova inhibicija raste sa koncentracijom Na^+ . Uzrok smanjenja aktivnosti Ca^{2+}

nalazi se verovatno u kompeticiji i suprotnom delovanju jona natrijuma i kalcijuma. Na osnovu rezultata Gál-a i Bánkay-a (36), koji su ustanovili da hidratacija kazeina raste sa porastom koncentracije NaCl do zasićenja ovim jonima, može se zaključiti da stabilizacija kazeina natrijumom potiče i od povećane hidratacije ovog proteina u prisustvu Na^+ . Waugh, Creamer, Slattery i Dresdner (114) su za smesu α_s - i β -kazeina dobili povećanje koeficijenta sedimentacije ($S_{20,w}$) i smanjenje unutrašnjeg viskoziteta (η) pri povećanju koncentracije dodatog NaCl, što takodje potvrđuje stabilizujuće dejstvo Na^+ na kazein. Ispitujući rastvorljivost, solvataciju i stabilizaciju α_{s1} - i β -kazeina Thompson et al. (107) su dobili rezultate koji potvrđuju stabilizujuće delovanje jednovalentnih katjona, ovog puta kalijuma na α_s -kazein.

Pored navedenih rezultata, koji se odnose na kazein, u literaturi se mogu naći i podaci o mogućnosti interakcije proteina uopšte, sa jonima metala (77, 78).

Smatra se još od ranije da se kazein u mleku nalazi u obliku Ca-kazeinatnog kompleksa sa Ca-fosfatom tako da se obično kada se pominje ovaj protein u mleku i ne govori o "kazeinu" nego o pomenutom kompleksu. Raspodela fosfatnih jedinjenja u mleku je prema Jenness-u i Patton-u (54) ovakva: fosfat kovalentno vezan za kazein 20%, neorganski fosfati u rastvoru 33%, i koloidni neorganski fosfat 38,5%. Treba napomenuti da se poslednja dva

fosfatna oblika nalaze u medjusobnoj ravnoteži, i da za koloidni neorganski fosfat još nije sa sigurnošću ustanovljeno da li je prisutan kao dikalcijumova ili tri-kalcijumova so. Interesantni su rezultati Pyne-a i McGann-a (87) koji nalaze, na osnovu odnosa (Ca)/(P) da se u prisustvu citrata u mleku ne stvaraju jednostavne soli kalcijuma i fosfora nego kombinovane soli tipa apatita, čiju oni hipotetičku formulu i daju. Na osnovu ovih rezultata pomenuti autori predlažu adekvatniji naziv za koloidni fosfat: koloidni fosfat-citrat. Uloga fosfata u strukturi kazeinske micelle, za koju još uvek postoje više hipoteza (32, 35, 88, 93) kao i uticaj na njenu stabilnost su od nesumnjive važnosti, pa se u literaturi može naći nešto više podataka o interakciji fosfora i kazeina. Američki autori Mills i Topper (70) na uverljiv način, komparativnim eksperimentima sa tkivom mlečne žlezde miša, in vitro, dokazuju da sinteza kazeina bez prisustva P uopšte nije moguća.

Fox (34), na osnovu rezultata proteolize α_{s1} - i β -kazeina koja se odigrala tek po uklanjanju koloidnog fosfata, kada su se kazeinske micelle dezagregirale, zaključuje da koloidni fosfat deluje kao nespecifični agregirajući agens, koji može uspešno da se zameni Ca^{2+} ili κ -kazeinom. Do sličnog zaključka došli su Morr i njegovi saradnici (73) koji tvrde da ako se ukloni koloidni fosfat iz micelle, primećuje se prisustvo submicelarnih

agregata, heterogenih u pogledu veličine i nejednakih po sastavu. Whikehart i Rafter (120) su formirali micide od prethodno parcijalno defosforilisanog α_s -kazeina koje su pod elektronskim mikroskopom izgledale znatno manje nego micide netretiranog α_s -kazeina. U jednom drugom radu, Whikehart (119) modifikuje sadržaj fosfata u miceli što znatno menja njenu strukturu.

Edmondson i Tarassuk (31) su, međutim, dodavanjem 0,15% Na_2HPO_4 sirovom obranom mleku dobili znatno smanjenje brzine sedimentacije kazeinata. Autori smatraju da se 40% ove razlike može pripisati povećanju viskoziteta, ali da je ostatak rezultat smanjenja srednjeg prosečnog prečnika micide ili povećanja stepena hidratacije. Do sličnih rezultata došli su Zittle i Pepper (129), koji su ustanovili da se agregacija kao i stepen agregacije kazeina sa 6 mM $\text{CaCl}_2/1$ u prisustvu 5 mM fosfata/1 smanjio zbog vezivanja kalcijuma za fosfatni anjon. Takođe se znatno smanjio uticaj temperature na agregaciju, što može biti posledica formiranja Ca-fosfatno-Ca-kazeinatnog kompleksa. Ispitujući interakciju CaCl_2 i Na_2HPO_4 u vodenim sistemima Vakaleris i Sabharwal (113) su pri ekvimolarnim koncentracijama konstatovali da su precipitovane soli smesa CaHPO_4 i $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pretežno CaHPO_4 . Promenom molarnih odnosa pokazalo se da se maksimalna sedimentacija javlja pri odnosu fosfat:kalcijum = 2:1. Interesantno je da je Na_2HPO_4 izazivao povećanu

precipitaciju kazeinata sa Ca^{2+} samo do koncentracije od 12,5 mM/l preko koje je uticao na bolju rastvorljivost proteina. Dodatak natrijum citrata u vodeni sistem imao je značajan solubilišući efekat, iako je došlo do precipitacije Ca-fosfatno-citratne soli tipa apatita.

Pored već pomenutih podataka o uticaju citratnog jona na stabilnost kazeina (44, 87, 113) u literaturi postoji još izvestan broj radova (127, 129) koji se uglavnom svi slažu u jednom: da je citratni jon vrlo efikasan u sprečavanju precipitacije kazeina kalcijumom što je posledica snažnog afiniteta koji ovaj jon pokazuje u odnosu na kalcijum. Boulet i Marier (10) su proučavanjem rastvorljivosti trikalcijumcitrata u rastvorima raznih jonskih jačina i u ultrafiltratu mleka, ustanovili da proizvod rastvorljivosti ovih rastvora u ravnoteži varira sa jonskom jačinom prema relaciji: $\text{pk}_s = 17,63 - 10,84 \sqrt{\mu}$, ali da na njega ne utiče promena pH u intervalu od 4,4 do 8,8 i temperature (21 i 95°C), ili prisustvo Mg^{2+} ili PO_4^{3-} .

Sem već iznesenih rezultata istraživanja uticaja citratnog i fosfatnog jona na stabilnost kazeina, u novijoj literaturi se mogu naći i podaci o analognom dejstvu ovih jona u pojedinim tehnološkim procesima. Citratni jon u procesu proizvodnje sira utiče na povećanje količine rastvorljivog N kod topljenog sira (57), kod holandskih sireva poboljšava se randman za 0,2 kg/kg

gotovog proizvoda, i povoljno utiče na organoleptički kvalitet pomenutih vrsta (60), dok zajedno sa fosfatnim jonom pozitivno deluje na osobine i nekih drugih sireva (33, 108). Efektom stabilišućih soli-fosfata i citrata na kvalitet zasladjenog kondenzovanog odnosno evaporiranog mleka bavilo se više naučnoistraživačkih ekipa (19, 38, 42, 100). Prema rezultatima ruskih autora (100) fosfatno-citratna smesa ima veoma povoljan stabilišući uticaj na evaporirano mleko, dobija se proizvod odgovarajućeg ukusa i konzistencije. Pozitivno dejstvo fosfata na kvalitet mleka u prahu i obranog mleka u prahu ogleda se u smanjenju higroskopnosti ovih proizvoda (71) dok citrat poboljšava kvalitet i stabilizuje pored pomenute dve vrste proizvoda i suhu pavlaku (101).

2.2. VISKOZITET KAZEINATNOG RASTVORA

U nekoliko objavljenih radova o kazeinu pominje se merenje viskoziteta kazeinatnih rastvora (22, 109, 114, 125, 126), i viskoziteta obranog mleka (31). Edmondson i Tarassuk (31) su koristeći Oswald-ov viskozimetar dobili pravilno povećanje viskoziteta obranog mleka na 20°C pri dodatku 0,15% Na₂HPO₄. Na osnovu merenja viskoziteta rastvora natrijum i kalijum kazeinata, po Höppler-u, Doležálek i saradnici (22) su došli do određenih zaključaka o tehnološkom kvalitetu kazeinata za potrebe prehrambene industrije. Rezultati Zittle-a i grupe oko njega (126) pokazuju da se kod 2% rastvora Na-kazeinata pri pH = 7.0, sa povećanjem koncentracije kalcijuma od 0 do 16 mM/l relativni viskozitet smanjuje sa skoro 1.8 na 1.2.

2.3. pH KAZEINATNOG RASTVORA

Micela kazeina su vrlo osetljive na promene koncentracije vodonikovih jona u sistemu. Pri pH = 4.6 (IET kazeina) dolazi do potpune precipitacije ovog proteina, a već i pri nešto višem pH (5,2 - 5,3) kazein se destabilizuje. pH vrednost sistema određuje stabilnost kazeinatne micela (ako su ostali parametri u sistemu identični), u odnosu na različite agense, kao što su: temperatura, alkohol, himozin, kalcijum, itd. Kako se pH snižava prema izoelektričnoj tački raste stepen agregiranja kazeinatnih micela u prisustvu Ca^{2+} (129), što može biti odraz promena u stepenu hidratacije, koja se smanjuje sa smanjenjem pH vrednosti. Towler i Dolby (109), su ustanovili medjusobnu zavisnost pH precipitacije kazeinskih micela i sadržaja kalcijuma, odnosno viskoziteta kazeina. Jedan drugi autor (6) je ispitao uticaj pH i temperature na rastvorljivost svake od osnovnih proteinskih komponenta kazeina posebno.

2.4. PREČNIK I MICELARNA TEŽINA GLOBULA KAZEINA

U sklopu problema fizičko-hemijskih osobina i tehnoloških svojstava kazeina znatan broj savremenih istraživačkih publikacija tretira strukturu kazeinske micelle (3, 4, 12, 29, 32, 35, 58, 59, 68, 72, 80, 88, 93, 114, 115, 119, 120) zatim veličinu, odnosno prečnik i raspodelu prečnika (13, 14, 24, 25, 45, 46, 47, 61, 63, 65, 74, 79, 94, 96, 98) kao i molekulsku ili bolje rečeno micelarnu težinu ovog proteinskog agregata (7, 23, 32, 74, 79).

Iako se veliki broj autora slaže da je micela sastavljena iz određenog broja subjedinica koje sve imaju jednak relativni odnos proteinskih i ostalih sastavnih elemenata (3, 4, 12, 32, 35, 58, 72, 93) tako da od veličine micelle ne zavisi njen sastav, postoji i suprotno mišljenje, po kome je micela sastavljena od monomera različitog sastava i uvezi sa tim i predlozi modela strukture kazeinske micelle sa κ -kazeinom na njenoj površini (115) ili u centru (80). Rezultati naših ranijih istraživanja kazeinskih micela iz mleka nativno frakcionisanih po grupama različitog prečnika diferencijalnim ultracentrifugovanjem i podvrgnutih mikroelektroforezi po Tiselius-u (12, 29) su potvrdili da je elektroforetski sastav

kazeinskih micela jednak u pogledu proteinskih frakcija (α_s -, κ -, β - i γ -kazein) bez obzira na veličinu odnosno prečnik globule, iz čega mogu proisteći dve pretpostavke: ili su navedene frakcije zajedno prisutne u istim asocijacijama ili se nalaze u odvojenim micelama sa identičnom raspodelom prečnika. Pošto kazeini jednako dobro obrazuju i kopolimere medjusobno kao i polimere, mogućnost polimerizacije ne objašnjava sastav micela u pogledu proteinskih frakcija. Ukoliko se u problem uključi i mehanizam delovanja himozina na kazein nameće se kao verovatnije rešenje da su α_s -, κ -, β - i γ -kazein zajedno prisutni u istim globulama, što odgovara i činjenici da kalcijum učestvuje u obrazovanju odredjenih veza u okviru micela (12).

Oblik i veličina, odnosno prečnik kao i raspodela prečnika kazeinskih micela u mleku su zahvaljujući primeni savremenih istraživačkih metoda uglavnom poznati. Posle pronalaska elektronskog mikroskopa, Nitschmann (79) je 1949. g. dokazao polidisperznost i globularni oblik kazeinskih micela, čime je odbačena pretpostavka o njihovoj štapičastoj ("rod like") formi. Isti naučnik je razmatrao i raspodelu veličina posmatranih micela pošto ih je podelio u šest klasa, i u rasponu prečnika od 400-2800 Å prikazao relativnu učestalost svake kategorije. Hostettler i Imhof (45) su zatim, pored detaljnije registrovane raspodele kazeinskih micela u obranom mleku

(10 klasa, interval 330 Å), srednjeg ponderisanog prečnika (700 Å), ustanovili i submikroskopsku strukturu i dali izgled kazeina u izvesnim mlečnim proizvodima. Vredan pažnje je i jedan drugi usput pomenuti eksperiment (46) navedenih autora u kome su oni rastvoru Na-kazeinata dodali kalcijumhlorid, i time izazvali formiranje kazeinatih globula što se pokazalo snimkom na elektronskom mikroskopu.

Veličina i raspodela veličina bila je predmet mnogih istraživanja (13, 14, 24, 25, 45, 46, 61, 63, 65, 79, 94, 96, 98), u kojima su pored elektronskog mikroskopa (14, 25, 45, 47, 61, 79, 94, 96, 98) korišćene metode diferencijalnog ultracentrifugovanja (13, 24, 46) i optičke metode: "light scattering" (65) i "inelastic laser light scattering" (63, 74) u istu svrhu. Distribucija koju su dobili Lin i saradnici (63) je pokazala da je 90% kazeina u micelama prečnika 400-2200 Å, pri čemu je oko 80% između 500 i 1000 Å sa najverovatnijim prečnikom od ~ 800 Å. Grupa autora iz Philadelphia-e (14) je vršeći komparativna ispitivanja uticaja glutaraldehida i drugih sredstava za fiksiranje kazeina kod pripreme preparata za snimanje elektronskim mikroskopom, ustanovila raspodelu prečnika kazeinskih globula obranog mleka u granicama od 500 do 2500 Å, sa 75% micela čiji je prečnik u intervalu 1000-1700 Å. Rezultati ovih autora sa 12 do 15% micela većih od 1600 Å slažu se sa podacima Nitschmann-a (79) o

raspodeli prečnika kazeinskih globula gde je 11 do 19% micela veće od 1600 Å. Interesantna je razlika u krivoj raspodele prečnika najmanjih kazeinskih micela sirovog i termički tretiranog mleka koji su primetili Hostettler i saradnici (47). Težinski udeo najsitnijih globula kazeina $r \leq 250 \text{ Å}$, je oko 14 puta zastupljeniji kod sirovog mleka u poredjenju sa termički tretiranim, dok raspodela kod ostalih klasa izgleda približno jednako. U jednom našem radu je određena (13) raspodela kazeinskih micela u ovčijem mleku diferencijalnim ultracentrifugovanjem, pri čemu se pokazalo da su najučestaliji prečnici u granicama od 535 do 1007 Å sa srednjim ponderisanim prečnikom od 817 Å. Schmidt i saradnici (98) su snimanjem na elektronskom mikroskopu ispitali raspodelu prečnika kazeinskih micela u mleku, u rasponu 200-2000 Å sa intervalom od 200 Å, tako da su obrazovali 11 klasa. Zatim su izračunali relativnu brojnu i relativnu zapreminsku učestalost, grafički prikazali ove raspodele, i izračunali neke statistički važne parametre na osnovu eksperimentalnih podataka.

U savremenoj stručnoj literaturi nalaze se pored podataka o veličini i polidisperznosti i raspodeli veličina, odnosno prečnika micela kazeina i rezultati određivanja micelarnih težina ovih agregata (7, 23, 32, 74, 79). Iako svi autori u navedenim radovima govore o "molekulskoj težini kazeinske micela" smatramo ispravnijim

termin "micelarna težina" s obrazloženjem da predmet posmatranja nije molekul nego micela. Na osnovu veličina micela odredjenih elektronskim mikroskopom, Nitschmann (79) je izračunao micelarne težine, koje za kategorije prečnika 400, 600 i 800 Å iznose $0,81 \times 10^8$, $2,66 \times 10^8$ i $6,25 \times 10^8$. Zahvaljujući potvrđenoj pretpostavci o globularnom obliku micela Bloomfield i Morr (7) su mogli da merenjem koeficijenta difuzije (D) i unutrašnjeg viskoziteta (η) uz upotrebu Einstein-ove i Stokes-Einstein-ove relacije dobiju srednju vrednost za micelarnu težinu kazeina u obranom mleku od $5,20 \times 10^8$. Veća grupa istraživača, sa Univerziteta u Minnesota-i, na čelu sa Morr-om (74) nastavila je da se bavi ispitivanjem micelarnih težina kazeina. Odredili su micelarne težine dve kazeinske frakcije: sitnijih odnosno krupnijih prečnika (obe izdvojene iz obranog mleka centrifugovanjem pri 20000 o/min, odnosno 5000 o/min za isto vreme) nakon što su ustanovili sedimentacionu konstantu ($S_{20,W}$) analitičkom ultracentrifugom i koeficijent difuzije ($D_{20,W}$) uz pomoć "inelastic laser light scattering" metode, za obe frakcije. Primenivši Svedberg-ovu jednačinu dobili su vrednosti micelarnih težina za ove frakcije: $2,3 \times 10^8$ i $1,8 \times 10^9$. Obzirom da se srednja micelarna težina koja se navodi u prethodnom radu (7) nalazi u intervalu micelarnih težina pomenutih dveju frakcija ($1,8 \times 10^9 > 5,20 \times 10^8 > 2,3 \times 10^8$)

rezultati ove dve naučne publikacije su u saglasnosti. Podaci do kojih su došli Dawney i Murphy (23) gel filtracijom, daju indikaciju da je micelarna težina kazeina $> 10^8$ u mleku, dok za kazein u mleku koje je oslobođeno koloidnog fosfata iznosi približno 2×10^6 . I Farel (32) citira podatak da se micelarna težina kazeina kreće između 10^8 i 10^9 , tako da se može konstatovati da se rezultati svih autora koji su se bavili ovim pitanjem slažu u pogledu reda veličine.

Iz svega navedenog proizilazi da su određivanja micelarne težine, oblika, veličine i raspodele veličina kazeinskih globula vršena u mleku, uz delimično ispitivanje uticaja kalcijumovih jona. Pošto sa model sistemima nije radjeno, u literaturi nedostaju podaci o delovanju ostalih jona, njihovih raznih koncentracija i kombinacija na ove parametre.

2.5. UTICAJ ETANOLA NA KAZEIN

Opšte je poznato da alkohol, slično kalcijumovim i vodoničnim jonima, deluje dehidratišuće na kazein i time izaziva njegovu destabilizaciju. Na ovom principu bazira tzv. alkoholna proba, uvedena za kontrolu kvaliteta mleka. Stabilnost kazeina u mleku u odnosu na alkohol je u određenoj vezi sa termičkom stabilnošću kao i osetljivošću kazeina na koagulaciju himozinom. Sommer i Binney (102) su приметили da je dodavanje dikalijumfosfata ili trinatrijumcitrate mleku, nestabilnom na alkohol zbog prethodno dodatog kalcijum acetata ili magnezijum hlorida, anuliralo efekat ovih jona, što je poslužilo kao osnova za postavljanje teorije o ravnoteži soli u mleku. Autori koji su se potom bavili ovim pitanjem (9, 20, 99) se uglavnom slažu da je pored pH koncentracija kalcijumovih jona presudni faktor koji određuje stabilnost mleka na alkohol. Ima međjutim i podataka (116) da nestabilnost u odnosu na etanol uslovljava slaba ishrana životinja koja preko fizioloških poremećaja dovodi do promene u sastavu mleka. Rezultati Barta-e i de Mann-a (5) koji su dobili negativan koeficijent korelacije (-0.349) između količine jonskog kalcijuma u mleku i procenta alkohola potvrđuju da je koncentracija Ca^{2+} samo jedan od mnogobrojnih parametara koji uslovljavaju stabilnost kazeinatnog kompleksa u odnosu na alkohol.

U istom radu (5) se uočava visok stepen korelacije (koefficijent korelacije $r = 0.487$) izmedju alkoholne probe i vremena koagulacije himozinom testiranih uzoraka.

Mora se medjutim konstatovati da većina citiranih radova ne uzima u obzir sve prisutne jone u sistemu, što svakako utiče na ispitivanu stabilnost prema alkoholu, te smanjuje verodostojnost dobijenih rezultata.

2.6. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA

Za razliku od poglavlja 2.1., u kome se takodje tretira uticaj pojedinih jona i jonskih vrsta na stabilnost kazeinske micele, u ovom poglavlju je posmatran uticaj jona kombinovan sa delovanjem povišene temperature. Redosled razmatranja po vrstama jona je kao u poglavlju 2.1.

U publikovanom pregledu o termičkoj stabilnosti mleka, Dyson Rose (92) navodi sledeće elemente kao glavne koji na nju utiču: koncentracija ukupne suve materije; homogenizacija; kiselost i pH; prethodna termička obrada; relativna koncentracija pojedinih jona; ukupna koncentracija svih jona; količina albumina i globulina; sastav kazeina. Svi ovi parametri, manje ili više direktno, i u manjoj ili većoj meri odredjuju ustvari termičku stabilnost kazeina, pa preko njega i mleka. Značajan uticaj koncentracije citratnih, fosfatnih, kalcijumovih i drugih jona je opšte priznat i smatra se da je njihov efekat u tome što utiču na jonski sastav seruma (69, 103, 104). Izvesni radovi u ovom području su, medjutim, zanimali istovremeni uticaj promene pH pri različitim koncentracijama prisutnih jona u sistemu, iako je Rose pokazao (89, 90) da toplotna stabilnost mleka varira tako znatno sa promenom pH u uskom intervalu od 6,5 - 6,8, da uticaj pH može da zamaskira druge jonske uticaje.

Interesantan je zaključak istog autora koji u jednom svom radu (91) tvrdi da ako neorganske soli bitno utiču na toplotnu stabilnost, onda je to samo u prisustvu β -laktoglobulina, što je u skladu sa rezultatima Nakanishi-a i Itoh-a (76). Oni su konstatovali smanjenje sposobnosti κ -kazeina da stabilizuje α_s -kazein u prisustvu CaCl_2 na $t = 90 - 100^\circ\text{C}$ pri dodatku NaCl , što nije bio slučaj u prisustvu β -laktoglobulina.

Čist 0,25% rastvor κ -kazeina je termostabilan (124) ako se termostabilnost meri njegovom sposobnošću da stabilizuje α_s -kazein u odnosu na Ca^{2+} . To potvrđuju i rezultati grupe japanskih autora (121, 122) koji su izolovali κ -kazein iz termički tretiranog mleka ($t = 80^\circ\text{C}$, $\tau = 30$ min) i konstatovali da za razliku od κ -kazeina izolovanog iz mleka netretiranog visokom temperaturom, nema sposobnost da stabilizuje α_s -kazein u prisustvu kalcijuma. Citirani autori (121) objašnjavaju gubitak stabilizujuće sposobnosti κ -kazeina zagrevanog mleka, njegovom interakcijom sa proteinima surutke za vreme termičkog tretmana. S druge strane α_s -kazein sprečava razaranje κ -kazeina toplotom, što je možda rezultat specifične asocijacije ova dva proteina (124). Davidov i Biryukova (18) su našli direktnu vezu između $(\beta + \kappa)$ -kazeinskih frakcija i toplotne stabilnosti mleka: povećani sadržaj ovih komponenata kazeina uslovljava veću termostabilnost mleka. Nadjeno je takodje da zagrevanje mleka (97) na

90°C prouzrokuje znatnu degradaciju α_s - i κ -kazeinskih frakcija i slabu degradaciju β -kazeina. Sterilizacija toplotom prouzrokovala je izražene promene u strukturi koncentrisanih mleka, zahvaljujući koalescenciji proteina (8).

Temperaturni koeficijent agregiranja kazeina CaCl_2 -om pobudio je pažnju Zittle-a et al. (129), jer je na osnovu eksperimenata bilo očigledno da mora biti veoma visok. Iz integrisanog oblika Arrhenius-ove jednačine:

$$K_2/K_1 = e \exp \frac{\Delta H (T_2 - T_1)}{R (T_2 T_1)} \quad (2)$$

izračunali su temperaturni koeficijent za interval od 1°C i 10°C i dobili za α_s -kazein 1.30, odnosno 14, a za kompletan kazein 1.35, odnosno 19. Izražavajući precipitaciju kalcijum kazeinata (2% rastvor kazeina + 0.0125 M kalcijum hlorid, pH = 6.5), procentom rastvorljivih proteina, posle termičkog tretmana na 90°C, Zittle et al. (126) su bili u mogućnosti da registruju opadanje rastvorljivosti od 100% bez termičkog tretmana, na oko 37% pri trajanju delovanja temperature od 5 min, na 30% pri 10 min, a rastvorljivost je bila < 20% posle delovanja $t = 90^\circ$, u toku 60 min. U istom radu (126) se uočava da se rastvorljivost ovog rastvora pri primenjenom termičkom

tretmanu, i fiksiranom trajanju, smanjuje sa povećanjem koncentracije kalcijumovih jona, od 0.0075 do 0.0175 M/l. Magnezijumov jon ima značajan destabilišući efekat (86) tako da prema tumačenju Rose-a može da bude od značaja, ali nedostaju podaci koji bi to potvrdili (92).

O delovanju jednovalentnih katjona sreću se suprotna mišljenja, uglavnom zahvaljujući primeni raznih jonskih koncentracija prilikom istraživanja. Prema nekim autorima (50) NaCl ima mali ili nikakav uticaj na rastvorljivost pri povišenim temperaturama, drugi (75, 76) tvrde da pomenuta so smanjuje rastvorljivost, odnosno stabilnost kazeina, tako što opada sposobnost κ -kazeina da stabilizuje α_s -kazein, dok Zittle (124, 127, 129) smatra da se precipitacija zagrevanjem u prisustvu dodatog NaCl smanjuje odnosno potpuno sprečava. Postoji i pretpostavka (128) o specifičnom efektu natrijum hlorida na disocijaciju kompleksa sastavljenog od α_s -kazeina i κ -kazeina, što se doduše jasno uočava samo pri znatno višim koncentracijama natrijuma od onih koje se normalno nalaze u mleku.

Nasuprot izraženoj sumnji Dyson Rose-a (92) da koncentracija fosfatnih ili citratnih jona u mleku može da bude u vezi sa termičkom stabilnošću, u literaturi se nalaze podaci koji to potvrđuju (17, 31, 127, 129). UHT (ultra visokom temperaturom) tretirano mleko je izrazito stabilnije u odnosu na gelifikaciju pri skladištenju ako mu je pre termičke obrade dodato 0.010 - 0.015% Na_2HPO_4 (17).

Edmondson i Tarassuk (31) su dodatkom 0.15% Na_2HPO_4 obranom mleku dobili znatno bolju stabilnost uzoraka u centrifugalnom polju, prethodno termički tretiranih ($t = 88^\circ\text{C}$, $\tau = 15$ min), od kontrolnih. Citirani autori medjutim, ne navode pH vrednosti ispitivanih uzoraka, pa bi se moglo smatrati da je pomeranjem pH ka baznoj oblasti zbog prisustva Na_2HPO_4 , izazvana veća toplotna stabilnost ovih uzoraka u odnosu na kontrolne. Da ovo ipak nije slučaj vidi se iz podataka Zittle-a (127) koji je proučavao delovanje fosfatnog jona koncentracije 0.005 M, u sistemu: 2% rastvor Na-kazeinata + 0.0125 M kalcijum hlorid, zagrevanom jedan sat na 90°C , pri pH = 6.6 i 6.1. Spektrofotometrijskim odredjivanjem rastvorljivih proteina posle termičkog tretmana uočeno je značajno stabilisjuće delovanje dodatog fosfata u sprečavanju precipitacije kazeina, efektivnije pri pH = 6.6 nego pri 6.1. Dalji ogleđi istih autora (127) su pokazali da fosfatni anjon ima veći afinitet za kalcijum pri višem pH u intervalu pH = 6.2 do 7.4. U literaturi nadjeni podaci (75) da NaH_2PO_4 smanjuje rastvorljivost i stabilnost kazeina mogu se samo delimično objasniti kao posledica delovanja pH, obzirom da je dodavana so veoma kiselog karaktera, a autori nisu vršili korekciju pH.

Ovde treba pomenuti i interesantne rezultate Abdulina-e i Kovalenko-a (1) koji su ispitivali strukturne promene kazeina u prisustvu 0.1 - 0.3% Na_2HPO_4 i našli

da pri količini fosfata od 0.3% i temperaturi višoj od 60°C (15 min) naglo opada sadržaj sijalne kiseline u rastvoru, sa daljim povećanjem temperature.

Ispitivanjem interakcije citratnih jona i kazeina na povišenoj temperaturi više se bavio Zittle sa grupom svojih saradnika (127, 129). Rastvorljivost kazeina u 2% rastvoru Na-kazeinata uz 12,5 mM CaCl₂, pri pH = 6.6, posle održavanja temperature od 90°C, 1 h, naglo je rasla sa porastom koncentracije dodatog citrata, tako da kod 5 mM/l citrata iznosi 100% (127). Stepen agregiranja kazeina sa 6 mM CaCl₂/l pri t = 25°C, 30°C i 35°C opada u prisustvu 0.5 mM/l natrijum citrata. Slično se događa ako se u sistem umesto citrata unese 5 mM/l fosfata, s tim što se može na osnovu grafika konstatovati da pri višim temperaturama sa kojima je radjeno (30 i 35°C) navedena količina fosfata ima jače izraženo stabilizujuće dejstvo u poredjenju sa citratom (129). Ispitujući rastvorljivost trikalcijum citrata u navedenim rastvorima različite jonske jačine Boulet i Marier (10) su ustanovili da proizvod rastvorljivosti rastvora u ravnoteži zavisi od jonske jačine, ali da na njega praktično ne utiče pH, temperatura ili prisustvo magnezijumovih ili fosfatnih jona. Proizvod rastvorljivosti dobijen pri t = 95°C nije se bitno razlikovao od analognog na 21°C. Dodatak fosfata nije izazvao promenu ni jedne vrste jona, dok je prisustvo Mg²⁺ povećalo koncentraciju Ca²⁺ ali istovremeno smanjilo koncentraciju citratnih jona.

2.7. KOAGULACIJA KAZEINA HIMOZINOM

Mehanizam i kinetika delovanja himozina na kazein su, zahvaljujući doprinosu više istraživača (15, 16, 39, 40, 43, 67, 110, 118), uglavnom poznati. Tuszyński je uz pomoć Scott Blair-a (110) postavio kinetički model koagulacije kazeina himozinom i ustanovio da ravnotežna konstanta za sve tri faze (encimatska, flokulaciona i faza nastanka gela) mora da bude približno ista i da iznosi $K = 1.6 \times 10^{-16}$, na 37°C. Iz rezultata do kojih su došli Castle i Wheelock (15, 16), ispitujući kinetiku delovanja himozina na kazein izdvojen iz mleka ultracentrifugovanjem, zapaža se da koncentracija natrijumovih i kalijumovih jona nema uticaja na Mihaelisovu konstantu (K_m), niti na brzinu reakcije (V), ali da su se obe ove vrednosti povećavale sa dodavanjem κ -kazeina.

Uticajem pojedinih jona na koagulaciju kazeina himozinom bavilo se u poslednje vreme više autora (84, 85, 111, 125). Tuszynski i Krystyna Zielinska su u svom radu (111), o vezi ravnoteže kalcijuma i koagulacije mleka, ustanovili značajnu zavisnost brzine koagulacije i čvrstine koaguluma od pH vrednosti uzoraka u toku registrovanog vremenskog intervala. Važnu ulogu pH vrednosti pri koagulaciji mleka himozinom pominju i drugi naučnici (48, 83). Prema podacima Puhan-a (83) aktivnost himozina se pri padu pH sa 6.70 na 6.60 povećava za 40,0%, pri pH = 6.48

aktivnost je veća za 83.2% i kod pH = 6.35 himozin je za 133.9% aktivniji nego na početku (pH = 6.70). Djordjević et al. (30) su registrovali skraćenje vremena koagulacije pri povećanju titracione kiselosti mleka, i ustanovili da i malo povećanje jonizovanog kalcijuma iznad količine u svežem mleku izaziva veoma značajno skraćenje vremena koagulacije. Grupa bugarskih autora (84, 85) je ispitivala uticaj više jonskih vrsta na vreme koagulacije mleka raznog porekla himozinom: $C_3H_4(OH)(COONa)_3$, NaCl, KNO_3 , $CaCl_2$, KCl, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $(NH_4)_2HC_6H_5O_7$, $BaCl_2$, $MgCl_2$ (84), odnosno devet različitih amonijumovih soli (85). Njihovi eksperimenti su pokazali da $CaCl_2$, $MgCl_2$, $BaCl_2$ (divalentni katjoni Ca^{2+} , Mg^{2+} i Ba^{2+}) i NaH_2PO_4 i u izvesnoj manjoj meri NaCl i KCl, povećavaju osetljivost mleka prema himozinu. Natrijum citrat, amonijum citrat, kalijum nitrat i dinatrijum fosfat imaju suprotan efekat. Da na koagulaciju utiče ne samo vrsta dodatih jona nego i promena pH koju oni u sistemu izazivaju, vidi se iz različitog dejstva NaH_2PO_4 i Na_2HPO_4 , i pored toga što sadrže iste jonske vrste, i iz delovanja grupe amonijumovih soli koje je uglavnom određeno njihovim kiselim, odnosno baznim karakterom. Mada su citirani autori svesni delovanja pH, oni nisu vršili njegovu korekciju, tako da navedeni podaci o uticaju pojedinih jona na vreme koagulacije mleka himozinom nisu sasvim uporedivi. Nasuprot ovim rezultatima Zittle (125) tvrdi da NaCl (0.05 M) smanjuje koagulaciju rastvora kazeina himozinom, zbog redukovano

formiranja micela. Ovo izgleda logično, naročito ako se ima u vidu linearna zavisnost vremena koagulacije od prečnika micela kazeina koju su postavili Hosttetter i Imhof (46). Jon kalijumnatrijum tartarata produžava vreme koagulacije mleka himozinom, što je posledica nastajanja nerastvornog kalcijumtartarata (28).

Ustanovljeno dejstvo pojedinih jona na koagulaciju mleka himozinom delimično je već našlo i praktičnu primenu (27, 55, 60, 62). Dodatak 1-2% limunske kiseline mleku pre koagulacije povoljno utiče na njegov tehnološki kvalitet pri proizvodnji "tvorog paste" (62). Kao što smo već ranije pomenuli, doziranjem 0.02% natrijum citrata u mleko za proizvodnju holandskih sireva, dobija se znatno bolja organoleptička ocena proizvoda i veći randman (60). Iz rezultata jednog našeg rada (27) se vidi da dodatak od 0.04% CaCl_2 omogućava koagulaciju mleka kome je dodato sojino brašno, što znači da je moguća proizvodnja sira obogaćenog biljnim proteinima.

*

*

*

Na osnovu iznetog pregleda u literaturi nadjenih rezultata iz oblasti koju tretira ova disertacija i odsustva izvesnih podataka, došli smo do sledećih zaključaka:

- Od dvovalentnih jona u mleku ispitano je jedino delovanje kalcijuma na stabilnost kazeina. U pogledu afiniteta Ca^{2+} i Mg^{2+} za kazein navode se suprotni podaci.

- Više autora ispitalo je raspodelu prečnika kazeinskih globula u mleku i delovanje temperature na prečnik. Medjutim, uopšte nema podataka o uticaju pojedinih jonskih vrsta i njihovih kombinacija (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , PO_4^{3-} , $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}$) na polidisperznost, odnosno raspodelu veličina, srednji ponderisani prečnik i oblik kazeinske micle.

- U nekoliko publikovanih radova se navodi srednja micelarna težina kazeina u mleku. O tome kako na micelarnu težinu utiču razne jonske vrste i koncentracije nema podataka.

- Podaci nadjeni u literaturi o rezultatu alkoholne probe ne zadovoljavaju zbog nedovoljno definisanih uslova eksperimenta.

- U pogledu uticaja jona na termičku stabilnost kazeina situacija je sledeća: kalcijum je delimično ispitan; o magnezijumu nema podataka; za natrijum se nalaze suprotna mišljenja; za kalijum nema podataka; za fosfatni jon rezultati su suprotni; citratni jon je samo parcijalno ispitan.

- O uticaju pojedinih jona na koagulaciju kazeina himozinom nadjeni podaci se ne mogu smatrati zadovoljavajućim zbog primenjenih eksperimentalnih uslova.

Pored ovde konstatovanog odsustva podataka, iz pregleda literature je jasno da je znatan broj citiranih rezultata proizvod eksperimenata koji su izvodjeni bez tačno utvrđenih, konstantnih parametara, što utiče na verodostojnost rezultata. Veoma mali broj autora je radio sa model sistemima. Izabrane koncentracije jona u ovim model sistemima uglavnom su znatno niže od onih u kojima se isti joni nalaze u mleku. Izneti problemi predstavljaju deo onoga što smo sebi postavili u zadatak da radom na disertaciji doprinesemo rešenju, postavljanjem i tretiranjem 54 model sistema rastvora kazeina sa različitim jonskim sastavom. Pri sastavljanju model sistema vodili smo računa da u dijapazonu primenjenih koncentracija pojedinih jona i jonskih vrsta bude i ona u kojoj su ovi joni zastupljeni u mleku.

Pored ovde konstatovanog odsustva podataka, iz pregleda literature je jasno da je znatan broj citiranih rezultata proizvod eksperimenata koji su izvodjeni bez tačno utvrđenih, konstantnih parametara, što utiče na verodostojnost rezultata. Veoma mali broj autora je radio sa model sistemima. Izabrane koncentracije jona u ovim model sistemima uglavnom su znatno niže od onih u kojima se isti joni nalaze u mleku. Izneti problemi predstavljaju deo onoga što smo sebi postavili u zadatak da radom na disertaciji doprinesemo rešenju, postavljanjem i tretiranjem 54 model sistema rastvora kazeina sa različitim jonskim sastavom. Pri sastavljanju model sistema vodili smo računa da u dijapazonu primenjenih koncentracija pojedinih jona i jonskih vrsta bude i ona u kojoj su ovi joni zastupljeni u mleku.

3. METODIKA ISTRAŽIVANJA

3.1. ISPITIVANJE SASTAVA I OSOBINA

Na-KAZEINATA

Za spravljanje model sistema korišten je Na-kazeinat pod komercijalnim nazivom ROVITA FN-5, proizvod firme Rovita, GmbH. Ispitivanje sastava i osobina ovog preparata izvršeno je prema navedenim metodama (2, 41, 81).

Sadržaj suve materije, odnosno vlage praha Na-kazeinata je odredjen standardnom metodom sušenja na 105°C do konstantne težine.

Proteini su odredjeni metodom Kjeldahl-a.

Mast je odredjena ekstrakcionom metodom po Soxhlet-u.

Laktoza je odredjena gravimetrijski - redukcijom sa bakarsulfatom.

Ukupne mineralne materije su odredjene žarenjem praha na 550°C .

Fosfor je odredjen prema internacionalnom standardu FIL-IDF 33, spektrofotometrom Carl Zeiss, model PMQ II.

Kalcijum i magnezijum su određeni kompleksometrijskom titracijom sa dinatrijumovom soli etilendiamin-tetrasirćetne kiseline (EDTA).

Kalijum i natrijum su određeni AA spektrofotometrom Perkin-Elmer, model 503.

Pored navedenih analiza kojima je utvrđen sastav Na-kazeinata ispitane su i sledeće osobine 3,00% vodenog rastvora Na-kazeinata:

Viskozitet rastvora na 20°C, po Höppler-u.

Veličina kazeinske micidele je određena elektronskim mikroskopom, Siemens & Halske, AG., model El mikroskop I a. Tehnika prepariranja je navedena u tački 3.5.2.

Termička stabilnost kazeinske micidele u ovom rastvoru određena je na način naveden u tački 3.7.1.

pH vrednost je ispitana pH-metrom Radiometar, model R-22.

3.2. PRIPREMA MODEL SISTEMA

Svi model sistemi sastavljeni su na sledeći način: na sobnoj temperaturi je uz upotrebu elektromagnetne mešalice VEB Labortechnik, tip UR 60, napravljen vodeni rastvor Na-kazeinata (koncentracije oko 4%), koji je zatim profiltriran da se uklone eventualne nerastvorne čestice. U rastvor je dozirana izračunata količina destilovane vode i rastvora predvidjenih soli tako da je koncentracija Na-kazeinata u gotovim model sistemima uvek iznosila tačno 3.00%. Sastav svih model sistema dat je u posebnom spisku u Prilogu, u kome su ovi klasirani prema vrstama dodatih jona i jonskih grupa. Dodavanje rastvora jona izvodjeno je postepeno, uz intenzivno mešanje mešalicom, na temperaturi 12-14°C. Odabrani joni su dodavani u obliku rastvora soli: Ca^{2+} kao CaCl_2 (1.8 M); Mg^{2+} kao MgCl_2 (1.8 M); Na^+ kao Na_2HPO_4 i NaH_2PO_4 (oba 0.5 M), odnosno $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ (0.25 M); K^+ kao K_2HPO_4 i KH_2PO_4 (oba 0.5 M), odnosno $\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7$ (0.25 M); i joni PO_4^{3-} i $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}$ u obliku natrijumovih i kalijumovih soli kako je već navedeno. U daljem izlaganju ćemo, jednostavnosti radi, zadržati oznaku jona za sve posmatrane jone i jonske grupe, iako podrazumevamo da svi nisu potpuno jonizovani u datim uslovima pojedinih model sistema.

Tako je od ukupno 54 razna model sistema konstruisano 10 grupa (A.1.; B.1. do B.8.; C.1. do C.8.;

D.1. do D.5.; E.1. do E.5.; F.1. do F.5.; G.1. do G.5.; H.1. do H.12.; I.1. do I.3.; J.1. do J.3.). Model sistem A.1. je čist rastvor Na-kazeinata. Sisteme tipa B karakteriše porast koncentracija kalcijumovih jona, a sisteme tipa C magnezijumovih. U sistemima tipa D raste koncentracija fosfatnih jona u prisustvu odabrane količine kalcijumovih jona, a u sistemima tipa E u prisustvu ekvimolarne količine magnezijumovih jona. Za sisteme tipa F i G je karakterističan porast citratnih jona pri izabranoj koncentraciji kalcijumovih, odnosno magnezijumovih jona. U sistemima tipa H se u prisustvu kalcijuma kombinuju uticaji raznih koncentracija fosfatnih i citratnih anjona. Model sistemi tipa I su nastali tako što je u sistemima odabranim iz grupe H, polovina količine kalcijumovih jona zamenjena magnezijumovim. Sistemi tipa J su takodje nastali od sistema H, s tim da su u sisteme umesto natrijumovih jona, dodate ekvimolarne količine kalijumovih.

U daljem tekstu će svi sistemi biti pominjani i pod usvojenim oznakama.

3.3. VISKOZITET MODEL SISTEMA B.1. DO B.8.
i C.1. DO C.8.

Odredjen je viskozitet model sistema B.1. do B.8. i C.1. do C.8., viskozimetrom po Höppler-u, kuglicom konstante $K = 0.07756$, na temperaturi od 20°C . Ispitivanje viskoziteta je ponovljeno sa istim sistemima, uz prethodnu korekciju pH na 6.70.

3.4. pH VREDNOST MODEL SISTEMA

Dinamika promene pH vrednosti model sistema B.1. do B.8. i C.1. do C.8. praćena je pH-metrom.

Da bi se isključio uticaj promene pH model sistema u prisustvu raznih doziranih jona u različitim koncentracijama i medjusobnim odnosima, na ponašanje kazeina, vršena je korekcija pH vrednosti svih postavljenih model sistema, potenciometrijskom titracijom sa 2N NaOH uz pomoć pH metra E512, Impulsomata E473 i Dosimata, Metrohm Herisau; korigovana pH vrednost iznosila je 6.70 za sve sisteme.

3.5. ODREĐJIVANJE MICELARNE TEŽINE, VELIČINE, RASPODELE VELIČINA I OBLIKA KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMIMA

3.5.1. Micelarna težina kazeina u model sistemima B.1. do B.5. i C.1. do C.5.

Micelarna težina i prečnik kazeinske globule u navedenim model sistemima određeni su fotoelektričnim nefelometrom, Shimadzu Photoelectric Light Scattering Photometer, model PG-21, pri talasnoj dužini od 546 mμ (52). Promena indeksa prelamanja rastvarača u funkciji promene koncentracije, veličina potrebna za dobijanje micelarne težine, ustanovljena je diferencijalnim refraktometrom, model DR-3, iste firme ($\frac{\partial n}{\partial c} = \text{tg } \sigma = 0.374$) (51). Na osnovu ovog podatka izračunata je konstanta K iz izraza

$$K = \frac{2\pi^2 n^2 (\partial n / \partial c)^2}{\lambda^4 N} = 9.175 \times 10^{-7}.$$

Konstanta instrumenta je određena sa dekstranom M = 250.000, koncentracije 0.01%, i iznosila je $\phi_c = c_c \phi_s = 3.2931 \times 10^{-4}$. Provera date vrednosti za ϕ_s izvršena je prema metodi preporučenoj od proizvođača instrumenta, "glass block" i za izabranu talasnu dužinu nadjeno je da iznosi 4.8844×10^{-4} . Pripremljene koncentracije uzoraka su se kretale od 0.25×10^{-3} do 1.00×10^{-3} g/cc.

Interpretacija rezultata izvedena je metodom ekstrapolacije po Zimm-u (123), a rezultati su obradjeni elektronskim računarom Hewlett-Packard, Calculator 9100 A. Pod pretpostavkom da su micela kazeina u navedenim sistemima globularni makromolekuli, ustanovljen je i prosečan prečnik micela na osnovu radijusa žiracije. Radijus žiracije se izračunava iz relacije (106):

$$\frac{\text{Početni nagib}}{\text{Odsečak}} = \frac{16 \pi^2}{3} \rho_g^2 (n/\lambda_0)^2 = 314.0948 \times 10^{-6} \rho_g^2 \quad (3)$$

Veza radijusa žiracije i prečnika za sfere, odnosno globularne makromolekule, data je izrazom:

$$\rho_g^2 = \frac{3D^2}{20} \cdot$$

3.5.2. Veličina, raspodela veličina i oblik micela kazeina u izabranim model sistemima

Veličina i prečnik micela kazeina u odabranim model sistemima (A.1., B.2., C.2., D.1., D.3., D.5., E.1., E.3., E.5., F.1., F.4., G.1., G.4., H.1., H.2., H.6., I.1., I.2., I.3., J.1., J.2., J.3.) odredjena je emisionim elektronskim mikroskopom. Metoda za pripremu preparata sistema za elektronsku mikroskopiju je delimično modifikovana metoda koju navode Hostettler & Imhof (45).

Modifikacija koju smo uveli je posledica toga da nismo preparirali mleko, nego veštački konstruisane model sisteme. Tako je izostalo uklanjanje nečistoća filtriranjem, i uklanjanje mlečne masti centrifugovanjem (30 min, 3000 o/min, na 3°C), odnosno petroletrom, obzirom da model sistemi nisu ove komponente ni sadržali (masti je bilo samo u tragovima). Za fiksiranje model sistema korišćen je formaldehid, p.a. u koncentraciji od 0.5% i trajanju od 24 h. Da bi se uklonio višak jona koji stvaraju smetnje pri izoštravanju i snimanju preparata izvršena je dijaliza uzoraka prema destilovanoj vodi, takodje 24 h. U prvoj fazi rada jedan broj uzoraka je snimljen dijaliziran i nedijaliziran te smo se na osnovu uporedjenja ovih snimaka odlučili za izvodjenje dijalize. Uzorak je zatim nanesen na nosač preparata - bakarnu pločicu prekrivenu folijom nitroceluloze sa umreženim krugovima prečnika 3 mm. Pravljeni su uvek po tri razredjenja preparata: 2.5, 5 i 10 µl, od 250-tnog razblaženja. Pošto organski materijal zbog slabog rasipanja elektrona od strane C-, H-, O-, i N-atoma daje vrlo slabe kontraste u elektronskom mikroskopu, vršeno je senčenje preparata uredjajem firme Balzers. U visokom vakuumu od 10^{-5} mm Hg uparava se smesa zlata i mangana i pod uglom od 19° emituje na preparat. Prednost senčenja je u reljefnosti fotografije, pa se i na osnovu izgleda senke mogu izvoditi zaključci o visini i obliku snimljenog objekta. Izabrali

smo uvećanje od 10.000 puta za sve sisteme. Uvećanja manja od ovoga nisu bila dovoljna. Uvećanja veća od 10.000 puta, pored toga što stvaraju teškoće oko izoštravanja za snimanje, nisu bila neophodna jer je dalje uvećanje (5 puta) dobijeno foto putem, tako da definitivno uvećanje na fotografijama iznosi 50.000 puta.

Izmeren je prečnik oko 2000 micela kod svakog pojedinog model sistema i dobijene vrednosti su svrstane u klase, svaka širine 200 Å. Statističkom obradom podataka elektronske mikroskopije kompjuterom, dobijena je raspodela prečnika kazeinskih micela u navedenim sistemima, srednji prečnik (\bar{x}), standardna devijacija (σ), disperzija (σ^2), koeficijent asimetrije (β_1) i koeficijent spljoštenosti (β_2) (11, 53, 112).

Pored veličine i prečnika radom sa elektronskim mikroskopom smo sa sigurnošću mogli da ustanovimo i oblik micela formiranih u konstruisanim model sistemima, što se pokazalo, kao što će se iz rezultata i diskusije rezultata i videti, veoma značajnim.

3.6. STABILNOST KAZEINA U ODNOSU NA ALKOHOL U MODEL SISTEMIMA

Ispitana je stabilnost kazeina u odnosu na alkohol svih sastavljenih model sistema, navedenih u spisku, standardnom metodom sa 68% alkoholom, uz prethodnu korekciju pH na 6.70, sa 2N NaOH.

