

Л.А. Остроумов, А.М. Осинцев, И.А. Смирнова,
М.А. Глушаков, А.Л. Чеботарев

ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ТЕРМОКИСЛОТНОЙ КОАГУЛЯЦИИ БЕЛКОВ ОБЕЗЖИРЕННОГО МОЛОКА*

На основе экспериментов по термокислотному свертыванию обезжиренного молока предложена модель, учитывающая влияние дозы внесенной кислоты, распределения мицелл по размерам и степени денатурации сывороточных белков, зависящей от температуры и продолжительности тепловой обработки. В модели используется феноменологический подход к описанию взаимодействий между мицеллами казеина, на которые в результате термической денатурации осаждаются сывороточные белки. Сравнение результатов моделирования с экспериментальными данными позволило проверить адекватность модели, а также выявить достоинства и недостатки использованного феноменологического подхода.

Мицеллы казеина, сывороточные белки, термокислотная коагуляция, липкие твердые сферы.

Введение

Термокислотный способ свертывания молока основан на одновременной коагуляции молочного казеина и сывороточных белков под действием кислоты и высокой температуры. Он позволяет более рационально использовать молочное сырье. Степень использования белков при данном методе составляет до 95–97 %, в то время как при кислотной коагуляции около 90 %, а при сычужной – примерно 85 %.

Белковая продукция, полученная термокислотным способом, в сравнении с продукцией, полученной использованием кислотной или сычужной коагуляции, отличается высокой биологической и пищевой ценностью, так как входящие в ее состав сывороточные белки лучше сбалансированы по аминокислотному скору в сравнении с казеином.

Несмотря на развитие практических аспектов термокислотных технологий, в настоящее время не существует последовательной физико-химической модели термокислотного свертывания молока. Считается, что термокислотный процесс протекает аналогично кислотному, а ускорение коагуляции обусловлено несколькими дополнительными факторами.

Во-первых, из-за сдвига изоэлектрической точки комплекса «казеиновая мицелла» – «сывороточные белки» свертывание начинается в области более высоких значений pH. Но после осаждения денатурированных сывороточных белков изоэлектрическая точка мицелл изменяется от $pH_i \approx 4,7$ до $pH_f \approx 5,2$ [1–3], тогда как свертывание молока при температуре 90 ± 5 °C происходит при добавлении кислотообразующего агента в количестве, обеспечивающем кислотность среды коагуляции (молоко + кислотный агент) $pH \approx 6$.

Во-вторых, из-за повышения температуры заметно увеличивается кинетическая энергия хаоти-

ческого движения частиц, что увеличивает эффективность их столкновений и повышает вероятность слипания. Однако средняя энергия теплового движения E пропорциональна абсолютной температуре T . Значит, для температур 90 и 30 °C: $E_2/E_1 = T_2/T_1 \approx (273+90)/(273+30) \approx 1,2$. Так что о значительном повышении кинетической энергии мицелл речи быть не может.

В-третьих, повышение температуры сопровождается значительным снижением вязкости среды, что приводит к увеличению подвижности частиц и, как следствие, к ускорению коагуляции. Действительно, вязкость молока при повышении температуры от 25 ± 5 до 90 ± 5 °C снижается примерно в 2–3 раза, во столько же раз увеличивая подвижность мицелл, но, если столкновения не приводят к агрегации частиц, частота этих столкновений не оказывает влияния на коагуляцию.

В-четвертых, достаточно часто можно встретить утверждение о том, что при повышении температуры результатом увеличения энергии и подвижности частиц может служить уменьшение толщины двойного электрического слоя, обеспечивающего коллоидную стабильность мицелл. Но, как известно, толщина дебаевского (или двойного электрического) слоя пропорциональна $\sqrt{T/I}$, где I – ионная сила раствора, т.е. с ростом температуры его толщина слегка увеличивается, а не уменьшается. Последнее, конечно, справедливо, если повышение степени диссоциации электролитов в результате изменения температуры не приводит к увеличению ионной силы, что, как показано в следующем абзаце, по-видимому, справедливо.

