

А.М. Осинцев, В.И. Брагинский, О.Ю. Лапшакова, А.Л. Чеботарев

## РОЛЬ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В КОЛЛОИДНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ МИЦЕЛЛ КАЗЕИНА

На основе анализа экспериментальных данных предложена модель, определяющая вклад ионов кальция в поддержание коллоидной стабильности мицелл казеина в молоке. Разработан алгоритм количественного определения момента начала флокуляции в мицеллярной системе.

Коагуляция молока, мицеллы казеина, коллоидная стабильность, ионы кальция.

Свертывание молока является важным технологическим процессом при производстве многих продуктов питания. В основе этого процесса лежит коагуляция казеиновых мицелл, которая может быть вызвана различными причинами, например, воздействием протеолитических ферментов, кислот, спиртов, солей или высокой температуры. Коагуляция может происходить и при совместном действии перечисленных выше факторов.

По современным представлениям коллоидная стабильность мицелл казеина обусловлена в основном наличием на их поверхности «волоскового» слоя, состоящего из гидрофильных макропептидных остатков К-казеина и обеспечивающего стерическое ограничение для сближения мицелл. По существу, этот слой представляет собой квазиупругую полиэлектролитическую «щетку» из макропептидных «волосков» [1, 2], несущих отрицательный заряд из-за частичной ионизации их карбоксильных групп, и связанной с ними гидратной оболочки мицеллы.

Потеря коллоидной стабильности мицеллярной системой связана с тем или иным способом разрушения волоскового слоя. Так, при сычужном свертывании происходит отщепление гидрофильных макропептидных волосков К-казеина протеолитическим ферментом, например, химозином, что приводит к разрушению защитного слоя и потере коллоидной стабильности.

При кислотной коагуляции дополнительные ионы водорода легко проникают в гидратную оболочку и связываются с диссоциированными зарядообразующими группами, что приводит к уменьшению заряда макропептидных остатков и коллапсу волоскового слоя.

Этиловый спирт, снижая диэлектрическую проницаемость растворителя, существенно уменьшает электролитическое действие воды на зарядообразующие группы К-казеина и, обладая очень высокой гидрофильностью, связывает воду, истощая гидратные оболочки мицелл.

Похожее действие на мицеллы могут оказывать и ионы солей при высоких концентрациях, которые, кроме того, заметно уменьшают толщину дебаевского слоя противоионов.

Различный механизм разрушения защитного слоя мицелл вызывает определенные трудности при разработке универсальной модели коагуляции молока. Тем

не менее, в последнее время был предпринят ряд попыток построения таких моделей.

В модели «липких» жестких сфер [3] мицелла может быть представлена в виде твердой сферической частицы с поверхностью, покрытой стабилизирующим слоем гидрофильных волосков К-казеина. Разрушение защитного слоя сычужным ферментом приводит к возникновению взаимодействия между мицеллами. Можно показать, что при небольших интенсивностях взаимодействия, характерных для начальной стадии дестабилизации коллоида, взаимодействие между частицами проявляется как «липкость» твердых частиц.

Если приближенно считать коллоидный раствор мицелл в молоке разбавленным раствором, в котором вероятность тройных (и более) встреч частиц достаточно мала по сравнению с парными встречами, то взаимодействие между мицеллами можно с хорошей степенью точности описывать парным потенциалом. Парный потенциал  $V(r)$  представляет собой бесконечную стенку на расстоянии  $r$ , равном диаметру ядра мицеллы  $d$ , что означает невозможность проникновения мицелл друг в друга, или их абсолютную твердость (рис. 1).