3.7. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA

Termička stabilnost kazeina postavljenih model sistema ispitana je delovanjem temperatura od 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 i 90°C u trajanju od tri minuta, posle korekcije pH vrednosti na 6.70. Po temperaturnom tretmanu rastvor je odmah hladjen u vodenom kupatilu sa ledenom vodom na $t = 20^{\circ}\text{C}$, u toku nekoliko minuta i na istoj temperaturi centrifugiran pri $n = 4000$ o/min u toku 3 minuta. Centrifugat je dekantiran, a talog sušen do konstantne težine, na 105°C. Termička stabilnost je izražena kao rastvorljivost u procentima suve materije ostale u centrifugatu.

Posle opisanog postupka, u sistemima D.1. do D.5. ispitana je sadržaj Ca^{2+} u centrifugatu kompleksometrijskom titracijom. Temperaturni tretman je ponovljen sa sistemima iste grupe sa minimalnim i maksimalnim sadržajem fosfata pri temperaturama od 20, 60 i 80°C, bez prisustva Na-kazeinata. U centrifugatima model sistema F.1. do F.5., tretiranih temperaturom od 80 i 90°C i termički netretiranih, ustanovljen je sadržaj proteina spektrofotometrijski, apsorbcijom pri $\lambda = 280$ m μ na aparatu Carl Zeiss, Model PMQ II. Na isti način je kod sistema H.1. do H.12., I.1. do I.3., i J.1. do J.3. ispitana sadržaj kazeina u centrifugatima. Centrifugat tri poslednje grupe sistema je

analiziran i na sadržaj kalcijuma (sistemi I.1. do I.3. i magnezijuma) kompleksometrijskom titracijom sa EDTA.

3.8. KOAGULACIJA KAZEINA HIMOZINOM U MODEL SISTEMIMA

Koagulacija kazeina u sistemima B.1. do B.8. i C.1. do C.8. je izazvana delovanjem 2% rastvora himozinskog ekstrakta jačine 10.000 internacionalnih jedinica na 35°C. Registrovano je vreme pojave flokulacije, količina kalcijuma (magnezijuma) u serumu i količina proteina u serumu. Kalcijum, odnosno magnezijum, je identifikovan kompleksometrijski, a količina proteina u serumu je odredjena fotokolorimetrijskom metodom "amido black", aparatom PRO MILK II, Foss Electric (37) (za kontrolu tačnosti aparata, odnosno baždarenje, poslužila je metoda po Kjeldahl-u). pH vrednost je pre hidrolize korigovana na 6.70.

Koagulacija kazeina u sistemima: A.1., D.1. do D.5., E.1. do E.5., F.1. do F.5., G.1. do G.5., H.1. do H.12., I.1. do I.3., J.1. do J.3. je izazvana kao što je navedeno u prethodnom stavu. Registrovano je da li dolazi do flokulacije kazeina u prisustvu predvidjenih smesa jona i za koje vreme. Koncentracija H^+ je i ovde korigovana na pH = 6.70, pre doziranja proteolitičkog fermenta.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Na-KAZEINAT

4.1.1. Sastav Na-kazeinata

Sastav Na-kazeinata koji je upotrebljen za pripremu ispitivanih model sistema prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1.: Sastav Na-kazeinata

Komponenta	Količina u Na-kazeinatu (g/100 g)	Količina u 3,00% rastvoru (g/100 ml)
Suva materija	93,510	3,0000
Proteini	86,770	2,7800
Mast	0,470	0,0150
Laktoza	0,000	0,0000
Supstance nerastvorne u vodi	8,140	0,0000
Mineralne materije (pepeo)	3,750	0,1205
Fosfor	0,729	0,0233
Kalcijum	0,175	0,0056
Magnezijum	0,083	0,0026
Kalijum	0,120	0,0038
Natrijum	1,380	0,0443

Iz podataka navedenih u Tabeli 1. vidi se da kvalitet Na-kazeinata odgovara zakonskim propisima ("Službeni list SFRJ", br. 27,1971), i da je njegov stepen čistoće takav da ispunjava zahteve za izvodjenje planiranih

eksperimenata. Kazein za proizvodnju Na-kazeinata dobija se izoelektričnom precipitacijom iz mleka. Precipitacijom pri izoelektričnoj tački (pH = 4.6) istaložene su kvantitativno belančevine, pa se može smatrati da je ukupna količina belančevina navedena u Tabeli 1., praktično čist kazein. Mast je u prahu Na-kazeinata, a naročito kada se sračuna na 3,00% rastvor, zastupljena zanemarljivo malom količinom (0,015%). Laktoza uopšte nije identifikovana. Sadržaj vode je uzet u obzir kod svodjenja koncentracije model rastvora na tačno 3,00% Na-kazeinata. U vodi nerastvorne supstance iz praha Na-kazeinata (8,14%) su uklonjene filtriranjem rastvora. Mineralne materije su prisutne u relativno maloj meri (3.75%), sa skoro potpunim odsustvom kalcijuma, magnezijuma i kalijuma u rastvoru. Fosfora ima nešto više (0,0233 g/100 ml rastvora), a natrijum je, prema očekivanju, najviše zastupljen.

4.1.2. Osobine Na-kazeinata

Sem relativnih količina pojedinih sastojaka Na-kazeinata, prikazanih u Tabeli 1., ustanovljene su i neke osobine čistog 3,00% rastvora kazeinatnog praha, za koje smo smatrali da su od značaja za ispitivanu problematiku, i to: viskozitet, veličina kazeinske micle, termička stabilnost i pH-vrednost.

Relativni viskozitet 3,00% rastvora Na-kazeinata iznosio je 2,5244 cp na 20°C.

U cilju odredjivanja veličine kazeinske micelle u spravljenom rastvoru napravljen je snimak elektronskim mikroskopom (Prilog: snimak sistema A.1.). Iz snimka se vidi da su kazeinske micelle u 3,00% rastvoru Na-kazeinata veoma sitne, reda veličine do 300 Å, približno sve uniformne po veličini i oble, bez izražene polidisperznosti. Zato smo smatrali nepotrebnim konstruisati krivu raspodele u ovom slučaju. Ovi naši rezultati, ustanovljeni snimkom model sistema A.1. na elektronskom mikroskopu, su u skladu sa podacima koje navode Hostettler i Imhof (46), da razblaživanje mleka vodom (1:200) dovodi do totalne dezagregacije kazeinatne micelle, što je posledica smanjenja koncentracije kalcijuma u sistemu. To je i bio razlog da citirani autori u tehniku pripreme preparata za elektronsku mikroskopiju uvedu razblaživanje rastvorom CaCl_2 , umesto vodom, odnosno fiksiranje preparata formaldehidom.

Ispitivanja termičke stabilnosti čistog 3,00% rastvora Na-kazeinata pokazala su da je ovaj rastvor, bez prisustva odredjenih jona koji ulaze u sklop pojedinih model sistema, termički stabilan. Rezultati su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2.: Rastvorljivost 3,00% rastvora Na-kazeinata, posle termičkog tretmana pri temperaturama od 20°C do 90°C

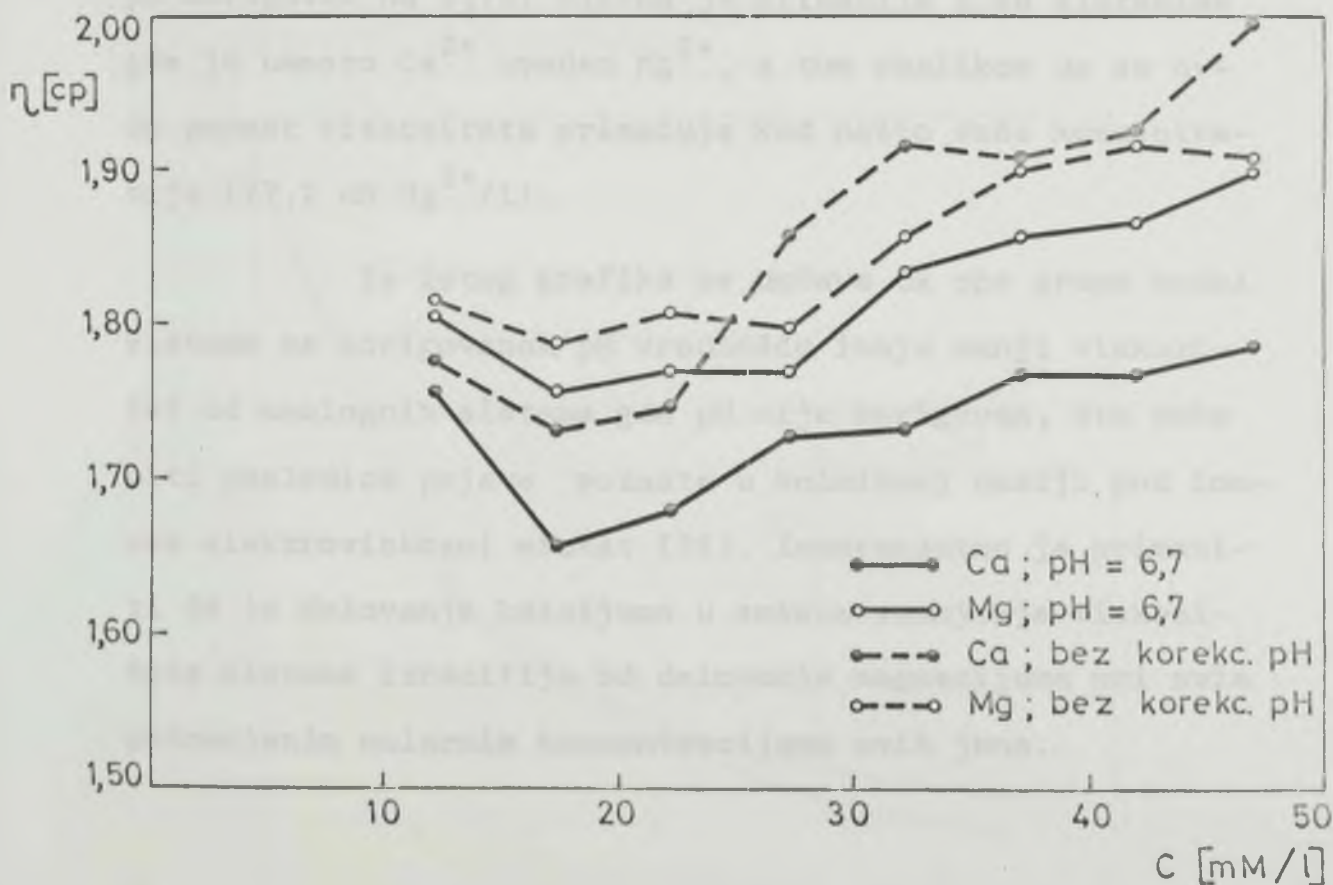
Temperatura (°C)	20	30	40	50	60	70	80	90
Rastvorljivost (%SM)	96,37	96,33	96,37	95,93	96,30	96,33	96,00	95,93

Podaci izneti u Tabeli 2. pokazuju da je rastvorljivost čistog kazeinata praktično nezavisna od visine termičkog tretmana, obzirom da se razlika u rastvorljivosti, koja varira u intervalu od 95,93 do 96,37%, nalazi u granicama eksperimentalne greške (0,44%). Ovo je bilo važno prethodno konstatovati, jer je tako eliminisan uticaj ponašanja samog kazeinata kod primene raznih temperatura termičkog tretmana na model sisteme.

pH vrednost 3,00% rastvora Na-kazeinata iznosila je u proseku 6,85.

4.2. VISKOZITET MODEL SISTEMA B.1. DO B.8.
i C.1. DO C.8.

Uz pretpostavku da ćemo merenjem viskoziteta rastvora uspeti da dobijemo izvesnu predstavu o osobinama micela kazeina u prisustvu jona odredjenih vrsta i koncentracija, izveli smo prethodne eksperimente čiji su rezultati prikazani u Grafiku 1.



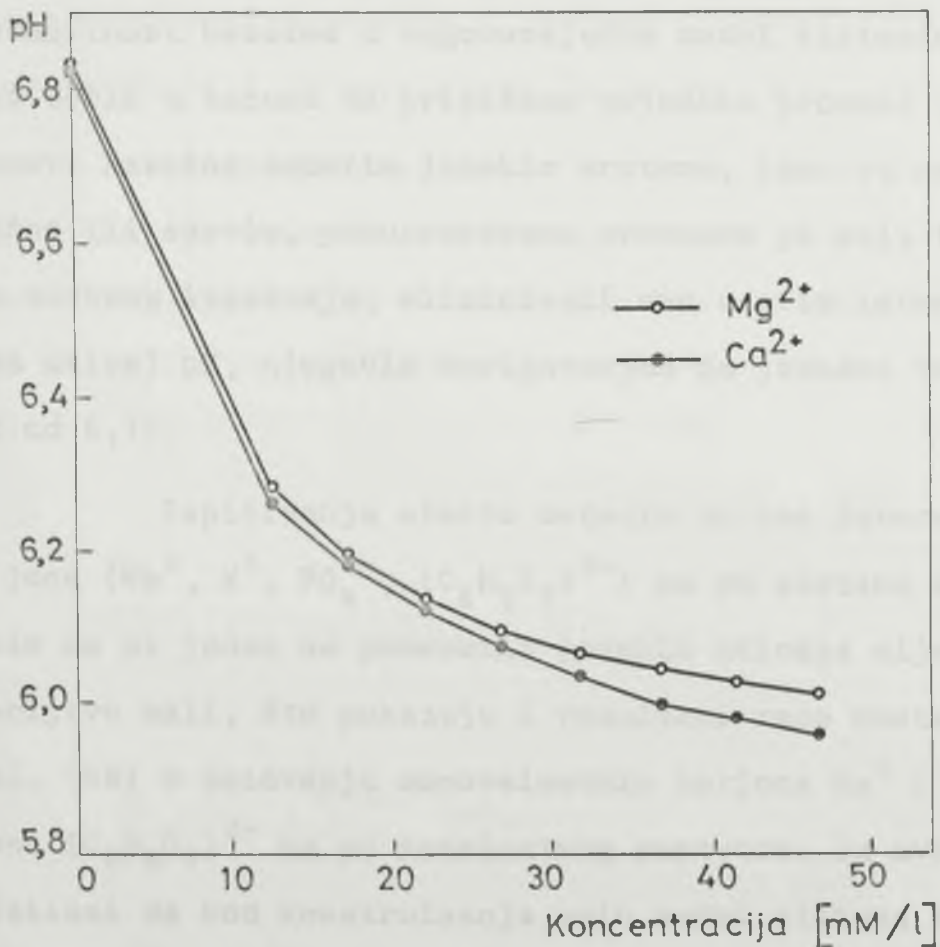
Grafik 1.: Viskozitet model sistema B.1. do B.8. i C.1. do C.8., pri pH = 6.7 (—●— i —○—) i bez korekcije pH (---●--- i ---○---).

Iz priloženog grafika se vidi da viskozitet svih ispitivanih model sistema opada sa porastom koncentracije kalcijumovih (sistemi tipa B), odnosno magnezijumovih jona (sistemi tipa C), do 17,3 mM/l. Sa daljim porastom koncentracije jona, viskozitet, prema očekivanju, ostaje približno konstantan, bez obzira na pH i jonsku vrstu. Medjutim, posle koncentracije od 22,2 mM Ca^{2+} /l, viskozitet raste, i to naglo kod sistema gde nije vršena korekcija pH vrednosti, a postepeno kod sistema gde je pH korigovan na 6,70. Slična je situacija i sa sistemima gde je umesto Ca^{2+} uveden Mg^{2+} , s tom razlikom da se ovde porast viskoziteta primećuje kod nešto veće koncentracije (27,2 mM Mg^{2+} /l).

Iz istog grafika se uočava da obe grupe model sistema sa korigovanom pH vrednošću imaju manji viskozitet od analognih sistema gde pH nije korigovan, što može biti posledica pojave poznate u koloidnoj hemiji pod imenom elektroviskozni efekat (26). Interesantno je primetiti da je delovanje kalcijuma u smislu smanjenja viskoziteta sistema izrazitije od delovanja magnezijuma pri svim primenjenim molarnim koncentracijama ovih jona.

4.3. pH VREDNOST MODEL SISTEMA

Razlike u viskozitetu, konstatovane kod navedenih model sistema kojima je korigovana pH vrednost u odnosu na analogne sisteme bez korekcije pH, ukazale su na to da različite koncentracije dodatih jona izazivaju promene u pH vrednosti pa smo želeli da tačno ustanovimo kolika je promena pH kazeinatnog rastvora prouzrokovana dodatkom jona određenih vrsta i koncentracija. Rezultati merenja pH vrednosti u sistemima B.1. do B.8. i C.1. do C.8. prikazani su u Grafiku 2.



Grafik 2.: pH vrednost model sistema B.1. do B.8. (—●—) i C.1. do C.8. (—○—)

Iz toka krivih u Grafiku 2. jasno se vidi da male koncentracije dodatih jona Ca^{2+} , odnosno Mg^{2+} , izazivaju znatan pad pH, koji je pri daljem porastu koncentracija pomenutih jona manje izražen. Pojava sniženja pH vrednosti sa porastom koncentracije navedenih jona u sistemu je verovatno posledica vezivanja Ca^{2+} , odnosno Mg^{2+} , za slobodne karboksilne grupe dikarbonskih aminokiselina u kazeinu, što uzrokuje povećanje koncentracije H^+ jona u rastvoru. Treba primetiti da ukupan pad pH od model sistema B.1. do B.8. iznosi $\Delta\text{pH} = 0,31$ i od C.1. do C.8. je $\Delta\text{pH} = 0,25$, što svakako nije bez značaja, i ima uticaja na stabilnost kazeina u odgovarajućim model sistemima. Da ne bi došli u zabunu da pripišemo pojedine promene u stabilnosti kazeina dodatim jonskim vrstama, iako su one, delimično ili sasvim, prouzrokovane promenom pH koju ti joni u sistemu izazivaju, eliminisali smo u ovim istraživanjima uticaj pH, njegovim korigovanjem na jednaku vrednost od 6,70.

Ispitivanja efekta ostalih za nas interesantnih jona (Na^+ , K^+ , PO_4^{3-} , $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}$) na pH sistema su pokazala da ni jedan od pomenutih jonskih uticaja nije zanemarljivo mali, što pokazuju i rezultati rada Hostettler-a et al. (48) o delovanju monovalentnih katjona Na^+ i K^+ i anjona $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}$ na pH kazeinatnog rastvora. Iz ovoga proizilazi da kod konstruisanja svih model sistema treba voditi računa da pH vrednost bude jednaka bez obzira na primenjene jonske vrste i koncentracije.

U sistemima u kojima varira koncentracija fosfata u prisustvu kalcijuma (sistemi D), odnosno magnezijuma (sistemi E), podešavanje pH vrednosti je bilo moguće izvesti dodavanjem željenih količina fosfatnog jona u obliku rastvora Na_2HPO_4 i NaH_2PO_4 u odgovarajućem odnosu. U sistemima u kojima raste koncentracija citrata, u prisustvu kalcijuma (sistemi F) odnosno magnezijuma (sistemi G), isti cilj je postignut doziranjem izračunatih količina citratnog jona u formi citratnog pufera: smese $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ i $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$. U sistemima koji slede (H.1. do H.12.; I.1. do I.3.; J.1. do J.3.) u kojima je kombinovano više anjonskih i katjonskih vrsta potrebna vrednost pH od 6,70 postignuta je na analogan način.

Treba primetiti da je ustanovljena konstantna vrednost za pH svih model sistema od 6,70 odabrana na osnovu činjenice da se kazein u prirodi nalazi u sistemu toga pH.

4.4. MICELARNA TEŽINA, VELIČINA, RASPODELA VELIČINA I OBLIK KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMIMA

4.4.1. Micelarna težina kazeina u model sistemima B.1. do B.5. i C.1. do C.5.

Micelarna težina kazeina u model sistemima B.1. do B.5. (sistemi sa dodatim kalcijumovim jonima) i C.1. do C.5. (sistemi sa dodatim magnezijumovim jonima) određena je "light scattering" metodom, kako je opisano u Metodici istraživanja (tačka 3.5.1.).

Merenjem intenziteta rasute svetlosti pod uglovima 45° i 135° ustanovljeno je da postoji znatna disimetrija rasipanja svetlosti kod navedenih model sistema. Ovo je posledica veličina micela u odnosu na talasnu dužinu upadnog svetla, te dolazi do Debay-evog rasipanja, gde intenzitet rasutog svetla zavisi od ugla posmatranja (49). Zbog toga smo interpretaciju rezultata izveli metodom dvojne interpolacije po Zimm-u (123), uz merenje intenziteta rasute svetlosti pod sledećim uglovima: 30° , 35° , 40° , 45° , 50° , 60° , 70° , 80° , 90° , 110° , 120° , 130° , 135° , 140° , 145° i 150° . Na osnovu izmerenih intenziteta rasipanja izračunate su vrednosti Rayleigh-evog količnika

$(R_{\theta, \nu})$ za svaki ugao i svaku koncentraciju, a zatim i vrednosti za ordinatu $(Kc/R_{\theta, \nu})$ i apscisu $(\sin^2\theta/2 + kc)$ u Zimm-ovom rešetkastom dijagramu. Zimm-ovi dijagrami navedenih model sistema nalaze se u Prilogu, Grafik 3. do Grafik 12. Isprekidana linija ekstrapolacije na nulu koncentracije seče se kod svih grafika sa linijom ekstrapolacije na nulu ugla u jednoj tački na ordinati, što je dokaz o tačnosti rada. Recipročna vrednost odsečka na ordinati predstavlja srednju micelarnu težinu kazeina u odgovarajućem model sistemu. Micelarne težine kazeina u sistemima B.1. do B.5. i C.1. do C.5. navedene su u Tabeli 3., odnosno u Tabeli 4. i Grafiku 13.

Tabela 3.: Micelarne težine kazeina u model sistemima B.1. do B.5.

Model sistem	$1/m_w \times 10^7$	\bar{M}_w (milioni)
B.1.	0,3250	30,770
B.2.	0,1750	57,140
B.3.	0,1640	60,980
B.4.	0,1130	88,490
B.5.	0,0915	109,290

Tabela 4.: Micelarne težine kazeina u model sistemima C.1. do C.5.

Model sistem	$1/\bar{M}_w \times 10^7$	\bar{M}_w (milioni)
C.1.	0,3250	30,770
C.2.	0,2770	36,100
C.3.	0,2300	43,480
C.4.	0,2300	43,480
C.5.	0,2300	43,480

Na osnovu rezultata navedenih u Tabeli 3. može se zaključiti da micelarna težina, što znači i veličina kazeinske globule u proseku, raste sa porastom koncentracije Ca^{2+} od B.1. do B.5. U sistemu B.5. gde koncentracija Ca^{2+} odgovara onoj u mleku (117), micelarna težina kazeina iznosi $1,0929 \times 10^8$. Autori koji su se bavili ispitivanjem micelarne težine kazeina u mleku navode za ovaj parametar vrednosti reda veličine 10^8 (7, 23, 79), odnosno interval od 10^8 do 10^9 (32, 74). Iz ovoga proizilazi da se u model sistemu, in vitro konstruisanom, dodatkom Ca^{2+} izaziva asociranje kazeina i stvaranje agregata slične veličine kao što se to događa in vivo, pri sintezi mleka. Kalcijumovi joni se u model sistemima, kao i u mleku, vežuju za slobodne karboksilne grupe asparaginske i glutaminske kiseline kao i za mono estar fosforne kiseline

kovalentno vezane za hidrosilne grupe oksiamino kiseli-
na u kazeinu, o čemu svedoči ustanovljeni pad pH vred-
nosti u prisustvu ovih jona, kao i povećanje micelarne
težine. Sem toga, zbog veće konstante vezivanja kalciju-
ma za karboksilne grupe ($k_{Ca,C}^O = 5,6$) i fosfatne grupe
($k_{Ca,P}^O = 72$) od natrijuma ($k_{Na,C}^O$ - zanemarljiva;
 $k_{Na,P}^O = 1$) (66), dodavanje kalcijumovih jona rastvoru
Na-kazeinata može da izazove eliminaciju dela natrijuma
iz kazeinata, i zamenu kalcijumom, što takodje dovodi do
agregacije i povećanja micelarne težine.

Postoje dva pitanja na koja se na bazi ovih
rezultata, medjutim, ne može dati odgovor, i to: da li
su sve micidele istih, ustanovljenih micelarnih težina, dak-
le iste veličine, ili je to polidisperzan sistem gde je
navedena vrednost srednja micelarna težina; i drugo: da
li su micidele globularnog oblika.

Rezultati Tabele 4. pokazuju kako se kreće
vrednost micelarne težine kazeina u model sistemima C.1.
do C.5., gde je umesto Ca^{2+} prisutan takodje dvovalentni
katjon Mg^{2+} , u istim jonskim koncentracijama. I u ovim mo-
del sistemima se može konstatovati povećanje micelarne te-
žine kazeina sa porastom koncentracije Mg^{2+} u sistemu,
ali samo do određene granice, odnosno do koncentracije
od 23,4 mM/l. Sa daljim povećanjem koncentracije Mg^{2+} pro-
sečna veličina kazeinske micidele ostaje nepromenjena.

Obzirom da u literaturi do sada nije bilo podataka o stepenu agregirajućeg dejstva magnezijumovih jona na kazein, i da postoji težnja da se dejstvo magnezijumovih jona identifikuje sa kalcijumovim na bazi iste valentnosti, pojava granične koncentracije magnezijuma, kao agregirajućeg agensa, predstavlja neočekivanu novinu.

Uporedjenje navedene dve grupe analognih model sistema pokazuje da je pri najnižoj koncentraciji dodatih jona micelarna težina kazeina ista bez obzira na jonsku vrstu. Medjutim, pri porastu koncentracija dodatih katjona pojavljuje se razlika u agregacionom ponašanju kazeina u zavisnosti od vrste prisutnog jona. Dok se u model sistemima sa kalcijumom primećuje stalan i izrazit porast micelarne težine, u sistemima gde se nalazi magnezijum micelarna težina postepeno raste do koncentracije od 23,4 mM/l Mg^{2+} (sistem C.3.), a zatim ostaje na konstantnom nivou pri daljem povećanju koncentracije Mg^{2+} . Tako je pri najvećoj primenjenoj koncentraciji magnezijumovih jona od 33,3 mM/l (sistem C.5.) micelarna težina kazeina oko 2,5 puta manja od težine kazeinske micle u analognom sistemu sa kalcijumom ($\bar{M}_w = 43,480$ miliona u sistemu C.5., u odnosu na $\bar{M}_w = 109,290$ miliona u sistemu B.5.). Ovaj interesantan podatak ukazuje da su moguće razlike u stabilnosti kazeina u prisustvu kalcijuma, ili magnezijuma, prema različitim agensima, iako su to joni iste valence.

Posle razmatranja rezultata merenja micelarnih težina kazeina, mora se konstatovati da i u grupi model sistema sa različitim koncentracijama Mg^{2+} ostaju ista pitanja, kao i kod prethodnih, bez odgovora. Očigledno je da u prisustvu dvovalentnih katjona dolazi do agregiranja kazeinskih micela in vitro. Sasvim je, međjutim, neizvesno kakav oblik imaju micidele u prisustvu Mg^{2+} , jer u dosada publikovanoj literaturi takvih podataka nema. U prirodnoj sredini, znači u mleku, kazein se nalazi u obliku globula, ali zahvaljujući kalcijumu. Nije poznato kakva je tu uloga magnezijumovih jona. O eventualnoj polidisperznosti u sistemima od C.1. do C.5. se na bazi ovih rezultata takodje ne može zaključivati, jer sistemi mogu biti uniformnih micelarnih težina, a isto tako ustanovljene i u Tabeli 4. navedene vrednosti za \bar{M}_w , mogu biti prosek polidisperznih sistema.

Korišćenjem formula za izračunavanje molekulskih težina na osnovu prečnika, odnosno radijusa žiracije, želeli smo da iz podataka Tabele 3. i Tabele 4. izračunamo odgovarajuće prečnike micela kazeina u sistemima B.1. do B.5. i C.1. do C.5. Međjutim, obzirom da obe ove formule pretpostavljaju da se radi o pojedinačnom globularnom makromolekulu, dakle sklopčanom polipeptidnom lancu, a ne o asocijatu više makromolekula kao u našem slučaju, gde u sastav ulaze i drugi mali molekuli i solvatna voda, dobijene vrednosti za prečnike ne odgovaraju stvarnosti.

Da bi bili u mogućnosti da damo odgovor i na navedena pitanja oko polidisperznosti, oblika i prečnika kazeinske micelle u prisustvu raznih jona u odabranim koncentracijama i kombinacijama, izabrane model sisteme smo snimili na elektronskom mikroskopu.

4.4.2. Oblik kazeinske micelle u izabranim model sistemima

Jedine direktne informacije o obliku proteinskog molekula daje elektronska mikroskopija. Sve ostale metode za ustanovljavanje oblika navedenih makromolekula zasnivaju se na posmatranju odstupanja neke fizičke karakteristike od idealnog ponašanja računatog za nehidratiran sferni molekul (105). Zato su od ukupnog broja konstruisanih model sistema izabrana karakteristična 22 sistema za snimanje elektronskim mikroskopom, sa ciljem uporedjenja delovanja prisustva pojedinih jona u različitim koncentracijama i kombinacijama na oblik, veličinu i raspodelu veličina kazeinske micelle, što odredjuje i stabilnost kazeina u sistemu.

Snimljeni su sledeći sistemi: A.1. (čist 3,00% rastvor Na-kazeinata); B.2. (iz grupe B sa dodatim jonima kalcijuma, izabran je sistem sa koncentracijom kalcijumovih jona koja je zastupljena i u sistemima kombinovanog jonskog sastava); C.2. (sistem iz grupe C sa dodatim

jonima magnezijuma; koncentracija magnezijumovih jona u ovom sistemu je ekvimolarna koncentraciji kalcijumovih jona u sistemu B.2. i takodje zastupljena u sistemima kombinovanog jonskog sastava); D.1., D.3. i D.5. (iz grupe sistema sa fosfatom u prisustvu kalcijumovih jona izabrani su sistemi sa minimalnim, srednjim i maksimalnim sadržajem fosfata); E.1., E.3. i E.5., (sistemi analogni prethodnim ali u prisustvu magnezijumovih jona); F.1. i F.4. (sistemi sa dve izabrane koncentracije citrata u prisustvu kalcijumovih jona); G.1. i G.4. (sistemi analogni prethodnim, ali je umesto kalcijumovih prisutna ekvimolarna količina magnezijumovih jona); H.1., H.2. i H.6. (iz grupe H izabran je sistem koji se u prethodnim eksperimentima pokazao najnestabilniji: H.1. i dva koja su bila stabilna, H.2. i H.6., pri najnižim koncentracijama fosfatnih i citratnih jona); I.1., I.2. i I.3. (sistemi nastali od sistema H.1., H.2. i H.6. zamenom 50% kalcijumovih jona magnezijumovim); i J.1., J.2. i J.3. (ovi sistemi su takodje analogni sistemima H.1., H.2. i H.6., s tom razlikom da je sva količina dodatih jednovalentnih katjona predstavljena kalijumom, a ne natrijumom). Snimci kazeinskih micela u navedenim model sistemima napravljeni uz pomoć emisionog elektronskog mikroskopa (uvećanje 50.000 puta) nalaze se u Prilogu: Fotografija 1 do 22. Na svakoj fotografiji nalazi se oznaka model sistema koji predstavlja.

Pre nego što predjemo na razmatranje različitih pokazatelja dobijenih statističkom obradom rezultata ovih eksperimenata, neophodno je zadržati se na zapažanjima koja proizilaze iz posmatranja preparata ispitivanih model sistema u polju elektronskog mikroskopa, odnosno fotografija datih u Prilogu. To je ujedno i prednost odredjivanja veličina micela na ovaj način, u odnosu na većinu drugih metoda, jer su makromolekuli, odnosno micelle čija se raspodela veličina odredjuje, zahvaljujući mnogostrukom uvećanju učinjene vidljivim pa je moguće sa sigurnošću zaključivati i o njihovom obliku.

Primećuje se da su se kazeinske micelle u model sistemima: B.2.; D.1.; D.3.; D.5.; F.1.; F.4.; H.1.; H.2.; H.6.; J.1.; J.2. i J.3.; formirale u obliku manje ili više pravilnih globula različitog prečnika. U svim navedenim sistemima je naročito izražen pravilan sferan oblik sitnijih micela, dok se kod izvesnog broja krupnijih globula zbog neznatnih odstupanja u njihovom obliku, može uočiti da su nastale kao posledica agregacije manjih formi. Izvanrednu pravilnost oblika najvećeg broja micela u svim citiranim model sistemima potvrđuje i izgled njihovih senki na preparatima tj. fotografijama. Na osnovu iznetog može se zaključiti da:

- Ca^{2+} izaziva formiranje kazeinskih micela in vitro, u rastvoru Na-kazeinata (model sistem B.2.)

- do agregacije kazeina in vitro dolazi i ako je u sistemu pored Ca^{2+} prisutna i jedna od sledećih anjonskih vrsta: PO_4^{3-} (model sistemi: D.1.; D.3.; D.5.;) ili $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}$ (model sistemi: F.1.; F.4.;) odnosno njihove kombinacije (model sistemi: H.1.; H.2.; H.6.)

- prethodni zaključci se ne menjaju i ako se u sistem uključi i K^+ (model sistemi: J.1.; J.2.; J.3.;

- posebno treba istaći, da u svim navedenim sistemima, in vitro formirane micelle kazeina imaju globularan oblik i da prečnici micela u pojedinim model sistemima nisu identični, nego pokazuju određenu polidisperznost, raspodelu, što odgovara načinu nastanka kazeinskih micela in vivo. Ova interesantna činjenica je verovatno u vezi sa pojavom pamćenja prvobitne veličine micelle, poznate pod nazivom "size memory". Na navedenu pojavu se može gledati sa dva aspekta: čisto genetski, gde se sposobnost povećanja ili smanjenja veličine micelle razmatra samo kao pojava koja je unapred uslovljena genetskim faktorima; i sa fizičko-hemijskog stanovišta, tj. da je uvećanje micela uslovljeno sa jedne strane prisustvom agregirajućih jona (Ca^{2+} , Mg^{2+}) i sa druge strane genetski uslovljenim osobinama samih micela kazeina da mogu da se asociraju do određenog stepena. Postojanje polidisperznosti i pri većim koncentracijama Ca^{2+} ukazuje na prisustvo terminalnih grupa u miceli koje omogućuju aglomeraciju, pa se u

zavisnosti od njihovog broja micela uvećava do određene granice.

Razmatranja o raspodeli i parametrima raspodele prečnika pojedinih model sistema će biti izneta donije, u komentaru podataka dobijenih statističkom obradom rezultata elektronske mikroskopije.

Nasuprot razmatranih model sistema, kazeinske micelle se u sistemima: C.2.; E.1.; E.3.; E.5.; G.1.; G.4.; I.1.; I.2.; i I.3.; nisu formirale u obliku pravilnih globula različitih prečnika. Posmatranjem fotografija navedenih sistema, uočava se da je do agregiranja, odnosno stvaranja micela došlo, međjutim stvoreni oblici u ovim sistemima imaju nepravilnu, nedefinisanu formu. Iz snimka preparata navedenih sistema (naročito model sistem C.2., samo sa magnezijumom), stiče se utisak nanosa, gde je nemoguće razaznati granice odvojenih agregata. Posledica toga je i izgled senki, koje su niske i neizražene, ili ih i nema. Loptasti oblici se samo mestimično pojavljuju no ne može se konstatovati ni da neki drugi pravilan geometrijski oblik preovladjuje. Jednostavno nema pravilnosti. Takav izgled micela u pomenutim model sistemima sprečio je da i ove sisteme statistički obradimo, jer je bilo nemoguće odrediti veličinu pojedinačnih micela i svrstati ih u klase, odnosno pripremiti ih za statističku analizu.

Medjutim snimci ove grupe model sistema omogućili su donošenje veoma važnog i interesantnog

zaključka u pogledu uloge Ca^{2+} odnosno Mg^{2+} u formiranju micela kazeina u konstruisanim model sistemima. Ukoliko se vratimo na početak rada gde je iznet spisak svih model sistema, sa odgovarajućim jonskim sastavom, vidimo da je u sistemima: C.2.; E.1.; E.3.; E.5.; G.1.; G.4.; I.1.; I.2.; i I.3.; za razliku od drugih ovde posmatranih sistema, prisutan magnezijumov jon. Iz istog spiska je jasno da su sistemi u pogledu ostalih jonskih koncentracija analogni: sistem C.2. odgovara sistemu B.2.; sistemi E.1., E.3., E.5. odgovaraju sistemima D.1., D.3., D.5.; sistemi G.1. i G.4. su analogni F.1. i F.4. U sistemima I.1., I.2. i I.3. je 50% dvovalentnih katjona zastupljeno magnezijumom (ostatak su kalcijumovi joni), što je i jedina razlika u odnosu na sisteme H.1., H.2. i H.6.

U radovima u kojima se iznose rezultati ispitivanja afiniteta magnezijumovih jona prema kazeinu, navode se suprotni rezultati. U redosledu po sposobnosti vezivanja zemnoalkalnih metala za kazein koji daju Dickson et al. (21) magnezijum je ispred kalcijuma, dok su Thompson et al. (107) ustanovili da je afinitet kalcijuma prema kazeinu veći nego magnezijuma. O obliku koji imaju micide nastale agregiranjem kazeina pod uticajem magnezijuma nema podataka. U pojedinim publikacijama (92) se nailazi na pretpostavku o identičnom delovanju jona kalcijuma i magnezijuma na kazein, sa obrazloženjem da se radi o jednako valentnim katjonima.

Na osnovu naših rezultata, medjutim, očigledno je da se oblik micela formiranih u model sistemima raznih jonskih vrsta i njihovih koncentracija u biti razlikuje ako je agregirajući agens jon magnezijuma od onih gde se agregiranje vrši pod dejstvom kalcijumovih jona, što dosada nije bilo poznato. Ovaj zaključak potvrđuje i činjenica da su najizrazitije nepravilne micide nastale u sistemu C.2. gde je od svih jonskih vrsta prisutan samo magnezijum, a da su najbliže pravilnom obliku micide kazeina u kombinovanim sistemima I.1., I.2., I.3., gde je ukupna količina dvovalentnih katjona zastupljena kalcijumom i magnezijumom u jednakim koncentracijama.

4.4.3. Veličina i raspodela veličina kazeinskih micela u izabranim model sistemima

Upotrebom elektronskog mikroskopa Nitschmann (79) je uspeo da pored pretpostavke o sfernom obliku kazeinskih micela, dokaže i hipotezu o njihovoj polidisperznosti. Ustanovljena raspodela veličina, odnosno prečnika kazeinskih micela u mleku, kretala se od 400 Å (sa učestalošću od 21%) do 2800 Å (gde je učestalost iznosila samo 2%) i imala srednji prečnik od 1200 Å. Posle ovog prvog rada u kome se na osnovu snimaka elektronskim mikroskopom zaključuje o stanju kazeinskih micela u mleku, pojavljuje

se niz radova Hostettler-a i Imhof-a (45, 46, 47, 48), koji takodje zahvaljujući primeni elektronske mikroskopije iznose nove zanimljive činjenice o submikroskopskoj strukturi i stanju kazeina u mleku i nekim mlečnim proizvodima, o uticaju termičkog tretmana, posebno uperizacije i liofilizacije na raspodelu kazeinskih micela u mleku, o promenama kazeina nastalim kao posledica delovanja himozina, i sl. Isti autori su započeli proučavanje ponašanja kazeina u model sistemima, napravivši elektronskim mikroskopom snimak vodenog rastvora Na-kazeinata, i istog rastvora u prisustvu kalcijumhlorida (46). To su ujedno i jedini literaturni podaci koji tretiraju uticaj kalcijumovih jona na veličinu kazeinske micelle u sistemu u kome su svi drugi parametri učinjeni konstantnim. U dosadašnjoj literaturi, medjutim, nema podataka o delovanju magnezijumovih, kalijumovih, natrijumovih, fosfatnih i citratnih jona i njihovih kombinacija na oblik, veličinu i raspodelu veličina kazeinskih micela, što ističe neophodnost istraživanja preduzetih ovom disertacijom.

Poznata je činjenica da se u proizvodnji kondenzovanog mleka, u cilju termičke stabilizacije, dodaju natrijumove i kalijumove soli fosforne i limunske kiseline. Ovaj deo naših istraživanja treba da dâ odgovor i na pitanje: u kom pravcu deluju kalcijumovi, fosfatni i

citratni joni na veličinu i raspodelu veličina kazeinskih micela u sistemu.

Za model sisteme snimljene elektronskim mikroskopom u kojima je bilo moguće odrediti tačnu veličinu globula kazeina (B.2.; D.1.; D.3.; D.5.; F.1.; H.1.; H.2.; H.6.; J.1.; J.2.; J.3.;) prečnici su svrstani u klase i podaci podvrgnuti statističkoj obradi. Pri tome je broj klasa: $i = 9-16$ (u zavisnosti od sistema); prečnik: $x_i = 100-3100 \text{ \AA}$; sa širinom intervala: $\Delta x_i = 200 \text{ \AA}$, i ukupan broj micela čiji je prečnik uzet u obzir za pojedinačne sisteme: $\Sigma n_i = N \approx 2000$ (1900-2182). Izračunati su sledeći parametri raspodele navedenih sistema: \bar{x} (srednja vrednost), σ^2 (disperzija), σ (standardna devijacija), β_1 (koeficijent asimetrije - prvi Pearson-ov koeficijent), $\gamma_1 = \sqrt{\beta_1}$, β_2 (koeficijent spljoštenosti - drugi Pearson-ov koeficijent) i $\gamma_2 = \beta_2 - 3$; i to za brojnu, prečničku, površinsku i zapreminsku raspodelu. Dobijene vrednosti prikazane su zbog bolje preglednosti u $\mu\mu$ ($1 \mu\mu = 10 \text{ \AA}$) u Tabeli 5, 6, 7. i 8. Koeficijenti γ_1 i γ_2 nisu dati u navedenim tabelama jer ih implicitno sadrže koeficijenti β_1 i β_2 . Gustine istih raspodela nalaze se u Prilogu (Tabela 9. do Tabela 19). S obzirom da gustine brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele imaju analognu tendenciju za isti model sistem, za grafičko prikazivanje izabrali smo samo jedan tip raspodele: prečničku. Histogrami prečničke raspodele ispitivanih model sistema nalaze se u Prilogu: Grafik 14. do Grafik 24.

Tabela 5.: Parametri brojne raspodele kazeinskih micela
u navedenim model sistemima

Model sistem	Parametri brojne raspodele				
	\bar{x}	σ^2	σ	β_1	β_2
B.2.	46,185	891,033	29,850	5,201	10,104
D.1.	57,833	1731,996	41,617	4,269	8,995
D.3.	48,314	940,861	30,673	5,668	10,788
D.5.	48,275	1290,117	35,918	8,941	14,423
F.1.	43,645	1000,655	31,633	5,348	9,106
H.1.	39,873	458,501	21,413	4,959	10,497
H.2.	39,231	496,041	22,272	3,978	10,060
H.6.	36,419	351,779	18,756	5,269	15,120
J.1.	40,873	382,196	19,549	4,291	11,260
J.2.	40,225	441,336	20,479	3,217	10,694
J.3.	38,597	293,852	17,142	4,756	12,040

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 5. može se konstatovati da je prosečan prečnik kazeinske micelle najmanji u sistemu kombinovanog jonskog sastava H.6. i iznosi 364 Å, a zatim sledi J.3. sa srednjim prečnikom od 386 Å. Poredjenjem ova dva sistema (koja su identična po sastavu sem što jednovalentni katjoni u sistemu J.3. nisu zastupljeni samo natrijumom nego delimično i kalijumom, bez promene ukupne koncentracije ovih jona) sa drugim

sistemima iz istih grupa kao što su H.1., H.2.; odnosno J.1., J.2., primećuje se da se sa porastom koncentracije citratnih jona (sistemi H.2., odnosno J.2.) u odnosu na početnu (sistemi H.1. i J.1.) prosečan prečnik kazeinske micela bitno ne menja, dok to nije slučaj pri porastu koncentracije citratnih i fosfatnih jona (sistemi H.6., odnosno J.3.). Zahvaljujući povećanom sadržaju oba navedena anjona kazeinska micela je u ovim sistemima u proseku manja od iste u svim ostalim posmatranim model sistemima. Takodje se može zaključiti, poredjenjem citratnih sistema sa sistemom B.2., da kombinacija dodavanja fosfatnih i citratnih jona u svim ispitivanim koncentracijama deluje povoljno na smanjenje globula kazeina, jer je prosečan prečnik kazeinske micela u svim ovim sistemima manji od srednjeg prečnika micela u sistemu u kojem se nalaze samo joni kalcijuma u analognoj količini (B.2.: $\bar{x} = 462 \text{ \AA}$). Prosečna veličina kazeinske micela verovatno utiče i na termičku stabilnost kazeina, odnosno njegovu osetljivost prema himozinu, što treba da pokažu kasnija ispitivanja.

U sistemima D.1., D.3. i D.5., gde se pored uvek jednako zastupljene koncentracije kalcijuma nalazi i fosfatni anjon u rastućim koncentracijama, stanje je sledeće: minimalna koncentracija PO_4^{3-} od 16,1 mM/l izaziva neobično veliko povećanje prečnika kazeinskih micela; za 116 \AA je prosečan prečnik micela (D.1.: $\bar{x} = 578 \text{ \AA}$)

veći od istog u odgovarajućem sistemu bez PO_4^{3-} (B.2.: $\bar{x} = 462 \text{ \AA}$). Razlika u veličini prečnika micela je tolika da ju je moguće uočiti i jednostavnim posmatranjem i uporedjenjem fotografija model sistema D.1. i B.2. Sa povećanjem koncentracije fosfatnih jona (sistemi D.3. i D.5.) srednji prečnik micela se smanjuje u oba sistema na istu vrednost od $\bar{x} = 483 \text{ \AA}$, što je veoma blisko sistemu bez fosfata (B.2.).

Već se na prvi pogled iz snimaka model sistema F.1. i F.4. u Prilogu primećuje izrazito delovanje citratnog jona u smislu smanjenja prosečnog prečnika kazeinske globule. U sistemu sa samo 2,35 mM/l $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}$ (model sistem F.1.) srednji prečnik micela iznosi $\bar{x} = 436 \text{ \AA}$ (Tabela 5.) dok je prečnik micela u sistemu F.4. sa 18.8 mM/l $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}$ reda veličine 200-300 \AA , sa veoma uskom raspodelom. Da navedena količina citrata, prisutna u model sistemu F.4., doprinosi dezagregiranju micela kazeina u takvoj meri da raspodela više uopšte nije izražena, a da se prečnik kazeinske micelle približava prečniku globula kazeina u model sistemu čistog rastvora Na-kazeinata (A.1.), očigledno je i iz fotografija ovih sistema.

Iz uporedjenja parametara raspodele model sistema grupe D sa parametrima sistema obeleženih oznakom F, proizilazi da je povoljno dejstvo citratnog jona na dezagregaciju kazeinske micelle znatno jače od delovanja fosfata.

Ovo tim pre ako se uzmu u obzir molarne koncentracije u kojima se navedeni joni nalaze u tim sistemima. Dok je fosfat zastupljen sa: 16,1; 29,1; i 42,0 mM/l, u odgovarajućim sistemima D, citrat se nalazi samo u koncentraciji od 2,35 i 18,80 mM/l u sistemima F.

Tabela 6.: Parametri prečničke raspodele kazeinskih micela u navedenim model sistemima

Model sistem	Parametri prečničke raspodele				
	\bar{x}	σ^2	σ	β_1	β_2
B.2.	65,478	1832,198	42,804	2,386	5,278
D.1.	87,781	3410,555	58,399	2,008	4,754
D.3.	67,788	1983,724	44,539	2,623	5,602
D.5.	74,999	3446,151	58,704	2,832	5,228
F.1.	66,572	2152,286	46,393	1,494	3,689
H.1.	51,372	874,614	29,574	3,096	6,161
H.2.	51,875	897,851	29,964	3,325	7,007
H.6.	46,078	674,333	25,968	6,925	13,096
J.1.	50,224	673,452	25,951	4,246	8,796
J.2.	50,732	694,574	26,355	2,641	7,404
J.3.	46,210	520,519	22,815	4,644	9,319

Vrednosti disperzije (σ^2), odnosno standardne devijacije (σ), iznete takodje u Tabeli 5, 6, 7 i 8,

neobično se razlikuju od sistema do sistema. Međutim, može se izvući jedan opšti zaključak, da je odstupanje od srednje vrednosti, izraženo navedenim parametrima, kod svih model sistema kombinovanog jonskog sastava (H.1., H.2., H.6., J.1., J.2., J.3.) relativno malo. Disperzija brojne raspodele se za ove sisteme kreće u granicama $\sigma^2 = 293 - 496$. Kod ostalih analiziranih sistema (B.2., D.1., D.3., D.5., F.1.) su raspodele razvučenije, odstupanja od srednje vrednosti veća, tako da disperzija ima vrednost $\sigma^2 = 891 - 1732$. Veća polidisperznost i šira raspodela kazeinskih micela citirane grupe sistema, posebno sistema D.1., D.3., D.5., gde su uz kalcijum prisutni samo fosfatni anjoni, očigledno je i na Graficima 14. do 24. u Prilogu, koji pokazuju histograme prečničke raspodele svih sistema.

Na osnovu iznosa prvog Pearson-ovog koeficijenta (β_1), koji se prema Tabeli 5. za brojnu raspodelu kreće u granicama $3,97 < \beta_1 < 8,94$, jasno je da je raspored kod svih sistema asimetričan ($\beta_1 > 0$), s tim što je duži krak rasporeda sa desne strane modusa. Relativno visok koeficijent asimetrije kombinovan sa izrazito visokim drugim Pearson-ovim koeficijentom (β_2) daje funkcijama gustine izgled gama-raspodele. Vrednost koeficijenta spljoštenosti je kod svih model sistema brojne raspodele $\beta_2 > 3$, kreće se u intervalu $8,99 < \beta_2 < 15,12$, što znači

da je koncentracija prečnika micela veća u okolini srednje vrednosti nego kod normalno spljoštenog rasporeda. Ovo je naročito ispoljeno kod sistema kombinovanog jonskog sastava H.6., gde β_2 iznosi 15,12. Izrazito konvergiranje vrednosti prečnika micela kazeina ka srednjoj vrednosti u navedenom sistemu potvrđuje i relativno mala standardna devijacija i disperzija ovog model sistema. Nasuprot ovome veoma izraženu spljoštenost pokazuje sistem D.1., gde β_2 iznosi 8,99. Razlika u pogledu spljoštenosti krivih raspodele navedena dva kao i ostalih sistema može se uočiti i na histogramima prečničkih raspodela datih u Prilogu (Grafik 14. do 24.).