* Работа выполнена в рамках инициативного долгосрочного договора о творческом сотрудничестве между Могилевским государственным университетом продовольствия (Республика Беларусь) и Кемеровским технологическим институтом пищевой промышленности (Российская Федерация).

В-пятых, часто ссылаются на возрастание степени диссоциации кислот при повышении температуры. Вместе с тем температурная зависимость степени

диссоциации электролитов определяется в соответствии с принципом Ле Шателье энтальпией диссоциации. У большинства слабых электролитов она мала,

так что их диссоциация от температуры зависит слабо. Поэтому степень диссоциации слабых электролитов при температурах 70–100 °С мало отличается от степени их диссоциации при температуре 30 °С [4]. Причем последнее утверждение относится как к свертывающему агенту (например, молочной кислоте), так и к зарядообразующим функциональным группам белков мицелл казеина, отвечающих за коллоидную стабильность мицеллярного раствора.

Вышеприведенные рассуждения указывают на необходимость более тщательного анализа механизма термокислотного свертывания молока. Поэтому целью данной работы является попытка построения простой феноменологической модели термокислотного процесса, достаточно адекватно отражающей его основные физико-химические особенности.

Материалы и методы

В качестве молочной основы в работе использовалось восстановленное обезжиренное молоко с массовой долей сухих веществ 8,8 %, массовой долей белков 3,2 % и титруемой кислотностью 15,0±16,0 °Т.

В качестве коагулянта использовался водный раствор молочной кислоты титруемой кислотностью 60°Т (в пересчете на молочную кислоту – 540 мг %). Количество внесенного коагулянта варьировалось в пределах от 0 до 23 % от массы восстановленного обезжиренного молока.

В ходе исследований подготовленные образцы ОБМ пастеризовались в течение 3 минут при температуре коагуляции, после чего вносился коагулянт и смесь выдерживалась в течение 5 минут при температуре коагуляции. Коагуляция проводилась при трех различных температурах: 75, 85 и 95 °С. После этого смесь охлаждалась до 20 °С. Из охлажденной смеси отбирались пробы и подвергались центрифугированию в течение 5 минут на лабораторной центрифуге с фактором разделения 500. Полученные после центрифугирования образцы представляли собой молочную плазму, из которой удалены крупные конгломераты белковых мицелл, образовавшихся под действием внесенного количества молочной кислоты. Согласно проведенным расчетам в центрифугированной плазме (ЦП) содержались белковые частицы с размерами менее 5 мкм.

Далее измерялась массовая доля сухих веществ в ЦП, ее активная кислотность, а также динамическая вязкость. Сухие вещества определялись ускоренным методом высушивания по ГОСТ 3626. Активная кислотность измерялась рН-метром по ГОСТ 3624. Для определения динамической вязкости ЦП использовался вискозиметр Освальда.

Модель

Так же как и в работе [5], будем считать мицеллы казеина твердыми сферами, способность к агрегации которых может быть выражена термином «липкость». Потенциальная энергия взаимодействия мицелл друг с другом $V(r)$ в зависимости от расстояния между их центрами представляет собой бесконечно «высокую» стенку на расстоянии r , равном диаметру ядра мицеллы D , что означает невоз-

можность проникновения мицелл друг в друга, или их абсолютную твердость (рис. 1).

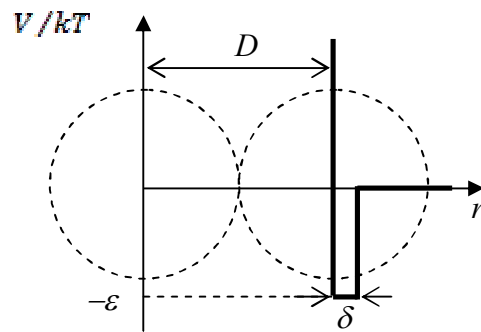


Рис. 1. Потенциальная энергия взаимодействия твердых «липких» сфер

На расстояниях $D < r < D + \delta$ стенка переходит в прямоугольную яму глубиной ϵ и шириной δ , что в пределе $\delta \rightarrow 0$ описывает притяжение двух мицелл как «липкость». На расстояниях $r > D + \delta$ мицеллы не взаимодействуют друг с другом. Выражение для потенциальной энергии взаимодействия такого типа имеет следующий вид:

$$\frac{V(r)}{kT} = \begin{cases} \infty, & r < D; \\ -\epsilon, & D < r < D + \delta; \\ 0, & r > D + \delta; \end{cases} \quad (1)$$

где k – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура. Значение δ выбрано равным $\delta \approx D/20$.