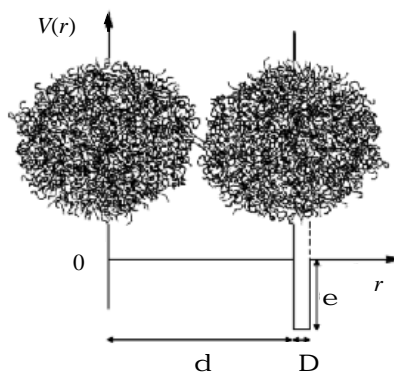


Рис. 1. Схематическое представление потенциала взаимодействия казеиновых мицелл

На расстоянии  $d < r < d + D$  стенка переходит в прямоугольную яму глубиной  $e$  и шириной  $D$ , что в предельной форме описывает притяжение двух мицелл. При этом  $D$  определяет расстояние, на котором возникает притяжение, а  $e$  характеризует его среднюю энергию. На расстоянии  $r > d + D$  потенциал равен 0, что означает отсутствие взаимодействия

между мицеллами. В силу того, что ширина ямы мала по сравнению с размерами мицелл, такое притяжение проявляется как своеобразная «липкость» практически не взаимодействующих частиц.

Выражение для потенциала парного взаимодействия имеет следующий вид:

$$\frac{V(r)}{k_B T} = \begin{cases} \frac{1}{2} \frac{Z^2}{\epsilon} \frac{d^2}{r^2}, & r < d \\ \frac{1}{2} \frac{Z^2}{\epsilon} \frac{d^2}{r^2} - e, & d < r < d + D \\ \frac{1}{2} \frac{Z^2}{\epsilon} \frac{d^2}{r^2}, & d + D < r \end{cases} \quad (1)$$

где  $k_B$  – постоянная Больцмана;  $T$  – абсолютная температура.

В случае сычужной коагуляции глубина ямы  $e$  связана с плотностью гликомакропептидных остатков на мицелле, которая уменьшается в результате протеолиза. Интенсивность притяжения в зависимости от времени  $t$  определяется плотностью щетки  $K$ -казеина, изменение которой может быть представлено следующей кинетикой:

$$P_0 - P = P_0 e^{-k[E]t}, \quad (2)$$

где  $P_0 - P$  – число волосков на поверхности мицеллы к моменту времени  $t$  после внесения протеолитического фермента,  $k$  – константа скорости реакции,  $[E]$  – концентрация фермента.

Глубина потенциальной ямы тогда в данном приближении определяется выражением:

$$\frac{e}{k_B T} = k[E]t. \quad (3)$$

При описании кислотной коагуляции в терминах модели «липких» твердых сфер глубина ямы  $e$  в зависимости от  $pH$  среды может быть приближенно описана в виде:

$$\frac{e}{k_B T} = \frac{1}{pC - pH}, \quad (4)$$

где  $pC$  – критическое значение  $pH$ , при котором происходит коллапс щетки из макропептидных волосков  $K$ -казеина на поверхности мицелл.

С точки зрения еще одной – зарядовой – модели [4], устойчивость коллоидного раствора казеина обеспечивается как за счет кулоновского отталкивания, так и за счет стерической стабилизации в результате образования плотной гидратной оболочки при взаимодействии воды с гидрофильными гликомакропептидными волосками  $K$ -казеина, а основной причиной обоих стабилизирующих факторов является возникновение отрицательного заряда мицеллы в результате диссоциации функциональных групп различных казеинов.

Выбор в качестве основного параметра, описывающего коагуляционную устойчивость мицелл, величину их заряда, позволяет с единых позиций описать коагуляцию молока, вызванную различными причинами. Например, в случае сычужного свертывания молока снижение величины поверхностного заряда мицелл происходит за счет отщепления ферментом заряженных гидрофильных гликомакропептидных остатков  $K$ -казеина. А при кислотной коагуляции дополнительные ионы водорода связываются с диссоциированными зарядообразующими группами,

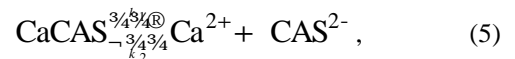
что также приводит к уменьшению поверхностного заряда мицелл.