Tabela 7.: Parametri površinske raspodele kazeinskih micela u navedenim model sistemima

Model sistem	Parametri površinske raspodele				
	\bar{x}	σ^2	σ	β_1	β_2
B.2.	93,460	2899,200	53,844	0,656	2,889
D.1.	126,634	5116,387	71,529	0,494	2,632
D.3.	97,052	3238,287	56,906	0,744	3,078
D.5.	120,948	5874,241	76,644	0,337	2,125
F.1.	98,902	2940,205	54,224	0,140	2,172
H.1.	68,397	1470,772	38,350	1,028	3,174
H.2.	69,183	1543,938	39,293	1,432	3,837
H.6.	60,713	1460,220	38,213	3,751	6,800
J.1.	63,633	1210,655	34,794	2,332	5,082
J.2.	69,074	1254,905	35,425	1,194	4,267
J.3.	57,474	947,446	30,780	2,573	5,357

Zaključci doneseni na osnovu posmatranja parametara brojne raspodele kazeinskih micela u Tabeli 5. mogu uglavnom, sa izvesnim manjim izmenama, da važe i za prečničku, površinsku i zapreminsku raspodelu kazeinskih micela, koje su prikazane u Tabeli 6., 7. i 8.

Tabela 8.: Parametri zapreminske raspodele kazeinskih micela u navedenim model sistemima

Model sistem	Parametri zapreminske raspodele				
	\bar{x}	σ^2	σ	β_1	β_2
B.2.	124,481	3289,987	57,358	0,071	2,206
D.1.	167,037	5514,860	74,262	0,027	2,095
D.3.	130,418	3762,807	61,342	0,113	2,400
D.5.	169,517	5677,771	75,351	0,030	1,913
F.1.	128,631	2660,696	51,582	0,010	2,369
H.1.	89,901	1844,640	42,949	0,131	2,101
H.2.	91,500	2095,100	45,772	0,310	2,288
H.6.	84,764	2661,853	51,593	1,053	2,985
J.1.	82,658	1859,598	43,123	0,726	2,698
J.2.	91,211	1710,202	41,354	0,239	2,707
J.3.	73,959	1489,698	38,557	0,827	2,766

Do odredjenih pomeranja navedenih tipova raspodela dolazi zbog njihovih definicija, gde promenljiva x figurira sa raznim eksponentom 1, 2 i 3, prema relaciji:

Za brojnu raspodelu: $y_n = \frac{n_i}{\sum_i n_i}$ (4)

Za prečničku raspodelu: $y_d = \frac{n_i x_i}{\sum_i n_i x_i}$ (5)

Za površinsku raspodelu: $y_p = \frac{n_i \pi x_i^2}{\sum_i n_i \pi x_i^2}$ (6)

Za zapreminsku raspodelu: $y_v = \frac{n_i \pi x_i^3 / 6}{\sum_i n_i \pi x_i^3 / 6}$ (7)

Gde je:

y_n - gustina brojne raspodele

y_d - gustina prečničke raspodele

y_p - gustina površinske raspodele

y_v - gustina zapreminske raspodele

n_i - broj micela

x_i - prečnik micela

Interesantni podaci dobijeni ovim ispitivanjima u pogledu delovanja fosfata na veličinu i raspodelu veličina kazeinske micela su delimično u suprotnosti sa sadašnjim saznanjem iz ove oblasti. Obično se fosfat, paralelno sa citratom, citira kao stabilizujući agens, što znači da treba očekivati da oba ova anjona deluju tako da smanjuju prosečnu veličinu kazeinskih micela u sistemu.

Naša ispitivanja su pokazala, medjutim, da niske koncentracije fosfata deluju upravo suprotno u sistemima D. Za takvo ponašanje fosfatnog jona može se dati sledeće objašnjenje: fosfat deluje na veličinu kazeinske micelle različito, u funkciji svoje koncentracije, tako što se pri nižim koncentracijama prvo vrši esterifikacija određenih slobodnih hidroksilnih grupa na kazeinu (uglavnom iz serina i treonina); za estarski vezani fosfat moguće je vezivanje kalcijumovih jona iz rastvora što dovodi do agregacije micela kazeina. Do asocijacije kazeinskih micela može doći i zbog reagovanja fosforne kiseline sa slobodnim amino grupama. Pri povećanju koncentracije fosfata u sistemu, aktivne grupe (OH, NH₂, COOH) aminokiseline su zasićene, čime je onemogućeno dalje kovalentno vezivanje fosfora za kazein. Fosfor se vezuje za kalcijum iz rastvora što sve izaziva poremećaj ravnoteže: vezani kalcijum/jonski kalcijum u korist vezanog oblika, pa dolazi do disocijacije vezanog kalcijuma, odnosno dezagregacije micelle kazeina i smanjenja njenog prosečnog prečnika. Pri razmatranju ovoga pitanja, medjutim, ne sme se izgubiti iz vida i činjenica da u mleku postoje i drugi joni i jonske grupe, koji mogu da modifikuju delovanje fosfata, kao što je to slučaj i u našim model sistemima kombinovanog jonskog sastava tipa H i J. Videli smo (Tabela 5.) da zahvaljujući prisustvu citrata (2,35 i 4,70 mM/l) u sistemima H.1. i H.2. sa 16,1 mMP/l prosečan

prečnik kazeinske micelle iznosi 399 Å, odnosno 392 Å, što znači da je za čitavih 179 Å, odnosno 186 Å manji od srednjeg prečnika micelle u odgovarajućem sistemu sa fosfatom a bez citrata (D.1.). Slično se može konstatovati i za sisteme J.1. i J.2. (gde je natrijumov jon delimično zamenjen kalijumovim) ako se uporede sa odgovarajućim sistemom bez citratnog anjona (D.1.).

Na osnovu izgleda krivih koje prikazuju raspodelu veličina kazeinskih globula u većini ispitivanih model sistema, koji podseća na gama-raspodelu, odlučili smo da sračunamo odgovarajuće parametre gama-raspodele za naše podatke i da utvrdimo stepen korelacije. Gama-raspodela je definisana sledećom funkcijom:

$$f(x) = C_k x^{\frac{k-2}{2}} \cdot e^{-\frac{x}{2}} \quad (8)$$

gde je:

$$C_k = \frac{1}{2^{k/2} \cdot \Gamma_{k/2}}$$

Logaritmovanjem gama-funkcije dobija se jednačina prave linije, koja je uz pomoć elektronskog računara i nacrtana za sve ispitivane model sisteme. Tačke koje su znatnije odstupale odbačene su iz daljeg računanja. Dobijene prave linije grafički ne prikazujemo jer stepen slaganja naših podataka, sa gama-raspodelom, dovoljno ilustruje i stepen korelacije i koeficijent određenosti. U tabeli 20. dati su koeficijenti korelacije

i koeficijenti odredjenosti za sve ispitivane model si-
steme.

Tabela 20.: Koeficijenti korelacije i koeficijenti
odredjenosti za navedene model sisteme

Model sistem	Koeficijent korelacije	Koeficijent odredjenosti
B.2.	0,984934	0,970095
D.1.	0,991469	0,983010
D.3.	0,980433	0,961249
D.5.	0,958364	0,918461
F.1.	0,974965	0,950557
H.1.	0,974617	0,949879
H.2.	0,973644	0,947982
H.6.	0,891022	0,793920
J.1.	0,962376	0,926168
J.2.	0,962287	0,925931
J.3.	0,962149	0,925730

Tabela 21.: Parametri brojne gama-raspodele kazeinskih micela u navedenim model sistemima

Model sistem	Parametri brojne gama-raspodele				
	\bar{x}	σ^2	σ	β_1	β_2
B.2.	34,451	1046,499	32,350	3,527	8,290
D.1.	50,794	1988,352	44,591	3,083	7,624
D.3.	31,009	1021,998	31,969	4,251	9,377
D.5.	27,458	1211,805	34,811	6,429	12,644
F.1.	36,844	1027,014	32,047	3,026	7,539
H.1.	24,778	512,294	22,634	3,338	8,007
H.2.	25,251	559,005	23,643	3,507	8,260
H.6.	13,698	332,160	18,225	7,081	13,621
J.1.	31,783	606,773	24,633	2,403	6,604
J.2.	32,357	666,348	25,819	2,501	6,677
J.3.	25,665	426,890	20,661	3,592	6,888

Vrednost parametara brojne, prečničke, površinske i zapreminske gama-raspodele (x , σ^2 , σ , β_1 , β_2) za pojedine model sisteme nalaze se u Tabeli: 21, 22, 23 i 24. Na osnovu prethodno konstruisanih histograma, nacrtane su krive površinske gama-raspodele i prikazane u: Grafiku 25. (za model sistem B.2.), Grafiku 26. (za model sisteme: D.1., D.3. i D.5.), Grafiku 27. (za model sistem F.1.), Grafiku 28. (za model sisteme: H.1., H.2. i H.6.) i Grafiku 29. (za model sisteme: J.1., J.2. i J.3.), i nalaze se u Prilogu.

Tabela 22.: Parametri prečniceke gama-raspodele kazein-
skih micela u navedenim sistemima

Model sistem	Parametri prečniceke gama-raspodele				
	\bar{x}	σ^2	σ	β_1	β_2
B.2.	64,827	1969,237	44,376	1,874	5,811
D.1.	89,939	3520,709	59,336	1,741	5,611
D.3.	63,967	2108,213	45,915	2,061	6,091
D.5.	71,591	3159,570	56,210	2,466	6,699
F.1.	64,718	1804,041	42,474	1,723	5,584
H.1.	45,453	939,775	30,656	1,819	5,729
H.2.	47,389	1049,083	32,389	1,868	5,803
H.6.	37,947	920,167	30,334	2,556	6,834
J.1.	50,874	971,242	31,165	1,501	5,251
J.2.	52,636	1039,912	32,248	1,563	5,308
J.3.	42,298	703,558	26,525	1,573	5,359

Proučavanje podataka datih u Tabeli: 21., 22., 23. i 24. koji predstavljaju parametre gama-raspodele ispitivanih sistema, dovodi do zaključaka koji u potpunosti odgovaraju prethodnim zaključcima izvedenim na osnovu rezultata navedenih u Tabeli: 5., 6., 7. i 8., Tabeli: 9. do 19. u Prilogu i Grafiku: 14. do 24. takodje u Prilogu, i koji se odnose na parametre raspodele navedenih sistema. Zato se ne bismo posebno zadržavali na

Tabela 23.: Parametri površinske gama-raspodele kazeinskih micela u navedenim model sistemima

Model sistem	Parametri površinske gama-raspodele				
	\bar{x}	σ^2	σ	β_1	β_2
B.2.	95,204	2891,974	53,777	1,276	4,914
D.1.	129,085	5053,066	71,085	1,213	4,819
D.3.	96,924	3194,428	56,519	1,360	5,040
D.5.	115,725	5107,335	71,466	1,525	5,288
F.1.	92,594	2581,069	50,804	1,204	4,806
H.1.	66,129	1367,255	36,976	1,251	4,876
H.2.	69,527	1539,160	39,232	1,274	4,910
H.6.	62,196	1508,173	38,835	1,559	5,339
J.1.	69,965	1335,711	36,547	1,091	4,637
J.2.	71,369	1399,280	37,407	1,099	4,689
J.3.	58,931	980,226	31,308	1,129	4,693

komentaru parametara gama-raspodele. Funkcije gustine površinske gama-raspodele prikazane po grupama srodnih sistema u Grafiku 25. do 29. takodje potvrđuju izvedene zaključke. Interesantno je konstatovati na osnovu podataka iz Tabele 20. da linearizovani oblik gama funkcije pokazuje izraženu pravilnost zavisnosti y od x , odnosno da raspodela veličina kazeinskih micela u ispitivanim sistemima odgovara gama-raspodeli sa visokim stepenom korelacije. Koeficijent korelacije (Tabela 20.)

Tabela 24.: Parametri zapreminske gama-raspodele kazeinskih micela u navedenim model sistemima

Model sistem	Parametri zapreminske gama-raspodele				
	\bar{x}	σ^2	σ	β_1	β_2
B.2.	125,581	3814,712	61,763	0,967	4,451
D.1.	186,230	6585,423	81,151	0,931	4,396
D.3.	129,883	4280,643	65,426	1,015	4,522
D.5.	159,858	7055,100	83,995	1,104	4,656
F.1.	120,469	3358,096	57,949	0,925	4,388
H.1.	86,804	1794,736	42,364	0,953	4,429
H.2.	91,664	2029,238	45,047	0,966	4,449
H.6.	86,444	2096,180	45,784	1,122	4,683
J.1.	89,056	1700,179	41,233	0,857	4,286
J.2.	93,098	1881,042	43,371	0,872	4,392
J.3.	75,565	1256,895	35,453	0,880	4,321

kreće se u intervalu od 0,891022 do 0,991469, što se smatra veoma dobrom korelacijom. Odgovarajući koeficijent odredjenosti varira od 0,793920 do 0,983010. Jedini sistem koji pokazuje nižu korelaciju (gde je koeficijent korelacije 0,891022) je sistem kombinovanog jonskog sastava H.6., koji i odredjuje navedene donje granice kretanja ovih koeficijenata. Kod svih ostalih sistema najniži koeficijent korelacije je 0,958364.

4.5. STABILNOST KAZEINA U ODNOSU NA ALKOHOL U MODEL SISTEMIMA

Alkoholna proba se u praksi koristi za utvrđivanje nekih aspekata tehnološkog kvaliteta mleka, pre svega za ustanovljavanje termičke stabilnosti, koja može biti poremećena snižavanjem pH vrednosti, porastom sadržaja laktoalbumina i laktoglobulina i bolešću životinje, što izaziva promene kako u odnosu pojedinih proteina mleka, tako i u sastavu i ravnoteži soli u njemu. Termička nestabilnost mleka može biti i posledica utrehtskog fenomena koga prouzrokuje višak kalcijuma. Sve ove tehnološke i fiziološko-patološke mane mleka mogu se ustanoviti alkoholnom probom.

Eksperimentima čiji se rezultati prikazuju i komentarišu u ovom poglavlju želeli smo da uz pomoć alkoholne probe uporedimo stabilnost kazeina u svim konstruisanim model sistemima. Obzirom da je podešavanjem koncentracije vodoničnih jona, pH svih sistema korigovan na istu vrednost, stabilnost kazeina na etanol zavisi isključivo od jonskih kombinacija i koncentracija u pojedinim sistemima. Očekujemo da ovi rezultati daju određeni uvid i o termičkoj stabilnosti kazeina i o osetljivosti kazeina na koagulaciju himozinom, i da će poslužiti i kao orijentacija za ispitivanja opisana u

naredna dva poglavlja. Pretpostavljamo, takodje, da postoji direktna veza izmedju rezultata alkoholne probe i prosečne veličine i raspodele veličina kazeinskih micela u sistemu.

Prvi u spisku od 54 ispitivana sistema, model sistem A.1., koji u rastvoru sadrži samo Na-kazeinat, je stabilan pri alkoholnoj probi. Kazein u model sistemima cele sledeće dve grupe: grupa B (sa dodatim jonima kalcijuma) i grupa C (sa dodatim jonima magnezijuma), pokazuje sasvim suprotno ponašanje. Ova vrsta sistema je stabilna tek pri koncentraciji kalcijumovih jona od 5,49 mM/l, odnosno 5,49 mM/l Mg^{2+} . Ranije je ustanovljeno delovanje kalcijumovih i magnezijumovih jona na micelarnu težinu i oblik kazeinskih agregata u sistemu, kao i uticaj kalcijumovih jona na veličinu i raspodelu veličina globula kazeina. U navedenim eksperimentima, kao što je poznato, nije uvek konstatovano istovetno dejstvo kalcijumovih i magnezijumovih jona. Medjutim, podatak da jednake koncentracije kalcijumovih i magnezijumovih jona dovode do destabilizacije kazeina prema alkoholu, ipak nije u koliziji sa rezultatima naših prethodnih ispitivanja. Na osnovu poredjenja rezultata iz Tabele 3. i Tabele 4., gde su iznete micelarne težine kazeina u prisustvu kalcijumovih, odnosno magnezijumovih jona, proizilazi da je pri najnižoj primenjenoj koncentraciji stepen agregirajućeg dejstva ovih jona jednak (sistemi B.1. i

C.1.). Snimci model sistema B.2. i C.2. na elektronskom mikroskopu su pokazali da magnezijum deluje kao agregirajući agens (C.2.), mada agregati nisu pravilnog oblika, kao u prisustvu kalcijuma (B.2.), što očigledno ne igra nikakvu ulogu kod stabilnosti micela u odnosu na alkohol.

Na osnovu navedenih rezultata se može konstatovati da je stabilnost kazeina prema alkoholu u model sistemima gde su prisutni samo joni kalcijuma, ili magnezijuma, izvanredno mala. Možda na prvi pogled izgleda neverovatno da ovde kazein, da bi ostao stabilan pri alkoholnoj probi, podnosi prisustvo samo 1/6 koncentracije kalcijuma koja se normalno nalazi u mleku, ili istu toliku molarnu koncentraciju magnezijuma. Znatno bolja stabilnost kazeina u mleku je, medjutim, posledica ranije pomenute ravnoteže soli, što potvrđuju i rezultati alkoholne probe model sistema iz ostalih grupa, gde su jonski uticaji kombinovani (Tabela: 25., 26. i 27).

Tabela 25.: Alkoholna proba model sistema grupe D i E

Model sistem	D.1.	D.2.	D.3.	D.4.	D.5.
Rezultat alkoholne probe	+	+	+	-	-

Model sistem	E.1.	E.2.	E.3.	E.4.	E.5.
Rezultat alkoholne probe	+	+	+	+	-

LEGENDA: flokulacija: +
jedva vidljiva flokulacija: +
bez flokulacije: -

U Tabeli 25. prikazano je ponašanje kazeina pri alkoholnoj probi u model sistemima sa jonima PO_4^{3-} i Ca^{2+} (sistemi D), odnosno PO_4^{3-} i Mg^{2+} (sistemi E). Očigledno je da su sistemi u kojima se pored Ca^{2+} ili Mg^{2+} nalazi i fosfatni anjon znatno stabilniji na alkohol od sistema u kojima se nalaze samo navedeni katjoni, čak i u nižim koncentracijama. Kao što se iz Tabele 25. vidi, model sistem D.3. sa 29,1 mM/l fosfora pokazuje samo slabe znake flokulacije, a D.4. (koncentracija fosfata: 35,5 mM/l) i D.5. (koncentracija fosfata: 42,0 mM/l) su sasvim stabilni. Kod model sistema grupe E se granična koncentracija fosfata nalazi u sistemu E.4. i iznosi 35,5 mM/l što navodi na zaključak da je kazein u model sistemima sa fosfatom nešto manje stabilan pri alkoholnoj probi u prisustvu magnezijumovih, nego kalcijumovih jona istog molariteta. To može biti posledica razlike u interakciji ovih jona sa anjonima fosfata.

Tabela 26.: Alkoholna proba model sistema grupe F i G

Model sistem	F.1.	F.2.	F.3.	F.4.	F.5.
Rezultat alkoholne probe	+	+	+	-	-

Model sistem	G.1.	G.2.	G.3.	G.4.	G.5.
Rezultat alkoholne probe	+	+	+	-	-

U Tabeli 26. prikazano je ponašanje model sistema grupe F (različite koncentracije citrata u prisustvu kalcijumovih jona), odnosno grupe G (različite koncentracije citrata u prisustvu magnezijumovih jona) pri alkoholnoj probi. Kao što se iz navedenih tabela vidi koncentracija citratnog anjona od 18,8 mM/l i više sprečava flokulaciju kazeina u sistemima sa Ca^{2+} ili Mg^{2+} (F.4., F.5. i G.4., G.5.). Na osnovu poredjenja ponašanja prema alkoholu ovih sistema i onih sa fosfatnim anjonom (grupa D i E) može se konstatovati da citrat stabilizuje kazein bolje od fosfata pri analognim molar- nim koncentracijama. Ovaj zaključak je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u prethodnom poglavlju o uticaju obeju jonskih vrsta na veličinu kazeinske micela.

Tabela 27.: Alkoholna proba model sistema grupe H

Model sistem	H.1.	H.2.	H.3.	H.4.
Rezultat alkoholne probe	+	+	+	-

Model sistem	H.5.	H.6.	H.7.	H.8.
Rezultat alkoholne probe	+	+	-	-

Model sistem	H.9.	H.10.	H.11.	H.12.
Rezultat alkoholne probe	+	+	-	-

Sistemi u kojima su kombinovani jonski uticaji kalcijuma, fosfata i citrata (grupa H) podvrgnuti su takođe alkoholnoj probi i rezultati prikazani u Tabeli 27. Iz navedene tabele se vidi da stabilnost kazeina na alkohol, pri jednakoj koncentraciji fosfata, raste sa porastom koncentracije citrata. Posmatrajući kolone u istoj tabeli, primećuje se da se sa porastom koncentracije fosfata stabilnost postiže i pri dvostruko manjim koncentracijama citrata. Kombinovani sistemi iz ove grupe su stabilni pri alkoholnoj probi sa najmanje 16,1 mM/l fosfora i 18,8 mM/l $(C_6H_5O_7)^{3-}$, odnosno 22,6 mM/l fosfora i 9,4 mM/l citrata, uz prisustvo 18,8 mM/l kalcijumovih jona. Sistemi iz grupe sa fosfatnim anjonom, koji su se pokazali nestabilni pri alkoholnoj probi (D.1. i D.2.), pri dodatku 18,8 mM/l citrata, odnosno 9,4 mM/l citrata postaju stabilni. Ovo potvrđuje pretpostavku, koju su izneli Barta i de Mann (5), nasuprot ranijim shvatanjima, da je koncentracija kalcijumovih jona samo jedan od faktora, koji uslovljavaju stabilnost kazeinatnog kompleksa u odnosu na alkohol. Naši rezultati su pokazali da je uticaj kalcijumovih jonova dominantan, ali da se isto tako pri

posmatranju stabilnosti kazeina na alkohol ne mogu zanemariti ni ostali jonski uticaji u sistemu, što je do sada uglavnom bio slučaj.

Zamena 50% dvovalentnih kalcijumovih jona u model sistemima H.1., H.2. i H.6. magnezijumovim (sistemima I.1., I.2. i I.3.) nije prouzrokovala nikakve promene u pogledu stabilnosti kazeina na alkohol u ovim sistemima.

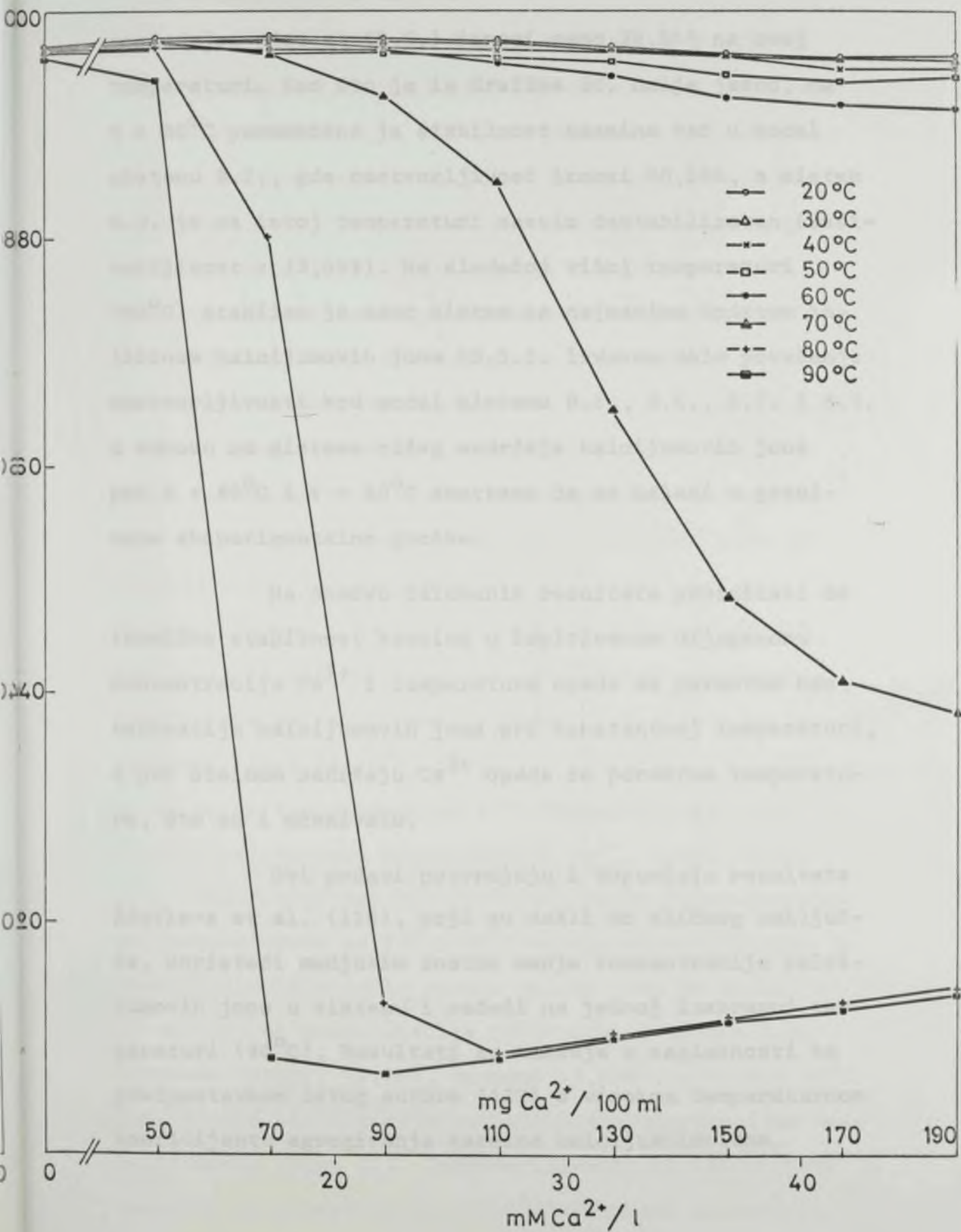
Model sistemi J.1., J.2. i J.3., konstruisani analogno sistemima H.1., H.2. i H.6., s tom razlikom da je jedan deo jednovalentnih katjona zastupljen kalijumom, umesto natrijumom, takodje su nestabilni pri alkoholnoj probi.

Poredjenje ponašanja kazeina prema alkoholu u odgovarajućim sistemima iz grupe H, I i J navodi na zaključak da zamena odredjenog dela kalcijumovih jona magnezijumovim, odnosno natrijumovih jona kalijumovim, bitno ne menja stabilnost sistema u odnosu na alkohol.

4.6. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA

Podaci o termičkoj stabilnosti kazeina određeni na način opisan u Metodici istraživanja, prikazani su za sisteme B.1. do B.8. u funkciji porasta koncentracije kalcijumovih jona, u Grafiku 30. U istom grafiku se vidi termička stabilnost kazeina u model sistemu A.1. (3% rastvor Na-kazeinata bez dodatih jona).

Iz navedenog grafika je očigledno da je termička stabilnost kazeina u model sistemu bez dodatih dvovalentnih jona (A.1.) vrlo visoka i rastvorljivost u centrifugatu se kreće u intervalu od 95,93% do 96,37%. Uzan dijapazon variranja rastvorljivosti sistema A.1. pri raznim temperaturama, znači da, kada je ovaj sistem u pitanju, rastvorljivost ne zavisi od temperature. Posmatrajući zatim u istom grafiku sisteme grupe B sa dodatim jonima kalcijuma, vidimo da su do temperature od 60°C, svi navedeni model sistemi praktično stabilni (rastvorljivost veća od 90%). Na temperaturi od 70°C za prva tri sistema se može reći da su stabilni. Međutim, sa daljim povećanjem koncentracije Ca^{2+} (sistem B.4.) rastvorljivost opada na 84,96%. Tok krive koja označava promenu stabilnosti sistema na 70°C u funkciji koncentracije Ca^{2+} , se u istom smislu nastavlja, tako da rastvorljivost



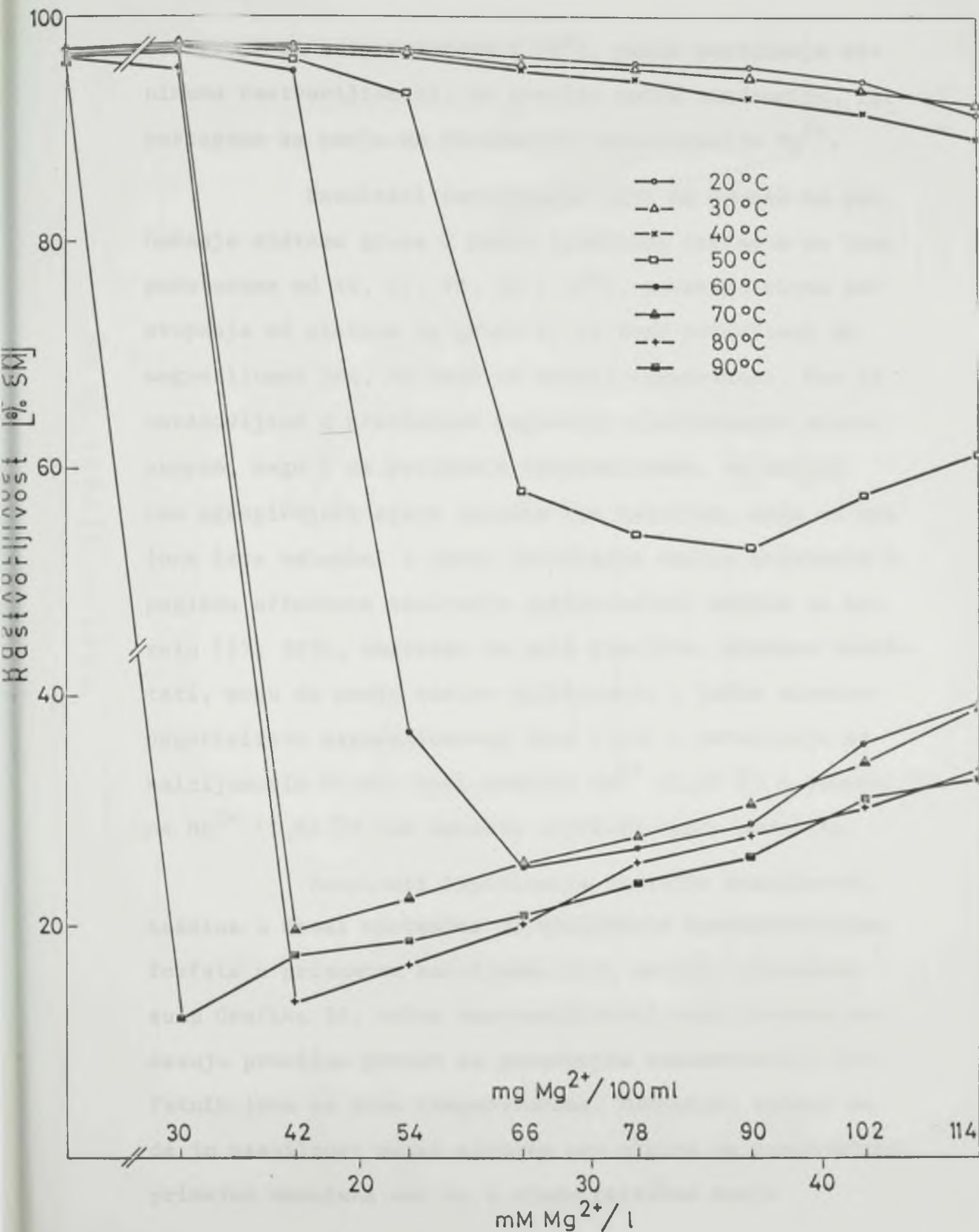
Grafik 30. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA A.1. I B.1. DO B.8.

poslednjeg sistema (B.8.) iznosi samo 38,64% na ovoj temperaturi. Kao što je iz Grafika 30. dalje jasno, na $t = 80^{\circ}\text{C}$ poremećena je stabilnost kazeina već u model sistemu B.2., gde rastvorljivost iznosi 80,08%, a sistem B.3. je na istoj temperaturi sasvim destabilizovan (rastvorljivost = 13,04%). Na sledećoj višoj temperaturi (90°C) stabilan je samo sistem sa najmanjom dodatom količinom kalcijumovih jona (B.1.). Izvesno malo povećanje rastvorljivosti kod model sistema B.5., B.6., B.7. i B.8. u odnosu na sisteme nižeg sadržaja kalcijumovih jona pri $t = 80^{\circ}\text{C}$ i $t = 90^{\circ}\text{C}$ smatramo da se nalazi u granicama eksperimentalne greške.

Na osnovu izloženih rezultata proizilazi da termička stabilnost kazeina u ispitivanom dijapazonu koncentracija Ca^{2+} i temperatura opada sa porastom koncentracije kalcijumovih jona pri konstantnoj temperaturi, a pri stalnom sadržaju Ca^{2+} opada sa porastom temperature, što se i očekivalo.

Ovi podaci potvrđuju i dopunjuju rezultate Zittle-a et al. (126), koji su došli do sličnog zaključka, koristeći međjutim znatno manje koncentracije kalcijumovih jona u sistemu i radeći na jednoj izabranoj temperaturi (90°C). Rezultati su takodje u saglasnosti sa pretpostavkom istog autora (129) o visokom temperaturnom koeficijentu agregiranja kazeina kalcijumhloridom.

Termička stabilnost kazeina, u prisustvu magnezijumovih jona odgovarajućih molarnih koncentracija (model sistemi C.1. do C.8.) prikazana je u Grafiku 31. Već na prvi pogled je jasno da postoji razlika u termostabilnosti ovih model sistema i prethodnih, gde su dodati kalcijumovi joni (grupa B), što na osnovu dosadašnjih literaturnih podataka nije bilo očekivano. Rastvorljivost svih sistema grupe C je veća od 90% samo pri temperaturnom tretmanu na 20, 30 i 40°C, s tim da i na najvišoj navedenoj temperaturi postoji izuzetak: model sistem sa maksimalnom količinom magnezijumovih jona (C.8.) pokazuje rastvorljivost neznatno nižu od 90% (89,26%). Na temperaturi od 50°C već je sistem C.4. destabilizovan, njegova rastvorljivost iznosi 58,11%, što je za 26,85% manje od rastvorljivosti odgovarajućeg sistema sa kalcijumovim jonima (B.4.) i to na temperaturi višoj za 20°C. Dalje je iz Grafika 31. očigledno da se na temperaturi od 60°C destabilizuje, kao prvi u nizu, pri porastu koncentracija Mg^{2+} , model sistem C.3. (rastvorljivost 37,14%) i svi većih koncentracija; na temperaturama od 70° i 80°C se sistemima u kojima je asocijacija kazeinskih micela toliko jaka da dolazi skoro do totalne precipitacije pridružuje i sistem C.2. (rastvorljivost: 19,90%, odnosno 13,68%); a na $t = 90^{\circ}C$ precipituje već i sistem sa najnižom koncentracijom magnezijumovih jona, C.1. (rastvorljivost: 12,99%). Interesantno je primetiti da kriva stabilnosti sistema iz

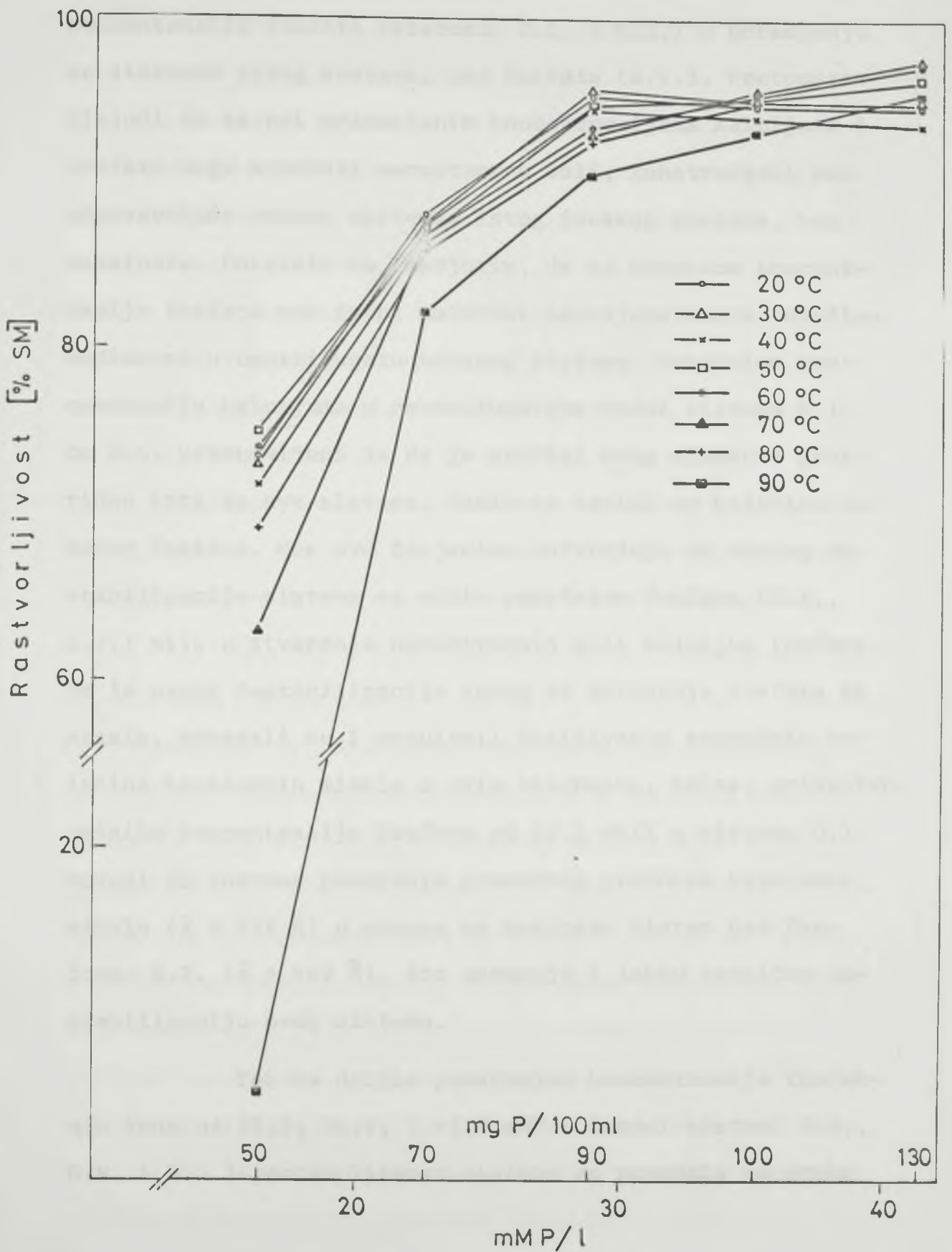


Grafik 31. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA A.1. i C.1. DO C.8.

ove grupe na temperaturama $\geq 50^{\circ}\text{C}$, posle postizanja minimuma rastvorljivosti, po pravilu menja tendenciju, tj. postepeno se penje sa povećanjem koncentracije Mg^{2+} .

Rezultati ispitivanja koji se odnose na ponašanje sistema grupe C posle termičkog tretmana na temperaturama od 50, 60, 70, 80 i 90°C , pokazuju bitna odstupanja od sistema iz grupe B. Iz toga proizilazi da magnezijumov jon, ne samo na sobnoj temperaturi, što je ustanovljeno u prethodnom poglavlju elektronskim mikroskopom, nego i na povišenim temperaturama, ne deluje kao agregirajući agens jednako kao kalcijum, mada su oba jona iste valence. I pored postojanja raznih shvatanja u pogledu afiniteta vezivanja zemnoalkalnih metala za kazein (27, 107), smatramo da naše gledište, odnosno rezultati, mogu da nadju realno objašnjenje u jačem elektro negativitetu magnezijumovog jona (1,2) u poredjenju sa kalcijumovim (1,0). Veći prečnik Ca^{2+} (1,97 Å) u odnosu na Mg^{2+} (1,60 Å) ide takodje u prilog našim podacima.

Rezultati ispitivanja termičke stabilnosti kazeina u model sistemima sa različitim koncentracijama fosfata u prisustvu kalcijuma: D.1. do D.5. prikazani su u Grafiku 32. Krive rastvorljivosti ovih sistema pokazuju pravilan porast sa povećanjem koncentracije fosfatnih jona na svim temperaturama. Medjutim, uočava se da je stabilnost model sistema bez obzira na temperaturu, primetno smanjena ako su u njemu prisutne manje



Grafik 32. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA
U MODEL SISTEMIMA D.1. DO D.5.

koncentracije fosfata (sistemi: D.1. i D.2.) u poredjenju sa sistemom istog sastava, bez fosfata (B.2.). Pretpostavljajući da se pri primenjenim koncentracijama kalcijuma i fosfata mogu stvarati nerastvorne soli, konstruisali smo odgovarajuće vodene sisteme, istog jonskog sastava, bez kazeinata. Pokazalo se, medjutim, da sa porastom koncentracije fosfata pri istoj količini kalcijuma raste količina sedimenta u centrifugatu vodenog sistema. Kontrolom koncentracije kalcijuma u centrifugatima model sistema D.1. do D.5. ustanovljeno je da je sadržaj ovog elementa praktično isti za sve sisteme, dakle ne zavisi od količine dodatog fosfata. Obe ove činjenice potvrđuju da razlog destabilizacije sistema sa nižim sadržajem fosfata (D.1., D.2.) nije u stvaranju nerastvornih soli kalcijum fosfata. Da je uzrok destabilizacije vezan za delovanje fosfata na kazein, pokazali su i rezultati ispitivanja raspodele veličina kazeinskih micela u ovim sistemima. Naime, prisustvo najniže koncentracije fosfora od 16,1 mM/l u sistemu D.1. dovodi do znatnog povećanja prosečnog prečnika kazeinske micelle ($\bar{x} = 578 \text{ \AA}$) u odnosu na analogan sistem bez fosfora: B.2. ($\bar{x} = 462 \text{ \AA}$), što uzrokuje i lakšu termičku destabilizaciju ovog sistema.

Tek sa daljim povećanjem koncentracije fosfatnih jona na 29,1; 35,5; i 42,0 mM/l (model sistemi D.3., D.4. i D.5.) rastvorljivost sistema se povećala na preko

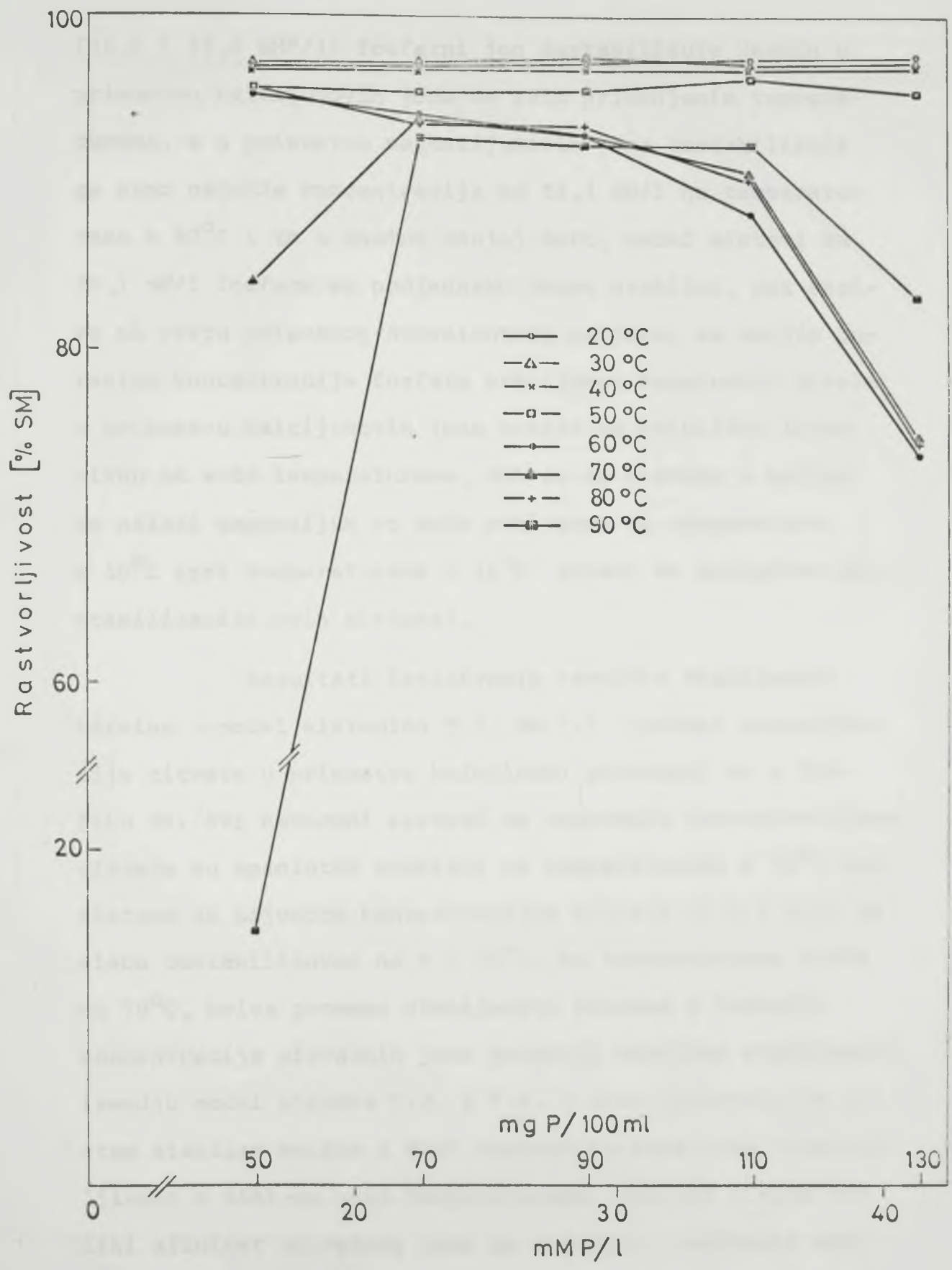
90%. Poredjenjem ovih sistema sa odgovarajućim bez fosfata (B.2.) dolazimo do interesantnog zaključka da stabilnost navedenih sistema dodatkom izabranih koncentracija fosfora nije bitno izmenjena na temperaturama $\leq 70^{\circ}\text{C}$. Na temperaturi od 80°C rastvorljivost se sa 80,08% (B.2.) povećava na 92,90% (D.3.), 95,38% (D.4.), odnosno 96,65% (D.5.), a na temperaturi od 90°C rastvorljivost sa samo 8,61% raste na vrednost veću od 90% u prisustvu sve tri primenjene koncentracije fosfatnih jona. Ovi rezultati daju osnovu da se konstatuje potreba za proveravanjem vrednosti dozvoljene našim pravilnikom o količini Na_2HPO_4 koju treba dodati mleku u cilju povećanja termičke stabilnosti kod tehnološkog procesa proizvodnje evaporiranog mleka.

Rezultati ispitivanja termičke stabilnosti kazeina u model sistemima D.1. do D.5., odnosno B.2., se veoma dobro slažu sa rezultatima dobijenim statističkom obradom podataka elektronske mikroskopije o veličini kazeinskih micela u istim sistemima. U sistemu sa najnižom koncentracijom fosfora D.1., gde prosečna veličina kazeinske micelle iznosi 578 \AA , rastvorljivost se kreće od 5,19% do 75,00%, u zavisnosti od temperature. Sa porastom koncentracije fosfora (sistemi D.3. i D.5.) snižava se vrednost prosečnog prečnika kazeinskih globula na 483 \AA , a istovremeno raste rastvorljivost na 82,16% do 88,17% u temperaturnom intervalu od 20° do 90°C . Naši podaci takodje pomažu razumevanju uzroka postojanja suprotnih rezultata u literaturi o delovanju fosfata na kazein pri povišenim temperaturama

(17, 31, 75, 127). Autori koji su se ovim pitanjem bavili su, u svojim istraživanjima, primenjivali različite koncentracije fosfata i različite režime temperaturnih tretmana, što je dovelo do suprotnih rezultata. Iz Grafika 32. je očigledno da smer delovanja fosfata na stabilnost kazeina pri termičkom tretmanu zavisi od koncentracije dodatog anjona i primenjene temperature.

Rezultati ispitivanja termičke stabilnosti kazeina u model sistemima E.1. do E.5. prikazani su u Grafiku 33. Iako su to sistemi sa fosfatom sastavljeni analogno prethodnim (tip D) uz učešće odgovarajuće koncentracije magnezijumovih umesto kalcijumovih jona, tendencija promene stabilnosti kazeina samo delimično odgovara onoj kod sistema sa oznakom D. Kao što je iz Grafika 33. očigledno, najstabilniji iz ove grupe na svim temperaturama je sistem E.2., kod koga je maksimalna rastvorljivost 97,19% na $t = 20^{\circ}\text{C}$, a minimalna rastvorljivost je na temperaturi od 90°C , i iznosi 92,91%. Model sistem E.1. je nestabilan samo na temperaturama od 80°C (rastvorljivost iznosi 84,00%) i 90°C (rastvorljivost iznosi 15,08%). Kod ostalih model sistema: E.3., E.4. i E.5., krive stabilnosti model sistema zadržavaju približno konstantan nivo, sa porastom koncentracije fosfatnih jona, na temperaturama $\leq 50^{\circ}\text{C}$, odnosno postepeno opadaju na temperaturama $\geq 60^{\circ}\text{C}$.