Липкость мицеллы зависит от многих параметров, например, от температуры, кислотности сыворотки, состояния поверхностного слоя и др. Мы ограничимся феноменологическим представлением взаимодействия, основанным на приближении, использованном в работе [5]:

$$\epsilon = \frac{\epsilon_{HF}}{(\text{pH} - \text{pH}_C)^q}, \quad \text{pH} > \text{pH}_C, \quad (2)$$

где ϵ_{HF} – величина, определяемая гидрофобностью поверхности мицеллы, а pH_C – критическое значение pH , примерно соответствующее изоэлектрической точке мицеллы; q – модельный параметр.

Для определения ϵ_{HF} воспользуемся следующими соображениями. При понижении температуры примерно до 10 °С гидрофобные связи не образуются. Как следует из данных работы [4], при температуре около 30 °С для мицелл среднего размера эта величина близка к единице. При возрастании температуры от 30 до 100 °С интенсивность гидрофобных взаимодействий увеличивается примерно на 50–100 % [6] и, кроме того, она пропорциональна площади гидрофобной поверхности. Если учесть, что в диапазоне температур от 70 до 100 °С интенсивность гидрофобных взаимодействий в белковых системах изменяется достаточно медленно, можно ограничиться следующим простым выражением:

$$\varepsilon_{HF} = \varepsilon_0 \frac{S^2}{S_m^2} = \varepsilon_0 \frac{D^2}{D_m^2}, \quad (3)$$

где ε_0 – безразмерная модельная величина порядка единицы; $S = \pi D^2$ – площадь поверхности мицеллы, а индекс m относится к значениям площади и диаметра мицелл, соответствующим максимуму функции распределения мицелл по размерам $f(D)$.

В качестве распределения по размерам выбрано лог-нормальное распределение, показанное на рис. 2, которое достаточно хорошо соответствует реальному [5]:

$$f(D) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\lambda D} \exp\left[-\left(\frac{\ln(D/D_m)}{\sqrt{2}\lambda}\right)^2\right], \quad (4)$$

где $D_m = 200$ нм; $\lambda = 0,1$.

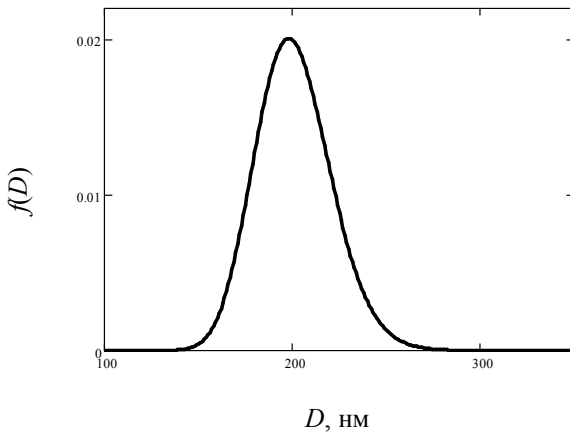


Рис. 2. Распределение мицелл казеина по размерам

В случае термокислотной коагуляции значение pH_C во многом определяется количеством осажденных на поверхности мицеллы денатурированных сывороточных белков.

Как следует из данных, полученных в работе [3], степень агрегации мицелл казеина с сывороточными белками практически пропорциональна степени денатурации последних. Денатурацию сывороточных белков при постоянной температуре можно в первом приближении считать реакцией первого порядка. В этом случае зависимость степени денатурации от времени при фиксированной температуре T описывается функцией вида:

$$\alpha(t) = 1 - e^{-\kappa(T)t}, \quad (5)$$

где $\kappa(T)$ – константа скорости денатурации при температуре T .