По своей сути обе приведенные выше модели достаточно похожи. Действительно, выбор потенциальной энергии для модели «липких» твердых сфер в форме (3) или (4), в силу своей феноменологической природы, достаточно условен. Поэтому подбор подходящей зависимости для связи потенциальной энергии с зарядом мицеллы даст точно такой же результат. Преимуществом зарядовой модели является, тем не менее, возможность физико-химического обоснования выбора той или иной формы потенциальной энергии.

Для уточнения основных факторов, влияющих на взаимодействие мицелл, безусловно, необходимы специфические исследования механизма разрушения коллоидной стабильности мицеллярной системы молочного казеина. Данная работа посвящена обоснованию гипотезы о существенной роли ионов кальция в коллоидной стабильности казеиновых мицелл.

Известно, что при сычужном свертывании молока значительное влияние на продолжительность коагуляции оказывает концентрация ионов кальция в молочной сыворотке. Для изменения активности ионов кальция нами использован ряд методов: ингибирование хелирующими соединениями («Трилон Б», динатрий фосфат), тепловая обработка, разбавление молока дистиллированной водой или раствором с заданной ионной силой. В результате исследований установлено, что понижение активности ионов кальция любым доступным способом ниже примерно 1,5 ммоль/л приводит к тому, что коагуляция молока не наблюдается в течение нескольких часов после внесения стандартной дозы протеолитического фермента. Аналогичные результаты описаны и другими авторами [5].

Для объяснения полученных результатов предложена количественная модель дополнительной электростатической стабилизации казеиновых мицелл в молоке за счет диссоциации ионов кальция из мицеллярного казеината. Известно, что кальций может химически связываться с фосфосериновыми группами белков казеиновых мицелл [6]. Такие группы в заметном количестве присутствуют в  $\alpha$ - и  $\beta$ -казеинах. Образующееся при этом соединение, вообще говоря, непостоянного состава, принято называть казеинатом кальция. Если предположить, что связывание кальция с фосфосериновыми группами молекул казеинов представляет собой обратимый процесс, то реакцию диссоциации-рекомбинации казеината кальция можно условно представить в виде:



где  $k_1$  – константа диссоциации (первого порядка);  $k_2$  – константа рекомбинации (второго порядка); условное обозначение CAS выбрано для представления «молекулы» казеина.

Кинетика диссоциации в случае справедливости реакции (5) описывается следующими уравнениями:

$$\frac{d[\text{CaCAS}]}{dt} = -k_1[\text{CaCAS}] + k_2[\text{Ca}^{2+}][\text{CAS}^{2-}], \quad (6)$$

$$\frac{d[\text{CAS}^{2-}]}{dt} = k_1[\text{CaCAS}] - k_2[\text{Ca}^{2+}][\text{CAS}^{2-}].$$

Система дифференциальных уравнений (6) описывает кинетику изменения дополнительного электростатического заряда мицелл, пропорционального концентрации ионизированных молекул казеинов  $[\text{CAS}^{2-}]$ . При заданной концентрации ионов кальция в молоке из этих уравнений легко выразить равновесное значение дополнительного заряда. Действительно, константа равновесной диссоциации для реакции (5) в соответствии с (6):

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[\text{Ca}^{2+}][\text{CAS}^{2-}]}{[\text{CaCAS}]}. \quad (7)$$

Учтем, что

$$[\text{CaCAS}] + [\text{CAS}^{2-}] = [\text{C}], \quad (8)$$

где  $[\text{C}]$  – полная молярная концентрация способных к реакции типа (5) фосфосериновых групп казеинов.

Подставляя (8) в (7) и выражая  $[\text{CAS}^{2-}]$ , получим следующее выражение для равновесного значения дополнительного заряда мицелл, возникающего при диссоциации мицеллярного казеината кальция:

$$q_{\text{cas0}} = 2eV_m N_A [\text{CAS}^{2-}] = 2eV_m N_A \frac{K[\text{C}]}{K + [\text{Ca}^{2+}]}, \quad (9)$$

где  $e$  – величина элементарного заряда;  $V_m$  – объем мицеллы;  $N_A$  – число Авогадро.