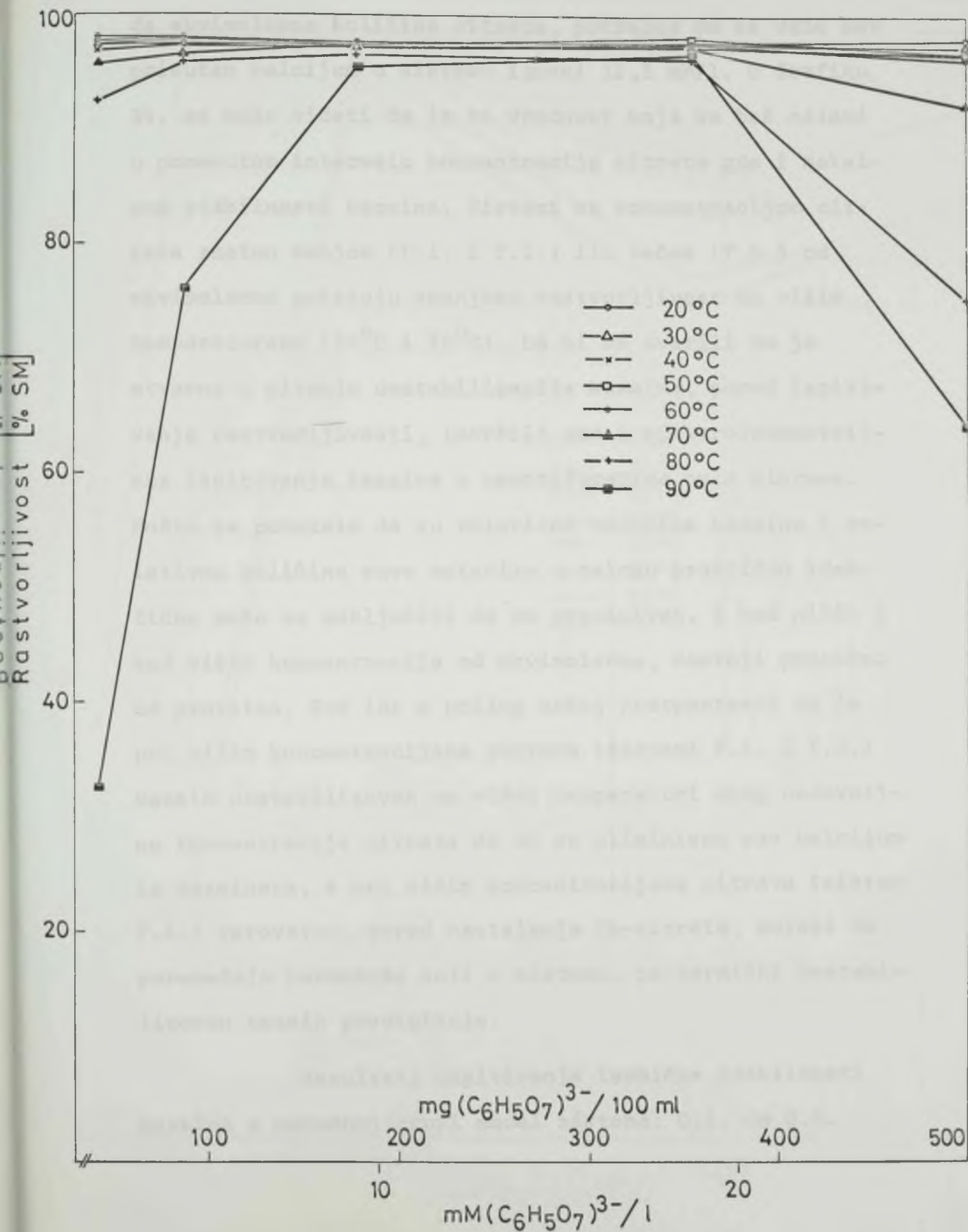
Na osnovu poredjenja model sistema grupe D i E (Grafik 32. i 33.) proizilazi da pri nižim koncentracijama



Grafik 33. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA E.1. DO E.5.

(16,1 i 22,6 mMP/l) fosfatni jon destabilizuje kazein u prisustvu kalcijumovih jona na svim primenjenim temperaturama, a u prisustvu magnezijumovih jona destabilizuje ga samo najniža koncentracija od 16,1 mM/l na temperaturama $\geq 80^{\circ}\text{C}$ i to u znatno manjoj meri; model sistemi sa 29,1 mM/l fosfora su podjednako dobro stabilni, bez obzira na vrstu prisutnog dvovalentnog katjona; sa daljim porastom koncentracije fosfata stabilnost kazeinskih micela u prisustvu kalcijumovih jona ostaje na približno istom nivou na svim temperaturama, dok se za sisteme u kojima se nalazi magnezijum to može reći samo za temperature $\leq 50^{\circ}\text{C}$ (pri temperaturama $> 50^{\circ}\text{C}$ dolazi do delimične destabilizacije ovih sistema).

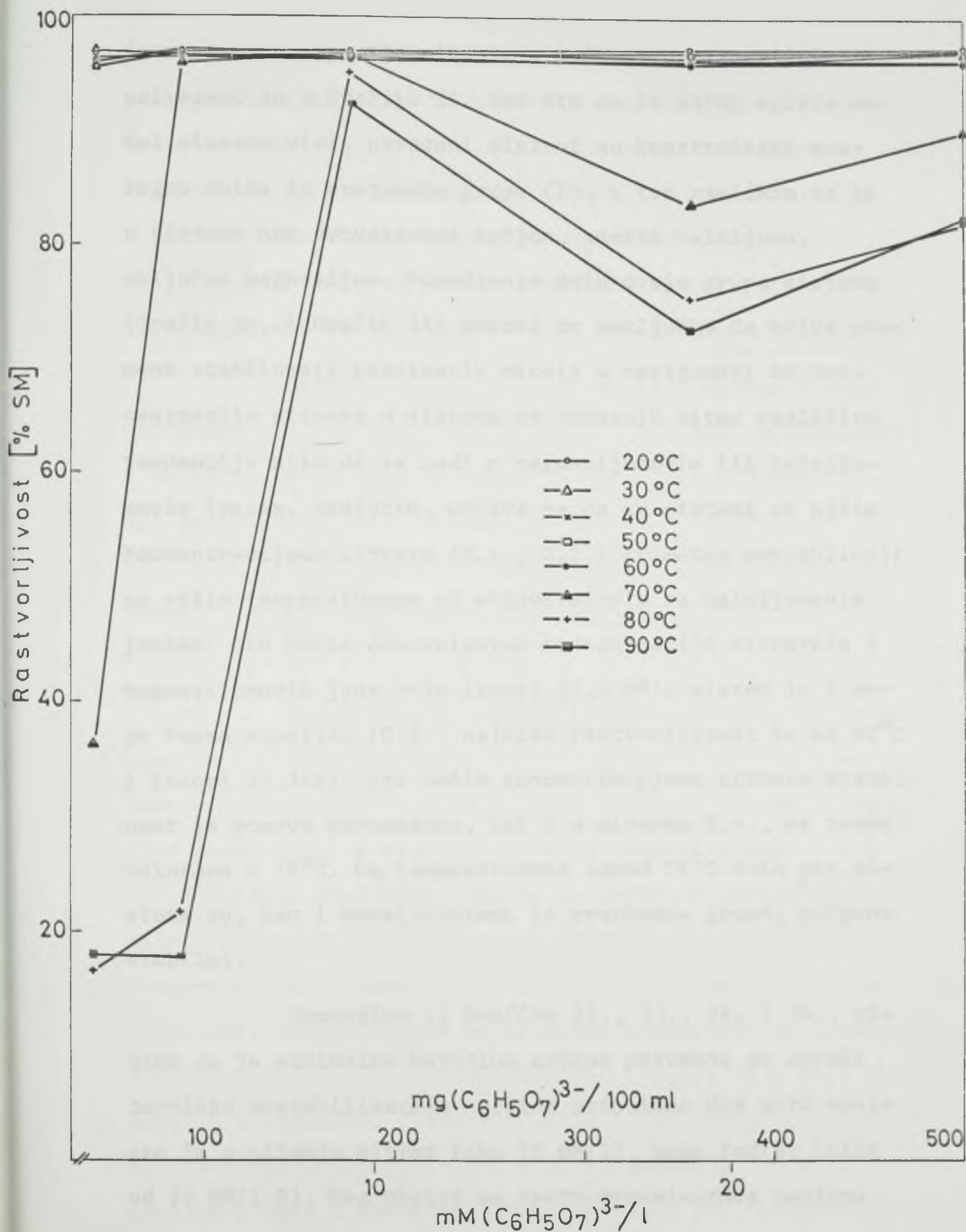
Rezultati ispitivanja termičke stabilnosti kazeina u model sistemima F.1. do F.5. (porast koncentracije citrata u prisustvu kalcijuma) prikazani su u Grafiku 34. Svi navedeni sistemi sa odabranim koncentracijama citrata su apsolutno stabilni na temperaturama $\leq 70^{\circ}\text{C}$ sem sistema sa najvećom koncentracijom citrata (F.5.) koji je slabo destabilizovan na $t = 70^{\circ}\text{C}$. Na temperaturama višim od 70°C , kriva promena stabilnosti sistema u funkciji koncentracije citratnih jona pokazuje maksimum stabilnosti između model sistema F.3. i F.4. U ovom intervalu je sistem stabilan koliko i čist rastvor Na-kazeinata (rastvorljivost $> 95\%$) na svim temperaturama. Imajući u vidu veliki afinitet citratnog jona za kalcijum, sračunali smo



Grafik 34. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA F1. DO F5.

da ekvimolarna količina citrata, potrebna da se veže sav prisutan kalcijum u sistemu iznosi 12,5 mM/l. U Grafiku 34. se može videti da je to vrednost koja se baš nalazi u pomenutom intervalu koncentracija citrata gde i maksimum stabilnosti kazeina. Sistemi sa koncentracijom citrata znatno manjom (F.1. i F.2.) ili većom (F.5.) od ekvimolarne pokazuju smanjenu rastvorljivost na višim temperaturama (80°C i 90°C). Da bi se uverili da je stvarno u pitanju destabilizacija kazeina, pored ispitivanja rastvorljivosti, izvršili smo i spektrofotometrijska ispitivanja kazeina u centrifugatima ovih sistema. Pošto se pokazalo da su relativna količina kazeina i relativna količina suve materije u talogu praktično identične može se zaključiti da se precipitat, i kod nižih i kod viših koncentracija od ekvimolarne, sastoji pretežno od proteina. Ovo ide u prilog našoj pretpostavci da je pri nižim koncentracijama citrata (sistemi F.1. i F.2.) kazein destabilizovan na višoj temperaturi zbog nedovoljne koncentracije citrata da bi se eliminisao sav kalcijum iz kazeinata, a pri višim koncentracijama citrata (sistem F.5.) verovatno, pored nastajanja Ca-citrata, dolazi do poremećaja ravnoteže soli u sistemu, pa termički destabilizovan kazein precipituje.

Rezultati ispitivanja termičke stabilnosti kazeina u narednoj grupi model sistema: G.1. do G.5.



Grafik 35. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA
U MODEL SISTEMIMA G.1. DO G.5.

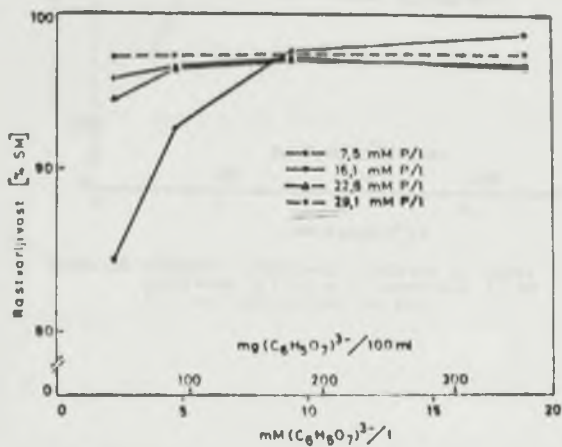
(porast koncentracije citrata u prisustvu magnezijuma) prikazani su u Grafiku 35. Kao što se iz datog spiska model sistema vidi, navedeni sistemi su konstruisani analogno onima iz prethodne grupe (F), s tom razlikom da je u sisteme kao dvovalentni katjon, umesto kalcijuma, uključen magnezijum. Poredjenje ovih dveju grupa sistema (Grafik 34. i Grafik 35.) dovodi do zaključka da krive promene stabilnosti kazeinskih micela u zavisnosti od koncentracije citrata u sistemu ne pokazuju bitno različite tendencije bilo da se radi o magnezijumovim ili kalcijumovim jonima. Međutim, uočava se da su sistemi sa nižim koncentracijama citrata (G.1., G.2.) primetno nestabilniji na višim temperaturama od odgovarajućih sa kalcijumovim jonima. Oko tačke ekvivalentne koncentracije citratnih i magnezijumovih jona koja iznosi 12,5 mM/l sistem je i ovde veoma stabilan (G.3.: najniža rastvorljivost je na 90°C i iznosi 92,39%). Pri većim koncentracijama citrata stabilnost je ponovo poremećena, čak i u sistemu G.4., na temperaturama $\geq 70^{\circ}\text{C}$. Na temperaturama ispod 70°C svih pet sistema su, kao i model sistemi iz prethodne grupe, potpuno stabilni.

Uporedimo li Grafike 32., 33., 34. i 35., vidimo da je minimalna količina anjona potrebna da spreči termičku destabilizaciju kazeina približno dva puta manja ako je u pitanju citrat (oko 10 mM/l), nego fosfat (više od 20 mM/l P), bez obzira na vrstu dvovalentnog katjona

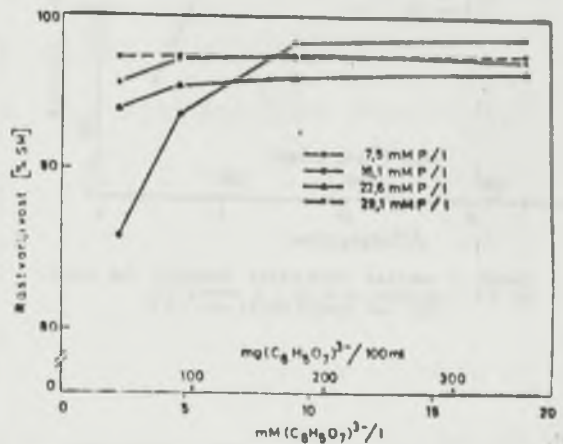
prisutnog u sistemu. U radu Zittle-a et al. (127) navodi se suprotno gledište: da fosfat koncentracije 5 mM/l ima jače izraženo stabilizujuće dejstvo na kazein od citrata. Obzirom da su pomenuti autori radili sa koncentracijama fosfatnog jona znatno nižima od onih koje smo mi izabrali, kao i od onih koje se normalno nalaze u mleku, njihovi i naši rezultati se ne isključuju.

Termička stabilnost kazeinskih micela u model sistemima H.1. do H.12. (različite koncentracije citratnih i fosfatnih anjona u prisustvu 18,8 mM/l kalcijumovih jona) prikazana je rastvorljivošću sistema u Grafiku 36. do 43., i količinama kazeina i kalcijuma ustanovljenim u centrifugatima ovih sistema posle termičkog tretmana, Grafik: 44. do 51.

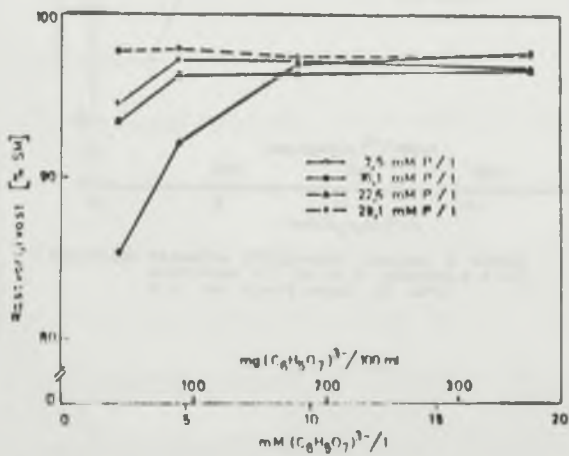
Iz Grafika 36. do 43. je očigledno da krive promene rastvorljivosti kazeina sa koncentracijom prisutnih jona u sistemima kombinovanog jonskog sastava tipa H imaju istu tendenciju na svim ispitivanim temperaturama. I kod model sistema ovog tipa, gde su istovremeno prisutni uticaji fosfata i citrata, mogu se primetiti pojave već konstatovane kod sistema samo sa fosfatom, odnosno citratom. Stabilnost kazeina raste sa porastom koncentracije fosfata, s tim što niže koncentracije fosfata (16,1 i 22,6 mM/l fosfora) i u prisustvu citrata (2,35 i 4,70 mM/l) destabilizuju kazein u sistemima na $t \leq 80^{\circ}\text{C}$, doduše u znatno manjoj meri nego u odsustvu citrata (Grafik 32): rastvorljivost



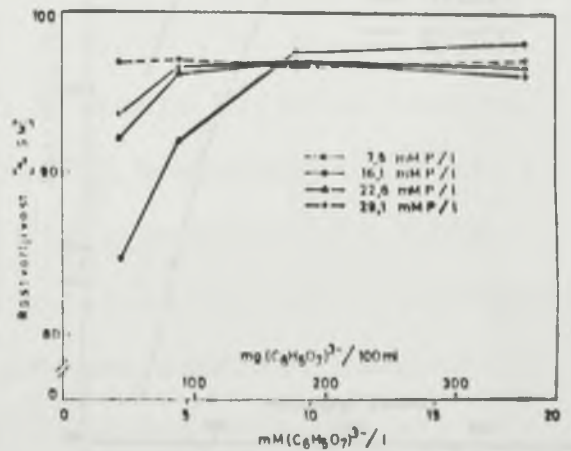
Grafik 36. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA H1 DO H12 (KONTROLA P1 DO P4) NA TEMPERATURI OD 20°C



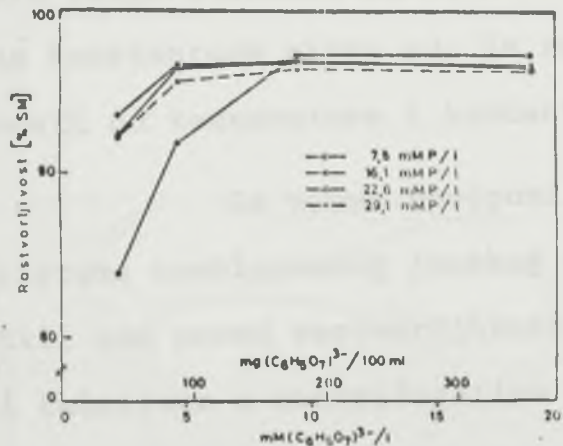
Grafik 37. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA H1 DO H12 (KONTROLA P1 DO P4) NA TEMPERATURI OD 30°C



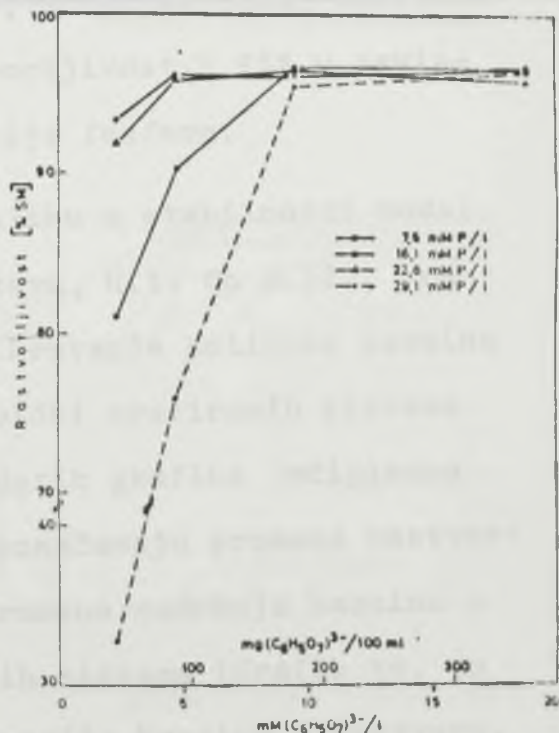
Grafik 38. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA H1 DO H12 (KONTROLA P1 DO P4) NA TEMPERATURI OD 40°C



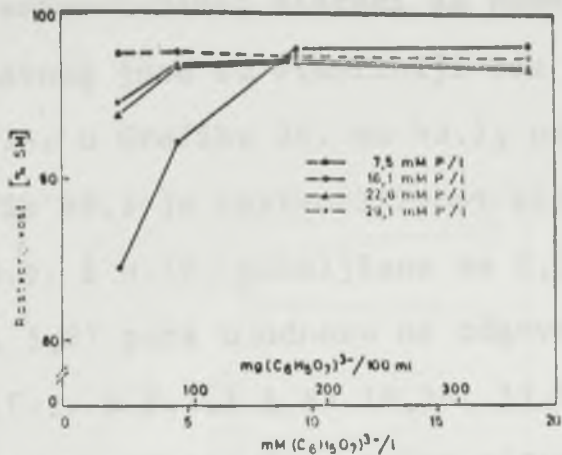
Grafik 39. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA H1 DO H12 (KONTROLA P1 DO P4) NA TEMPERATURI OD 50°C



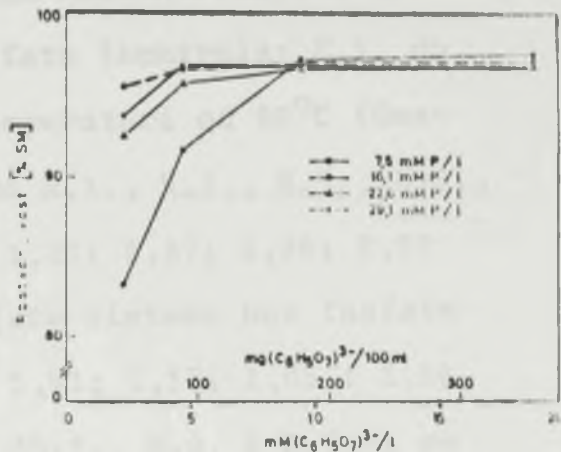
Grafik 4A. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA M1 DO M12 (KONTROLA F1 DO F4) NA TEMPERATURI OD 80°C



Grafik 4B. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA M1 DO M12 (KONTROLA F1 DO F4) NA TEMPERATURI OD 80°C



Grafik 40. TERMIČKA STABILNOST KAFEINA U MODEL
SISTEMIMA M 1 DO M 12 (KONTROLA F1 DO
F4) NA TEMPERATURI (6) 60°C



Grafik 41. TERMIČKA STABILNOST KAFEINA U MODEL
SISTEMIMA M 1 DO M 12 (KONTROLA F1 DO
F4) NA TEMPERATURI (6) 70°C

model sistema H.1. veća je od 80%, a rastvorljivost ostalih sistema grupe H/H.2. do H.12./ je veća od 90% na svim temperaturama; sistemi sa pomenutim koncentracijama citratnog jona su stabilniji bez fosfata (kontrola: F.1. do F.4. u Grafiku 36. do 43.); na temperaturi od 90°C (Grafik 43.) je rastvorljivost sistema H.1., H.2., H.5., H.6., H.9. i H.10. poboljšana za 2,57; 1,21; 2,87; 1,26; 2,92 i 1,27 puta u odnosu na odgovarajuće sisteme bez fosfata (F.1. i F.2.) i za 16,26; 17,82; 1,41; 1,17; 1,05 i 1,06 puta u odnosu na one bez citrata (D.1., D.2. i D.3.); sa porastom koncentracije citrata u dijapazonu od 2,35 do 9,40 mM/l raste kriva stabilnosti sistema na svim odabranim temperaturama, da bi se zatim, u daljem toku, zadržala na konstantnom nivou gde je rastvorljivost $\geq 95\%$ u zavisnosti od temperature i koncentracije fosfora.

Da bismo upotpunili sliku o stabilnosti model sistema kombinovanog jonskog sastava, H.1. do H.12., pratili smo pored rastvorljivosti i kretanje količine kazeina i kalcijuma u centrifugatima termički tretiranih sistema (Grafik 44. do 51.). Iz uporedo datih grafika očigledno je da su tendencije krivih koje označavaju promene rastvorljivosti (Grafik 36. do 43.) i promene sadržaja kazeina u centrifugatima termički tretiranih sistema (Grafik 44. do 51.) identične. Znači da koncentracija kazeina u rastvoru, bez obzira na temperaturu termičkog tretmana, raste, kao i rastvorljivost sistema, sa porastom koncentracije fosfatnih

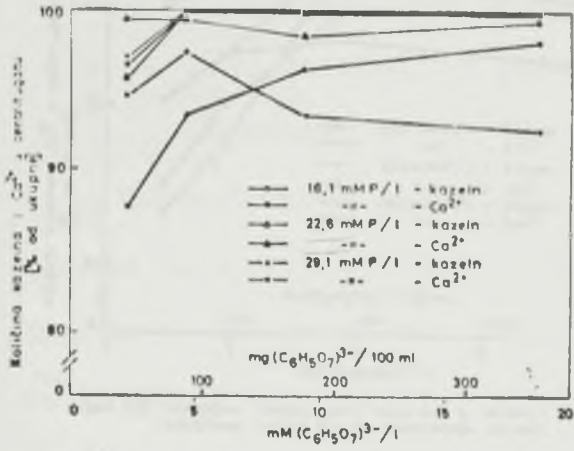


Gráfico 44. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA M1. DO M12 NA TEMPERATURI OD 20°C

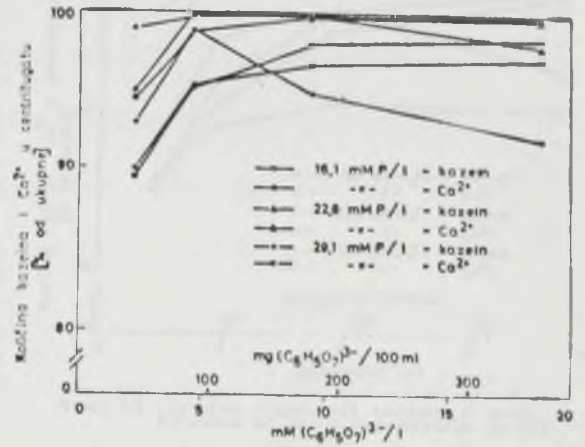


Gráfico 46. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA M1 DO M12 NA TEMPERATURI OD 30°C

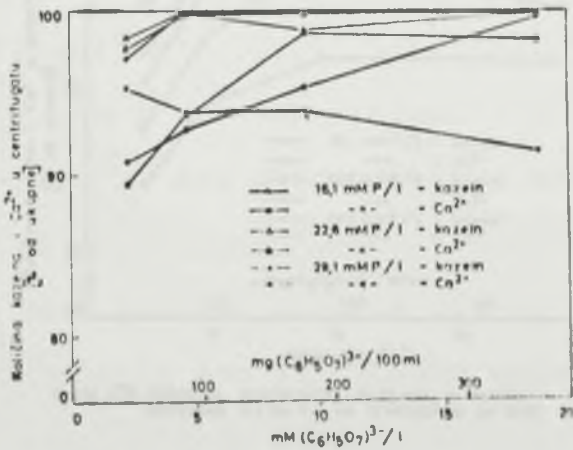


Gráfico 48. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA M1 DO M12 NA TEMPERATURI OD 60°C

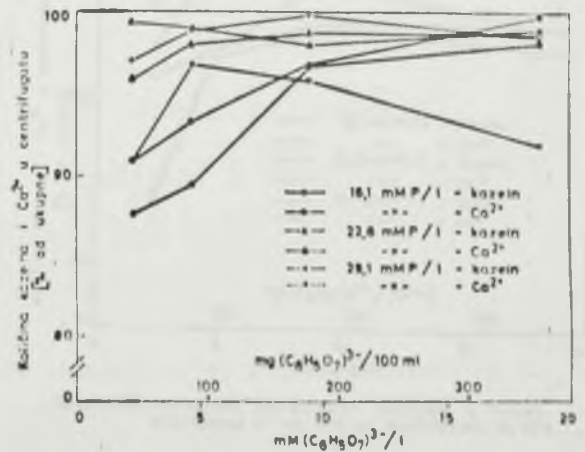


Gráfico 49. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA M1 DO M12 NA TEMPERATURI OD 80°C

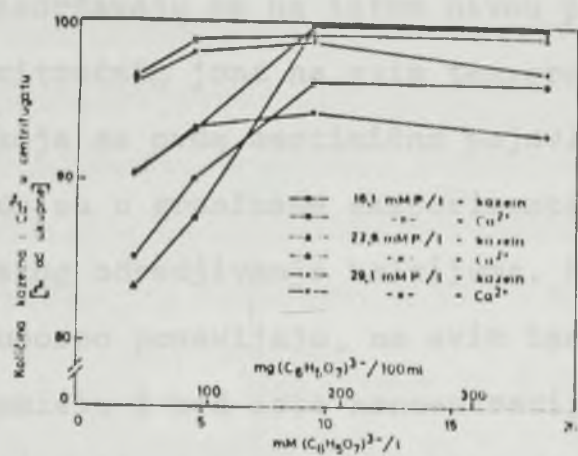


Gráfico 4B TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA M1 DO M12 NA TEMPERATURI OD 60°C

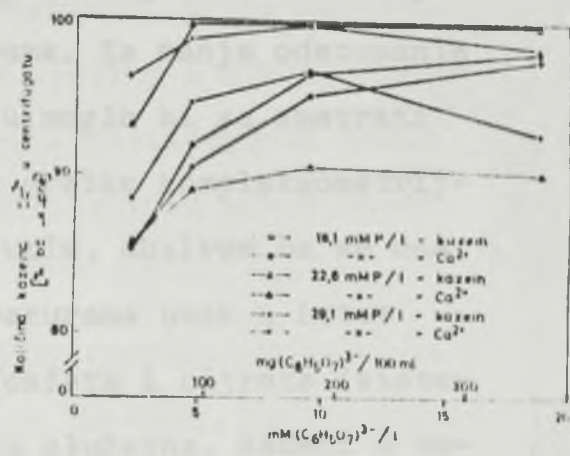


Gráfico 4D TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA M1 DO M12 NA TEMPERATURI OD 70°C

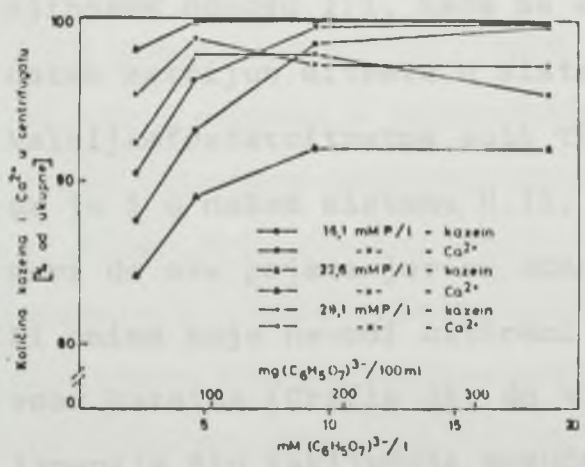


Gráfico 50 TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA M1 DO M12 NA TEMPERATURI OD 80°C

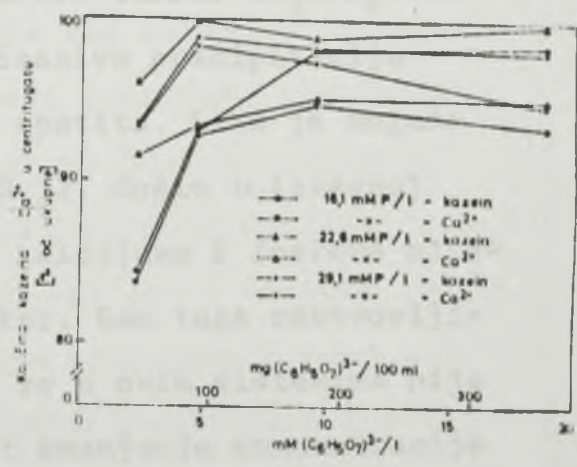


Gráfico 51 TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA M1 DO M12 NA TEMPERATURI OD 90°C

jona, i sa porastom koncentracije citratnih jona, do količine ekvimolarne sadržaju kalcijuma u sistemu. Krive promene relativne količine rastvorljivog kalcijuma u centrifugatima istih sistema (Grafik 44. do 51.) rastu, odnosno zadržavaju se na istom nivou pri povećanju koncentracije citratnih jona na svim temperaturama. Za manja odstupanja koja se ovde mestimično pojavljuju moglo bi se smatrati da su u granicama eksperimentalne greške kompleksometrijskog određivanja kalcijuma. Međutim, obzirom da se ona uporno ponavljaju, na svim temperaturama uvek u istom smislu i kod iste koncentracije fosfata i citrata (sistemi H.11. i H.12.), mislimo da nisu slučajna. Radeći u vodenim sistemima Vakaleris et al. (113) su utvrdili da se maksimalna precipitacija fosfora i kalcijuma javlja pri njihovom odnosu 2:1, kada se uglavnom taloži Ca_2HPO_4 . Dodatak natrijum citrata u sistem izaziva precipitaciju kalcijumfosfatcitratne soli tipa apatita. Lako je moguće da je i u našem sistemu H.11. i H.12. došlo u izvesnoj meri do ove pojave jer su odnosi kalcijuma i fosfora bliski onima koje navodi citirani autor. Sem toga rastvorljivost kazeina (Grafik 36. do 43.) se u ovim sistemima nije izmenila što isključuje mogućnost smanjenja koncentracije kalcijumovih jona u rastvoru zbog veće asocijacije kazeinskih micela.

Tok krivih koje označavaju promene količine rastvorljivog kalcijuma u sistemima tipa H je na osnovu

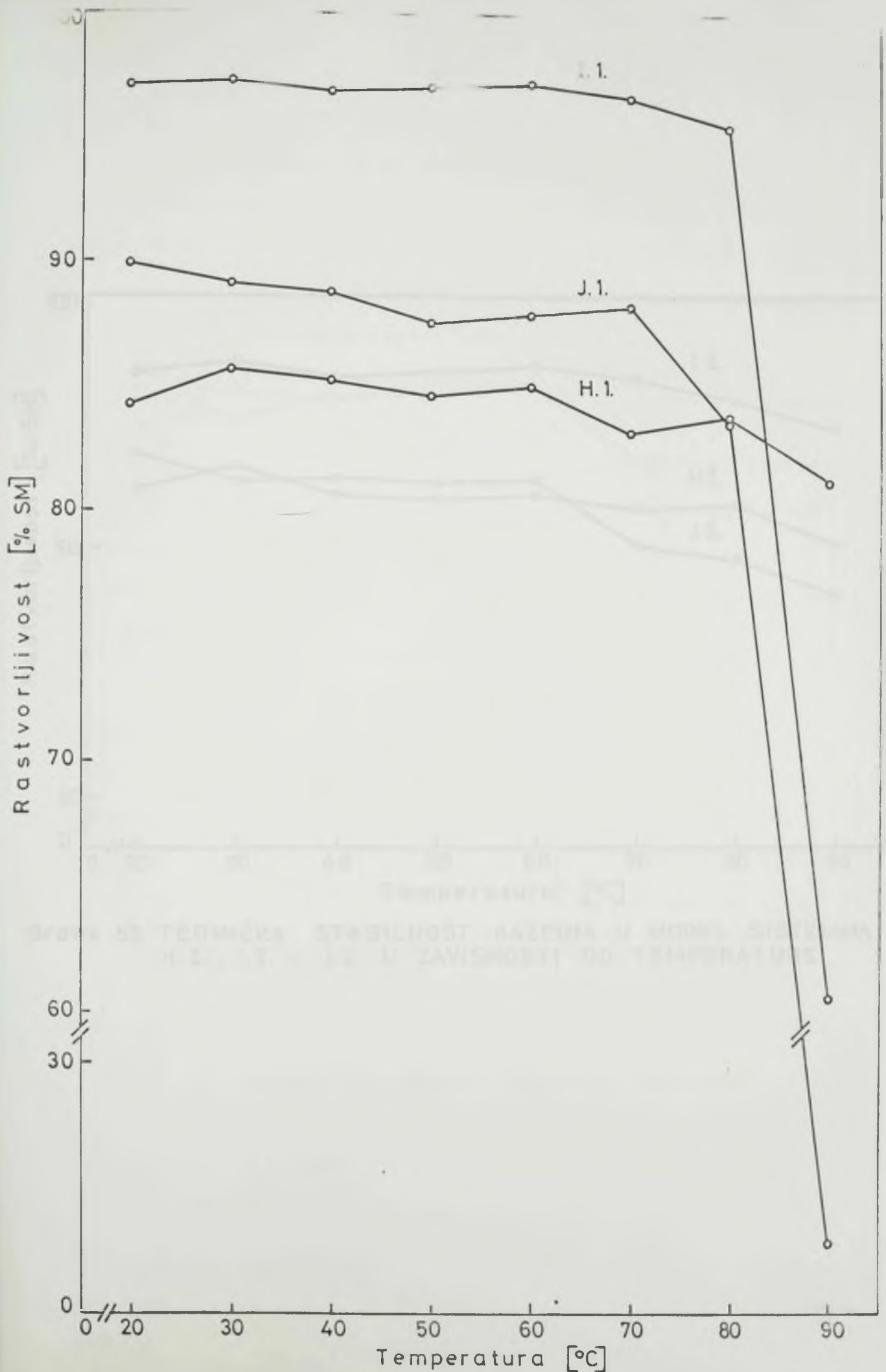
ranijih rezultata i očekivan. Kako rastu koncentracije stabilizujućih jona u sistemu, raste rastvorljivost sistema, primećuje se porast količine kazeina u rastvoru, stepen agregiranja kazeinskih micela kalcijumom je manji pa više kalcijumovih jona ostaje u rastvoru. Kasnije, kada rastvorljivost sistema i količina kazeina u njemu poprimi konstantnu vrednost, i koncentracija kalcijumovih jona takodje osciluje oko određenog konstantnog nivoa (sem pomenutog izuzetka: H.11. i H.12.).

Ispitivana je i termička stabilnost kazeina u model sistemima I.1. do I.3. i J.1. do J.3., koji po sastavu odgovaraju sistemima H.1., H.2. i H.6., s tom razlikom da je kod prvih 50% dvovalentnih katjona zastupljeno magnezijumom, a kod drugih su svi dodati jednovalentni katjoni predstavljeni kalijumom. Ovim smo želeli da ustanovimo kakvu promenu u termostabilnosti izabranih sistema iz grupe H izaziva prisustvo magnezijuma (tip I), odnosno kalijuma (tip J), pri nepromenjenom ukupnom sadržaju dvovalentnih, odnosno jednovalentnih katjona u sistemu. U izabranom dijapazonu koncentracija kalijumovih jona, od 24.2 do 44,3 mM/l, nalazi se i ona kojom je ovaj jon zastupljen u mleku i koja, prema podacima koje navode Webb i Johnson (117), iznosi oko 35,3 mM/l. Na osnovu iskustva stečenog ovim istraživanjima o određenim razlikama u ponašanju kalcijumovih i magnezijumovih jona i pored njihove iste valentnosti, odlučili smo da ustanovimo da li i

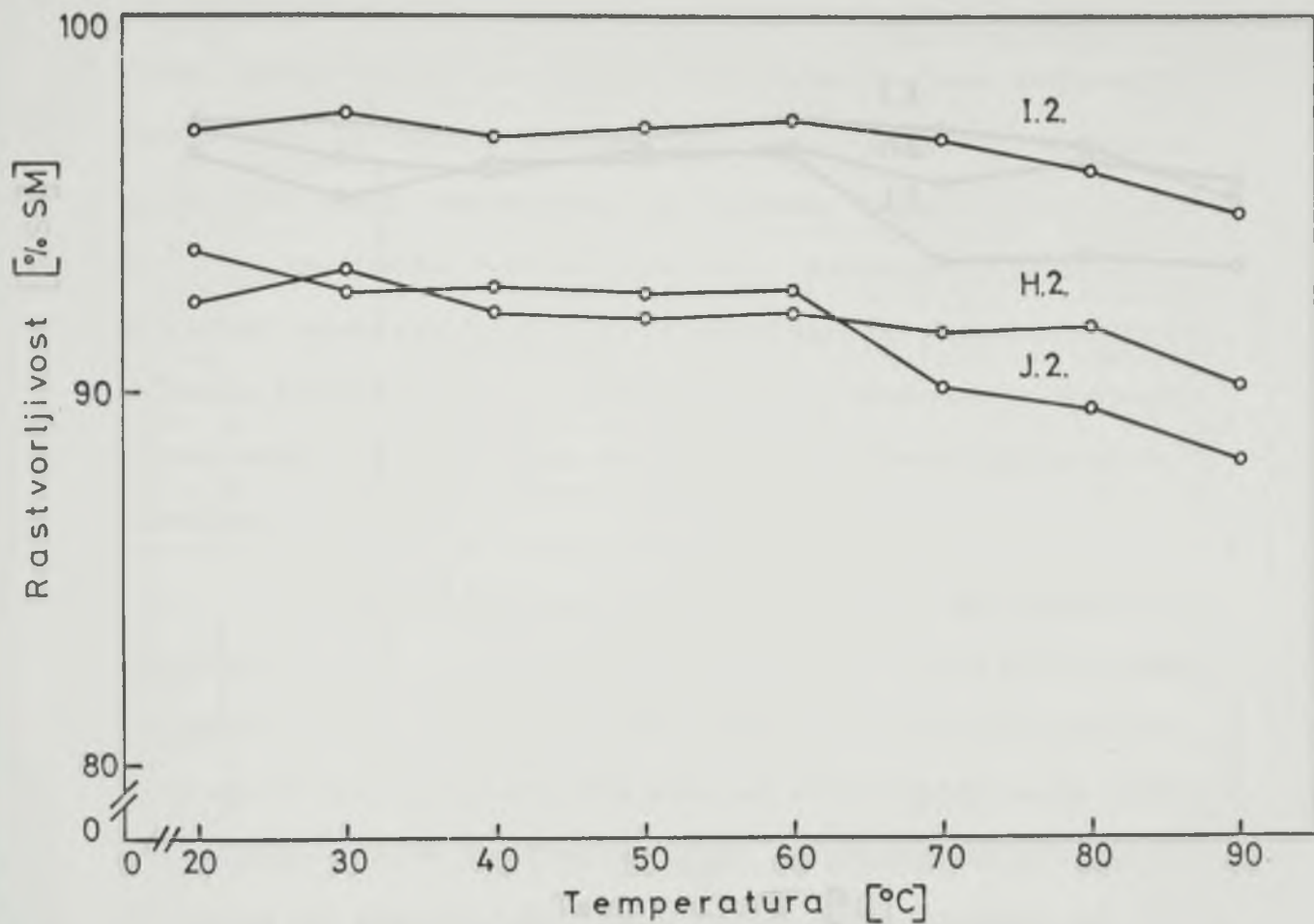
kalijumov jon pokazuje odstupanje u pogledu dejstva na stabilnost kazeina u poredjenju sa natrijumovim. Zato smo pored već opisanih ispitivanja uticaja kalijumovih jona u poglavlju o veličini, raspodeli veličina i obliku kazeinskih micela i njihove stabilnosti na alkohol, želeli da ustanovimo i dejstvo ovog jona na termičku stabilnost kazeina, i uporedimo sa delovanjem natrijumovih jona. Činjenica da u mleku ima oko 2,4 puta više kalijumovih jona nego natrijumovih, samo potvrđuje da njihov efekat ne treba zanemarivati.

Krive rastvorljivosti u funkciji temperature model sistema: H.1., I.1. i J.1. prikazane su u Grafiku 52.; odgovarajuće krive za sisteme: H.2., I.2. i J.2. nalaze se u Grafiku 53., a krive rastvorljivosti sistema H.6., I.3. i J.3. su u Grafiku 54.

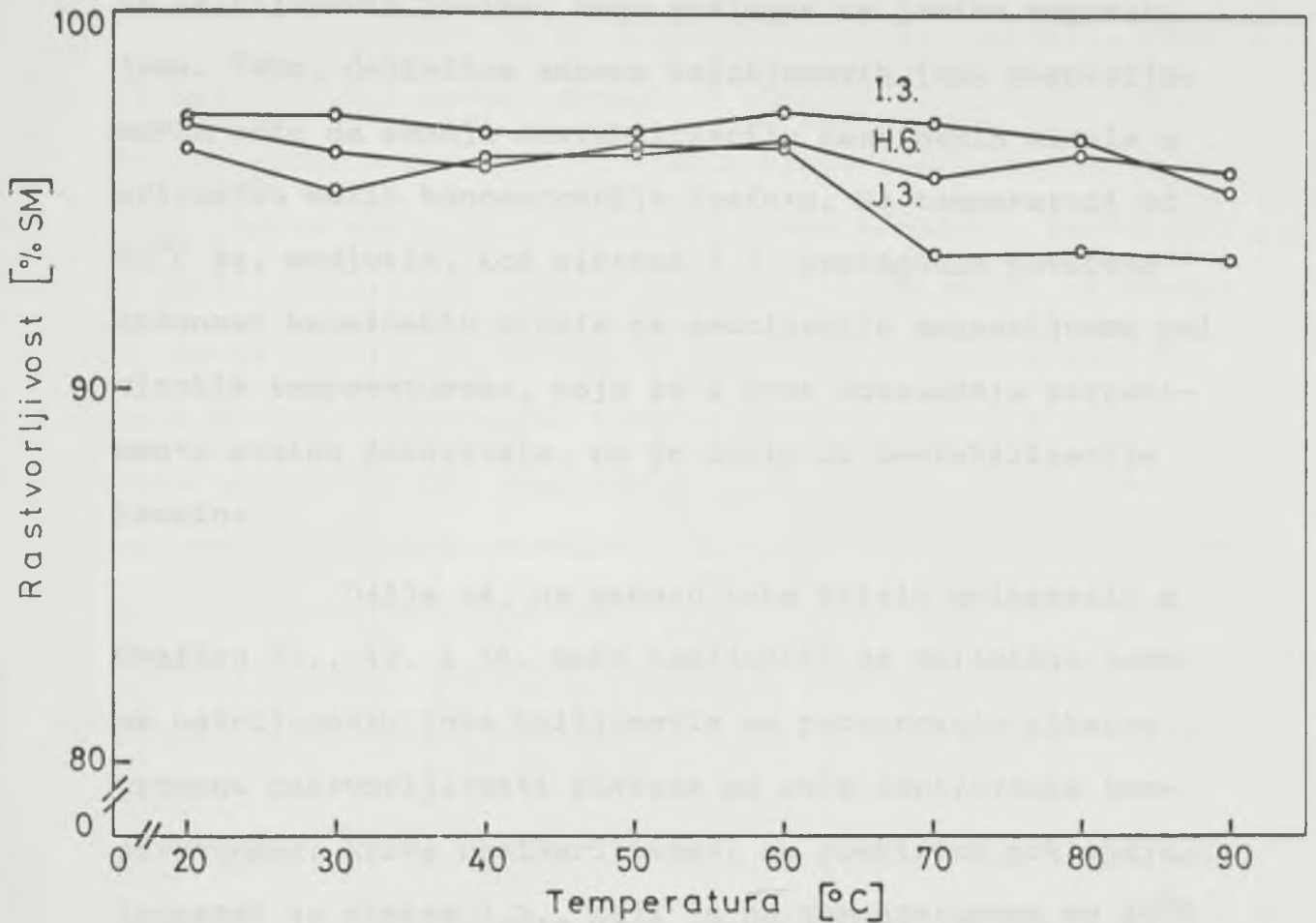
Na osnovu posmatranja i poredjenja navedenih grafikona može se doći do sledećeg zaključka: model sistemi u kojima je 50% kalcijumovih jona zamenjeno magnezijumovim (tip I) stabilniji su od ostalih ispitivanih sistema (tip H i J) na svim temperaturama; izuzetak je model sistem I.1. na temperaturi od 90°C , pri kojoj rastvorljivost kazeina sa preko 95% pri 80°C , pada na oko 60%, što je znatno niže od rastvorljivosti odgovarajućeg sistema bez magnezijumovih jona (H.1.). Povoljno dejstvo jona magnezijuma na stabilnost sistema kombinovanog jonskog sastava može biti u vezi sa interakcijom ovog jona i fosfatnog



Grafik 52. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA H.1., I.1. i J.1. U ZAVISNOSTI OD TEMPERATURE



Grafik 53. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA H.2., I.2. I J.2. U ZAVISNOSTI OD TEMPERATURE



Grafik 54. TERMIČKA STABILNOST KAZEINA U MODEL SISTEMIMA H.6., I.3. i J.3. U ZAVISNOSTI OD TEMPERATURE

anjona. Ranije je, naime, ustanovljeno (Grafik 32. i 33.) da fosfat u koncentracijama od 16,1 i 22,6 mM/l, koje su i ovde primenjene, destabilizuje znatno jače sisteme sa kalcijumovim jonima, nego analogne sa jonima magnezijuma. Tako, delimična zamena kalcijumovih jona magnezijumovim može da smanji destabilizaciju kazeinskih micela u prisustvu malih koncentracija fosfata. Na temperaturi od 90°C je, medjutim, kod sistema I.1. prevagnula povećana sklonost kazeinskih micela za asocijaciju magnezijumom pri visokim temperaturama, koja se i kroz dosadašnje eksperimente stalno pokazivala, pa je došlo do destabilizacije kazeina.

Dalje se, na osnovu toka krivih prikazanih u Grafiku 52., 53. i 54. može zaključiti da delimična zamena natrijumovih jona kalijumovim ne prouzrokuje nikakve promene rastvorljivosti sistema na svim ispitivanim temperaturama: krive rastvorljivosti se praktično poklapaju. Izuzetak je sistem J.1., koji je na temperaturama od 20°C do 80°C, u proseku nešto rastvorljiviji (za 3,36%) od odgovarajućeg sistema tipa H, ali skoro potpuno precipituje na temperaturi od 90°C (rastvorljivost iznosi 22,81%).

Ispitivanje sadržaja proteina i kalcijuma u centrifugatima termički tretiranih sistema ove tri grupe, potvrdila je rezultate dobijene odredjivanjem njihove rastvorljivosti.

4.7. KOAGULACIJA KAZEINA HIMOZINOM U MODEL SISTEMIMA

Sigurno je da veličina kazeinskih micela, stabilnost kazeina prema alkoholu i njegova termostabilnost, kao kompleks međusobno povezanih karakteristika, određuju i stepen osetljivosti kazeina prema himozinu. Hosttetter i Imhof (45) su, na osnovu velikog broja merenja, ustanovili da se vreme koagulacije himozinom produžava sa smanjenjem prečnika kazeinskih micela, iz čega ovi autori zaključuju da se reakcija koagulacije kazeina himozinom događa na površini globule kazeina. U ovoj disertaciji je već ustanovljeno različito delovanje kalcijumovih i magnezijumovih jona na oblik i veličinu kazeinskih micela i na termičku stabilnost kazeina; takodje je ispitan uticaj fosfata, citrata i jednovalentnih katjona: natrijuma i kalijuma, na iste parametre. Navedeni literaturni podaci, kao i ovi naši rezultati navode na određene pretpostavke o osetljivosti kazeina prema himozinu u pojedinim model sistemima, koje naredni eksperimenti treba da potvrde ili odbace.