Результат моделирования по формуле (5) показан на рис. 3. Данные приведены для шести различных температур: 75, 80, 85, 90, 95 и 100 °C по порядку, начиная с нижней кривой. Из рисунка видно, что кинетика первого порядка вполне адекватно описывает процесс денатурации сывороточных белков в выбранном диапазоне температур.

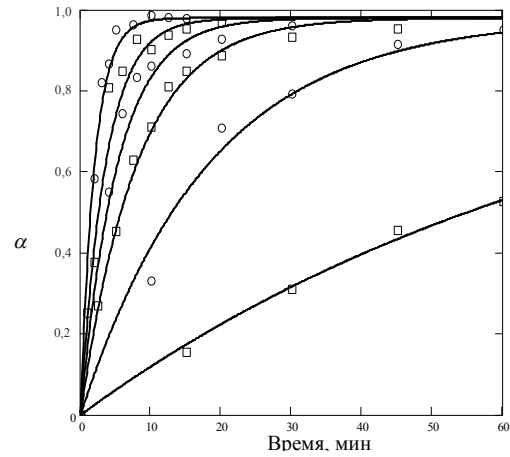


Рис. 3. Зависимость степени денатурации сывороточных белков от времени: точки – эксперимент [3]; линии – результат моделирования

Полученные в результате подбора к экспериментальным данным значения констант скорости денатурации при различных температурах были использованы для моделирования температурной зависимости денатурации. При моделировании предполагалось, что при температуре ниже 70 °C сывороточные белки практически не денатурируют. В результате получена следующая формальная модельная зависимость:

$$\kappa(T) = \kappa_0 (T - 343)^2, \quad (6)$$

где $\kappa_0 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$. Эта зависимость показана на рис. 4.

Принимая во внимание, что изоэлектрическая точка казеиновых мицелл увеличивается после длительной термической обработки от значения pH_i до pH_f , а также учитывая, что количество осажденных сывороточных белков пропорционально степени их денатурации, в линейном приближении получим следующее модельное выражение для критического значения pH :

$$pH_C = pH_i + \alpha (pH_f - pH_i), \quad (7)$$

где α – коэффициент пропорциональности.

Как видно из рис. 2, в молоке присутствует заметное количество мицелл, размер которых существенно превышает средний. В соответствии с выражениями (2) и (3) такие мицеллы при термокислотном свертывании будут обладать пониженной коллоидной стабильностью, а следовательно, коагулировать при более низких температурах или при более высоких значениях pH . Этот вывод полностью соответствует данным работы [3].

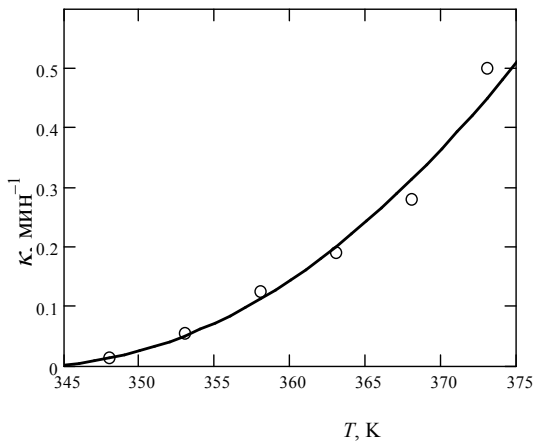


Рис. 4. Зависимость константы скорости денатурации сывороточных белков от температуры: точки – значения, полученные при моделировании кривых на рис. 2; линия – результат моделирования по формуле (4)

При вычислении pH в формуле (2) необходимо учитывать зависимость степени диссоциации слабых электролитов от температуры. Как уже отмечалось выше, зависимостью степени диссоциации большинства слабых органических кислот в области температур 70–100 °С можно пренебречь. Исключение составляет вода, большая величина и положительный знак энтальпии диссоциации которой приводят к существенному возрастанию с температурой ее константы диссоциации. Поэтому необходимо учесть дополнительные протоны, возникающие при высокой температуре. Для чистой воды pH при изменении температуры в диапазоне от 0 до 100 °С с достаточной степенью точности можно представить следующей формальной зависимостью [4]:

$$\text{pH}(T) = \frac{1}{2} \left(\frac{4471}{T} - 6,09 + 0,017 \cdot T \right) \quad (8)$$