Заряд, остающийся на поверхности мицеллы после действия фермента в течение времени  $t$  определяется выражением (2):

$$q_S(t) = q_{S0} \exp(-k_{S0}[E]t), \quad (10)$$

где  $q_{S0}$  – начальный заряд мицеллы;  $k_{S0}$  – константа скорости протеолиза к-казеина.

На рис. 2 представлены термограммы сычужного свертывания молока с нормальной и пониженной, за счет разведения, концентрациями кальция. Принцип действия термографа изложен в литературе [7]. На рисунке используются относительные концентрации веществ:  $[E_{\text{rel}}]$  – относительная концентрация фермента ( $[E_{\text{rel}}] = 1$  для нормальной дозы фермента);  $[\text{Ca}_{\text{rel}}^{2+}]$  – относительная концентрация ионов кальция в молочной сыворотке ( $[\text{Ca}_{\text{rel}}^{2+}] = 1$  для стандартного обезжиренного молока).

Как видно из рисунка, увеличение степени разведения молока приводит к значительному увеличению продолжительности коагуляции, что, на наш взгляд, связано со значительным уменьшением концентрации ионов кальция.

Вместе с тем, увеличение концентрации фермента приводит к практически пропорциональному сокращению продолжительности коагуляции даже при недостатке ионов кальция в молоке.

На основе последнего факта было сделано предположение о существовании протеолитического действия фермента по отношению к  $\alpha$ - и  $\beta$ -казеинам,

расположенным внутри мицеллы. При этом отщепление макропептидных участков с большим содержанием фосфосериновых групп приводит к снижению дополнительного заряда, возникающего при недостатке ионов кальция. Важно отметить, что этот эффект наблюдался как при использовании ферментов с низкой протеолитической избирательностью («КГ-50»), так и чистого химозина («Максирен»).

Изменение величины дополнительного заряда может быть представлено аналогично (10):

$$q_{\text{cas}}(t) = q_{\text{cas0}} \exp(-k_{\text{cas0}}[E_{\text{rel}}]t), \quad (11)$$

где  $q_{\text{cas0}}$  – заряд, определяемый выражением (9);  $k_{\text{cas0}}$  – константа скорости дополнительного протеолиза.

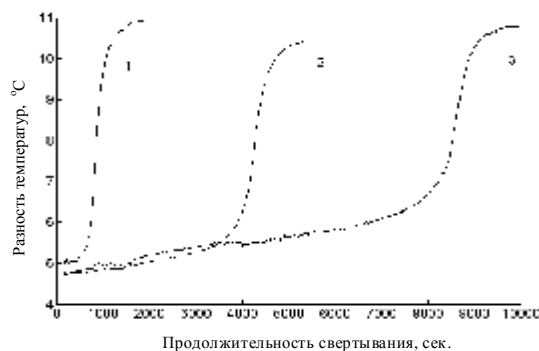


Рис. 2. Термограммы процесса сычужной коагуляции в зависимости от степени разведения восстановленного обезжиренного молока и концентрации фермента:

$$1 - [\text{Ca}_{\text{rel}}^{2+}] = 1, [E_{\text{rel}}] = 2; 2 - [\text{Ca}_{\text{rel}}^{2+}] = 0,5, [E_{\text{rel}}] = 8;$$

$$3 - [\text{Ca}_{\text{rel}}^{2+}] = 0,5, [E_{\text{rel}}] = 4$$

Предполагая в грубом приближении, что заряд, характеризующий коллоидную стабильность мицеллы, представляет собой сумму поверхностного и дополнительного заряда, а потенциальная энергия отталкивания мицелл пропорциональна квадрату этого заряда, можно считать, что стабильность мицеллы в целом задается выражением:

$$e = P \frac{\dot{e} q_S(t)}{\dot{e} q_{S0}} + \frac{q_{\text{cas}}(t)}{q_{S0}} \frac{\dot{U}}{\dot{U}} - e_0, \quad (12)$$

где  $P$  – константа, определяемая физическими параметрами задачи.