Izvršena je koagulacija himozinom svih, navedenih u spisku, model sistema pod uslovima opisanim u Metodici istraživanja. Registrovano je vreme za koje dolazi do pojave koagulacije.

Rezultati su za sisteme B.1. do B.8. (različite koncentracije kalcijumovih jona) i C.1. do C.8. (različite

koncentracije magnezijumovih jona) izneti u Tabeli 28.

Tabela 28.: Vreme koagulacije kazeina himozinom u model sistemima B.1. do B.8. i C.1. do C.8.

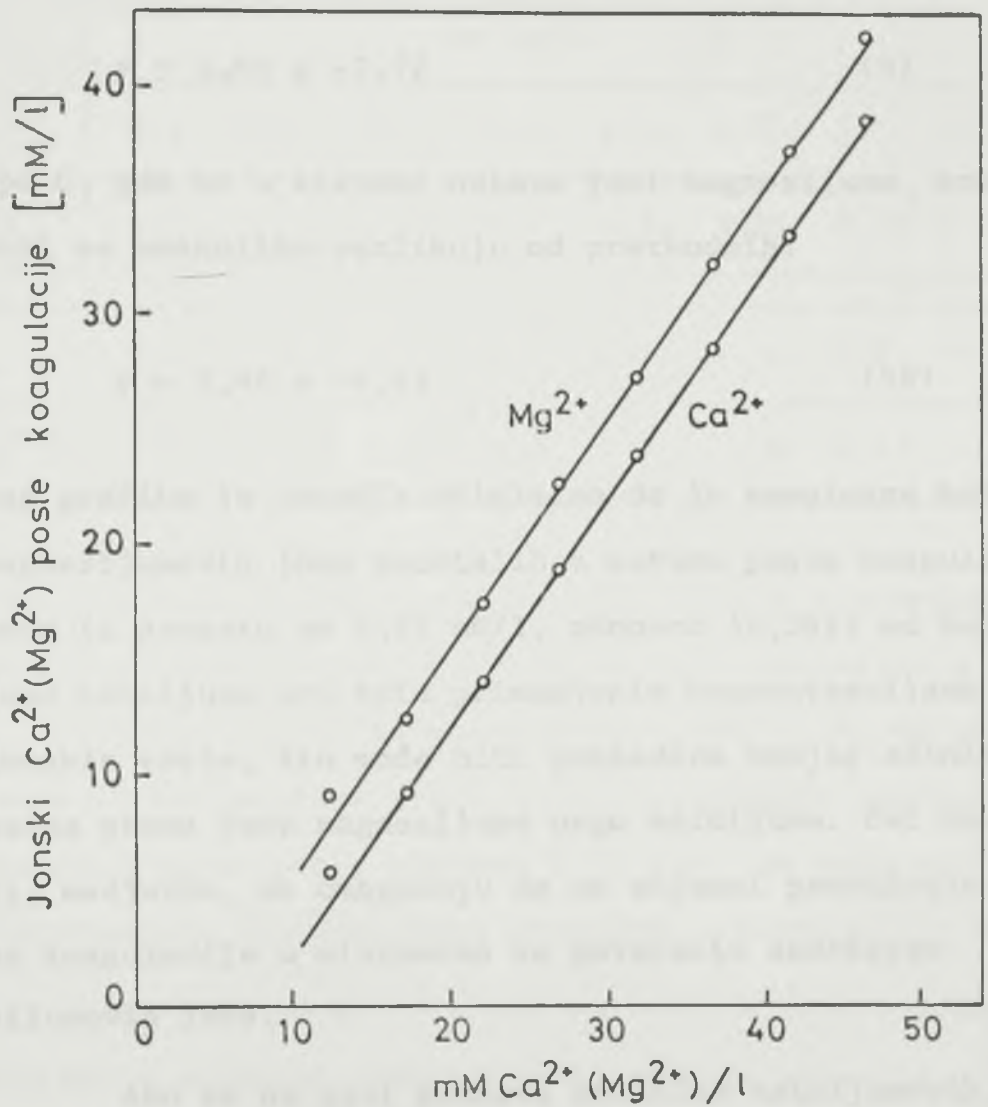
Model sistem	B.1.	B.2.	B.3.	B.4.	B.5.	B.6.	B.7.	B.8.
Vreme koagulacije (sec)	337	234	224	217	216	219	217	217

Model sistem	C.1.	C.2.	C.3.	C.4.	C.5.	C.6.	C.7.	C.8.
Vreme koagulacije (sec)	608	309	275	353	392	420	417	425

Iz navedene Tabele se vidi da vreme koagulacije model sistema tipa B opada sa porastom koncentracije kalcijumovih jona, do sistema B.4., gde je $\tau = 217$ sec. Sa daljim povećanjem koncentracije kalcijumovih jona u sistemu vreme pojave koagulacije se praktično ne menja. Ovaj podatak je u skladu sa rezultatima Djordjevića et al. (30), koji su konstatovali skraćenje vremena koagulacije mleka pri povećanju količine kalcijumovih jona u mleku samo do određene koncentracije, posle koje se kriva promene vremena koagulacije u funkciji koncentracije pomenutih jona asimptotski približava jednoj konstantnoj vrednosti.

Iz podataka u Tabeli 28. se vidi da je minimalno vreme koagulacije u zavisnosti od koncentracije magnezijumovih jona (sistemi tipa C) kod sistema C.3., dok se sa daljim povećanjem koncentracije ovih jona produžava vreme potrebno da himozin koaguliše te sisteme. Istovremeno se mora konstatovati da je, pri jednakim molarnim koncentracijama kalcijumovih i magnezijumovih jona, vreme koagulacije kod svih sistema sa kalcijumom kraće od vremena koagulacije odgovarajućih sistema sa magnezijumom. Kod minimalne koncentracije navedenih jona razlika iznosi 44,57%, kod sistema B.2. i C.2.: 24,27%, a kod model sistema B.3. i C.3. je još manja: samo 18,54%. S obzirom da vreme koagulacije narednih sistema sa kalcijumom ostaje konstantno, a da se isti parametar analognih sistema sa magnezijumom povećava, raste i razlika, koja kod poslednjeg sistema izražena u procentima iznosi: 48,94%. Neočekivano ponašanje kazeina prema himozinu u prisustvu većih primenjenih koncentracija magnezijumovih jona navelo nas je da ustanovimo sadržaj jonskog kalcijuma, odnosno magnezijuma, posle koagulacije himozinom sistema B, odnosno C, i kretanje količine rastvorljivih azotnih materija, u serumu koaguliranih sistema.

Molarne koncentracije kalcijumovih, odnosno magnezijumovih jona konstatovanih u filtratu posle koagulacije, prikazane su u Grafiku 55., u funkciji sadržaja istih jonskih vrsta u sistemima pre delovanja himozina.



Grafik 55. KOLIČINA JONSKOG KALCIJUMA (MAGNEZIJUMA) POSLE KOAGULACIJE MODEL SISTEMA B.1. DO B.8. (C.1. DO C.8.)

Iz navedenog grafika je jasno da je zavisnost linearna u oba slučaja. Za tip B, gde je posmatran uticaj kalcijumovih jona, na osnovu grafika dobijena jednačina ove pravolinijske zavisnosti glasi:

$$y = 1,44 x - 7,72 \quad (9)$$

Kod tipa C, gde se u sistemu nalaze joni magnezijuma, koeficijenti se unekoliko razlikuju od prethodnih:

$$y = 1,46 x - 4,43 \quad (10)$$

Iz istog grafika je takodje očigledno da je apsolutna količina magnezijumovih jona zaostalih u serumu posle koagulacije veća (u proseku za 3,51 mM/l, odnosno 16,30%) od količine jona kalcijuma pri svim primenjenim koncentracijama ovih jonskih vrsta, što može biti posledica manjeg afinite- ta kazeina prema jonu magnezijuma nego kalcijuma. Ovi rezultati, medjutim, ne omogućuju da se objasni produženje vremena koagulacije u sistemima sa povećanim sadržajem magnezijumovih jona.

Ako se na bazi poznate količine kalcijumovih, odnosno magnezijumovih, jona pri konstruisanju model sistema grupe B i C, i ustanovljene količine ovih jona u serumu koagulisanih sistema, izračuna njihov deo vezan za parakazein posle delovanja himozina, dobijaju se vrednosti

navedene u Tabeli 29. i prikazane u zavisnosti od količine u sistem dodatih jona. Kod svih sistema tipa C se primećuje da je apsolutna količina vezanog magnezijuma manja

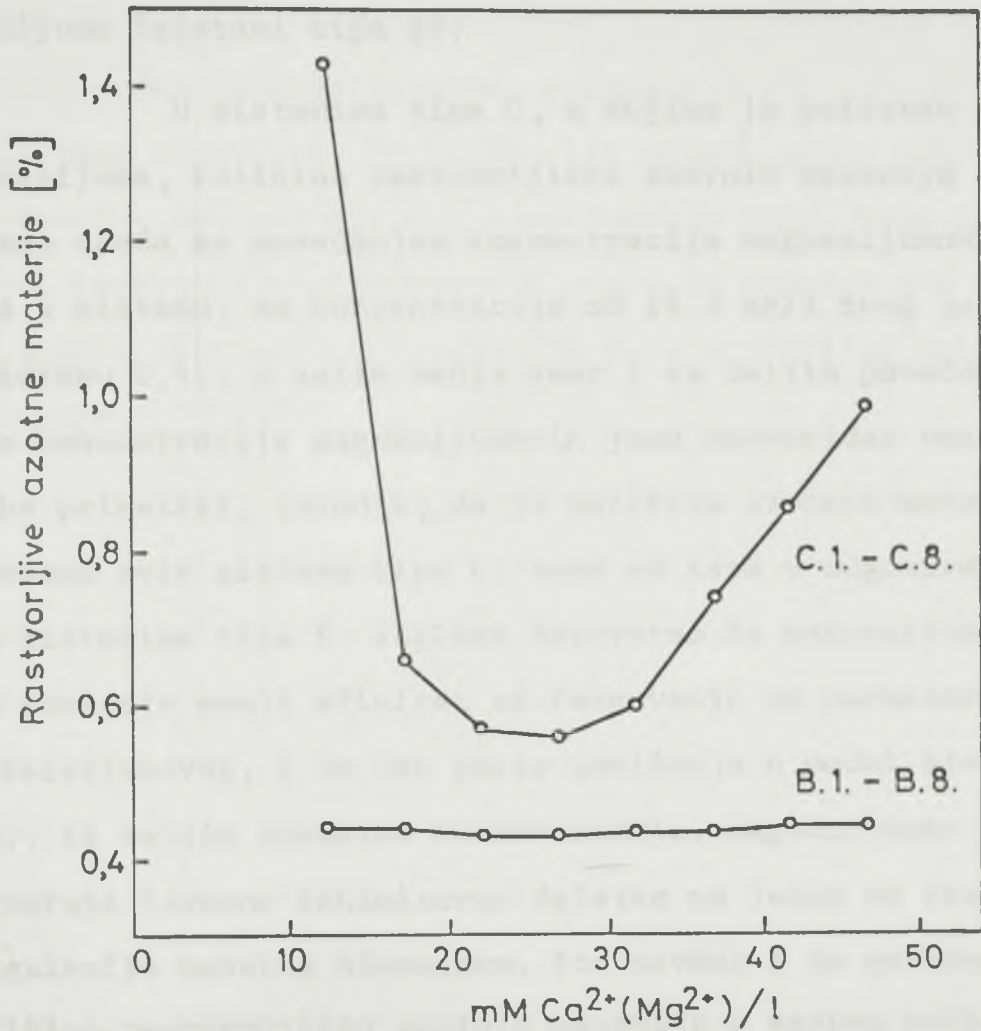
Tabela 29.: Količina vezanog kalcijuma (magnezijuma) posle koagulacije model sistema B.1. do B.8. (C.1. do C.8.)

Model sistem	B.1.	B.2.	B.3.	B.4.	B.5.	B.6.	B.7.	B.8.
Ca ²⁺ , veza- ni (mM/l)	6,65	8,27	8,41	8,56	8,56	9,02	9,02	8,68

Model sistem	C.1.	C.2.	C.3.	C.4.	C.5.	C.6.	C.7.	C.8.
Mg ²⁺ , veza- ni (mM/l)	3,08	4,86	4,80	4,74	4,74	4,86	4,81	4,46

nego količina vezanog kalcijuma u odgovarajućim sistemima, što smo na osnovu konstatovane količine ovih elemenata u serumu i pretpostavili. Simptomatično je, međjutim, da sadržaj vezanog magnezijuma u zavisnosti od njegove koncentracije neznatno opada posle sistema C.6. Znači da veća količina magnezijumovih jona inhibira koagulaciju kazeina himozinom.

Rešenje ovoga problema smo pokušali da nadjemo u odredjivanju količine rastvorljivih azotnih materija u sistemima B i C posle koagulacije. Rezultati ispitivanja sadržaja rastvorljivih azotnih materija u serumu himozinom koagulisanih sistema B.1. do B.8. i C.1. do C.8. nalaze se u Grafiku 56. Iz navedenog grafika se vidi da koncentracija



Grafik 56. KOLIČINA RASTVORLJIVIH N MATERIJA U SERUMU POSLE KOAGULACIJE MODEL SISTEMA B.1. DO B.8. i C.1. DO C.8.

rastvorljivih azotnih materija, za koje se pretpostavlja da se sastoje uglavnom iz tzv. glikomakropeptida (GMP), u serumu posle koagulacije, zadržava konstantnu vrednost (od 0,43 do 0,44%) pri svim primenjenim koncentracijama kalcijuma (sistemi tipa B).

U sistemima tipa C, u kojima je prisutan jon magnezijuma, količina rastvorljivih azotnih materija u serumu opada sa povećanjem koncentracije magnezijumovih jona u sistemu, do koncentracije od 28.3 mM/l ovog jona u sistemu C.4., a zatim menja smer i sa daljim povećavanjem koncentracije magnezijumovih jona neprekidno raste. Treba primetiti, takodje, da je količina azotnih materija u serumu svih sistema tipa C, veća od iste u odgovarajućim sistemima tipa B. Izgleda verovatno da magnezijumov jon pokazuje manji afinitet za reagovanje sa parakazeinom od kalcijumovog, i da čak posle zasićenja u model sistemu C.4., sa daljim porastom koncentracije, magnezijumov jon ostvaruje izvesno inhibitorno dejstvo na jednu od faza koagulacije kazeina himozinom, što dovodi i do povećanja količine rastvorljivih azotnih materija u serumu ovih sistema. Snimcima na elektronskom mikroskopu u ovom radu je ustanovljeno da agregiranje kazeinskih micela pod uticajem magnezijuma nije identično agregiranju koje nastaje u prisustvu kalcijuma. Dok kalcijum uzrokuje stvaranje pravilnih globula kazeina različitog prečnika, magnezijum

dovodi do nastajanja kazeinskih agregata nepravilnog i neodređenog oblika. Iz ovoga proizilazi da je himozinu mehanički onemogućen pristup unutar te mase, te jedan deo kazeina ne biva zahvaćen dejstvom himozina. To znači da je povećana količina rastvorljivih azotnih materija u serumu rezultat inhibicije prve, encimatske faze koagulacije kazeina himozinom. Do inhibicije dolazi posle određene granične koncentracije magnezijumovih jona, kada aglomerati kazeina postaju takve veličine da himozin sve manje uspeva da deluje, jer je i relativna površina micela sve manja.

Rezultati ispitivanja vremena koagulacije kazeina himozinom u model sistemima D.1. do D.5. (porast koncentracije fosfata u prisustvu 18.8 mM/l kalcijumovih jona), i model sistemima E.1. do E.5. (sistemi sastavljeni analogno prethodnim uz prisustvo jednake molarne koncentracije magnezijumovih jona umesto kalcijumovih), prikazani su u Tabeli 30.

Tabela 30.: Vreme koagulacije kazeina himozinom u model sistemima D.1. do D.5. i E.1. do E.5.

Model sistem	D.1.	D.2.	D.3.	D.4.	D.5.
Vreme koagulacije (sec)	264	393	626	1197	1570

Model sistem	E.1.	E.2.	E.3.	E.4.	E.5.
Vreme koagulacije (sec)	922	1019	1276	2100 ^a	4980 ^a

Kontrola za sisteme D: model sistem B.2. ($\tau = 234$ sec)

Kontrola za sisteme E: model sistem C.2. ($\tau = 309$ sec)

^aslabi znaci koagulacije posle navedenog vremena

Za kontrolni uzorak sistema grupe D uzet je odgovarajući sistem (sa 18.8 mM/l kalcijuma) bez dodatih fosfatnih anjona, a za kontrolni uzorak sistema grupe E sistem jednake molarne koncentracije magnezijumovih jona, takodje u odsustvu fosfata. Imajući u vidu veliku promenu aktivnosti himozina koja nastaje kao posledica neznatne promene pH sredine (83), pridržavali smo se i kod ovih ispitivanja konstantne vrednosti pH sistema od 6,70. Tako uticaj pojedinih jonskih vrsta na vreme koagulacije kazeina himozinom u model sistemima ne može da se pripiše promeni pH, koju ovi joni u sistemu izazivaju.

Iz Tabele 30. proizilazi da se u prisustvu fosfata i sa porastom koncentracije ovog jona, vreme koagulacije produžava, bez obzira koji se od odabranih dvovalentnih katjona nalazi u sistemu. Ukoliko je to magnezijum (model sistemi tipa E) inhibicija je izraženija (u sistemima sa minimalnom koncentracijom 3,49 puta, a sa maksimalnom 3,17 puta), nego kada se u sistemu nalazi

kalcijum (sistem tipa D), mada kod svih sistema iz grupe sa magnezijumom, dakle i pri najvećoj primenjenoj koncentraciji fosfata, dolazi do koagulacije.

Čini se da, u prisustvu fosfata, prva faza delovanja himozina nije inhibirana, ali da fosfatni anjon stabilizuje nastali parakazein u odnosu na dvovalentne katione u sistemu, te se druga i treća faza koagulacije obavljaju sporije i u manjoj meri. To potvrđuje i jedva izražena koagulacija u sistemima E.4. i E.5. Duže trajanje koagulacije u svim sistemima tipa E, u poredjenju sa koagulacijom u sistemima tipa D, je posledica dejstva magnezijumovih jona, što se može zaključiti na osnovu uporedjenja vremena koagulacije kontrolnih sistema za ove dve grupe (B.2. i C.2.).

Rezultati ispitivanja vremena koagulacije himozinom model sistema F.1. do F.5. (porast koncentracije citrata u prisustvu 18.8 mM/l Ca^{2+}) i G.1. do G.5. (sistemi sastavljeni analogno prethodnim uz prisustvo jednake molarne koncentracije magnezijumovih jona umesto kalcijumovih) prikazani su u Tabeli 31.

Tabela 31.: Vreme koagulacije kazeina himozinom u model sistemima F.1. do F.5. i G.1. do G.5.

Model sistem	F.1.	F.2.	F.3.	F.4.	F.5.
Vreme koagulacije (sec)	306	423	1140 ^a	-	-

Model sistem	G.1.	G.2.	G.3.	G.4.	G.5.
Vreme koagulacije (sec)	482	690	2220 ^a	-	-

Kontrola za sisteme F: model sistem B.2. ($\tau = 234$ sec)

Kontrola za sisteme G: model sistem C.2. ($\tau = 309$ sec)

^aslabi znaci koagulacije posle navedenog vremena

Na osnovu Tabele 31. se može konstatovati da citratni jon, slično fosfatnom produžava vreme koagulacije kazeina himozinom, u prisustvu kalcijumovih (sistemi tipa F), odnosno magnezijumovih jona (sistemi tipa G). Inhibicija je toliko jaka da u sistemima F.4. i F.5., odnosno G.4. i G.5. uopšte ne dolazi do koagulacije.

Uporedimo li inhibitorno dejstvo fosfata i citrata vidimo da je citratni anjon znatno jači inhibitor koagulacije kazeina himozinom. Ovaj anjon sprečava navedenu reakciju u minimalnoj koncentraciji od 18,8 mM/l (sistemi F.4. i G.4.), dok i maksimalna primenjena koncentracija fosfata od 42,0 mMP/l, dozvoljava, doduše slabu, koagulaciju sistema (model sistemi D.5. i E.5.). Inhibitorno dejstvo citrata je već ranije konstatovano. Rezultati se dobro uklapaju i sa podacima o termostabilnosti kazeina u istim sistemima. Zato smo pretpostavili da se i ovde prva faza delovanja himozina nesmetano dešava, a da su druga i treća

inhibirane vezivanjem Ca^{2+} (Mg^{2+}) od strane citrata. Ovoj pretpostavci u prilog ide i činjenica da je koagulacija onemogućena u onim model sistemima gde koncentracija citratnih jona prelazi koncentraciju ekvimolarnu količini kalcijumovih, odnosno magnezijumovih jona u sistemu računatu na trikalcijumcitrat. Pretpostavku smo i dokazali naknadnim dodavanjem Ca^{2+} , odnosno Mg^{2+} , u sisteme F.4. i F.5., odnosno G.4. i G.5., što je izazvalo momentalnu koagulaciju.

Rezultati ispitivanja vremena koagulacije himozinom model sistema kombinovanog jonskog sastava H.1. do H.12. (kalcijum, fosfat, citrat) prikazani su u Tabeli 32.

Iz Tabele 32. proizilazi da je osetljivost kazeina prema himozinu u model sistemima iz grupe H, u kojima su kombinovani jonski uticaji citrata i fosfata, veća od stabilnosti sistema u kojima se pojavljuju odvojeno fosfati (sistemi tipa D), odnosno citrati (sistemi tipa F). Šta više, ukoliko se pažljivo uporede vrednosti u navedenoj tabeli sa onima iz Tabela 30. i 31., može se zaključiti da je produženje vremena koagulacije u svim sistemima tipa H., približno jednako zbiru vremena koja označavaju produženje prouzrokovano fosfatom u odgovarajućim D sistemima, i vremena produženja zbog prisustva citrata u sistemima tipa F. I ovde pri koncentraciji citrata od 18,80 mM/l uopšte ne dolazi do koagulacije, bez obzira na količinu prisutnog fosfata.

Tabela 32.: Vreme koagulacije kazeina himozinom u model sistemima H.1. do H.12.

Koncentracija citrata (mM/l)	Vreme koagulacije (sec)			
	K	Koncentracija P mM/l		
		16,1	22,6	29,1
K	234	264	394	626
2,35	306	309 ^b (H.1.)	461(H.5.)	683(H.9.)
4,70	423	428 ^c (H.2.)	566 ^d (H.6.)	992(H.10.)
9,40	1140 ^a	1440 ^a (H.3.)	1800 ^a (H.7.)	2100 ^a (H.11.)
18,80	-	- (H.4.)	- (H.8.)	- (H.12.)

K - Vreme koagulacije kontrolnih sistema, bez dodatog fosfata, odnosno citrata.

a - slabi znaci koagulacije posle navedenog vremena

b - Vreme koagulacije analognog sistema sa 50% Mg²⁺ (I.1.) iznosi: 497 sec.

Vreme koagulacije analognog sistema sa K⁺ (J.1.) iznosi: 230 sec

c - Vreme koagulacije analognog sistema sa 50% Mg²⁺ (I.2.) iznosi: 630 sec.

Vreme koagulacije analognog sistema sa K⁺ (J.2.) iznosi: 280 sec.

d - Vreme koagulacije analognog sistema sa 50% Mg²⁺ (I.3.) iznosi: 1860^a sec.

Vreme koagulacije analognog sistema sa K⁺ (J.3.) iznosi: 430 sec.

Podaci o vremenu koagulacije model sistema I.1. do I.3. i J.1. do J.3., koji po sastavu odgovaraju sistemima H.1., H.2. i H.6., s tom razlikom da je kod prvih polovina količine kalcijumovih jona zamenjena magnezijumovim, a kod drugih su svi dodati jednovalentni katjoni predstavljeni kalijumom, dati su pod oznakama b, c, i d, uz Tabelu 32. da bi se mogli uporediti sa vrednostima u analognim H sistemima (H.1., H.2., H.6.). Kao što smo i očekivali na osnovu do sada iznetih rezultata o delovanju Mg^{2+} , odnosno Ca^{2+} , na vreme koagulacije kazeina himozinom, zastupljenost polovine dvovalentnih katjona magnezijumom umesto kalcijumom (sistemi tipa I), dalje produžava ispitivano vreme. Najveća razlika je kod sistema sa maksimalnim ispitivanim sadržajem fosfata i citrata (H.6. i I.3.) i iznosi 1294 sec.

Na osnovu poredjenja sistema tipa J, sa odgovarajućim iz grupe H, može se primetiti, da kalijumov jon pokazuje manji stabilizujući efekat od natrijumovog u odnosu na koagulaciju himozinom. Kod sva tri sistema tipa J, vreme koagulacije je kraće nego kod analognih H sistema. Skraćenje vremena delovanja himozina kreće se od 79 do 148 sec, i najmanje je u sistemu J.1., dok je kod preostala dva podjednako. To znači da je nastali parakazein slabije stabilizovan kalijumovim nego natrijumovim jonima u istim koncentracijama. Ovakav zaključak je donet i za kazein, na

osnovu prosečnog prečnika kazeinske micela u sistemima tipa J., odnosno odgovarajućim H sistemima.

Pored veze izmedju oblika micela i osetljivosti kazeina na koagulaciju himozinom, može se zaključiti da postoji i odredjena zavisnost izmedju veličine micela kazeina, termostabilnosti, stabilnosti u odnosu na alkohol i vremena koagulacije. Sa smanjenjem prečnika kazeinske micela, povećanjem termostabilnosti i stabilnosti u odnosu na alkohol, smanjuje se i osetljivost kazeina na koagulaciju himozinom. Izuzetak su sistemi sa fosfatom, gde sve primenjene koncentracije fosfata dovode do smanjenja osetljivosti kazeina na himozin, bez obzira na prečnik micela u sistemu.

Z A K L J U Č C I

Istraživanja izvršena u ovom radu, koja su obuhvatala ispitivanje uticaja pojedinih jona i njihovih kombinacija na micelarnu težinu, oblik, veličinu i raspodelu veličina kazeinske micelle, stabilnost kazeina prema alkoholu, njegovu termičku stabilnost kao i osetljivost kazeina na koagulaciju himozinom, daju osnova za donošenje sledećih najvažnijih zaključaka:

- Micelarna težina kazeinske globule raste u rastvoru Na-kazeinata sa porastom koncentracije kalcijumovih jona od 13,8 mM/l (model sistem B.1.), gde iznosi $\bar{M}_w = 30,770$ miliona, do 33,7 mM/l (sistem B.5.) gde iznosi $\bar{M}_w = 109,290$ miliona. Znači da se u model sistemu in vitro konstruisanom dodatkom kalcijumovih jona izaziva asocijacija kazeina i stvaranje agregata slične veličine kao što se to dešava in vivo, pri sintezi mleka.

- Povećanje micelarne težine kazeinske globule pod uticajem porasta koncentracije magnezijumovih jona, se može konstatovati samo do određene granice, odnosno do koncentracije od 23,4 mM/l (sistem C.3.) gde iznosi $\bar{M}_w = 43,480$ miliona. Sa daljim povećanjem koncentracije magnezijumovih jona prosečna veličina kazeinske micelle ostaje nepromenjena. Tako pri najvećoj primenjenoj

koncentraciji magnezijumovih jona od 33.3 mM/l micelarna težina kazeina iznosi takodje 43,480 miliona, što je oko 2,5 puta manje od težine kazeinske micidele u analognom sistemu sa kalcijumom i ukazuje na bitnu razliku u stabilnosti kazeina u prisustvu kalcijuma, odnosno magnezijuma, iako su oba jona iste valence.

- Istraživanja izvršena uz pomoć elektronskog mikroskopa su pokazala da kalcijumov jon izaziva formiranje kazeinskih micela globularnog oblika in vitro, u rastvoru Na-kazeinata, bilo da se nalazi sam, ili u prisustvu sledećih jona: natrijuma, kalijuma, fosfata, citrata i njihovih kombinacija. U sistemima u kojima je prisutan kalcijum (B.2., D.2., D.3., D.5., F.1., F.4., H.1., H.2., H.6.) kazein se nalazi uvek u polidisperznom obliku sa odredjenom raspodelom prečnika globula, što je verovatno u vezi sa pojavom nazvanom pamćenje prvobitne veličine micidele, tzv. "size memory".

- Za razliku od prethodnih model sistema, u analognim sistemima gde je agregirajući agens dvovalentni katjon magnezijuma, kazeinske micidele se nisu formirale u obliku pravilnih globula različitih prečnika (C.2., E.1., E.3., E.5., G.1., G.4., I.1., I.2., I.3.). Do nastanka agregata je došlo i u ovim sistemima, medjutim stvoreni oblici imaju nepravilnu i nedovoljno definisanu formu. Simptomatično je da su najizrazitije nepravilne micidele nastale

u sistemu, gde je od svih jonskih vrsta prisutan samo magnezijum, a da su najbliže pravilnom obliku micide kazeina u kombinovanim sistemima, u kojima se katjoni kalcijuma i magnezijuma nalaze u jednakim molskim koncentracijama, uz prisustvo fosfatnih i citratnih jona.

- Statistička obrada podataka elektronske mikroskopije je omogućila donošenje nekoliko interesantnih zaključaka. Prosečan prečnik kazeinske micide je najmanji kod sistema kombinovanog jonskog sastava, koji se sastoji od 18.8 mM/l Ca^{2+} , 22 mM/lP i 4,70 mM/l $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}$ (H.6.), i iznosi 364 Å; u analognom sistemu u prisustvu kalijumovih jona umesto natrijumovih je nešto veći i iznosi 386 Å (J.3.). Prosečan prečnik kazeinske micide je u svim sistemima kombinovanog jonskog sastava manji od srednjeg prečnika micela u sistemu u kome se nalazi samo kalcijumov jon u analognoj količini. To znači da kombinacija dodavanja fosfatnih i citratnih jona u svim ispitivanim koncentracijama deluje stabilizujuće na kazein.

- Zabuna koja postoji u literaturi oko stabilizujućeg, odnosno destabilizujućeg, delovanja fosfatnog anjona je rešena na sledeći način (sistemi D): smer delovanja fosfata na stabilnost kazeina u sistemu je odredjen njegovom koncentracijom. Niža koncentracija fosfora (16,1 mM/l) izaziva neobično veliko povećanje prosečnog prečnika kazeinske micide za 116 Å, u odnosu na srednji prečnik micela u odgovarajućem sistemu bez fosfata. Sa povećanjem koncentracije

fosfatnih jona prosečan prečnik micela kazeina se smanjuje na vrednost blisku onoj u odgovarajućem sistemu, samo sa kalcijumom (B.2.).

- Citratni anjon u svim koncentracijama (sistemi F) prouzrokuje dezagregaciju kazeinskih micela, koja je utoliko izraženija ukoliko je veća koncentracija ovog jona, tako da su kazeinske micidele u sistemu sa 18.8 mM/l citrata (F.4.) reda veličine 200-300 Å sa uskom raspodelom. Pomenuti red veličine kazeinskih micela je blizak prečniku globule kazeina u model sistemu čistog rastvora Na-kazeinata (A.1.), što je očigledno i iz fotografija pomenutih sistema.

Uporedjenje primenjenih molarnih koncentracija fosfatnih i citratnih anjona i njihovog dejstva na veličinu micidele kazeina pokazuje da je citrat znatno efektniji stabilizujući agens od fosfata.

- Vrednosti disperzije i standardne devijacije navedenih sistema pokazuju da je odstupanje od srednje vrednosti kod svih model sistema kombinovanog jonskog sastava, u kojima se nalazi kalcijum, fosfat, citrat, odnosno kalcijum, kalcijum, fosfat i citrat, (H.1., H.2., H.6., J.1., J.2., J.3.), relativno malo ($\sigma^2 = 293-496$), dok ostale sisteme, u kojima se nalazi samo kalcijum, odnosno fosfat ili citrat u prisustvu kalcijuma (B.2., D.1., D.3., D.5., F.1.), karakteriše razvučenija raspodela i veća odstupanja od srednje vrednosti ($\sigma^2 = 891 - 1732$).

- Raspodela veličina kazeinskih micela u ispitivanim model sistemima odgovara Γ -raspodeli sa stepenom korelacije koji se kreće u intervalu od 0,891022 do 0,991469, i koeficijentom odredjenosti od 0,793920 do 0,983010.

- Na destabilizaciju model sistema u prisustvu alkohola podjednako intenzivno utiču odgovarajuće koncentracije kalcijumovih, odnosno magnezijumovih, jona. Fosfatni i citratni anjon imaju suprotan efekat, s tim što citrat stabilizuje kazein u odnosu na alkohol bolje od fosfata pri analognim molarnim koncentracijama. Delimična zamena dvovalentnih jona magnezijumom, odnosno monovalentnih jona kalijumom, ne uzrokuje bitne promene u pogledu stabilnosti navedenih model sistema prema alkoholu.

- Termička stabilnost kazeina u ispitivanom dijapazonu koncentracija kalcijumovih jona i temperatura (sistemi tipa B) opada sa porastom koncentracije kalcijumovih jona pri konstantnoj temperaturi, a pri stalnom sadržaju Ca^{2+} opada sa porastom temperature. Rezultati ispitivanja termičke stabilnosti kazeina u prisustvu magnezijuma (sistemi tipa C) su pokazali da magnezijumov jon do određene koncentracije deluje na povišenim temperaturama kao jači agregirajući agens od kalcijumovog. Različiti temperaturni koeficijent agregiranja kazeina kalcijumom, odnosno magnezijumom, može da bude u vezi sa većim elektro-negativitetom i manjim prečnikom magnezijumovog jona, i

pored iste valentnosti jona ovih dvaju metala.

- Smer delovanja fosfata na stabilnost kazeina u prisustvu kalcijumovih (sistemi D) odnosno magnezijumovih jona (sistemi E) pri termičkom tretmanu određuje koncentracija dodatog anjona i primenjena temperatura. Stabilnost kazeina u model sistemima ovog tipa zavisi još i od vrste primenjenog agregirajućeg agensa, tj. da li se radi o kalcijumu ili magnezijumu.

- Rezultatima ispitivanja termičke stabilnosti kazeina u model sistemima (sistemi F i G) ustanovljeno je da je citratni anjon veoma dobar stabilizujući agens i u prisustvu kalcijumovih i magnezijumovih jona. Pokazalo se da je najveća stabilnost kazeinskih micela postignuta u sistemima gde količina citratnog anjona odgovara ekvimolarnoj koncentraciji citrata potrebnoj da veže ceo sadržaj dvovalentnog katjona u sistemu (12,5 mM/l).

Iz uporedjenja stabilnosti model sistema D, E, F, G proizilazi da je minimalna količina anjona potrebna da spreči termičku destabilizaciju kazeina približno dva puta manja ako je u pitanju citrat (oko 10 mM/l), nego fosfat (više od 20 mM/l), bez obzira na vrstu dvovalentnog katjona prisutnog u sistemu.

- U model sistemima kombinovanog jonskog sastava (sistemi H) se zapaža koordinativno dejstvo pojedinih jonskih vrsta. Kombinovani sistemi u kojima je 50% kalcijumovih jona zamenjeno magnezijumovim (sistemi I) stabilniji

su od analognih sistema u kojima je zastupljen samo kalcijum (sistemi H i J) na svim temperaturama. Povoljno delovanje jona magnezijuma na stabilnost sistema kombinovanog jonskog sastava može da bude u vezi sa interakcijom ovog jona i fosfatnog anjona. Delimična zamena natrijumovih jona kalijumovim (sistemi J) ne prouzrokuje bitne promene termostabilnosti kazeinske micele na svim ispitivanim temperaturama.

- Osetljivost kazeina na himozin raste sa porastom koncentracije kalcijumovih jona do odredjenog nivoa (28,7 mM/l Ca^{2+} , sistem B.4.), posle koga se više ne menja. Kod sistema u kojima su dodati magnezijumovi joni (C), kriva promene vremena koagulacije kazeina himozinom ima minimum kod koncentracija od 23,4 mM/l (sistem C.3.), što znači da se sa daljim povećanjem broja ovih jona u sistemu produžava vreme potrebno da himozin koaguliše te sisteme. Određivanjem jonskog kalcijuma, odnosno magnezijuma, u filtratu posle koagulacije ustanovljeno je da količina jona ove vrste linearno zavisi od njihove prvobitne koncentracije u sistemu, a da je u proseku za 3,51 mM/l veća kada je u pitanju magnezijum. Koncentracija rastvorljivih azotnih materija u serumu posle koagulacije je u sistemima sa kalcijumom (B) konstantna (0,43 do 0,44%), dok u prisustvu magnezijuma pokazuje minimum kod koncentracije od 28,3 mM/l (sistem C.4.). Za sve sisteme sa magnezijumom količina

rastvorljivog azota je veća od analogne u serumu koaguliranih sistema sa kalcijumom.

- U prisustvu fosfata i sa porastom koncentracije ovog jona, vreme koagulacije se produžava bez obzira koji od odabranih dvovalentnih katjona se nalazi u sistemu (D i E). Ako je to magnezijum inhibicija je izraženija, što je i očekivano na osnovu vremena koagulacije kontrolnih sistema (B.2. i C.2.). Fosfat ne inhibira prvu fazu koagulacije, ali stabilizuje nastali parakazein u odnosu na dvovalentne katjone u sistemu, te se druga i treća faza odvijaju sporije i u manjoj meri.

- Citratni anjon je još jači inhibitor koagulacije od fosfatnog, tako da u sistemima sa 18.8 mM/l citrata i više ni u prisustvu kalcijuma (F.4. i F.5.) i magnezijuma (G.4. i G.5.) uopšte ne dolazi do koagulacije. Inhibirana je takodje druga i treća faza koagulacije kazeina himozinom, vezivanjem kalcijuma, odnosno magnezijuma, od strane citrata. U sistemima gde koncentracija citratnog jona prelazi koncentraciju ekvimolarnu količini kalcijuma, odnosno magnezijuma u sistemu, koagulacija je sasvim onemogućena. Naknadno dodavanje kalcijuma, odnosno magnezijuma, izaziva momentalnu koagulaciju, obzirom da je prva faza delovanja himozina već završena.

- Ispitivanja koagulacije model sistema kombinovanog jonskog sastava tipa H pokazala su da se delovanja

pojedinih jonskih vrsta u smislu skraćenja, produženja ili totalnog onemogućenja koagulacije, sabiraju. Zamena 50% dvovalentnih jona u sistemu magnezijumom (tip I) još više produžava ispitivano vreme. Kalijumov jon (tip J) pokazuje slabiji stabilizujući efekat od natrijumovog u odnosu na koagulaciju kazeina himozinom.

L I T E R A T U R A

1. Abdulina, T.N.; Kovalenko, M.S.: Izv. vyssh. ucheb. Zaved. Pishch. Tekhnol., 5, 38-41, 1971.
2. "Anleitung zum Praktikum für Molkereitechniker", Milchtechnisches Institut, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, 1966.
3. Ashoor, S.H.: Diss. Abstr. Int., Sect. B, 31, 7358-7359, 1971.
4. Ashoor, S.H.; Sair, R.A.; Olson, N.F.; Richardson, T.: Biochim. biophys. Acta, 229, 423-430, 1971.
5. Batra, S.C. i de Mann, J.M.: Milchwissenschaft, 19, 531-535, 1964.
6. Bingham, E.W.: J. Dairy Sci., 54, 1077-1080, 1971.
7. Bloomfield, V.A. i Morr, C.V.: Neth. Milk Dairy J., 27, 103-120, 1973.
8. Board, P.W.; Bain, J.M.; Gove, D.W.; Mullett, J.T.: J. Dairy Res. 37, 513-519, 1970.
9. Boogaerdt, J.: Nature, 174, 884, 1954.
10. Boulet, M. i Marier, J.R.: J. Dairy Sci., 43, 155-164, 1960.
11. Brookes, B.C. i Dick, W.F.L.: "An Introduction to Statistical Method", Heinemann, London, 1969.

12. Carić, M.: "Istraživanje kazeina ovčijeg mleka u toku laktacije", magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1970.
13. Carić, M. i Djordjević, J.: Z. Lebensmittel-Untersuch.u. - Forsch., 150, 24-28, 1970.
14. Carroll, R.J., Thompson, M.P. i Nutting G.C.: J. Dairy Sci., 51, 1903-1908, 1968.
15. Castle, A.V.; Wheelock, J.V.: Biochem. J., 119, 12, 1970.
16. Castle, A.V. i Wheelock, J.V.: J. Dairy Research, 40, 77-84, 1973.
17. Corradini, C.: Scienza Tec. latt. - casear., 22, 243-248, 1971.
18. Davidov, R.B., Biryukova, Z.A.: Moloch. Prom., 32, 19-23, 1971.
19. Davidov, R.B.; Kulebyakin, Yu.I.; Yaroshkevich, A.P.: Dokl. mosk. sel' skokhoz. Akad. K.A. Timiryazeva (Zootekhniya), 164, 139-143, 1970.
20. Davies, D.T.; White, J.C.D., J. Dairy Sci., 25, 256, 1958.
21. Dickson, I.R.; Perkins, D.J.: Biochem. J., 124, 235-240, 1971.
22. Doležálek, J.; Brezina, P.; Peterková, L.: Prům.Potravin, 23, 156-159, 1972.
23. Downey, W.K.; Murphy, R.F.: J. Dairy Res., 37, 47-59, 1970.

24. Dyachenko, P.F.; Alekseeva, N.Yu.: Trudȳ uses. nauchno-issled. Inst. moloch. Prom., 27, 3-9, 1970.
25. Dyachenko, P.; Uhdanova, E. i Polukarov, Yu., Mol. Prom., 5, 35, 1955.
26. Djaković, Lj.: Koloidna hemija, Naučna knjiga, Beograd, 1966.
27. Djordjević, J.; Carić, M.: Kemija Ind., 18, 819-823, 1969.
28. Djordjević, J. i Carić, M.: Zbornik radova Tehnološkog Fakulteta, 2, 153-161, 1970.
29. Djordjević, J. i Carić, M.: Le Lait, LI, 653-660, 1971.
30. Djordjević, J., Stefanović, R., Tomić, J.: Zbornik radova Poljoprivrednog fakulteta, XIX, 1-7, 1971.
31. Edmondson, L.F. i Tarassuk, N.P.: J. Dairy Sci., 39, 36-45, 1956.
32. Farrell, H.M. jr.: J. Dairy Sci., 56, 1195-1206, 1973.
33. Flickinger, G.D.; Stimpson, E.G.: W. Germ. Pat. Appl., 1 921, 825, 1969.
34. Fox, P.F.: J. Dairy Res., 37, 173-180, 1970.
35. Garnier, J.; Ribadeau-Dumas, B.: J. Dairy Res., 37, 493-504, 1970.
36. Gál, S.; Bánkay, D.: J. Fd Sci., 36, 800-803, 1971.
37. Gebrauchsanweisung für den PRO MILK Mk II.

38. Gould, I.A.; Harman, T.D.: Centennial Res. Ser. Dep. Dairy Tech., Ohio St. Univ., 1, 30-46, 1970.
39. Green, M.L.: J. Dairy Res., 39, 53.1972.
40. Green, M.L.; Crutchfield, G.: J. Dairy Res., 38, 151-164, 1971.
41. "Handbuch der Lebensmittelchemie", Band III/1, Springer Verlag, Berlin, 1968.
42. Harman, T.D.; Gould, I.A.: Centennial Res. Ser. Dep. Dairy Tech., Ohio St. Univ., 1, 1-16, 1970.
43. Hill, R.D.: J. Dairy Res., 37, 187-192, 1970.
44. Hongo, F.; Ohtaka, F.: Sci. Rep. Fac. Agric. Ibaraki Univ., 16, 73-75, 1968.
45. Hostettler, H.W.; Imhof, K.: Landw. Jahrbuch der Schweiz, 66, 308-380, 1952.
46. Hostettler, H.; Imhof, K.: Milchwissenschaft, 6, 351, 1951.
47. Hostettler, H.; Imhof, K.; Stein, J.: Milchwissenschaft, 20, 189, 1965.
48. Hostettler, H. i Rügger, H.R.: Landwirtsch. Jahrbuch der Schweiz, 64, 670-714, 1950.
49. Huglin, M.B.: "Light Scattering from Polymer Solutions", Academic Press, London i New York, 1972.

50. Igarashi, Y.; Saito, Z.: Jap. J. zootech. Sci., 41, 262-269, 1970.
51. Instructions for Shimadzu Differential Refractometer, Model Dr-3.
52. Instructions for Shimadzu Photoelectric Light-Scattering Photometer Model PG-21.
53. Ivanović, B.: "Teorijska statistika", Jugosl. Inst. za ekon. istraživanja, Beograd, 1966.
54. Jenness, R. i Patton, S.: "Principles of Dairy Chemistry", Wiley, New York, 1959.
55. Kalatzopoulos, G.K.: "Contribution to the study of some rheological properties of cheese curd", Doktorska disertacija, Agricultural High School, Atina, 1970.
56. Kanamori, M.; Miyoshi, M.; Ibuki, F.; Maki, Z.: J. Jap. Soc. Fd Nutr., 24, 227-234, 1971.
57. Kapats, N.: Sotsijal. Zemjodel., 21, 49-62, 1969.
58. Kim, G.: Diss. Abstr. Int., Sect. B, 32, 5613, 1972.
59. Kirchmeier, O.: Kolloid-Z. & Z. Polym., 236, 137-140, 1970.
60. Kniga, M.I.; Tenditnik, V.S.; Shevchenko, I.M., Dokl. vses. Akad. sel'skokhoz. Nauk, 5, 25-27, 1970.
61. Knoop, E. i Wortmann, A., Milchwissenschaft, 15, 273, 1960.

62. Kononenko, I.E.; Tylkin, V.B.: *Tovarovedenie*, 5, 51-55, 1971.
63. Lin, S.H.C.; Dewan, R.K.; Bloomfield, V.A.; Moor, C.V.: *Biochemistry*, Easton, 10, 4788-4793, 1971.
64. Lin, S.H.C.; Leong, S.L.; Dewan, R.K.; Bloomfield, V.A.; Moor, C.V.: *Biochemistry*, Easton, 11, 1818-1821, 1972.
65. Livesey, P.J.; Billmeyer, F.W., Jr.: *J. Colloid Interface Sci.*, 30, 447-472, 1969.
66. Mc Kenzie, H.A.: "Milk Proteins, Chemistry and Molecular Biology", Academic Press, New York and London, 1971.
67. Mercier, J.C.; Garnier, J.: *Annls Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 9, 427-433, 1969.
68. Mercier, J.C.; Grosclaude, F., Dumas, B.R.: *Milchwissenschaft*, 27, 402-408, 1972.
69. Miller, P.G. i Sommer, H.H.: *J. Dairy Sci.*, 23, 405, 1940.
70. Mills, E.S.; Topper, Y.J.: *J. Cell Biol.*, 44, 310-328, 1970.
71. Moor, H.de; Hendrickx, H.: *Meded. Fac. LandbWet. Rijksuniv. Gent*, 36, 731-742, 1971.
72. Morr, C.V.: *J. Dairy Sci.*, 50, 1744, 1967.

73. Morr, C.V.; Josepson, R.V., Jenness, R.: J. Dairy Sci., 54, 1955, 1971.
74. Morr, C.V.; Lin, S.H.C.; Dewan, R.K. i Bloomfield, V.A.: J. Dairy Sci., 56, 415-418, 1973.
75. Nakanishi, T.; Itoh, T.: Agric. biol. Chem., 33, 1270-1276, 1969.
76. Nakanishi, T.; Itoh, T.: J. Agric. chem. Soc. Japan, 44, 118-123, 1970.
77. Neurath, H.: "The Proteins, Composition, Structure, and Function", Volume II, Academic Press, New York i London, 1964.
78. Neurath, H.: "The Proteins Composition, Structure, and Fuction", Volume V, Academic Press, New York i London, 1964.
79. Nitschmann, H.: Helv. chim. acta, 32, 1258, 1949.
80. Parry, R.M., Jr.; Carroll, R.J.: Biochim. biophys. Acta, 194, 138-150, 1969.
81. Pejić, O. i Djordjević, J.: "Mlekarski praktikum", Naučna knjiga, Beograd, 1972.
82. Pepper, L.; Hipp, N.J.; Gordon, W.G.: Biochim. biophys. Acta, 207, 340-346, 1970.
83. Puhan, Z.: Schweizerische Milchzeitung, 94, 141-142, 1968.
84. Prodanski, P.: Milchwissenschaft, 23, 491-497, 1968.

85. Prodanski, Dzhondzhorowa: *Milchwissenschaft*, 24, 667-669, 1969.
86. Pyne, G.T.: *J. Dairy Res.*, 29, 101, 1962.
87. Pyne, G.T. i Mc Gann, T.C.A.: *J. Dairy Res.*, 37, 269-278, 1970.
88. Ribadeau-Dumas, B.; Garnier, J.: *J. Dairy Res.*, 37, 269-278, 1970.
89. Rose, D.: *J. Dairy Sci.*, 44, 1405, 1961.
90. Rose, D.: *J. Dairy Sci.*, 44, 430, 1961.
91. Rose, D.: *J. Dairy Sci.*, 45, 1305, 1962.
92. Rose, D.: *Dairy Sci. Abstract*, 25, 45-52, 1963.
93. Rose, D.: *Dairy Sci. Abstract*, 31, 171-175, 1969.
94. Rose, D. i Colvin, J.R.: *J. Dairy Sci.*, 49, 1091, 1966.
95. Sabharwal, K.; Vakaleris, D.G.: *J. Dairy Sci.*, 55, 277-282, 1972.
96. Saito, Z. i Hashimoto, J.: *Fac. Agric. Kokkaido Univ.*, 54, 17, 1964.
97. Schalitshev, J.; Nakashev, K.; Petrowa, M.: *Milchwissenschaft*, 26, 284-288, 1971.
98. Schmidt, D.G., Walstra, P. i Buchheim, W.: *Neth Milk Dairy J.*, 27, 128-142, 1973.
99. Seekles, L., Smeets, W.T.G.M.: *Neth. Milk Dairy J.*, 1, 7, 1947.