Тогда дополнительная концентрация протонов за счет повышения температуры:

$$[H^+]_T = 10^{-\text{pH}(T)} - 10^{-7} \quad (9)$$

Концентрация протонов после внесения молочной кислоты:

$$[H^+]_0 = 10^{-\text{pH}_0} \quad (10)$$

где pH_0 – кислотность молока после внесения молочной кислоты.

Окончательно в формулу (2) должна быть подставлена следующая величина pH:

$$\text{pH} = -\lg([H^+]_0 + [H^+]_T) \quad (11)$$

Будем считать, что необратимая агрегация мицелл происходит, когда глубина ямы достигает величины порядка $3kT$. С формальной точки зрения это означает, что вероятность остаться в контакте примерно в 20 раз превышает вероятность распада образовавшейся пары мицелл. При меньших значениях глубины ямы «слипания» мицелл обратимы и сказываются лишь на увеличении эффективной динамической вязкости.

Методика расчета заключается в выполнении следующих шагов. Прежде всего вычисляем для выбранной температуры свертывания (75, 85 или 95 °С) значение pH по формулам (8), (9), (10) и (11). Затем по формулам (2), (3), (5), (6) и (7) находим значение D_c , для которого выполняется условие $\varepsilon = 3$. Тогда для всех мицелл с размерами $D > D_c$ выполняется условие $\varepsilon > 3$, то есть они способны коагулировать.

Массу мицелл, размер которых превышает D_c , можно рассчитать с помощью функции распределения (4):

$$m_{D_c} = N_{D_c} \frac{\pi}{6} \int_{D_c}^{\infty} D^3 \rho(D) f(D) dD,$$

где $N_{D_c} = N_0 \exp\left(\int_{D_c}^{\infty} f(D) dD\right)$ – число мицелл, размер которых превышает D_c .

Следовательно, степень коагуляции определяется соотношением

$$\beta = \frac{m_{D_c}}{m} = \frac{\exp\left(\int_{D_c}^{\infty} f(D) dD\right) \int_{D_c}^{\infty} D^3 \rho(D) f(D) dD}{\exp\left(\int_0^{\infty} f(D) dD\right) \int_0^{\infty} D^3 \rho(D) f(D) dD}.$$

В этом выражении учтено, что плотность мицелл $\rho(D)$ может зависеть от их размеров. Действительно, частицы больших размеров, заметно превышающих средний размер мицелл, обычно представляют собой достаточно рыхлые образования, возникающие вследствие агрегации частиц меньших размеров. Поэтому их плотность может быть заметно ниже плотности мелких частиц.

Для сравнения расчетных данных с экспериментом учтем два дополнительных фактора.

Во-первых, коагуляцию, возникающую при вливании коагулянта в раствор. С этой целью будем считать, что количество прокоагулировавших из-за локального понижения pH белков пропорционально объему внесенного коагулянта: $m_{\text{лок}} = a \cdot V_{\text{коаг}}$, где a – коэффициент пропорциональности.

Во-вторых, так как экспериментальные данные содержат информацию о полном содержании белков, включая сывороточные, необходимо учесть также степень коагуляции последних: $m_{\text{сыв}} = \alpha \cdot m_{\text{сыв}}^{(0)}$, где $m_{\text{сыв}}^{(0)}$ – масса сывороточных белков в молоке. При расчетах используем соотношение: $m_{\text{сыв}}^{(0)} = 0,3 m_{\text{каз}}$.
 $= 0,3 \exp\left(\int_0^{\infty} f(D) dD\right) \frac{\pi}{6} \int_0^{\infty} D^3 \rho(D) f(D) dD$ (т.е. сывороточные белки по массе составляют примерно 30 % от массы казеинов).