Значение  $e_0$  является феноменологической константой, определяющей интенсивность гидрофобных взаимодействий.

На рис. 3 представлены результаты расчетов по формулам (10)-(12) при различных значениях концентрации ионов кальция и дозы внесенного фермента. При моделировании считалось, что нарушение стабильности коллоидной системы происходит при понижении потенциальной энергии отталкивания мицелл до величины тепловой энергии  $\frac{e}{k_B T} \approx 2$ .

Параметры модели, при которых получены результаты, представленные на рис. 3, имеют следующие значения:  $k_{S0} = 8 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ ;  $k_{\text{cas0}} = 7,5 \cdot 10^{-6} \text{ c}^{-1}$  (для «Максирена»);  $P = 4,081 k_B T$ ;  $e_0 = 3 k_B T$ ;  $C = 1$ .

Обычно считается, что кислотное свертывание молока не зависит от концентрации ионов кальция в сыворотке и определяется только значением  $pH$  молока. Тем не менее, этот факт не вполне очевиден. Если рассматривать термокислотное свертывание как коагуляцию в изоэлектрической точке казеинов ( $pH \approx 4,6 \div 4,7$ ), то трудно объяснить начало флокуляции мицелл при  $pH \approx 5,1 \div 5,2$ . С другой стороны, известно, что именно при значениях  $pH \approx 5,1$  происходит практически полная ионизация коллоидного фосфата кальция, являющегося одной из составных частей мицелл казеина. Таким образом, механизм дестабилизации коллоидной системы, реализующийся при кислотном свертывании молока, может быть вполне аналогичен описанному выше. С одной стороны, дополнительные протоны снижают заряд макропептидных волосков и вызывают коллапс полиэлектролитической щетки, а с другой, увеличение концентрации ионов кальция в результате растворения коллоидного фосфата кальция приводит к снижению дополнительного заряда мицелл.

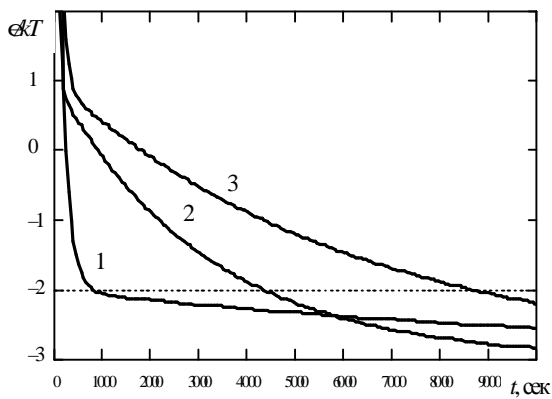


Рис. 3. Расчеты зависимости продолжительности сычужной коагуляции от концентрации ионов кальция; параметры кривых 1-3 те же, что и для рис. 2

Эти предположения можно использовать, например, для описания зависимости активности фермента от  $pH$  молока при кислотно-сычужном свертывании.

Обычно влияние кислотности на активность фермента формально учитывается в виде зависимости константы скорости протеолиза  $k_{50}$  от  $pH$ . Однако нам

удалось установить, что, по крайней мере частично, уменьшение времени свертывания молока с понижением значения его  $pH$  можно объяснить снижением дополнительного заряда мицелл за счет возрастания степени диссоциации мицеллярного фосфата кальция при увеличении кислотности.

Рассмотрим очень упрощенную схему, описывающую диссоциацию мицеллярного фосфата кальция (ССР):



где  $\text{ССР}^*$  – «молекула» казеинат-кальций-фосфатного комплекса после того, как она потеряет ион кальция.