100. Shchedushnova, T.N.; Radaeva, I.A.: Moloch. Prom., 33, 27-29, 1972.
101. Shtal'berg, S.M.; Radaeva, I.A.; Shul'kina, S.P.: Trudy vses. nauchnoissled. Inst. moloch. Prom., 27, 100-105, 1970.
102. Sommer, H.H. i Binney, T.H.: J. Dairy Sci., 6, 176, 1923.
103. Sommer, H.H. i Hart, E.B.: J. Dairy Sci., 5, 525, 1922.
104. Sommer, H.H. i Hart, E.B.: Res. Bull. Wis. agric. Exp. Sta., 67, 1926.
105. Springall, H.D.: "The Structural Chemistry of Proteins", Academic Press, New York, 1954.
106. Stacey, K.A.: "Light-scattering in Physical Chemistry", Butterworths Scientific Publications, London, 1956.
107. Thompson, M.P.; Gordon, W.G., Boswell, R.T. i Farrell, H.M. Jr.: J. Dairy Sci., 52, 1166, 1969.
108. Tinyakov, V.G.: Izv. v'yssh. ucheb. Zaved., Pishch. Tekhnol., 2, 165-167, 1970.
109. Towler, C.; Dolby, R.M.: N.Z. J Dairy Sci. Technol., 5, 143-144, 1970.
110. Tuszyński, W.B.: J. Dairy Res., 38, 115-125, 1971.
111. Tuszyński, W.B.; Zielinska, K.: Milchwissenschaft, 23, 208-211, 1968.

112. Uilks, S.: "Matematičeskaja statistika", Nauka, Moskva, 1967.
113. Vakaleris, D.G.; Sabharwal, K.: J. Dairy Sci., 55, 283-288, 1972.
114. Waugh, D.F., Creamer, K.L.; Slattery, C.W.; Dresdner, G.W.: Biochemistry, Easton, 9, 786-795, 1970.
115. Waugh, D.F.; Talbot, B.: Biochemistry, Easton, 10, 4153-4162, 1971.
116. Weimar, A.C.: J. Dairy Sci., 6, 95, 1923.
117. Webb, B.H. i Johnson, A.H.: "Fundamentals of Dairy Chemistry", AVI, Westport, 1965.
118. Wheelock, J.V.; Sinkinson, G. i Hindle, E.J.: Dairy Sci. Abstract, 34, 655-664, 1972.
119. Whikehart, D.R.: Diss. Abstr. Int., Sect. B, 30, 2539, 1969.
120. Whikehart, D.R.; Rafter, G.W.: J. Dairy Sci., 53, 1171-1176, 1970.
121. Yoshino, U.; Takemoto, S.; Yamauchi, K.; Tsugo, T.: Jap. J. zootech. Sci., 40, 299-303, 1969.
122. Yoshino, U.; Tanaka, K.; Yamauchi, K.; Tsugo, T.: Jap. J. zootech. Sci., 40, 476-482, 1969.
123. Zimm, B.: J. Chem. Phys., 16, 1093, 1948.
124. Zittle, C.A.: J. Dairy Sci., 52, 1356-1358, 1969.

125. Zittle, C.A.: J. Dairy Sci., 53, 1013-1017, 1970.
126. Zittle, C.A.; Della Monica, E.S. i Custer, J.H.:
J. Dairy Sci., 39, 1651-1659, 1956.
127. Zittle, C.A.; Della Monica, E.S. i Custer, J.H.:
J. Dairy Sci., 40, 280-288, 1957.
128. Zittle, C.A. i Jasewics, L.B.: J. Dairy Sci., 45,
703, 1962.
129. Zittle, C.A. i Pepper, L.: J. Dairy Sci., 41, 1671-
1682, 1958.

F I L O Z O F I J E

1. Filozofski nauka o svetu.
2. Filozofski nauka o ljudskom duhu i njegovim sposobnostima.
3. Filozofski nauka o ljudskom životu i njegovim vrednostima.
4. Filozofski nauka o ljudskim odnosima i njihovim zakonitostima.
5. Filozofski nauka o ljudskim delima i njihovim posledicama.

P R I L O Z I

1. Filozofski nauka o svetu.
2. Filozofski nauka o ljudskom duhu i njegovim sposobnostima.
3. Filozofski nauka o ljudskom životu i njegovim vrednostima.
4. Filozofski nauka o ljudskim odnosima i njihovim zakonitostima.
5. Filozofski nauka o ljudskim delima i njihovim posledicama.

P R I L O Z I

1. Spisak model sistema.
2. Zimm-ovi dijagrami kazeina u model sistemima B.1. do B.5. i C.1. do C.5.
3. Micelarne težine kazeina u model sistemima B.1. do B.5. i C.1. do C.5.
4. Histogrami prečničke raspodele kazeinskih micela u izabranim model sistemima.
5. Γ -funkcije za površinski prosek kazeinskih micela u izabranim model sistemima.
6. Gustine brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u izabranim model sistemima.
7. Fotografije kazeinskih micela u izabranim model sistemima (uvećanje 50.000 puta).

SPISAK MODEL SISTEMA

Model sistemi	Koncentracija jona (mM/l)					
	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	aPO ₄ ³⁻	(C ₆ H ₅ O ₇) ³⁻
A.1. Na-kazeinat	1.4	1.1	19.3	1.0	7.5	-
B.1. Ca ²⁺ /Na-kazeinat	13.8	1.1	19.3	1.0	7.5	-
B.2. "	18.8	1.1	19.3	1.0	7.5	-
B.3. "	23.8	1.1	19.3	1.0	7.5	-
B.4. "	28.7	1.1	19.3	1.0	7.5	-
B.5. "	33.7	1.1	19.3	1.0	7.5	-
B.6. "	38.7	1.1	19.3	1.0	7.5	-
B.7. "	43.7	1.1	19.3	1.0	7.5	-
B.8. "	48.8	1.1	19.3	1.0	7.5	-
C.1. Mg ²⁺ /Na-kazeinat	1.4	13.4	19.3	1.0	7.5	-
C.2. "	1.4	18.5	19.3	1.0	7.5	-
C.3. "	1.4	23.4	19.3	1.0	7.5	-
C.4. "	1.4	28.3	19.3	1.0	7.5	-
C.5. "	1.4	33.3	19.3	1.0	7.5	-
C.6. "	1.4	38.3	19.3	1.0	7.5	-
C.7. "	1.4	43.3	19.3	1.0	7.5	-
C.8. "	1.4	48.4	19.3	1.0	7.5	-

Model sistemi

D.1. $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}/\text{Na-kazeinat}$

D.2. "

D.3. "

D.4. "

D.5. "

E.1. $\text{Mg}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}/\text{Na-kazeinat}$

E.2. "

E.3. "

E.4. "

E.5. "

F.1. $\text{Ca}^{2+}/(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}/\text{Na-kazeinat}$

F.2. "

F.3. "

F.4. "

F.5. "

G.1. $\text{Mg}^{2+}/(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}/\text{Na-kazeinat}$

G.2. "

G.3. "

G.4. "

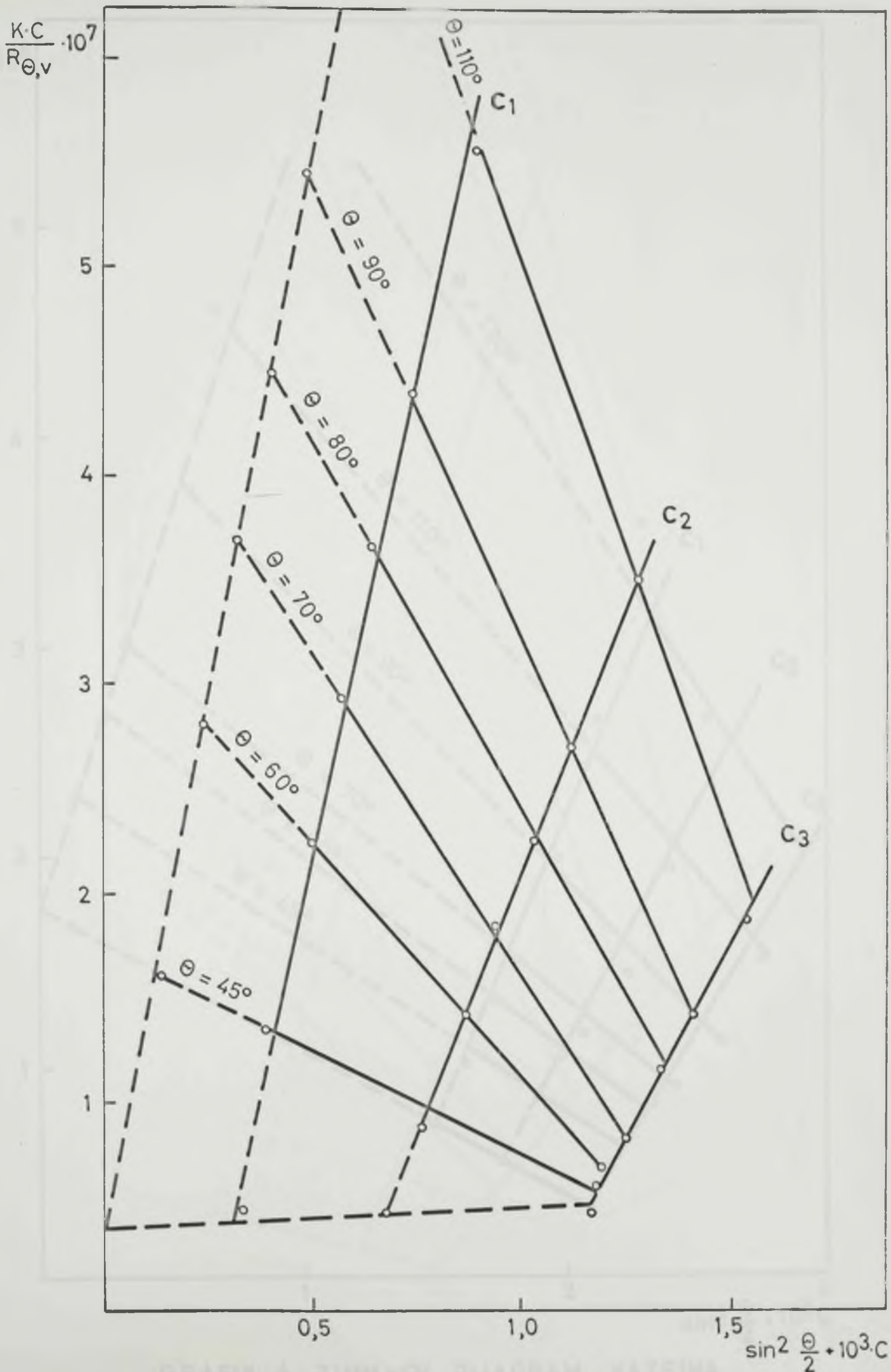
G.5. "

Koncentracija jona (mM/l)

Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	K^+	aPO_4^{3-}	$(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{3-}$
18.8	1.1	36.5	1.0	16.1	-
18.8	1.1	49.5	1.0	22.6	-
18.8	1.1	62.5	1.0	29.1	-
18.8	1.1	69.1	1.0	35.5	-
18.8	1.1	80.7	1.0	42.0	-
1.4	18.5	36.5	1.0	16.1	-
1.4	18.5	49.5	1.0	22.6	-
1.4	18.5	62.5	1.0	29.1	-
1.4	18.5	69.1	1.0	35.5	-
1.4	18.5	80.7	1.0	42.0	-
18.8	1.1	26.3	1.0	7.5	2.35
18.8	1.1	33.4	1.0	7.5	4.70
18.8	1.1	47.5	1.0	7.5	9.40
18.8	1.1	75.7	1.0	7.5	18.80
18.8	1.1	98.5	1.0	7.5	26.40
1.4	18.5	26.3	1.0	7.5	2.35
1.4	18.5	33.4	1.0	7.5	4.70
1.4	18.5	47.5	1.0	7.5	9.40
1.4	18.5	75.7	1.0	7.5	18.80
1.4	18.5	98.5	1.0	7.5	26.40

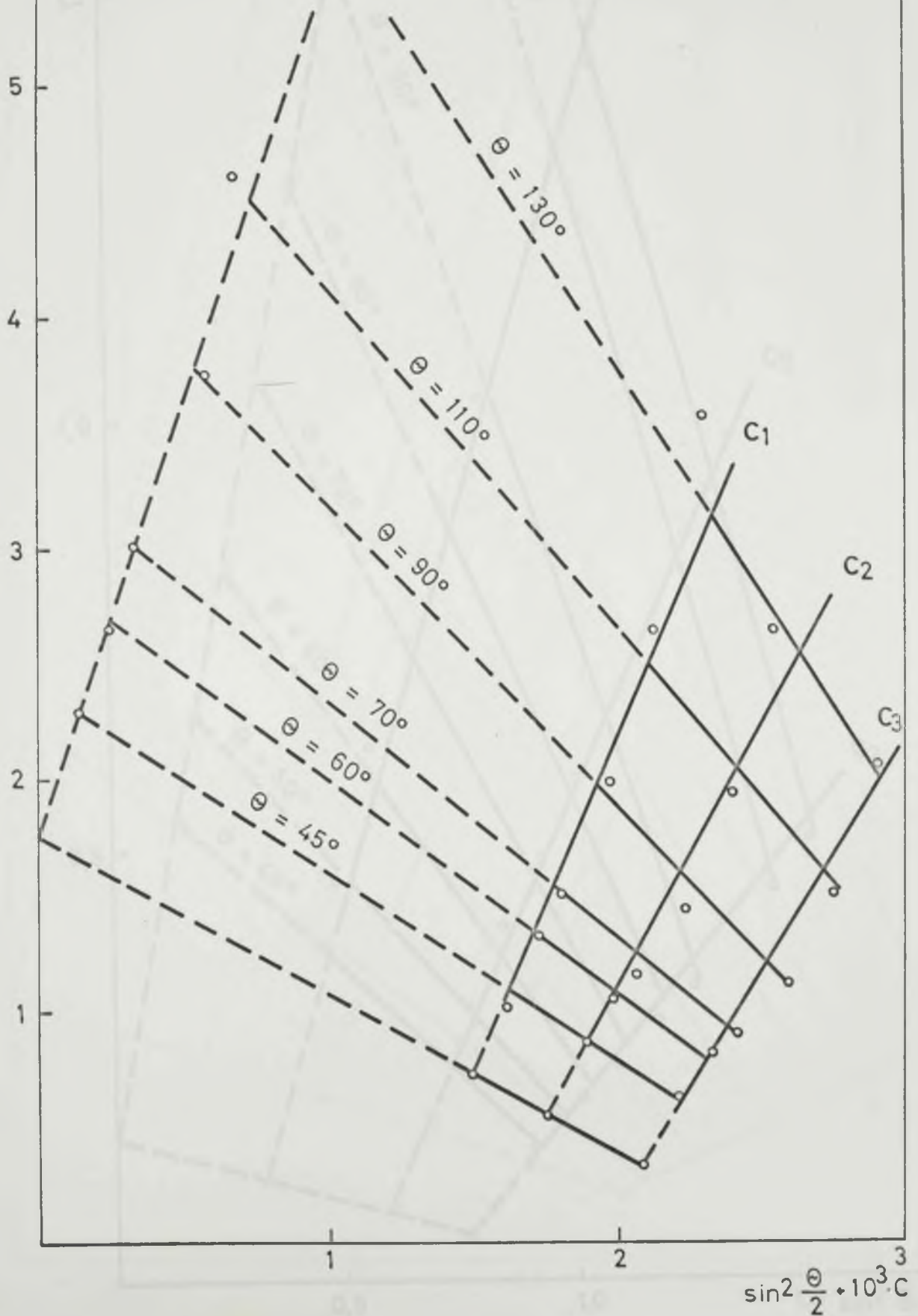
Model sistemi	Koncentracija jona (mM/l)					
	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	aPO ₄ ³⁻	(C ₆ H ₅ O ₇) ³⁻
H.1. Ca ²⁺ /PO ₄ ³⁻ /(C ₆ H ₅ O ₇) ³⁻ /Na-kazeinat	18.8	1.1	43.5	1.0	16.1	2.35
H.2. "	18.8	1.1	50.6	1.0	16.1	4.70
H.3. "	18.8	1.1	64.7	1.0	16.1	9.40
H.4. "	18.8	1.1	92.9	1.0	16.1	18.80
H.5. "	18.8	1.1	56.5	1.0	22.6	2.35
H.6. "	18.8	1.1	63.6	1.0	22.6	4.70
H.7. "	18.8	1.1	77.7	1.0	22.6	9.40
H.8. "	18.8	1.1	105.9	1.0	22.6	18.80
H.9. "	18.8	1.1	69.5	1.0	22.6	2.35
H.10. "	18.8	1.1	76.6	1.0	29.1	4.70
H.11. "	18.8	1.1	90.7	1.0	29.1	9.40
H.12. "	18.8	1.1	118.9	1.0	29.1	18.80
I.1. Ca ²⁺ /Mg ²⁺ /PO ₄ ³⁻ /(C ₆ H ₅ O ₇) ³⁻ /Na-kazeinat	9.9	9.9	43.5	1.0	16.1	2.35
I.2. "	9.9	9.9	50.6	1.0	16.1	4.70
I.3. "	9.9	9.9	63.6	1.0	22.6	4.70
J.1. Ca ²⁺ /K ⁺ /PO ₄ ³⁻ /(C ₆ H ₅ O ₇) ³⁻ /Na-kazeinat	18.8	1.1	19.3	24.2	16.1	2.35
J.2. "	18.8	1.1	19.3	31.3	16.1	4.70
J.3. "	18.8	1.1	19.3	44.3	22.6	4.70

^anavedene koncentracije su date u obliku fosfora (P)

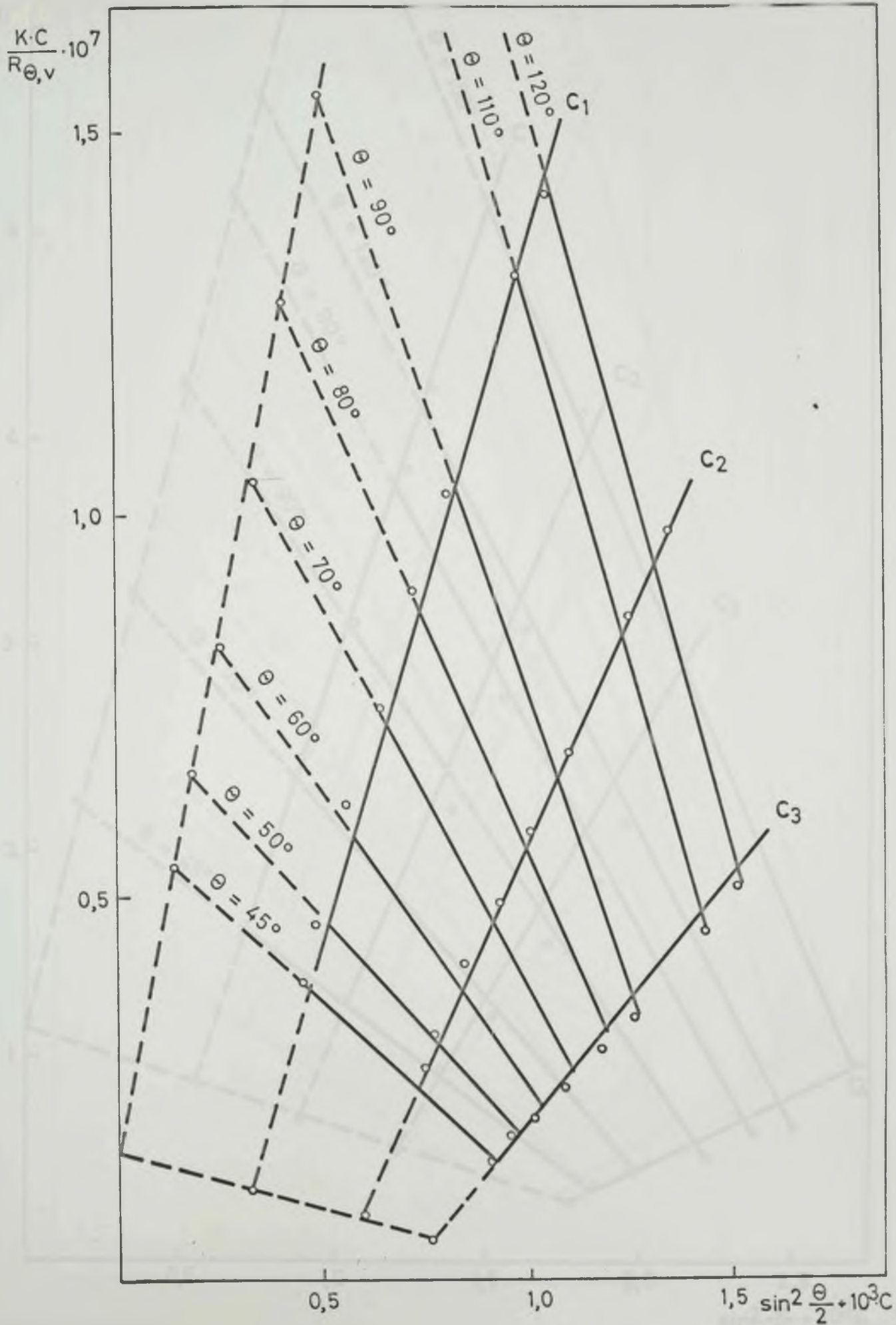


GRAFIK 3. ZIMM-OV DIJAGRAM KAZEINA
U MODEL SISTEMU B.1.

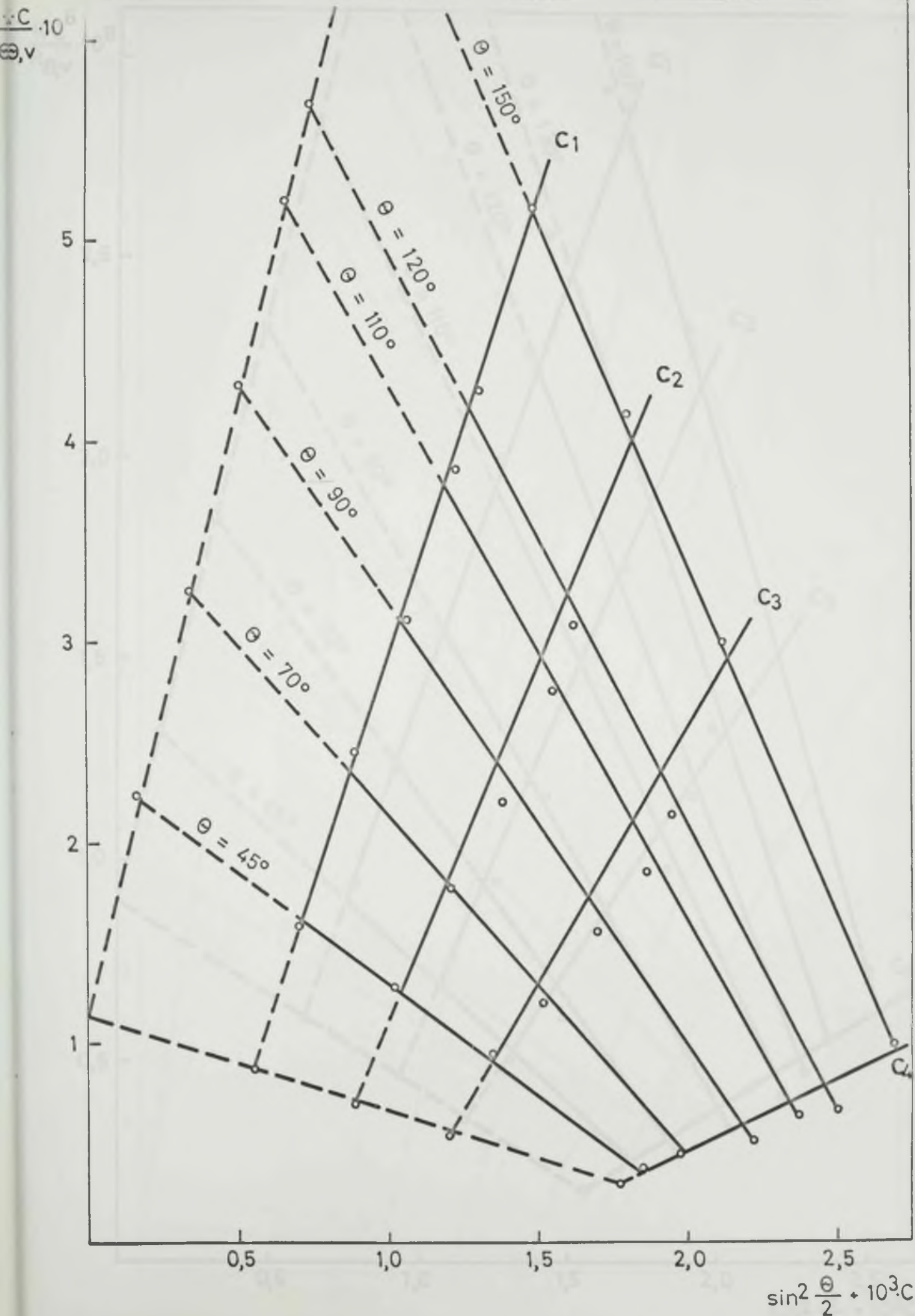
$$\frac{KC}{R_{\theta, \nu}} \cdot 10^8$$



GRAFIK 4. ZIMM-OV DIJAGRAM KAZEINA
U MODEL SISTEMU B.2.

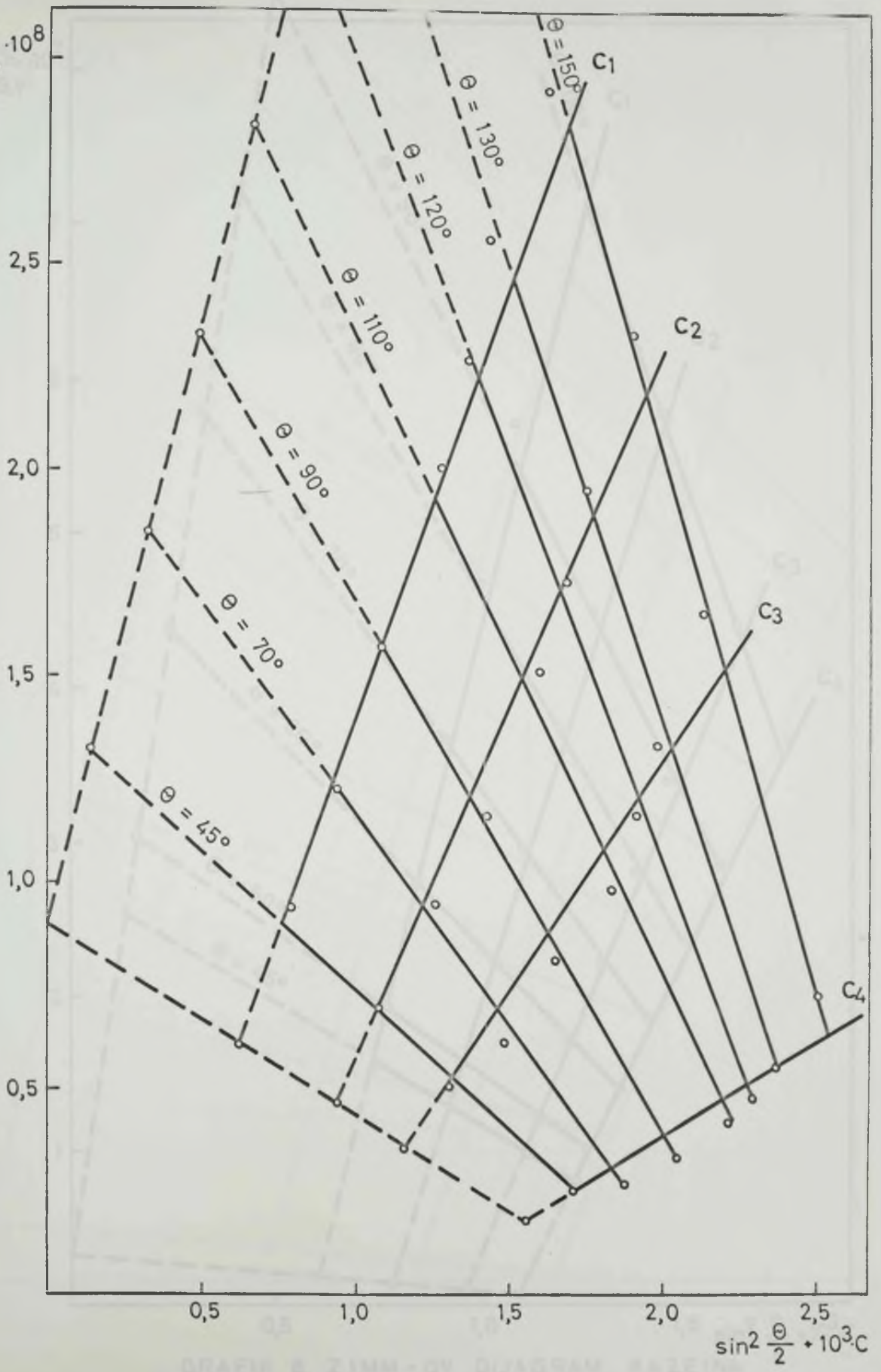


GRAFIK 5. ZIMM-OV DIJAGRAM KAZEINA U MODEL SISTEMU B.3.

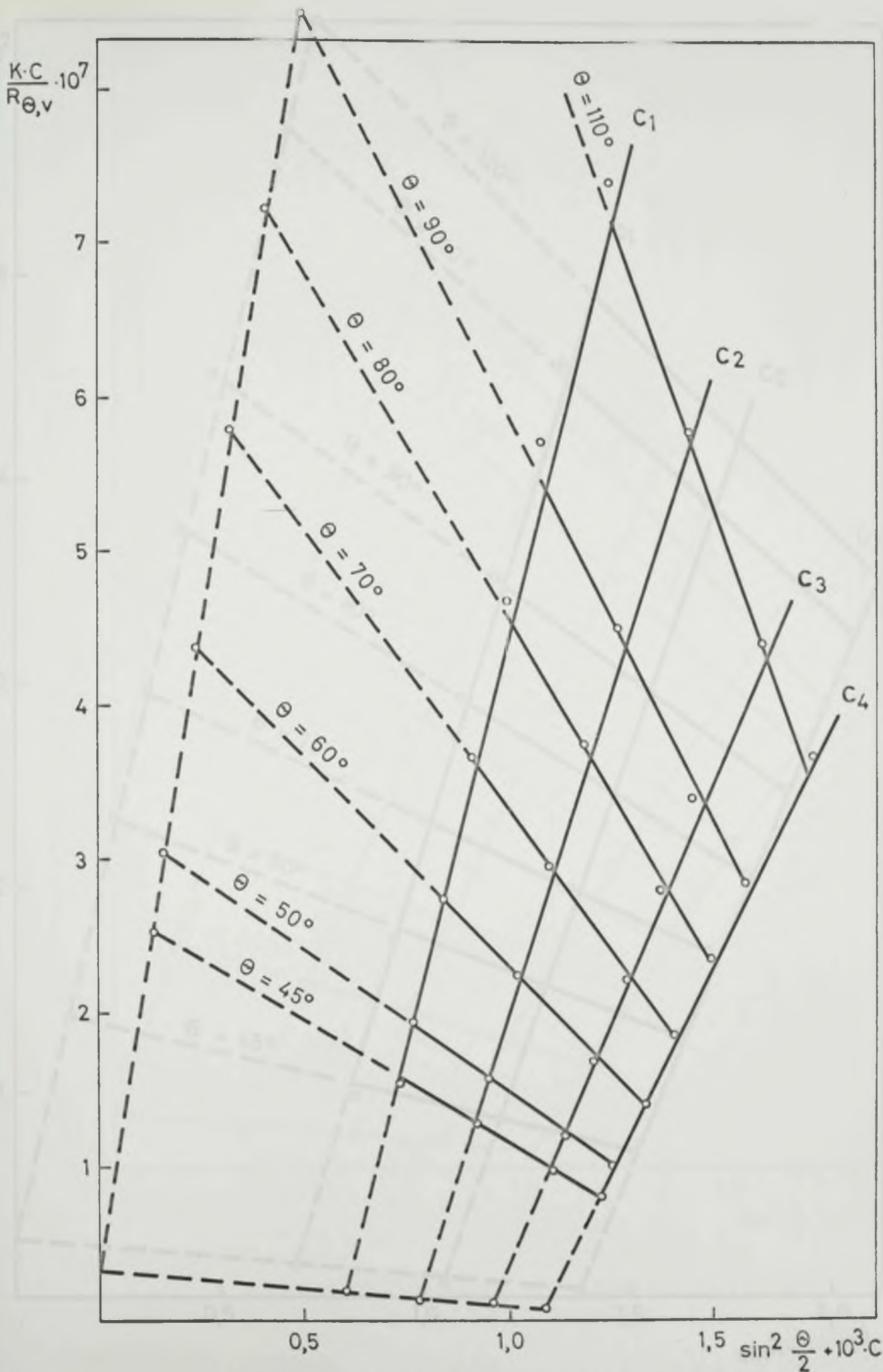


GRAFIK 6. ZIMM - OV DIJAGRAM KAZEINA U MODEL SISTEMU B. 4.

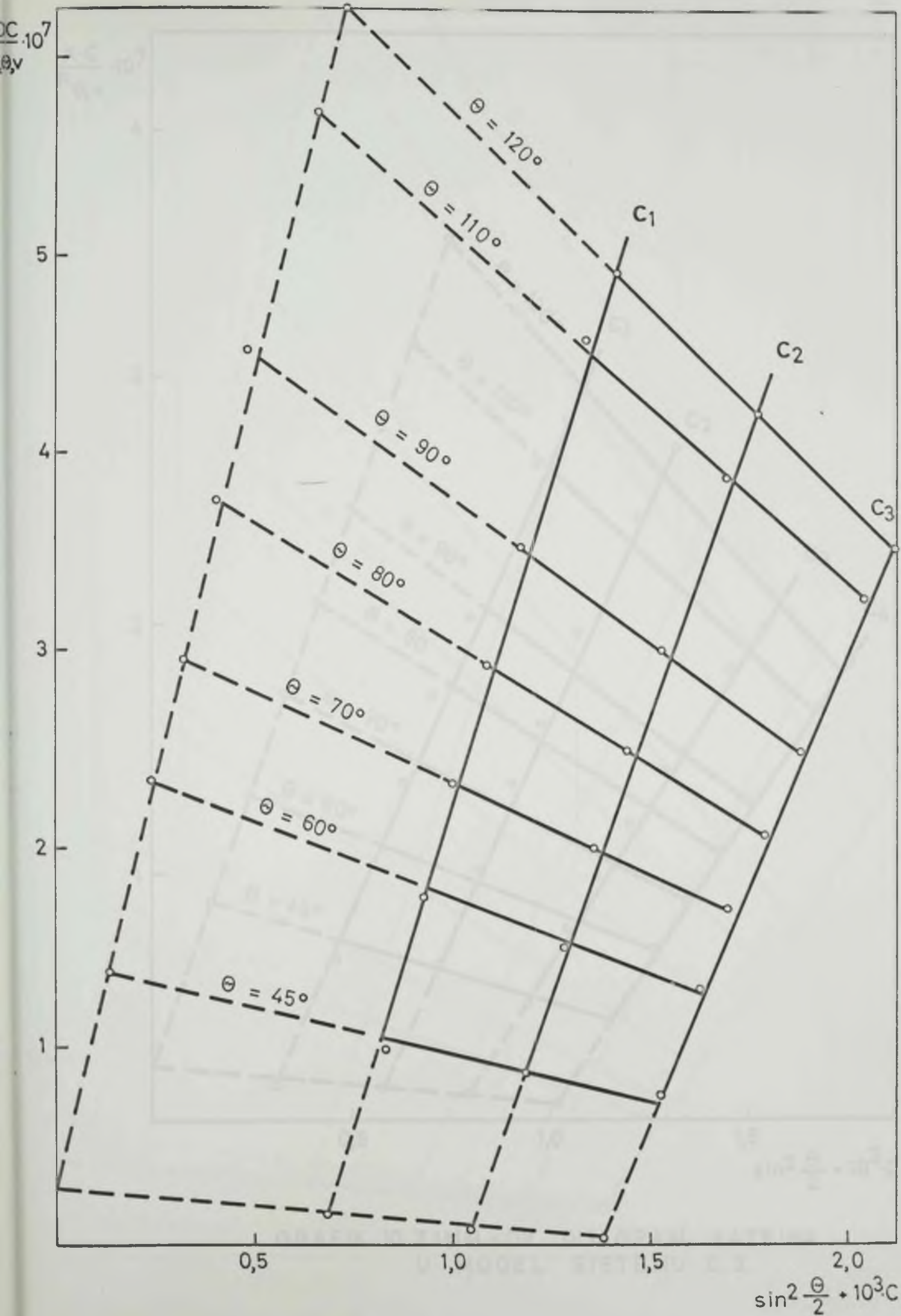
$$\frac{K \cdot C}{R_{\theta, v}} \cdot 10^8$$



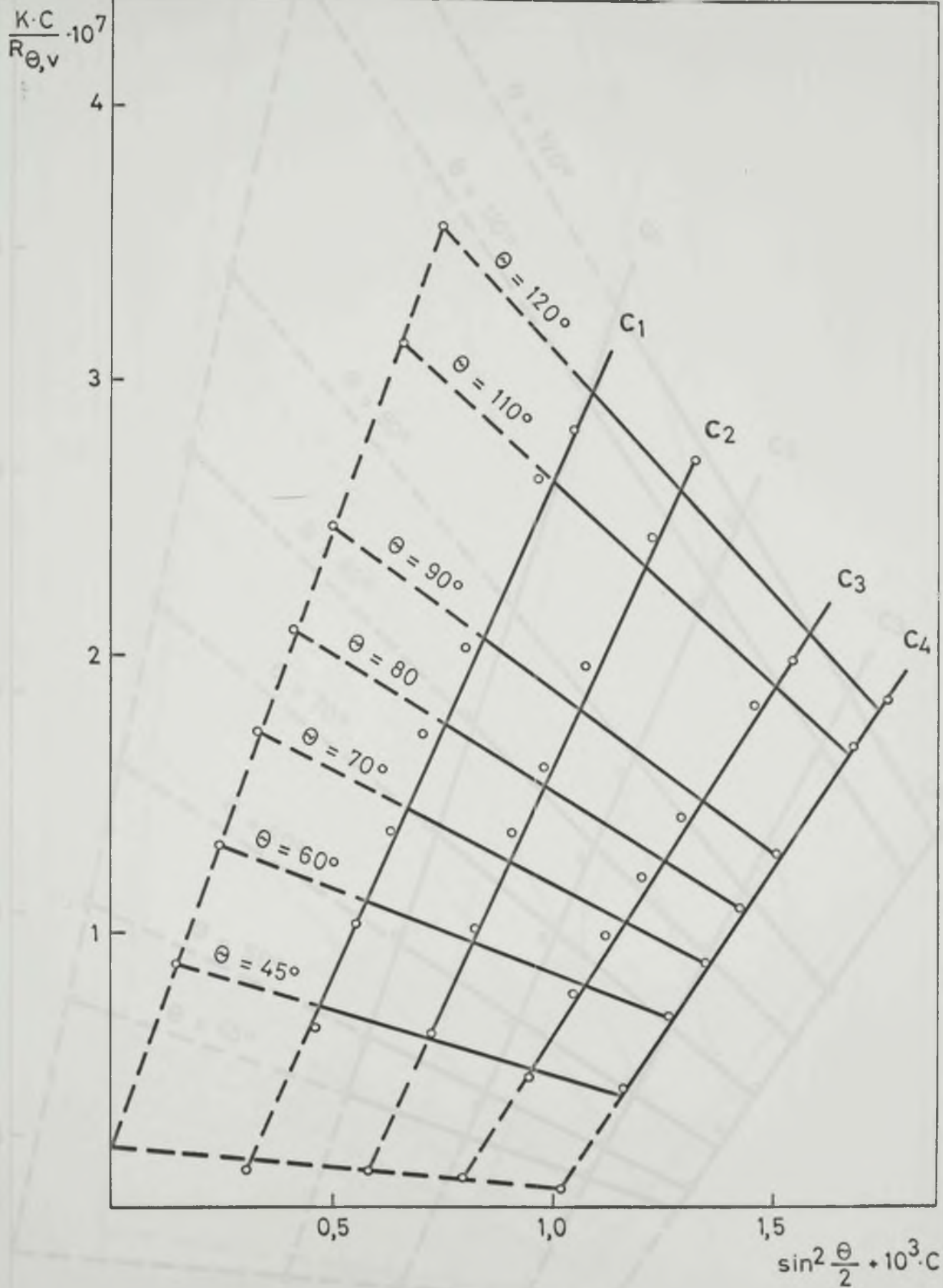
GRAFIK 7. ZIMM - OV DIJAGRAM KAZEINA
II MODEL SISTEMI B 5



GRAFIK 8. ZIMM - OV DIJAGRAM KAZEINA
U MODEL SISTEMU C.1.

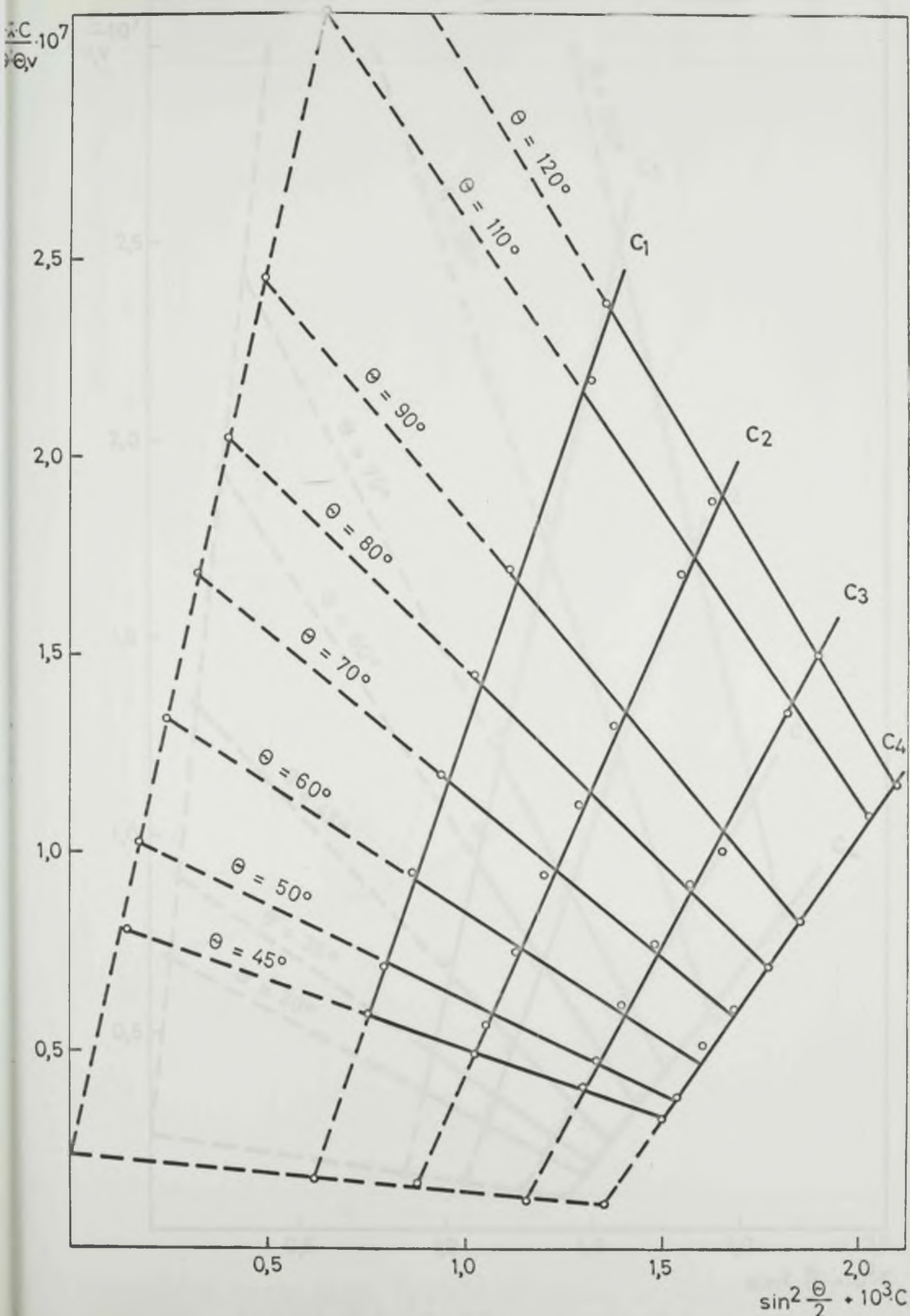


GRAFIK 9. ZIMM - OV DIJAGRAM KAZEINA U MODEL SISTEMU C.2.

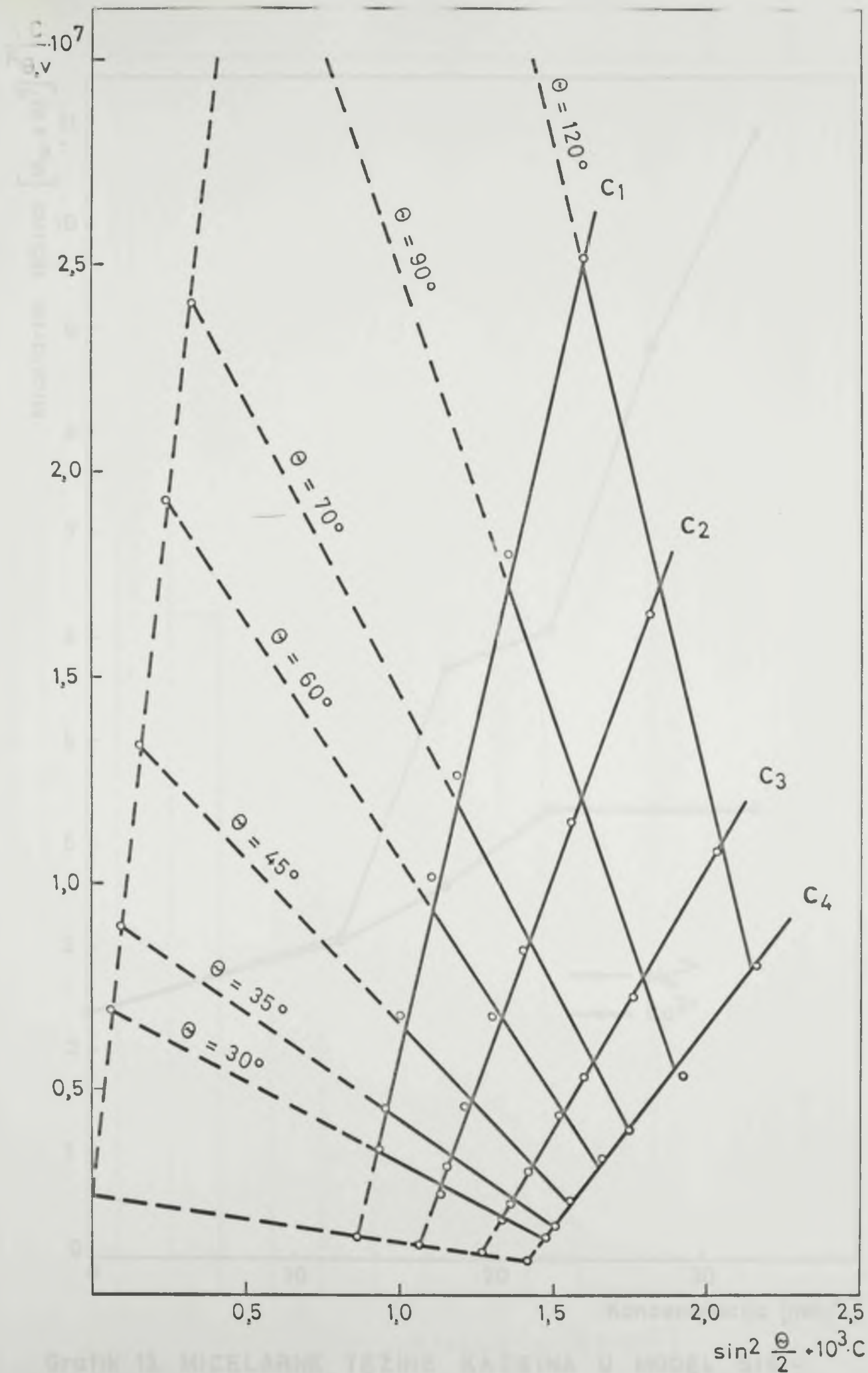


GRAFIK 10. ZIMM-OV DIJAGRAM KAZEINA U MODEL SISTEMU C.3.