Таким образом:

$$\beta = \frac{\left(\exp\left(\int_{D_c}^{\infty} f(D) dD\right) + 0,3\alpha \right) \int_{D_c}^{\infty} D^3 \rho(D) f(D) dD + a \cdot V_{\text{коаг}}}{\left(\exp\left(\int_0^{\infty} f(D) dD\right) + 0,3\right) \int_0^{\infty} D^3 \rho(D) f(D) dD + a \cdot V_{\text{коаг}}} \quad (12)$$

При расчетах в качестве плотности использовалась функция $\rho = \rho_0(1 - \exp(-4D_m/D))$, коагуляция, возникающая при вливании коагулянта в раствор, учитывалась параметром, характеризующим изменение массы коагулянта в пересчете на одну мицеллу при внесении 1 мл раствора кислоты: $a = 10^{-17}$ г/мл.

Результаты и выводы

На рис. 5 приведены результаты расчетов по описанной выше схеме. Там же для сравнения представлены соответствующие экспериментальные данные, рассчитанные по формуле

$$\beta = \frac{P_0 - P}{P_0},$$

где β – степень коагуляции; P_0 – массовая доля белков в исходном обезжиренном молоке; P – массовая доля белков в ЦП.

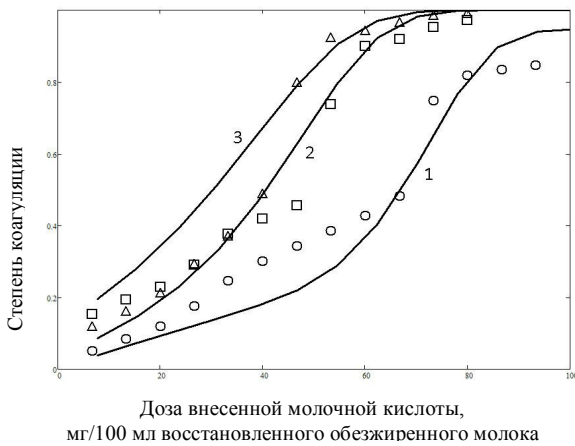


Рис. 5. Зависимость степени коагуляции молока от дозы внесенной молочной кислоты при различных температурах свертывания. Экспериментальные кривые: \circ – 75 °C; \square – 85 °C; Δ – 95 °C. Расчетные кривые: 1 – 75 °C; 2 – 85 °C; 3 – 95 °C

Параметры модели, использованные для расчета: $\varepsilon_0 = 2,5$; $q = 2$; $pH_i = 4,8$; $pH_f = 5,1$.

Вид экспериментальных зависимостей можно объяснить следующим образом. На всех трех кривых зависимости степени коагуляции от дозы внесенной кислоты можно выделить три явно различных диапазона кислотности, соответствующих различным интенсивностям агрегативных процессов термокислотной коагуляции.

Первый диапазон характеризуется умеренным ростом степени коагуляции и соответствует избирательной агрегации менее стабильных белковых мицелл, которые при данных значениях pH и температуры теряют устойчивость. Протекающий при этом процесс может быть условно назван избирательной

коагуляцией. Конечно, выделить его в чистом виде в данном типе экспериментов не представляется возможным из-за сопутствующей коагуляции, вызванной локальным внесением кислоты.

Следующий диапазон изменения кислотности соответствует быстрой массовой коагуляции мицелл казеина и связанных с ними сывороточных белков. Левая граница этого диапазона определяется дозой внесенной кислоты, после увеличения которой наблюдается резкое повышение степени коагуляции. Правой границей служит минимальное значение концентрации кислотообразующего агента, соответствующее явной коагуляции.

Внесение коагулянта в количествах больших, чем необходимо для явной коагуляции, приводит к относительно медленной остаточной коагуляции молочных белков, что соответствует третьему диапазону кислотностей на представленных зависимостях.