Запишем выражение для константы равновесия реакции (4):

$$K = \frac{[\text{ССР}^*] \times [\text{Ca}^{2+}]}{[\text{ССР}] \times [\text{H}^+]^2}, \quad (14)$$

где  $K = \frac{k_+}{k_-}$ .

Сделаем очевидное предположение о концентрациях реагентов:

$$[\text{ССР}^*] = [\text{Ca}^{2+}], \quad [\text{ССР}^*] = [\text{ССР}]_0 - [\text{ССР}], \quad (15)$$

где  $[\text{ССР}]_0$  – концентрация ССР при очень высоких значениях  $pH$ .

Подставим (15) в (14):

$$[\text{Ca}^{2+}]^2 + K[\text{H}^+]^2[\text{Ca}^{2+}] - K[\text{H}^+]^2[\text{ССР}]_0 = 0.$$

Это квадратное уравнение для концентрации ионов кальция имеет следующее положительное решение:

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{[\text{H}^+]}{2} \left( \sqrt{K^2[\text{H}^+]^2 + 4K[\text{ССР}]_0} - K[\text{H}^+] \right). \quad (16)$$

Дополнительные ионы кальция могут учитываться в первом приближении добавлением значения, рассчитанного по формуле (16), в формулу (9).

Таким способом решается задача об учете влияния кислотности на скорость сычужного свертывания. В заключение отметим, что разработанный подход к учету роли ионов кальция при коагуляции молока, возможно, способен объяснить поразительное сходство термокислотной и термокальциевой коагуляции молока. Однако разработка модели высокотемпературной коагуляции молока выходит за рамки данной работы.

#### Список литературы

1. Dalgleish, D. G. Casein micelles as colloids: Surface structure and stabilities // Journal of Dairy Science. 1998. – V. 81. – P. 3013-3017.
2. De Kruijff, C. G.  $\kappa$ -Casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles / C. G. De Kruijff, E. B. Zhulina // Colloids Surfaces A. – 1996. – V. 117. – P. 151–159.
3. De Kruijff, C.G. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation // Journal of Dairy Science. – 1998. – V. 81. – P. 3019-3028.
4. Осинцев, А.М. Моделирование индукционной стадии коагуляции молока. III. Кислотно-сычужная коагуляция / А.М. Осинцев, В.И. Брагинский, Л.А. Остроумов, М.П. Абрамова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2003. – № 5. – С. 21-23.
5. Tsioulpas, A. Effect of Minerals on Casein Micelle Stability of Cows' Milk / A. Tsioulpas, J. L. Michael, A. S. Grandison // Journal of Dairy Research. – 2007. – V. 74. – P. 167–173.
6. Dickinson, E. Influence of calcium ions on creaming and rheology of emulsions containing sodium caseinate / E. Dickinson, M. Golding // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 1998. – V. 144. – P. 167-177.

7. Осинцев, А.М. Термографический метод исследования коагуляции молока / А.М. Осинцев, Н.А. Бахтин, В.И. Брагинский, О.В. Иваненко // Сыроделие и маслоделие. – 2005. – № 5. – С. 20-21.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт  
пищевой промышленности»,  
650056, г. Кемерово, б-р Строителей, 47

#### **SUMMARY**

**A.M. Osintsev, V.I. Braginsky, O.Yu. Lapshakova, A.L. Chebotaryov**

**Role of calcium ions in colloid stability of casein micelles**

**Kemerovo Institute of Food Science and Technology,  
Bul. Stroiteley, 47, 650056, Kemerovo, Russia**

Basing on analysis of experimental data the model defining contribution of calcium ions into colloid stability of casein micelles in milk is proposed. The algorithm is developed for quantitative calculation of the beginning of flocculation in the micellar system.

Milk coagulation, casein micelles, colloid stability, calcium ions.