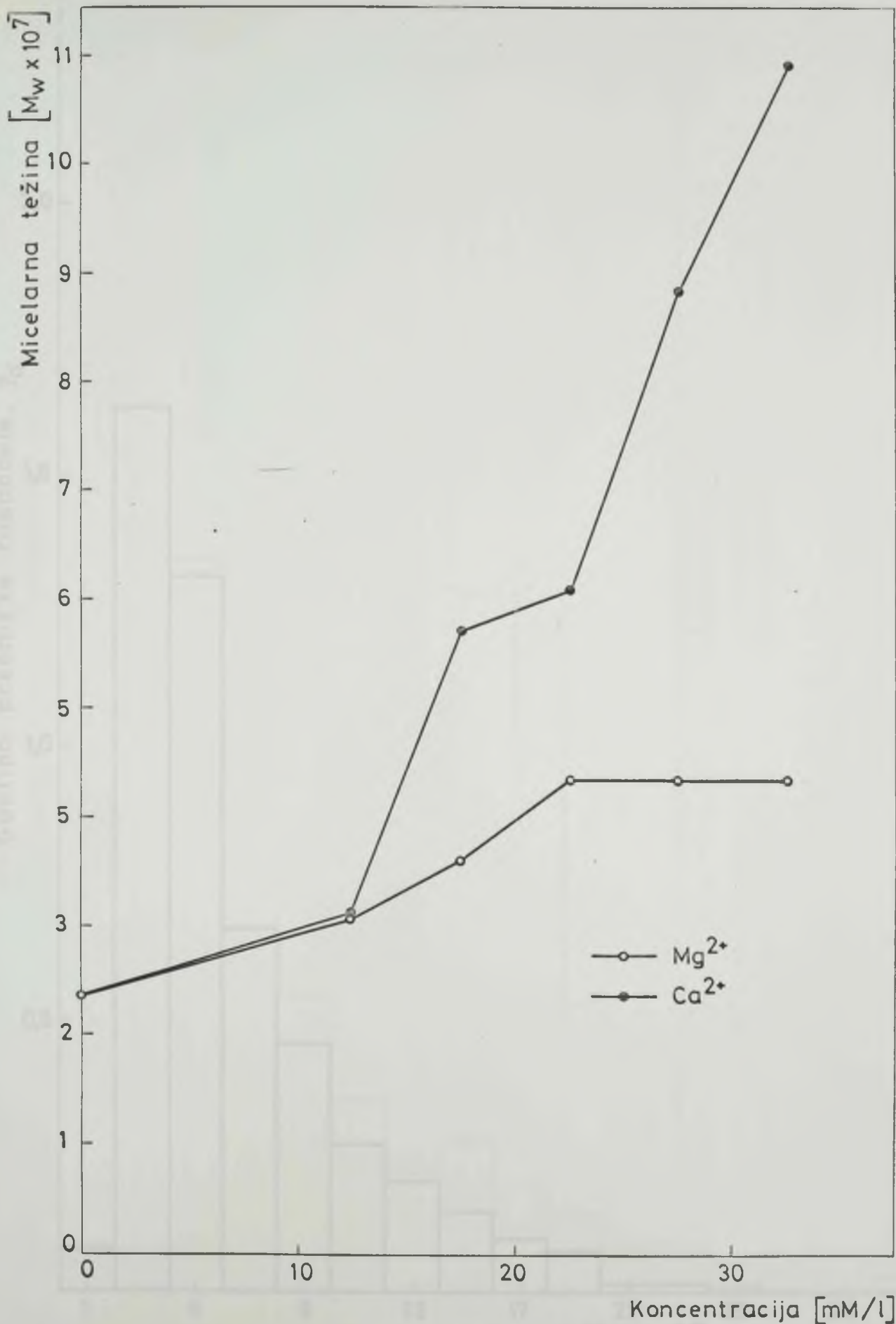
GRAFIK 11. ZIMM-OV DIJAGRAM KAZEINA U MODEL SISTEMU



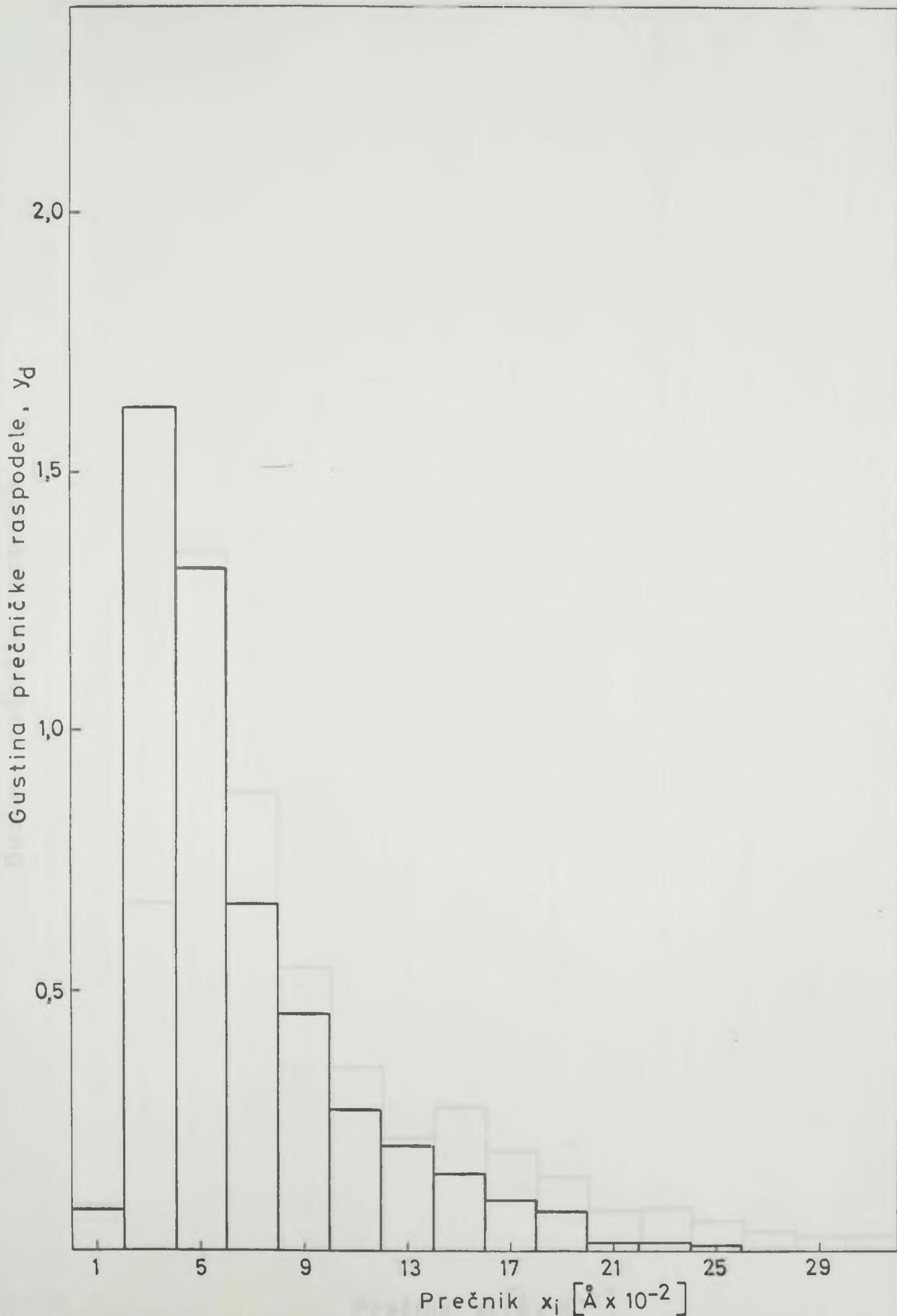
GRAFIK 11. ZIMM-OV DIJAGRAM KAZEINA U MODEL SISTEMU C4



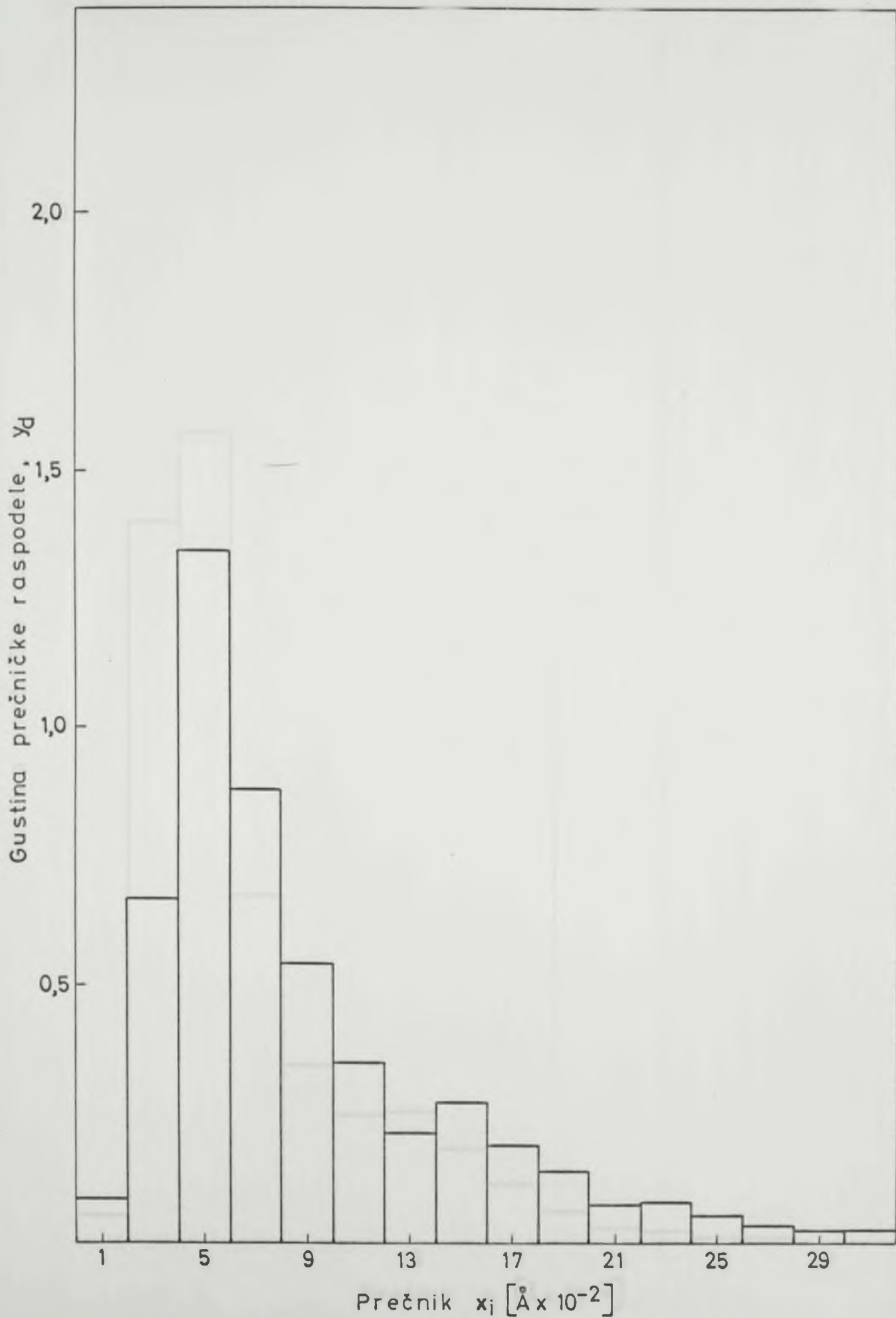
GRAFIK 12. ZIMM-OV DIJAGRAM KAZEINA U MODEL SISTEMU C.5.



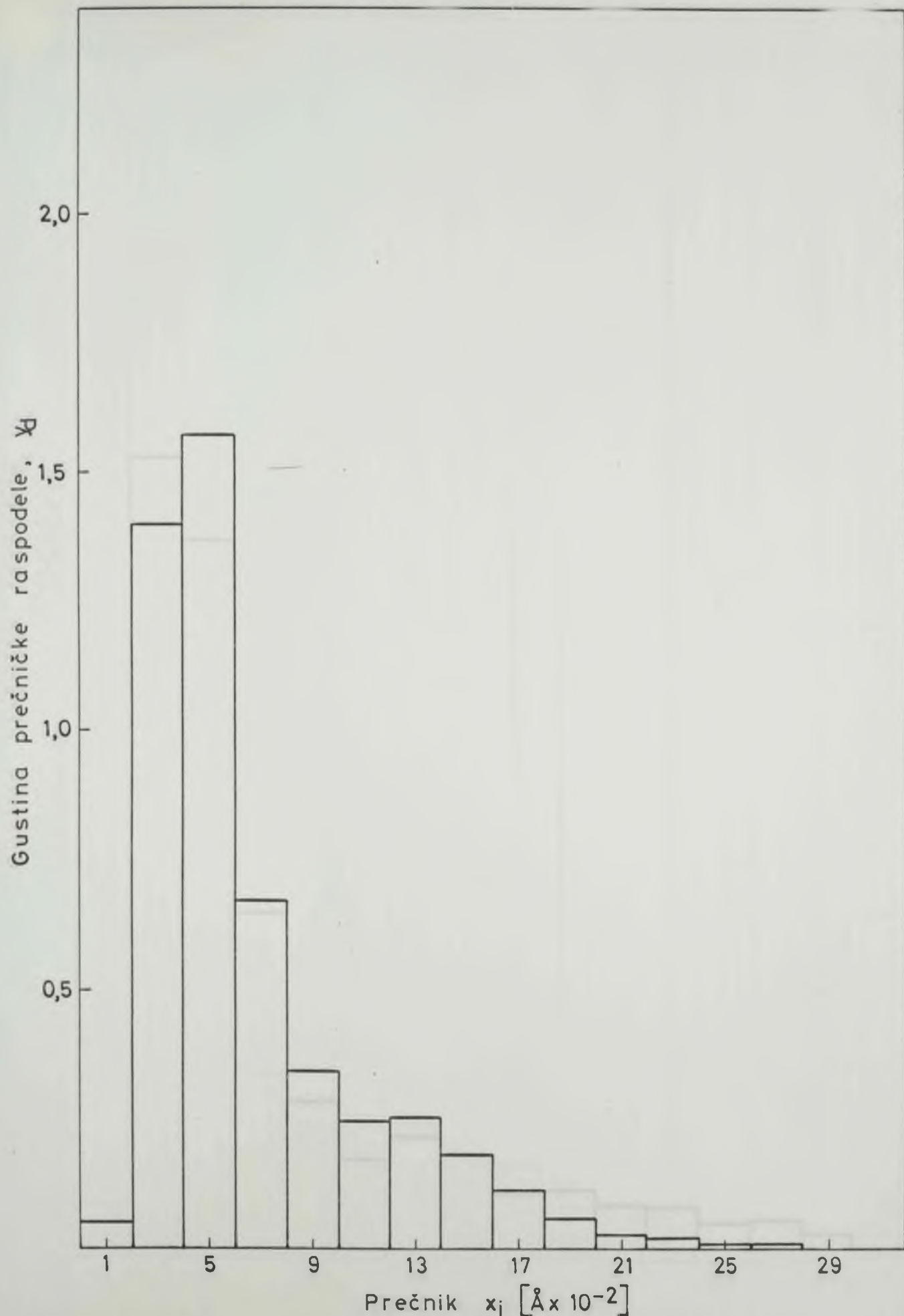
Grafik 13. MICELARNE TEŽINE KAZEINA U MODEL SISTEMIMA B.1. DO B.5. I C.1. DO C.5.



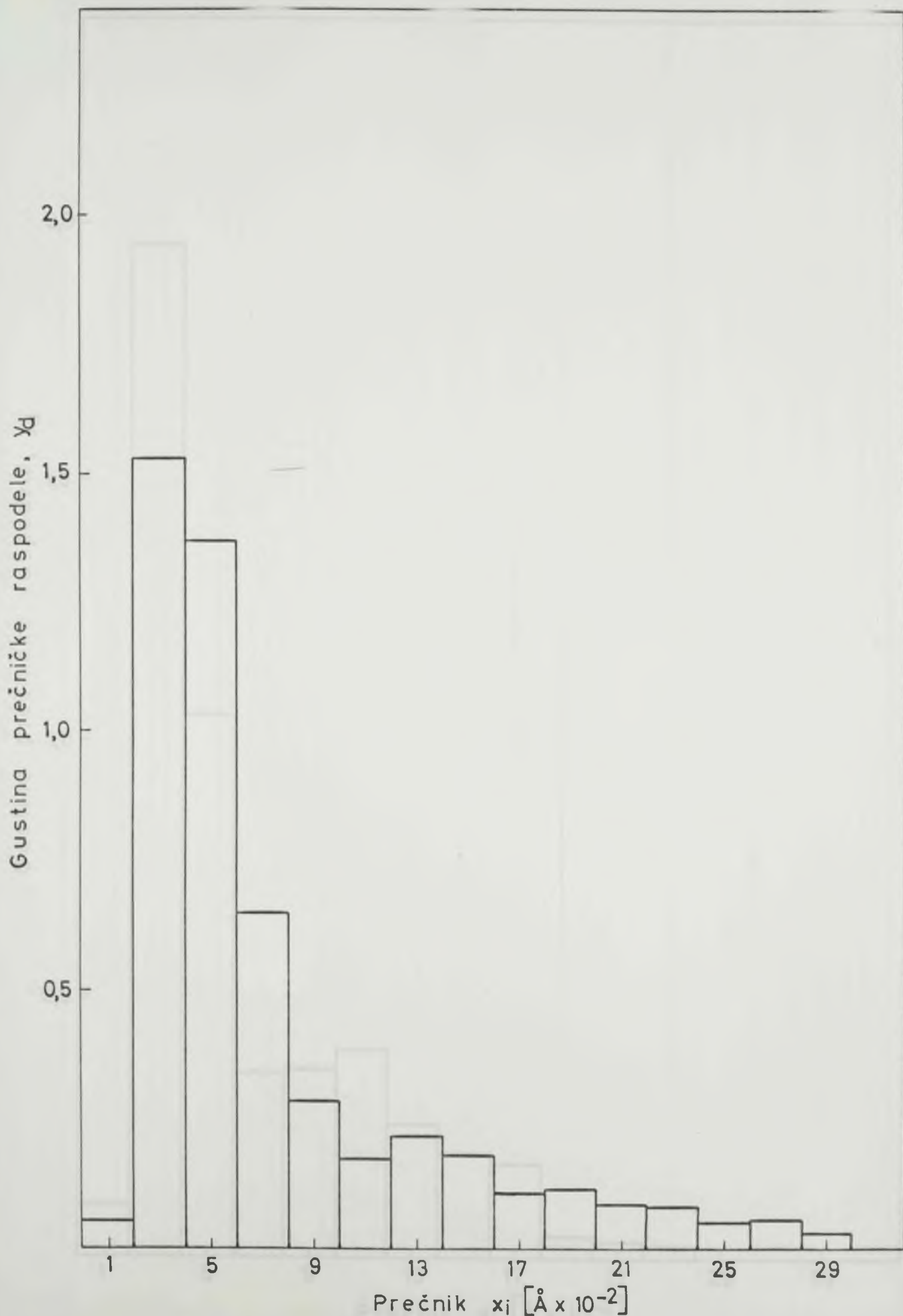
Grafik 14. HISTOGRAM PREČNIČKE RASPODELE KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU B.2.



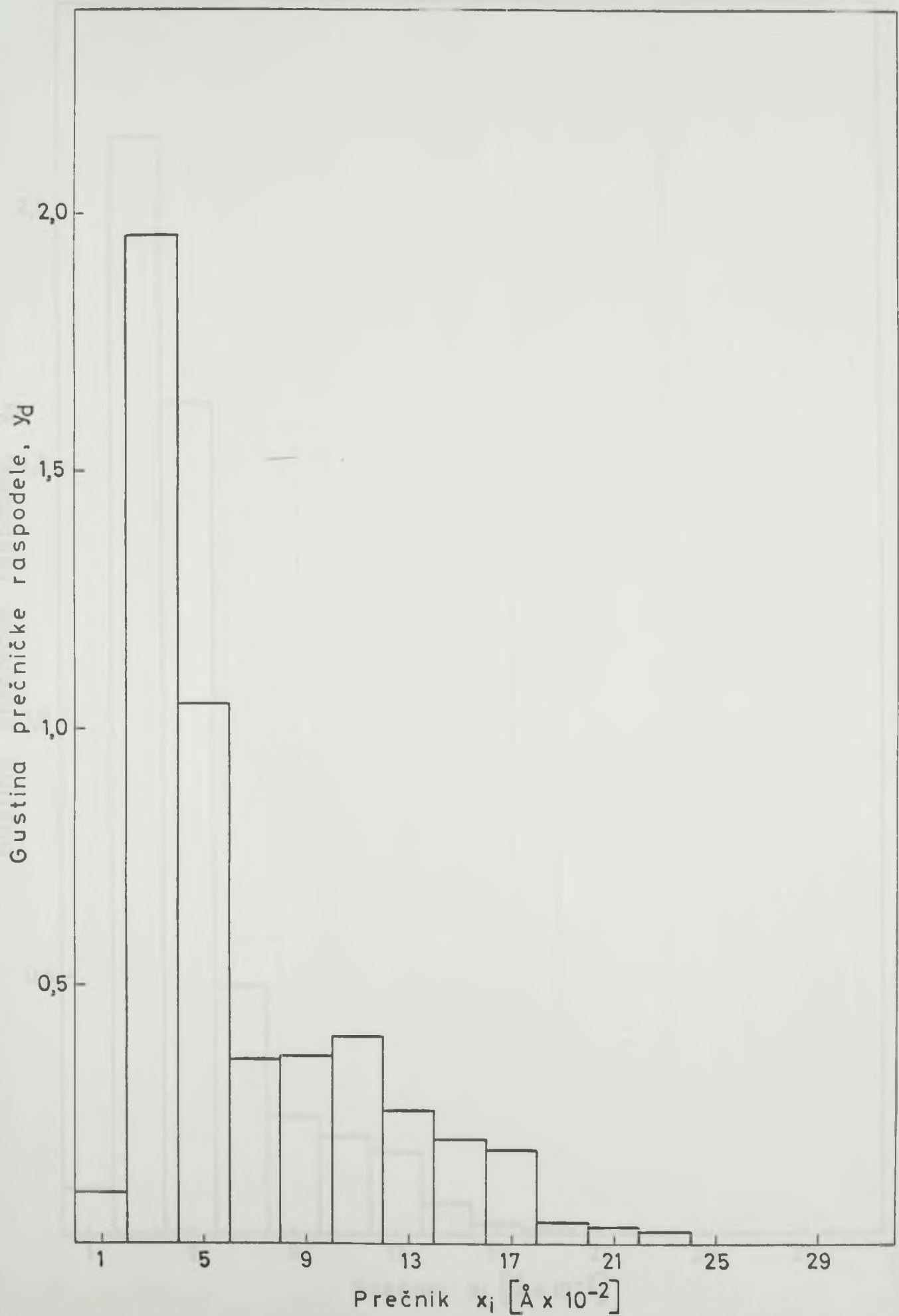
Grafik 15. HISTOGRAM PREČNIČKE RASPODELE KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU D.1.



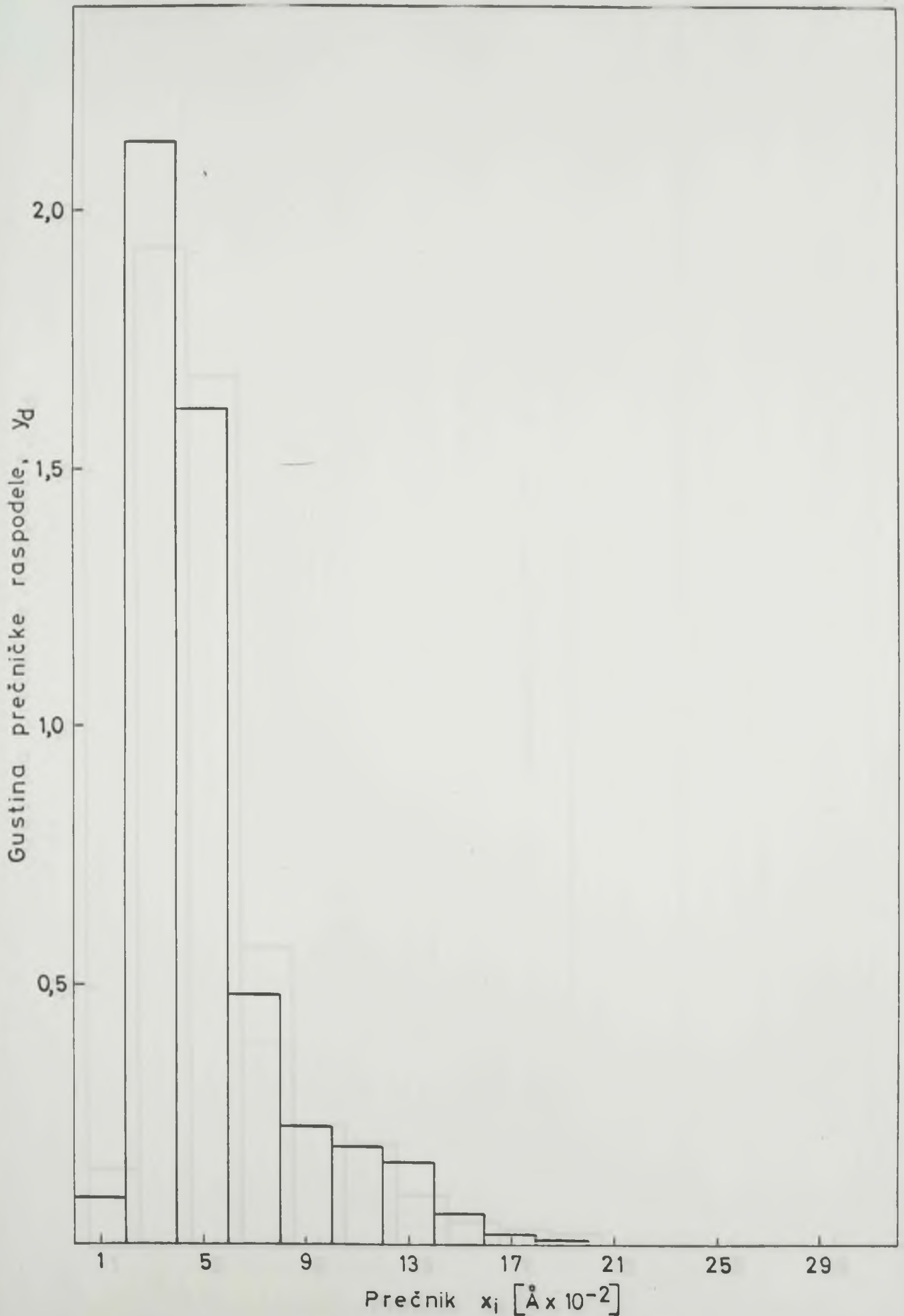
Grafik 16. HISTOGRAM PREČNIČKE RASPODELE KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU D.3.



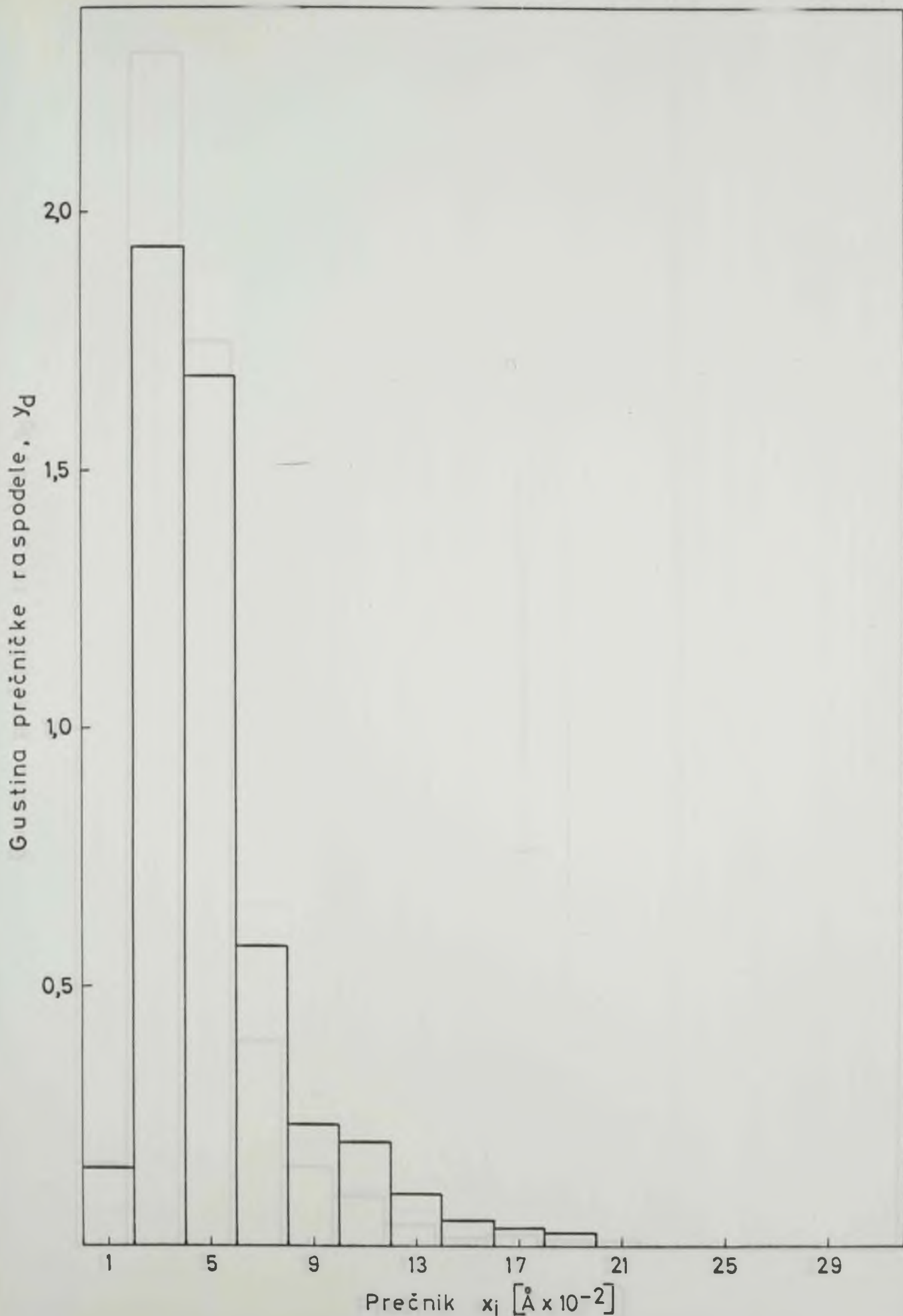
Grafik 17. HISTOGRAM PREČNIČKE RASPODELE KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU D. 5.



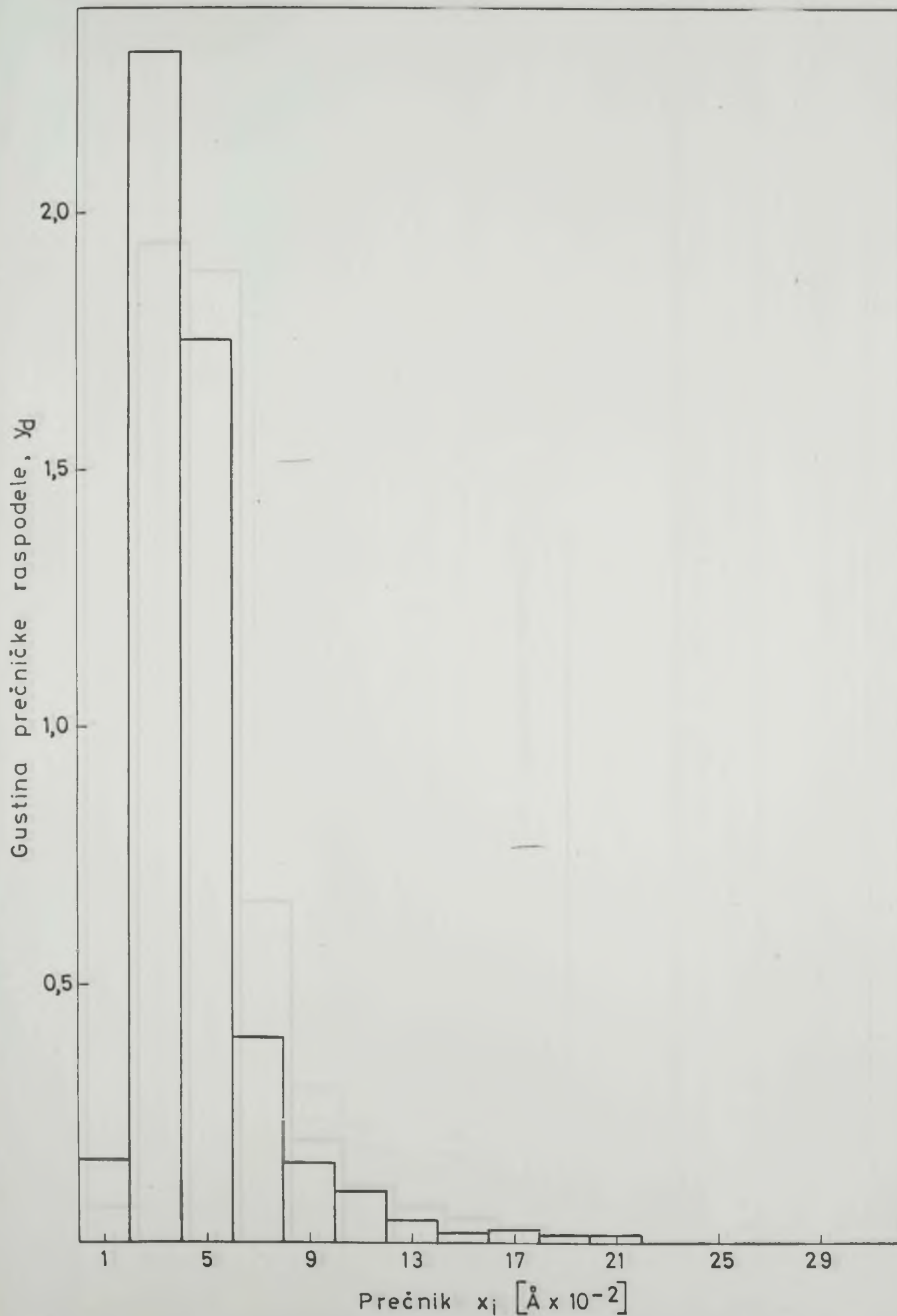
Grafik 18. HISTOGRAM PREČNIČKE RASPODELE KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU F 1



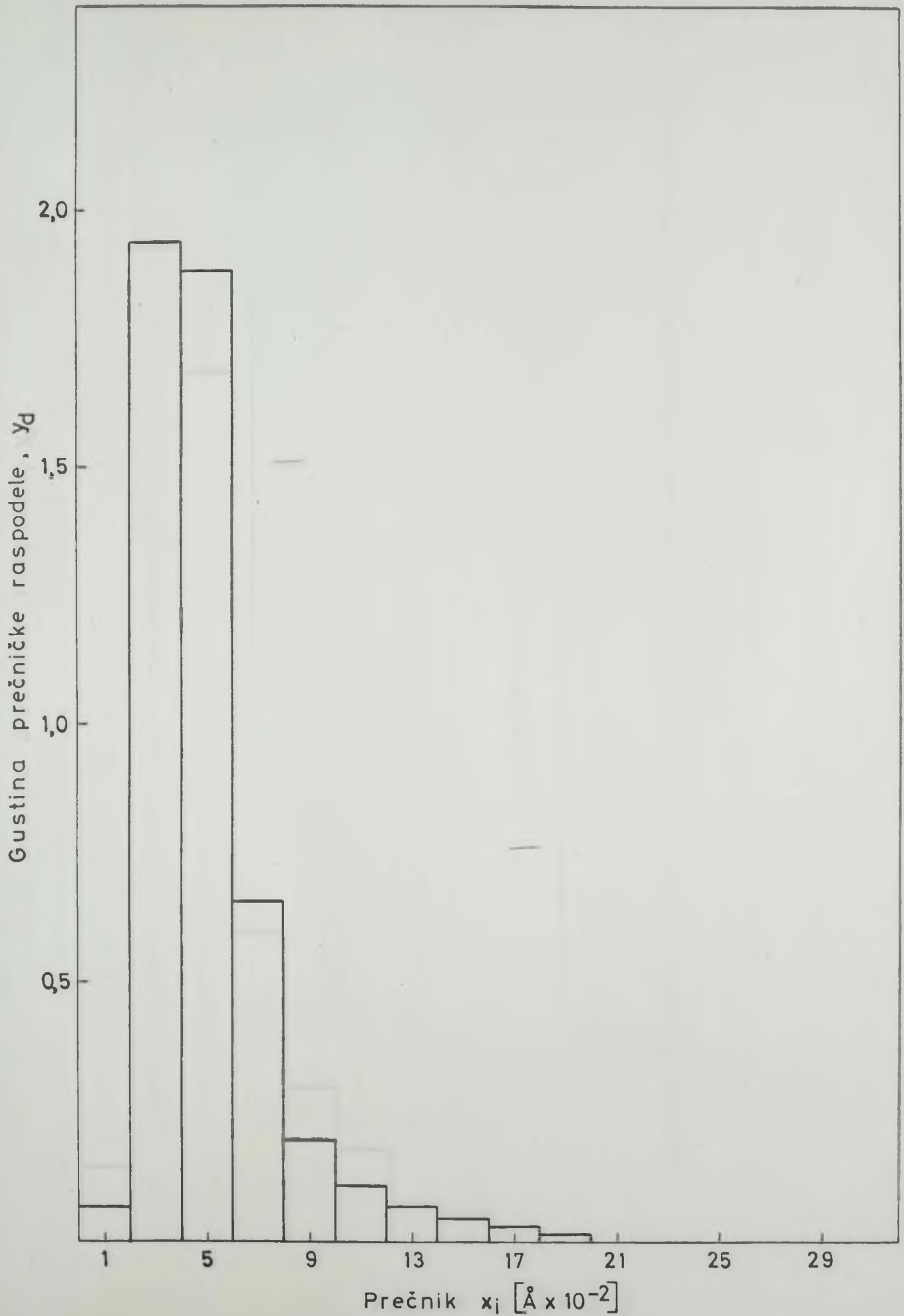
Grafik 19. HISTOGRAM PREČNIČKE RASPODELE KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU H.1.



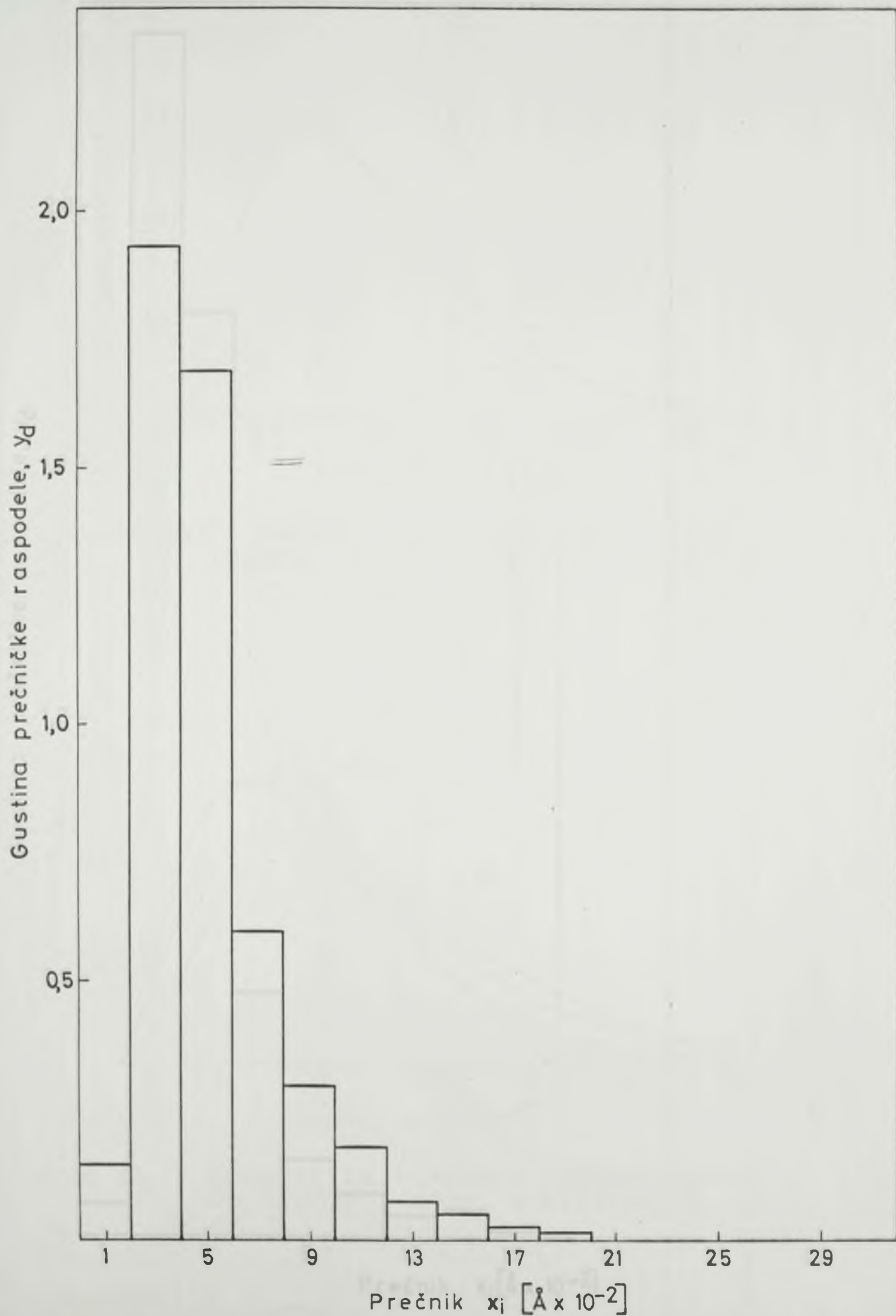
Grafik 20. HISTOGRAM PREČNIČKE RASPODELE KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU H. 2.



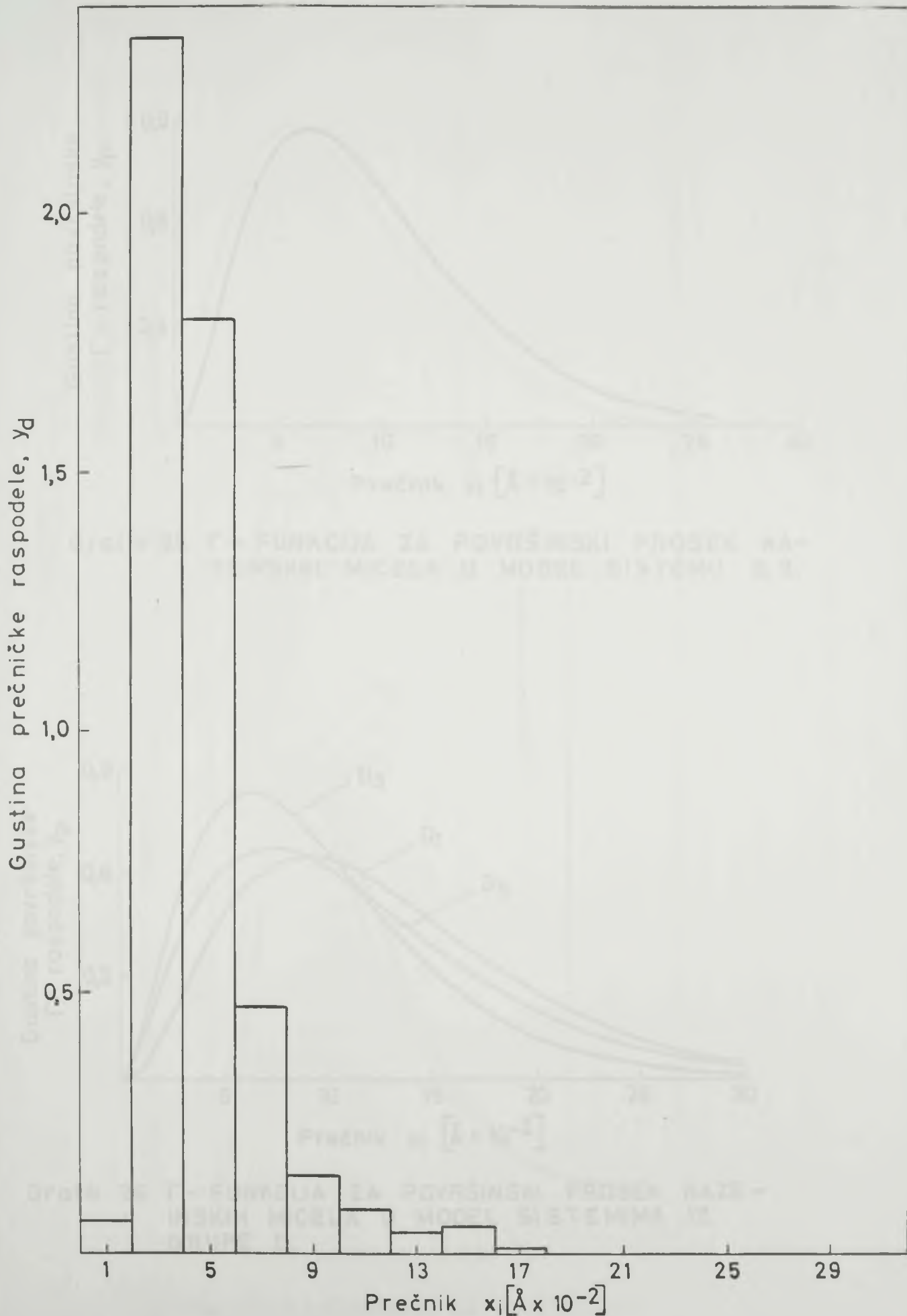
Grafik 21. HISTOGRAM PREČNIČKE RASPODELE KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU H. 6.



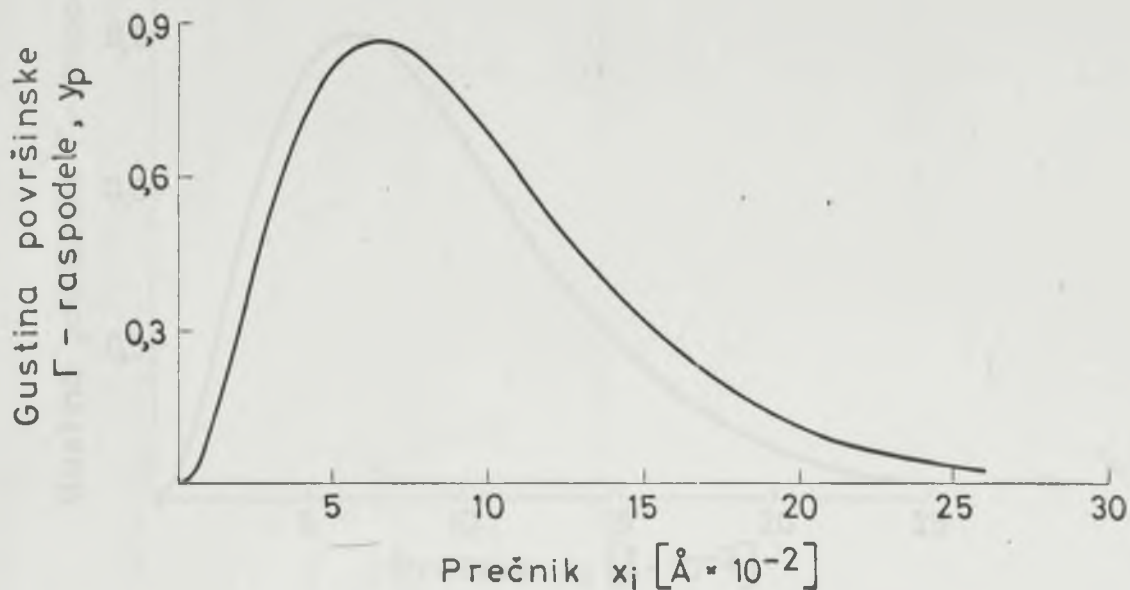
Grafik 22. HISTOGRAM PREČNIČKE RASPODELE KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU J.1.



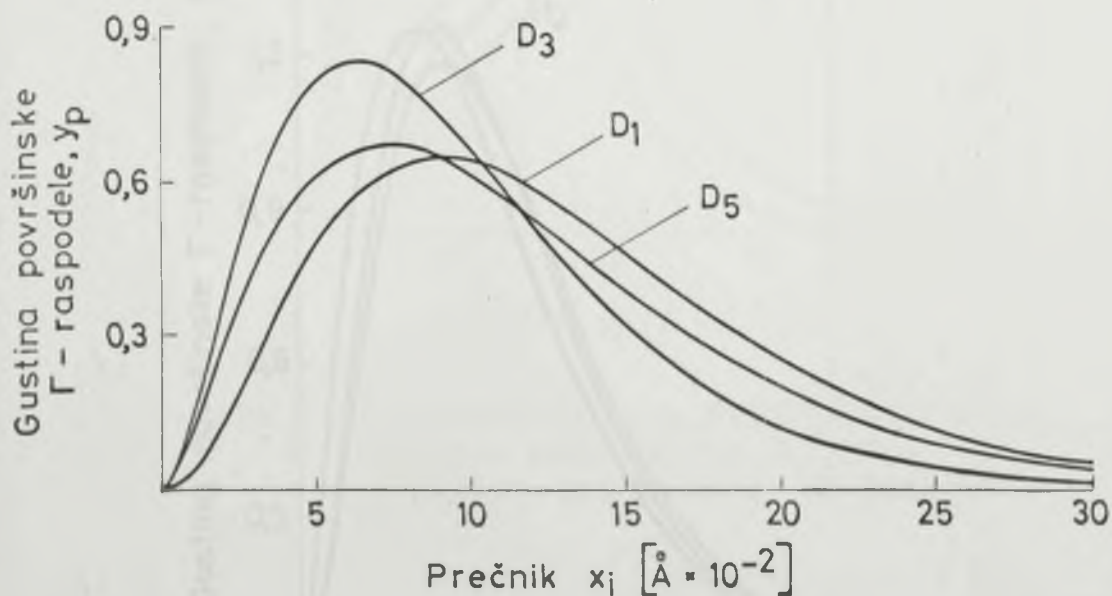
Grafik 23. HISTOGRAM PREČNIČKE RASPODELE KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU J. 2.



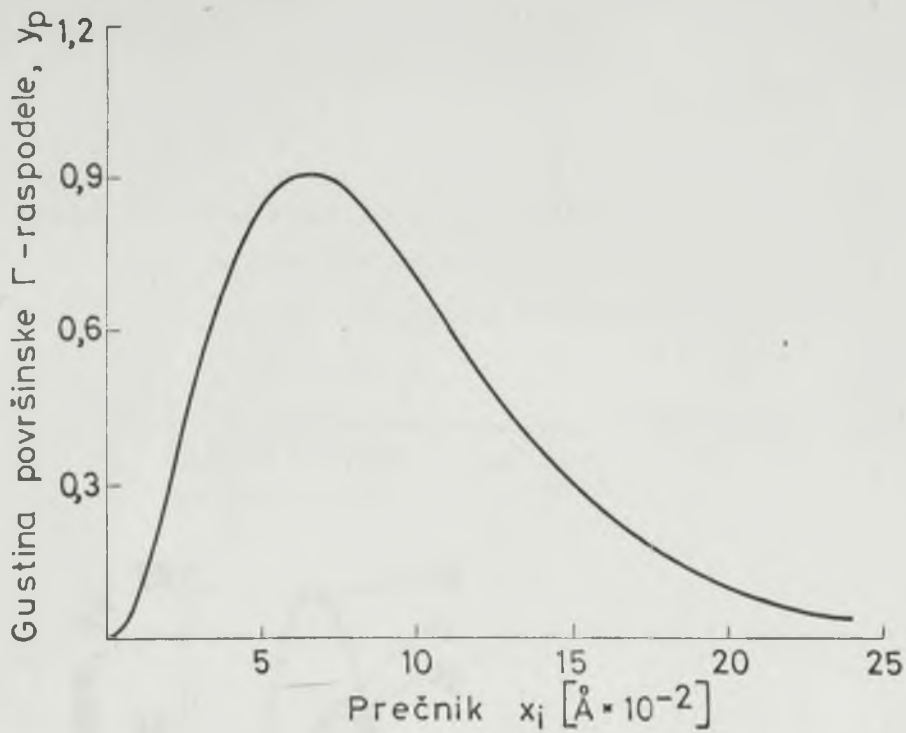
Grafik 24. HISTOGRAM PREČNIČKE RASPODELE KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU J. 3.