Указанные типы коагуляции проявляются и на теоретических кривых. Особенно хорошо они заметны на кривой 1. Отметим, что, несмотря на достаточно хорошее соответствие модельных и экспериментальных данных, вряд ли можно утверждать, что модель абсолютно адекватно отражает физико-химические особенности процесса термокислотного свертывания молока. Дело в том, что полный набор параметров включает около десятка феноменологических величин и достаточно хорошую подгонку к эксперименту можно сделать при их неоднозначном выборе.

Одним из выводов, основанных на исследовании влияния различных параметров на вид модельных кривых, является требование к ширине распределения мицелл по размерам: она должна быть относительно небольшой. Это означает, что зависимость потенциальной энергии взаимодействия (липкости мицелл) от их размеров не должна быть существенной.

Другая особенность – не столь значительное, как ожидалось, смещение изоэлектрической точки в область более высоких значений pH.

Все это указывает на необходимость пересмотра модели для потенциала гидрофобного взаимодействия мицелл, основанного в приведенной нами модели на традиционных представлениях об особенностях термокислотной коагуляции. Одним из подходов к решению этой проблемы, возможно, является предположение о том, что величина ε_{HF} , скорее всего, определяется также взаимодействием ионов кальция с мицеллярными казеинами [7]. Такое предположение могло бы, например, объяснить и поразительное сходство термокислотной и термокальциевой коагуляции молока. Вполне вероятно, что именно уточнение механизма влияния кальция на стабильность коллоидной системы молока во время его свертывания при повышенной температуре станет предметом наших дальнейших исследований.

Список литературы

1. Anema, S.G. Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size / S.G. Anema, Y. Li // Journal of Dairy Research. – 2003. – V. 70. – P. 73–83.
2. O'Connell, J.E. The Two-Stage Coagulation of Milk Proteins in the Minimum of the Heat Coagulation Time-pH Profile of Milk: Effect of Casein Micelle Size / J.E. O'Connell, P.F. Fox // Journal of Dairy Science. – 2000. – V. 83. – P. 378–386.

3. Lucey, J.A. Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk / J.A. Lucey, C.T. Teo, P.A. Munro, H. Singh // *Journal of Dairy Research*. – 1997. – V. 64. – P. 591–600.
4. Харнед, Г. Физическая химия растворов электролитов / Г. Харнед, Б. Оуэн. – М.: Издательство иностранной литературы, 1952. – 628 с.
5. De Kruif, C.G. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation // *Journal of Dairy Science*. – 1998. – V. 81. – P. 3019–3028.
6. Tsai, C.J. The hydrophobic effect: a new insight from cold denaturation and a two-state water structure / C.J. Tsai, J.V. Maizel Jr, R. Nussinov // *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2002. – V. 37(2). – P. 55–69.
7. Остроумова, Т.Л. Компьютерное моделирование кислотно-сычужной коагуляции молока / Т.Л. Остроумова, Е.Б. Асташенко, А.М. Осинцев, В.И. Брагинский // *Хранение и переработка сельхозсырья*. – 2009. – № 3. – С. 13–14.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

Могилевский государственный университет продовольствия,
212027, Республика Беларусь, г. Могилев, пр-т Шмидта, 3.
Тел./факс: (375 222) 48-00-11
e-mail: mgup@mogilev.by

SUMMARY

L.A. Ostroumov, A.M. Osintsev, I.A. Smirnova, M.A. Glushakov, A.L. Chebotarev

Phenomenological model of thermoacid coagulation of skim milk proteins

Being based on experimental data concerning thermoacid coagulation of skim milk a model is offered considering influence of milk acidity, micelle size distribution and whey protein denaturation degree dependent on temperature and thermal process duration. The model uses phenomenological approach to describe interactions between the casein micelles being covered with the denaturated whey proteins as a result of thermal process. The comparison of experimental data with the results of modeling allowed to check the model adequacy and to reveal values and weaknesses of the used phenomenological approach.

Casein micelles, whey proteins, thermoacid coagulation, sticky hard spheres.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

Mogilev State University of Food Technologies
3, Prospekt Shmidta, Mogilev, 212027, Republic of Belarus
Phone/Fax: +375(222) 48-00-11
e-mail: mgup@mogilev.by