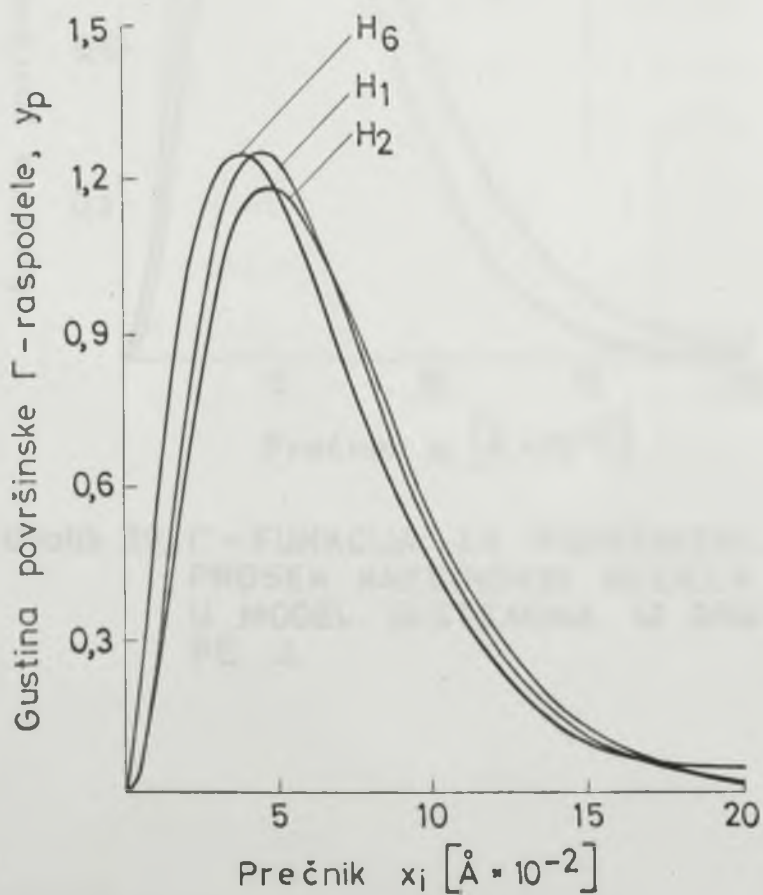
Grafik 25. Γ - FUNKCIJA ZA POVRŠINSKI PROSEK KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU B. 2.



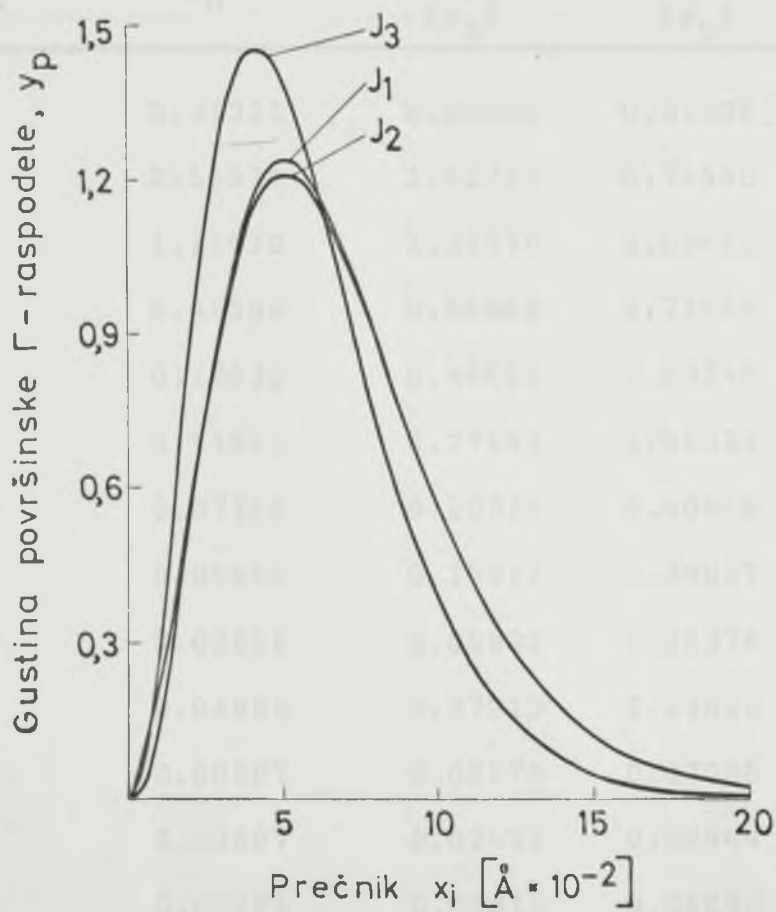
Grafik 26. Γ - FUNKCIJA ZA POVRŠINSKI PROSEK KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMIMA IZ GRUPE D.



Grafik 27. Γ -FUNKCIJA ZA POVRŠINSKI PROSEK KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMU F 1.



Grafik 28. Γ -FUNKCIJA ZA POVRŠINSKI PROSEK KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMIMA IZ GRUPE H.



Grafik 29. Γ - FUNKCIJA ZA POVRŠINSKI PROSEK KAZEINSKIH MICELA U MODEL SISTEMIMA IZ GRUPE J.

Tabela 9.: Gustine brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u model sistemu B.2.

Prečnik X_i	Gustina broj- ne raspodele (y_n)	Gustina prečničke raspodele (y_d)	Gustina površinske raspodele (y_p)	Gustina zapreminske raspodele (y_v)
10	0.31321	0.06862	0.01006	0.00102
30	2.50534	1.62753	0.74546	0.23907
50	1.21420	1.31470	1.00451	0.53740
70	0.44103	0.66868	0.71463	0.53533
90	0.23632	0.46052	0.63248	0.60947
110	0.11641	0.27541	0.46339	0.54426
130	0.07263	0.20336	0.40426	0.56238
150	0.04655	0.14922	0.34037	0.54623
170	0.02605	0.09832	0.25378	0.46150
190	0.01903	0.07910	0.23023	0.46809
210	0.00507	0.02270	0.07036	0.15819
230	0.00507	0.02422	0.08444	0.20700
250	0.00221	0.01315	0.05033	0.13358

Tabela 10.: Gustine brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u model sistemu D.1.

Prečnik X_i	Gustina broj- ne raspodele (y_n)	Gustina prečničke raspodele (y_d)	Gustina površinske raspodele (y_p)	Gustina zapreminske raspodele (y_v)
10	0.50655	0.08759	0.00998	0.00079
30	1.29284	0.67065	0.22920	0.05430
50	1.55746	1.34652	0.76698	0.30283
70	0.72833	0.88156	0.70299	0.38859
90	0.35030	0.54515	0.55893	0.39723
110	0.18397	0.34992	0.43849	0.38089
130	0.09577	0.21527	0.31880	0.32728
150	0.10585	0.27453	0.46912	0.55568
170	0.06552	0.19261	0.37301	0.50075
190	0.04284	0.14075	0.30466	0.45710
210	0.02016	0.07321	0.17514	0.29044
230	0.02016	0.08018	0.21009	0.38157
250	0.01260	0.05447	0.15513	0.30626
270	0.00756	0.03530	0.10857	0.23148
290	0.00504	0.02527	0.08350	0.09122
310	0.00504	0.02702	0.09541	0.23357

Tabela 11.: Gustina brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u model sistemu D.3.

Prečnik X_i	Gustina brojne raspodele (y_n)	Gustina prečničke raspodele (y_d)	Gustina površinske raspodele (y_p)	Gustina zapreminske raspodele (y_v)
10	0.23833	0.04933	0.00728	0.00075
30	2.25539	1.40046	0.61978	0.19156
50	1.52283	1.57597	1.16243	0.59887
70	0.46663	0.67608	0.69814	0.50355
90	0.18565	0.34583	0.45915	0.42579
110	0.11039	0.25132	0.40783	0.46224
130	0.09533	0.25652	0.49193	0.65894
150	0.06021	0.18694	0.41365	0.63932
170	0.03261	0.11476	0.28779	0.50411
190	0.01505	0.05920	0.16593	0.32482
210	0.00753	0.03271	0.10134	0.21929
230	0.00502	0.02389	0.08104	0.19206
250	0.00251	0.01298	0.04788	0.12333
270	0.00251	0.01402	0.05584	0.15535

Tabela 12.: Gustine brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u model sistemu D.5.

Prečnik X_i	Gustina broj- ne raspodele (y_n)	Gustina prečničke raspodele (y_d)	Gustina površinske raspodele (y_p)	Gustina zapreminske raspodele (y_v)
10	0.27193	0.05633	0.00751	0.00062
30	2.46203	1.52999	0.61200	0.15180
50	1.32533	1.37268	0.91513	0.37831
70	0.44831	0.65006	0.60672	0.35115
90	0.15434	0.28773	0.34528	0.25693
110	0.07594	0.17304	0.25380	0.23082
130	0.08084	0.21770	0.37735	0.40559
150	0.05879	0.18269	0.36537	0.45314
170	0.03185	0.11215	0.25421	0.35730
190	0.02940	0.11570	0.29311	0.46045
210	0.01960	0.08525	0.23871	0.41447
230	0.01715	0.08170	0.25055	0.47646
250	0.00980	0.05075	0.16915	0.34964
270	0.00980	0.05481	0.19730	0.44045
290	0.00490	0.02943	0.11381	0.27288

Tabela 13.: Gustina brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u model sistemu F.1.

Prečnik X_i	Gustina broj- ne raspodele (y_n)	Gustina prečničke raspodele (y_d)	Gustina površinske raspodele (y_p)	Gustina zapreminske raspodele (y_v)
10	0.45319	0.10383	0.01560	0.00158
30	2.85110	1.95972	0.88312	0.26788
50	0.91633	1.04975	0.78843	0.39859
70	0.22410	0.35942	0.37793	0.26749
90	0.17679	0.36456	0.49285	0.44849
110	0.20185	0.40792	0.67402	0.74965
130	0.20715	0.25958	0.50691	0.66629
150	0.20776	0.20539	0.46277	0.70186
170	0.04111	0.18428	0.47057	0.80885
190	0.00996	0.04336	0.12375	0.23773
210	0.00747	0.03594	0.11338	0.24074
230	0.00498	0.02624	0.09067	0.21085

Tabela 14.: Gustine brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u model sistemu H.1.

Prečnik X_i	Gustina broj- ne raspodele (y_n)	Gustina prečničke raspodele (y_d)	Gustina površinske raspodele (y_p)	Gustina zapreminske raspodele (y_v)
10	0.34960	0.08768	0.01707	0.00250
30	2.83904	2.13605	1.24739	0.54712
50	1.29282	1.62116	1.57786	1.15345
70	0.27687	0.48605	0.66230	0.67782
90	0.10089	0.22773	0.39896	0.52497
110	0.06804	0.18771	0.40194	0.64642
130	0.04927	0.16064	0.40652	0.77266
150	0.01642	0.06179	0.18041	0.39565
170	0.00469	0.02001	0.06621	0.16456
190	0.00235	0.01118	0.04135	0.11487

Tabela 15.: Gustine brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u model sistemu H.2.

Prečnik X_i	Gustina broj- ne raspodele (y_n)	Gustina prečničke raspodele (y_d)	Gustina površinske raspodele (y_p)	Gustina zapreminske raspodele (y_v)
10	0.59211	0.15093	0.02909	0.00421
30	2.52895	1.93386	1.11837	0.48496
50	1.32105	1.68366	1.62279	1.17282
70	0.32632	0.58224	0.78566	0.79494
90	0.10263	0.23544	0.40848	0.53138
110	0.07105	0.19922	0.42244	0.67167
130	0.03158	0.10464	0.26223	0.49275
150	0.01316	0.05031	0.14547	0.31540
170	0.00789	0.03421	0.11211	0.27548
190	0.00526	0.02549	0.09336	0.25639

Tabela 16.: Gustina brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u model sistemu H.6.

Prečnik X_i	Gustina broj- ne raspodele (y_n)	Gustina prečničke raspodele (y_d)	Gustina površinske raspodele (y_p)	Gustina zapreminske raspodele (y_v)
10	0.58050	0.15939	0.03459	0.00570
30	2.81218	2.31652	1.50821	0.74525
50	1.27709	1.75333	1.90256	1.56685
70	0.20640	0.39671	0.60267	0.69486
90	0.06192	0.15302	0.29887	0.44305
110	0.03354	0.10130	0.24184	0.43816
130	0.01290	0.04605	0.12991	0.27817
150	0.00516	0.02125	0.06918	0.17093
170	0.00516	0.02409	0.08886	0.24882
190	0.00258	0.01346	0.05550	0.17369
210	0.00258	0.01488	0.06780	0.23452

Tabela 17.: Gustine brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u model sistemu J.1.

Prečnik X_i	Gustina broj- ne raspodele (y_n)	Gustina prečničke raspodele (y_d)	Gustina površinske raspodele (y_p)	Gustina zapreminske raspodele (y_v)
10	0.26492	0.06481	0.01290	0.00203
30	2.63962	1.93741	1.15725	0.54559
50	1.53938	1.88310	1.87469	1.47305
70	0.38425	0.65806	0.91718	1.00895
90	0.08831	0.19444	0.34843	0.49281
110	0.04057	0.10919	0.23915	0.41340
130	0.02148	0.06832	0.17683	0.36126
150	0.01193	0.04379	0.13079	0.30831
170	0.00716	0.02978	0.10080	0.26929
190	0.00239	0.01109	0.04197	0.12532

Tabela 18.: Gustina brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u model sistemu J.2.

Prečnik X_i	Gustina broj- ne raspodele (y_n)	Gustina prečničke raspodele (y_d)	Gustina površinske raspodele (y_p)	Gustina zapreminske raspodele (y_v)
10	0.58269	0.14823	0.02698	0.00405
30	2.51756	1.92945	1.12155	0.48933
50	1.29544	1.67821	1.62031	1.17217
70	0.33641	0.60791	0.81045	0.82085
90	0.15811	0.29942	0.47085	0.60560
110	0.07791	0.18033	0.34659	0.54484
130	0.02750	0.07522	0.17085	0.31741
150	0.01591	0.05232	0.14855	0.31833
170	0.00687	0.02459	0.07304	0.17745
190	0.00458	0.01832	0.06083	0.16516

Tabela 19.: Gustina brojne, prečničke, površinske i zapreminske raspodele kazeinskih micela u model sistemu J.3.

Prečnik X_i	Gustina broj- ne raspodele (y_n)	Gustina prečničke raspodele (y_d)	Gustina površinske raspodele (y_p)	Gustina zapreminske raspodele (y_v)
10	0.22637	0.05865	0.01269	0.00221
30	3.00498	2.33565	1.51632	0.79147
50	1.38557	1.79492	1.94212	1.68955
70	0.26119	0.47370	0.71757	0.87396
90	0.06468	0.15081	0.29372	0.45995
110	0.02985	0.08507	0.20251	0.38758
130	0.01244	0.04189	0.11785	0.26657
150	0.01244	0.4834	0.15690	0.40950
170	0.00245	0.01096	0.04031	0.11922

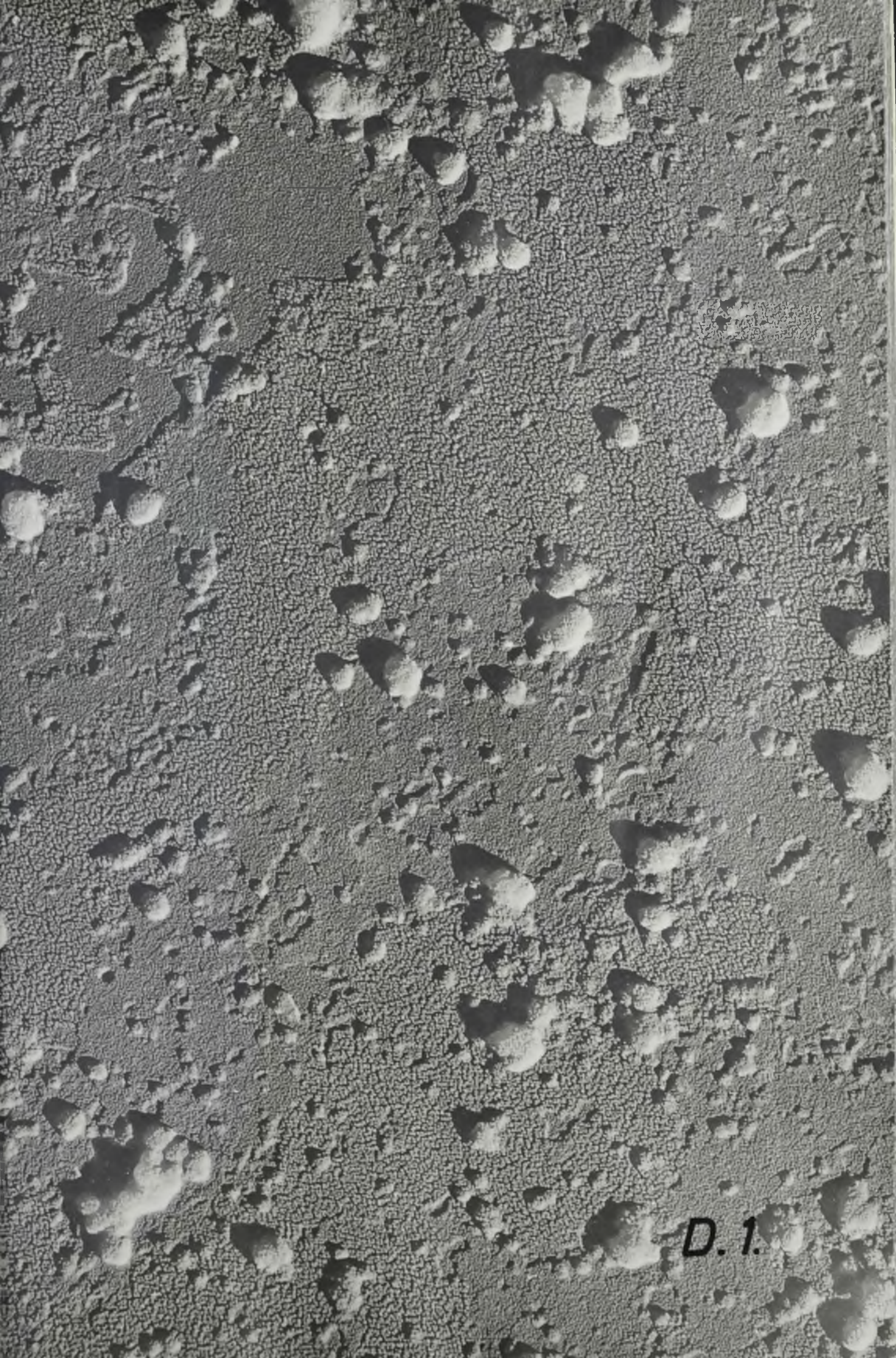


A. 1.



B. 2.

C. 2.

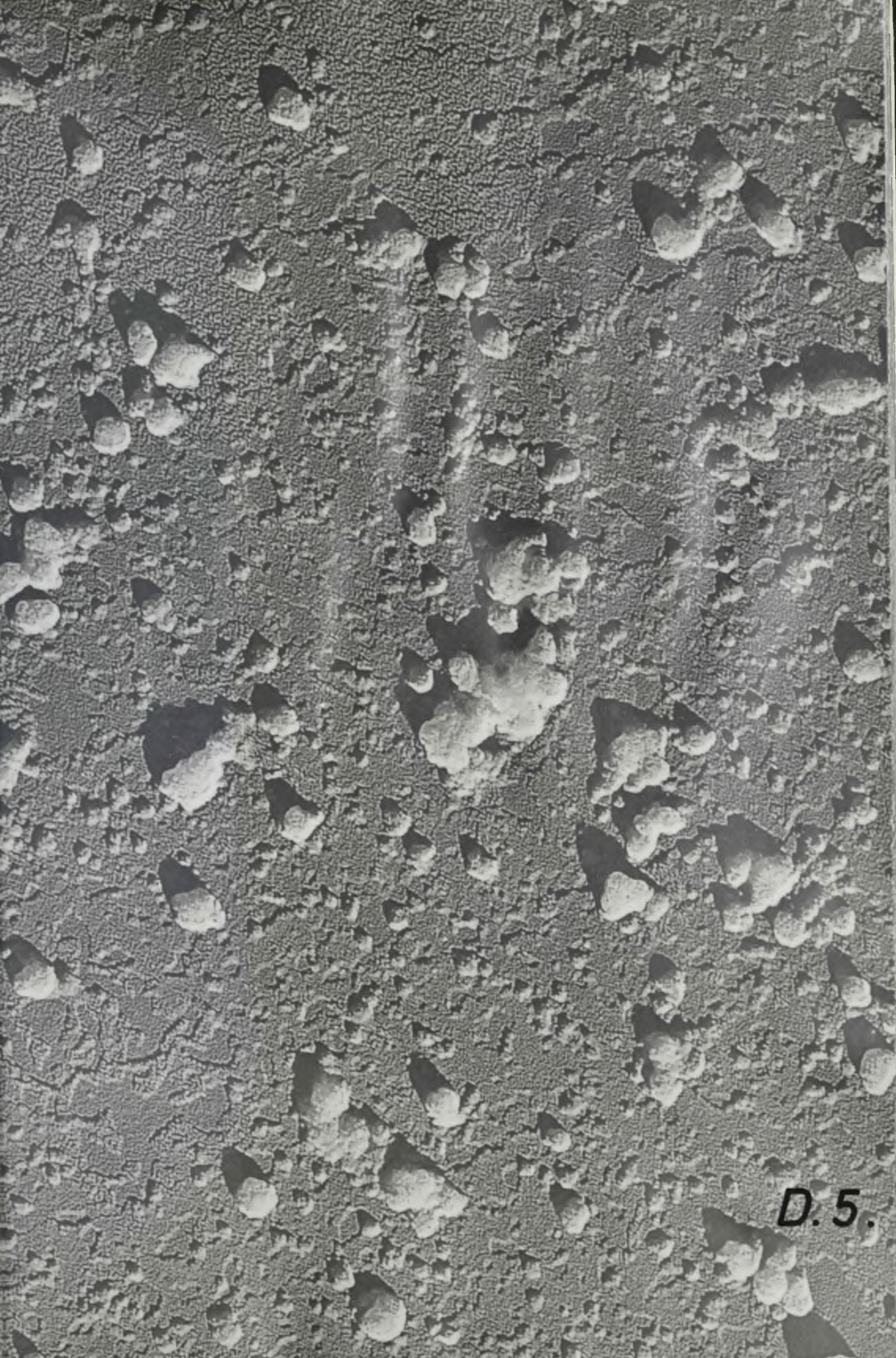


THE
LUNAR
SURFACE

D. 1.



D. 3.



D. 5.



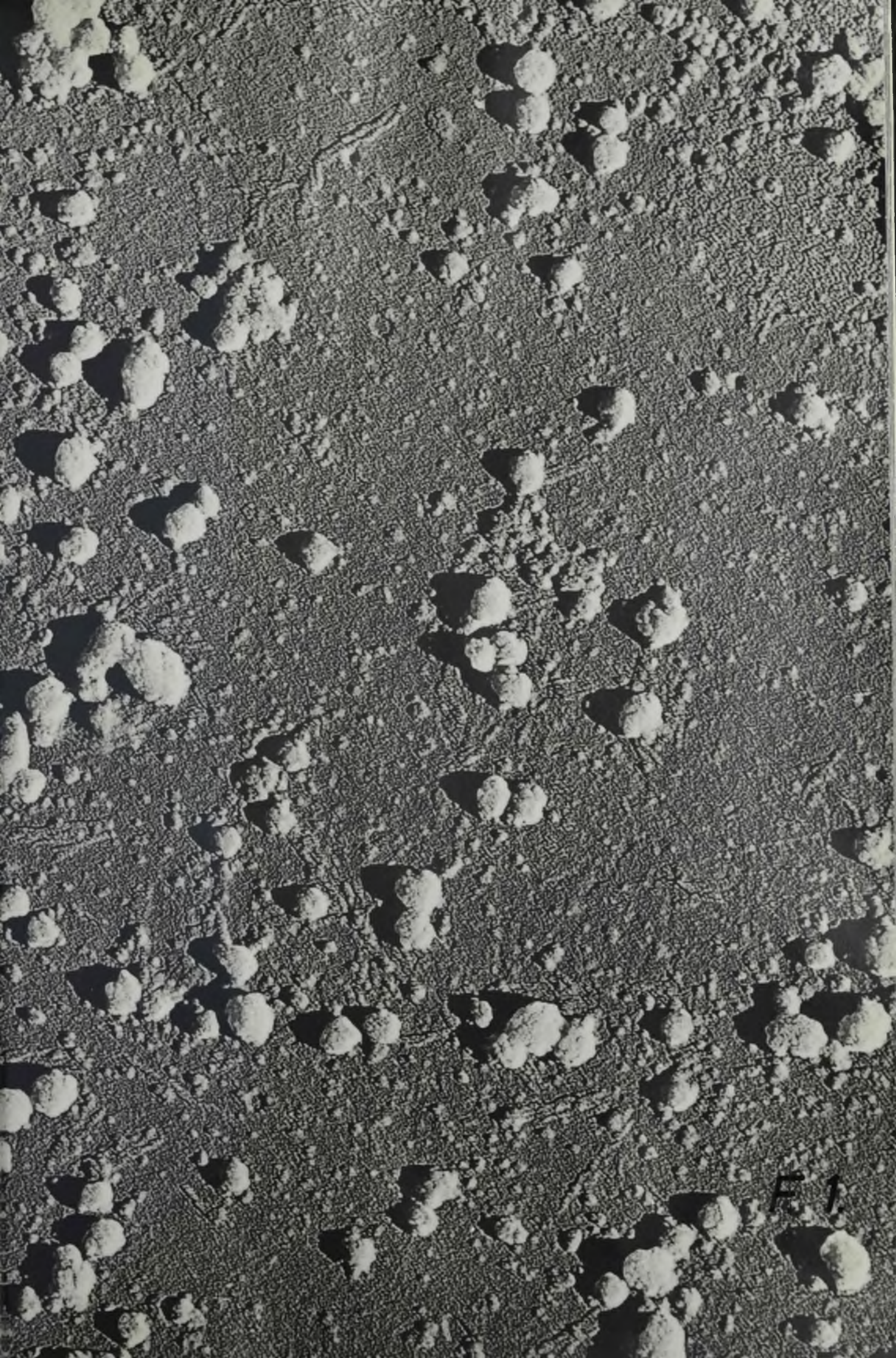
E.1.



E.3.



E. 5.



F 1



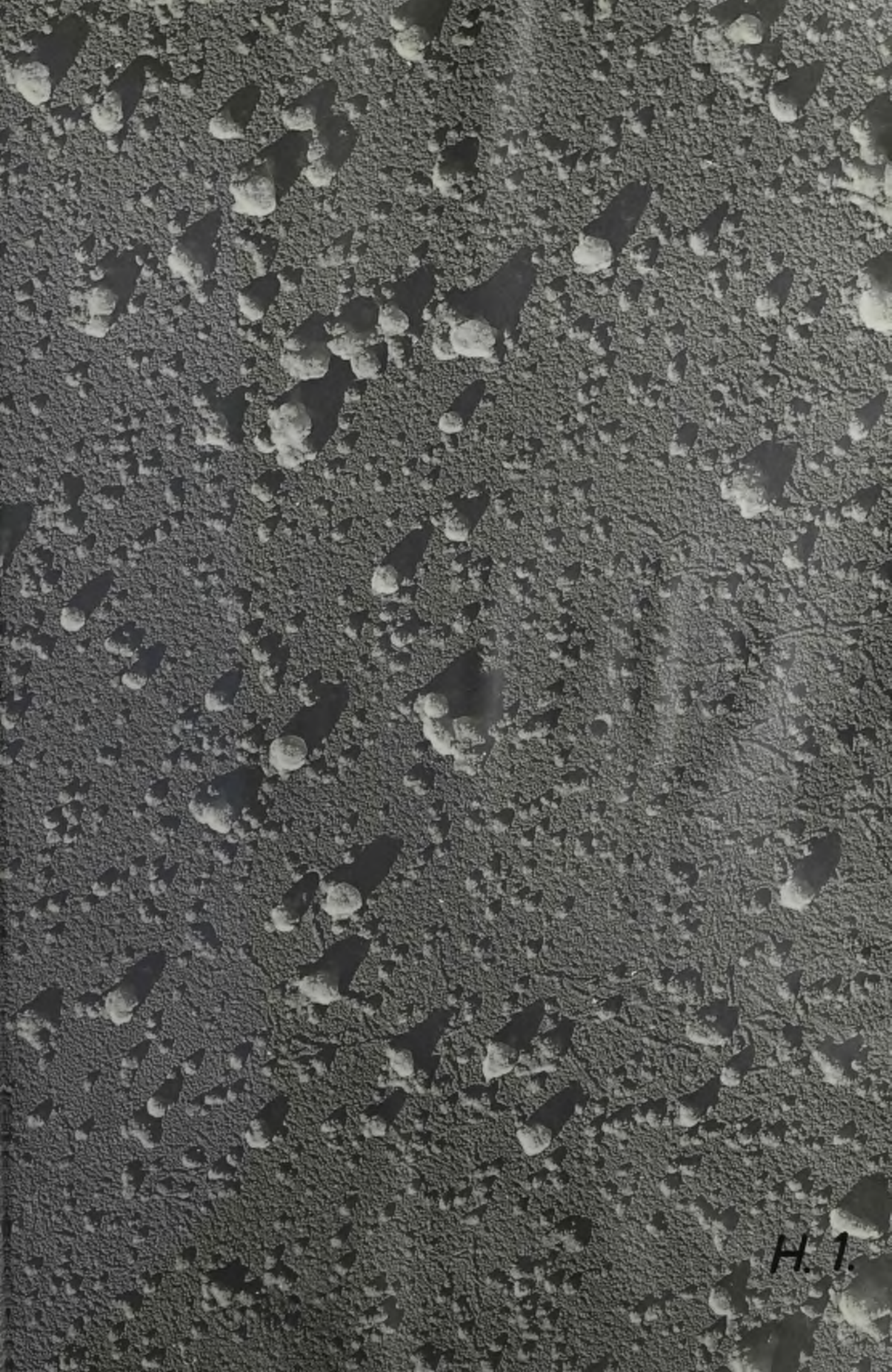
F 4

6.7

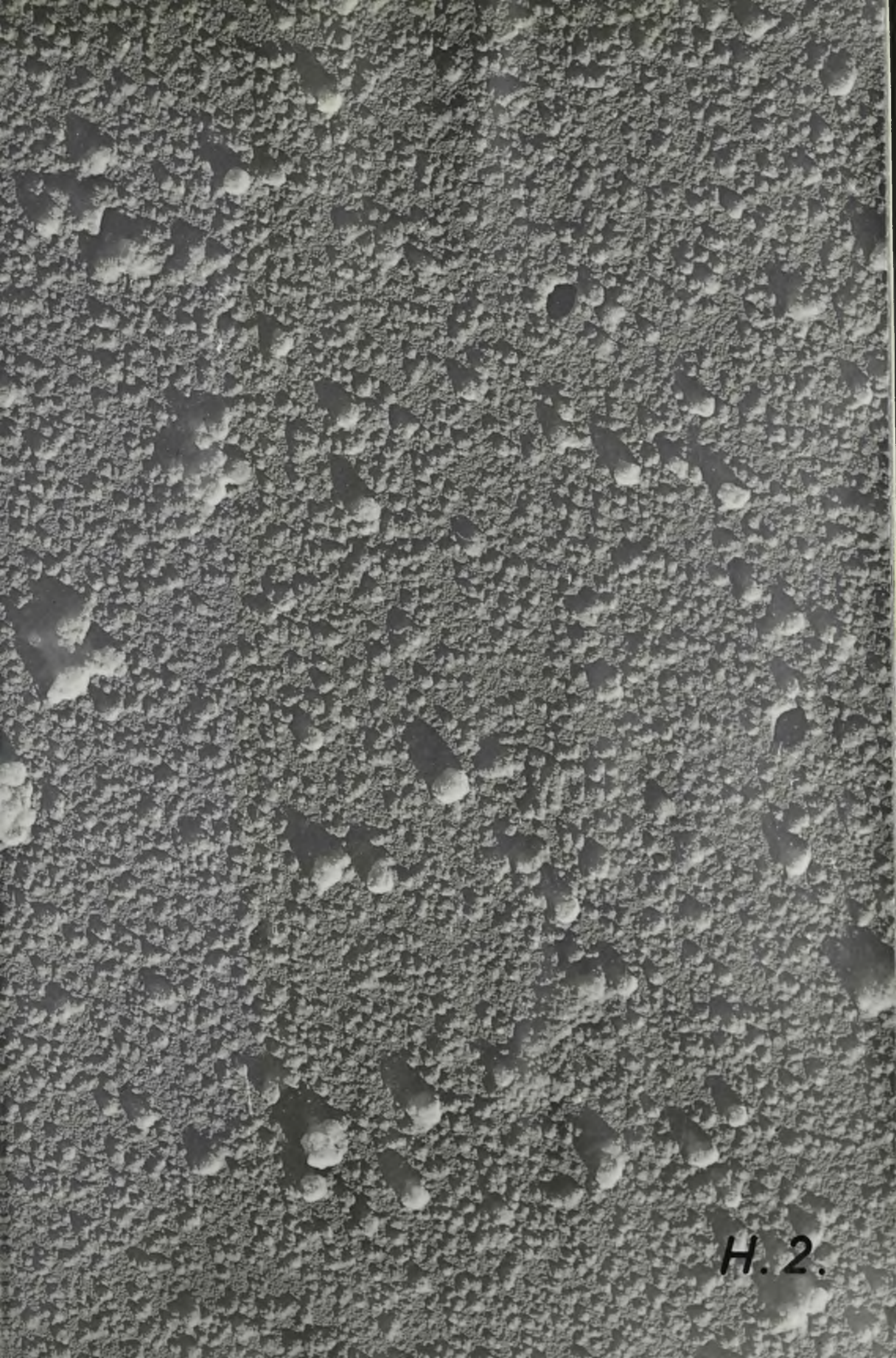




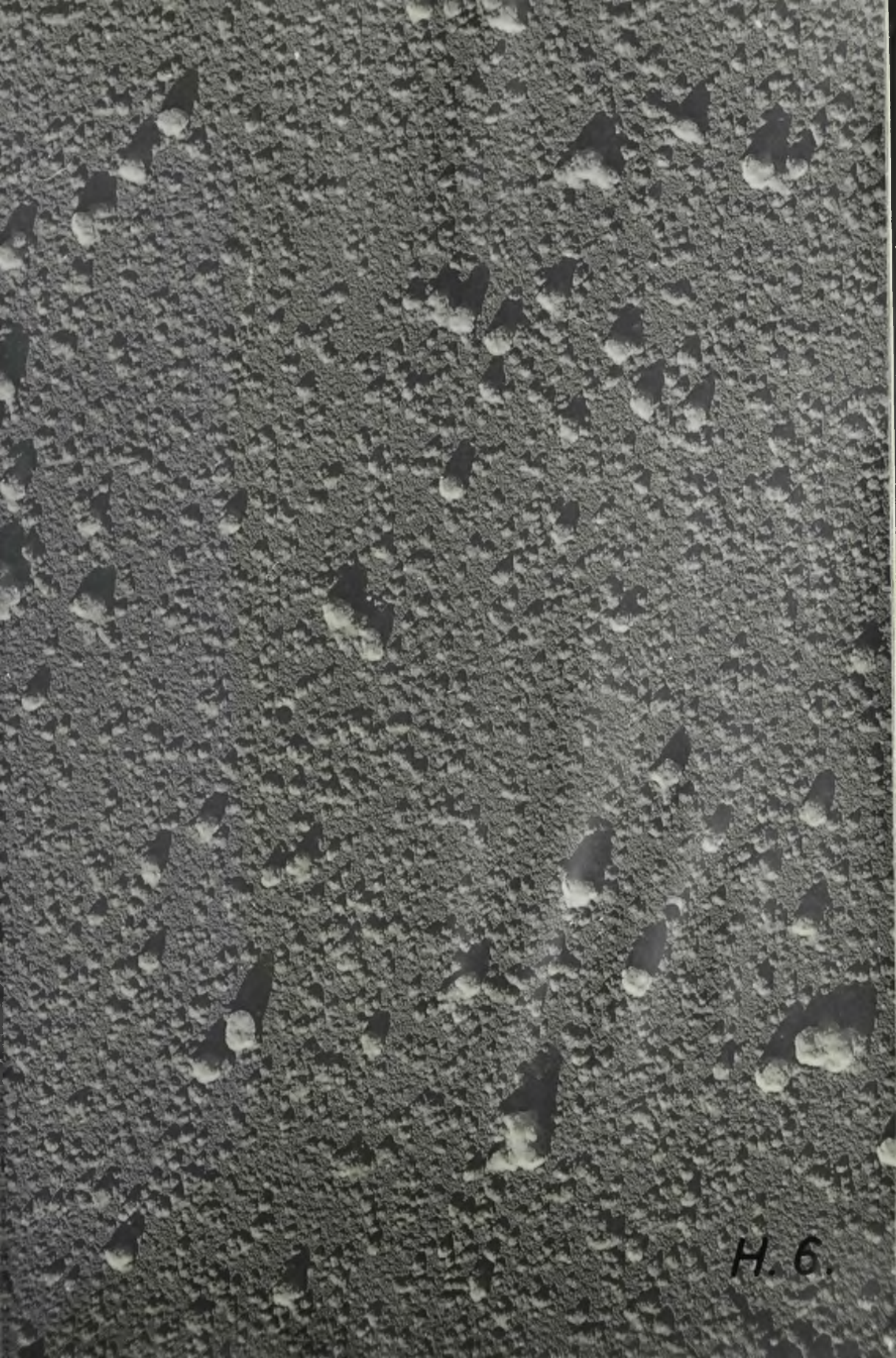
G. 4.



H. 1.



H. 2.

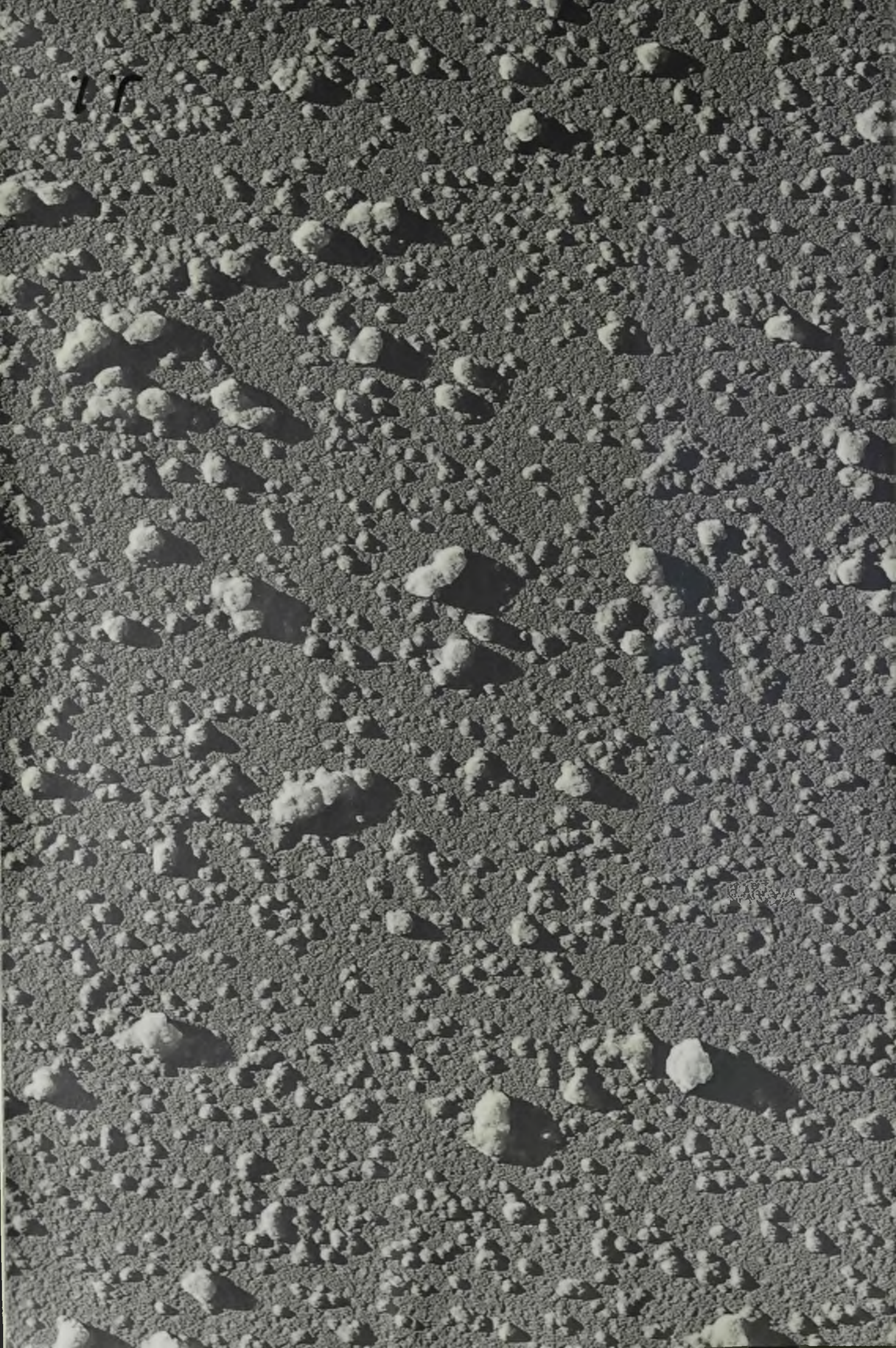


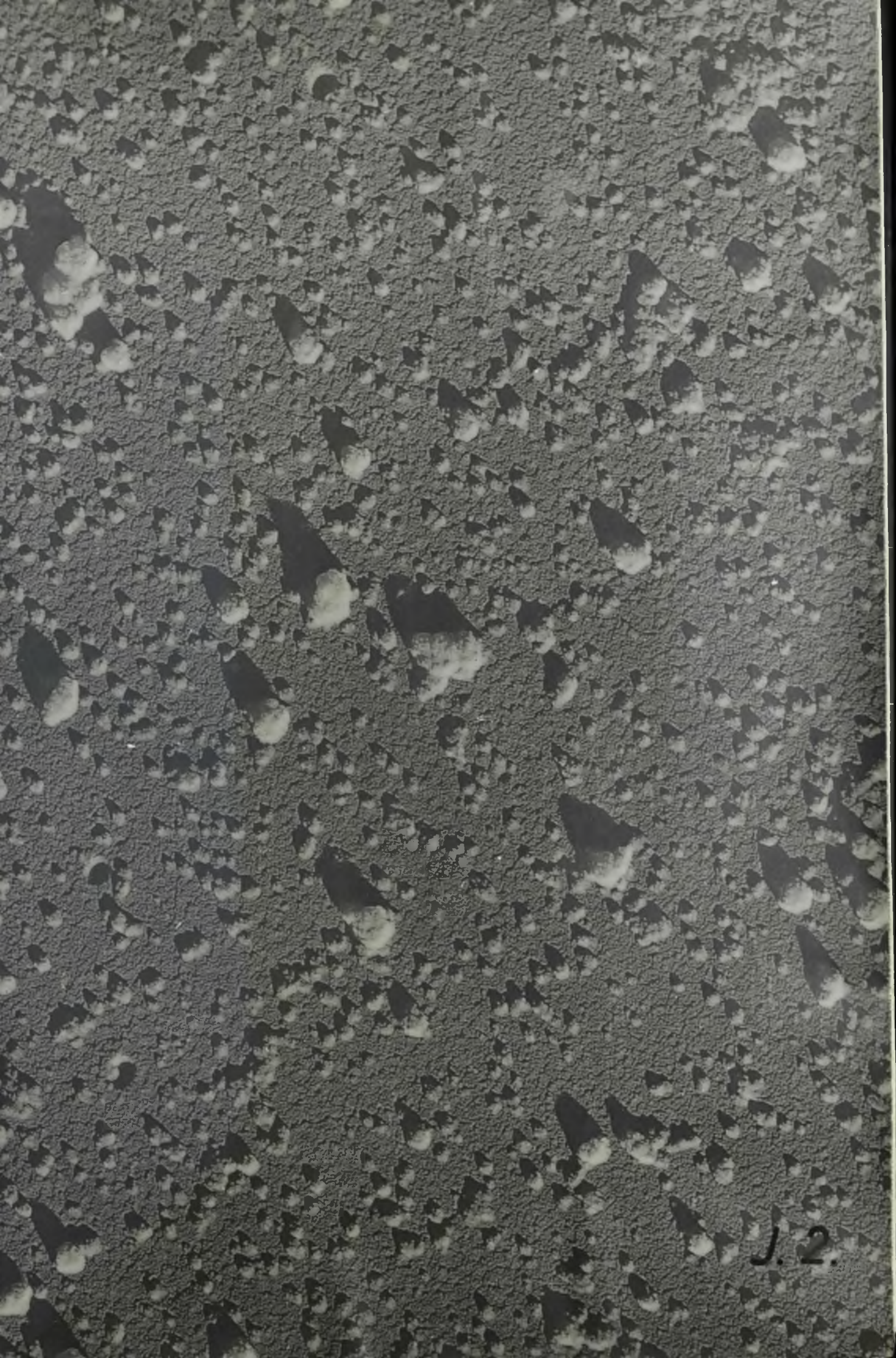
H. 6.

1.2.

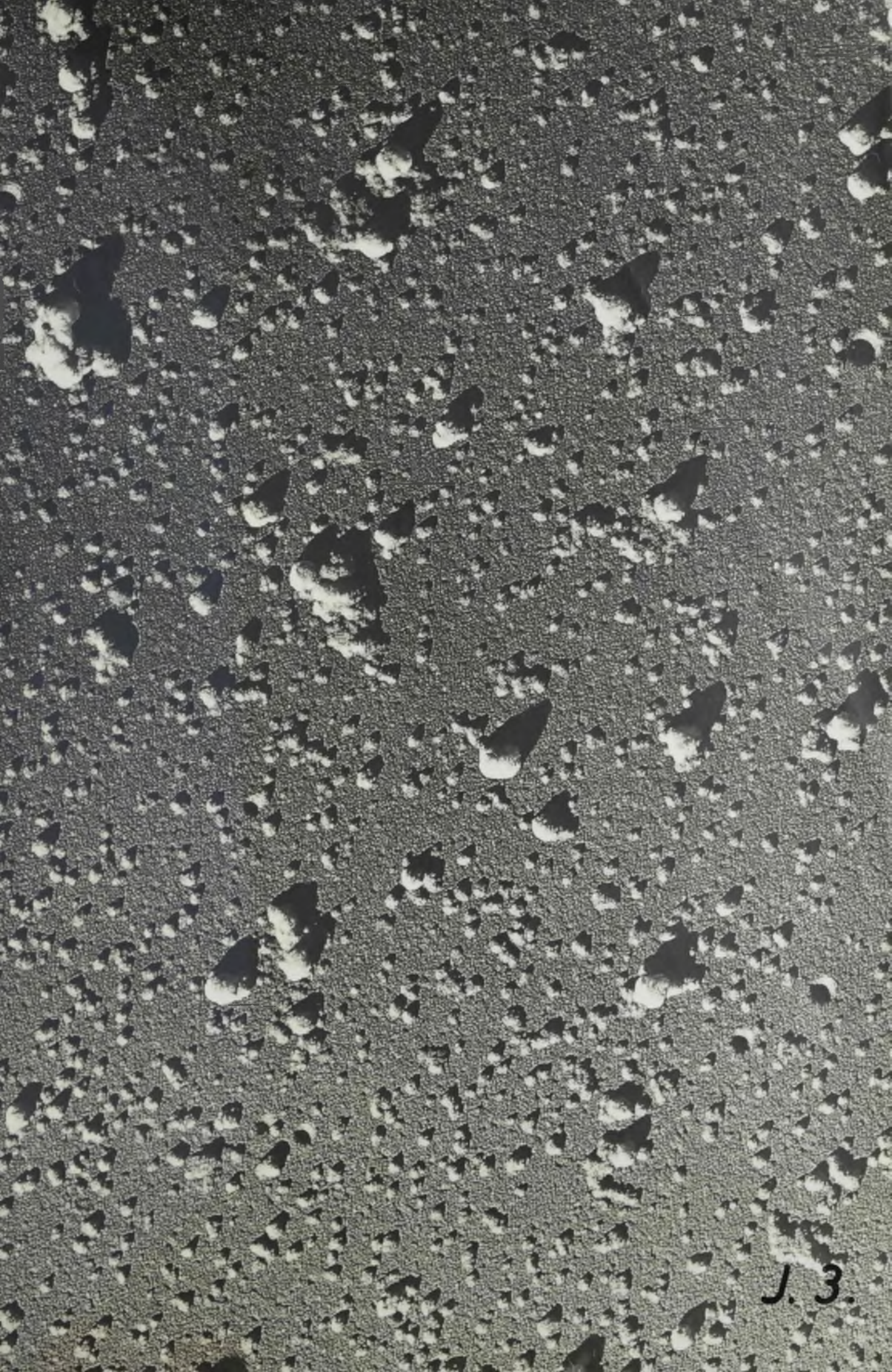


I. 3.





J. 2.



J. 3.