

Міністерство освіти і науки України  
Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя  
(повне найменування вищого навчального закладу)

Факультет інженерії машин, споруд та технологій  
(назва факультету)

Кафедра харчової біотехнології і хімії  
(повна назва кафедри)

ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА  
до дипломної роботи

**магістр**

(освітній ступінь)

на тему:

Отримання біологічно активних

фосфопептидів з протеїнів молока

Виконав: студент

VI

курсу,

групи

МЛмз-61

спеціальності

181 «Харчові технології»

(шифр і назва спеціальності)

Процик Д.І.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Керівник

(підпис)

Сторож Л.А.

(прізвище та ініціали)

Нормоконтроль

(підпис)

Покотило О.С.

(прізвище та ініціали)

Рецензент

(підпис)

Стадник І.Я.

(прізвище та ініціали)

Міністерство освіти і науки України  
Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя  
(повне найменування вищого навчального закладу)

Факультет інженерії машин, споруд та технологій

Кафедра харчової біотехнології і хімії

Освітній ступінь магістр

Напрямок підготовки \_\_\_\_\_

(шифр і назва)

Спеціальність 181 «Харчові технології»

(шифр і назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри Проф. Покотило О.С.

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_\_ р.

**ЗАВДАННЯ**  
**НА ДИПЛОМНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ**

***Процика Дениса Івановича***

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи

***Отримання біологічно активних  
фосфопептидів з протеїнів молока***

Керівник роботи

***Сторож Людмила Анатоліївна, к.т.н., доцент***

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

Затверджені наказом по університету від «30» серпня 2019 року № 4/7 – 771

2. Термін подання студентом роботи

грудень 2019 р.

3. Вихідні дані до роботи

***Спеціальна, періодична література та нормативна  
документація з питань досліджень. Методики та методи досліджень стандартні  
та уніфіковані.***

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

***Провести літературний та патентний пошук щодо біологічної активності пептидів  
з протеїнів молока. Отримати протеїни – попередники біоактивних фосфопептидів.  
Виділити фосфопептиди з гідролізатів казеїну. Охарактеризувати фосфопептиди за  
молекулярною масою.***

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень, слайдів)

***Таблиці, графіки, схеми, діаграми***

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

## 7. Дата видачі завдання

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1	Аналітичний огляд та патентний пошук інформації відповідно до теми дипломної роботи	1.09.2019-22.09.2019	
2	Складання схеми досліджень	23.09.2019-29.09.2019	
3	Опрацювання методики досліджень	30.09.2019-06.10.2019	
4	Виконання експериментальних досліджень (Частина I)	07.10.2019-28.10.2019	
5	Завершення експериментальних досліджень (Частина II)	29.10.2019-01.12.2019	
6	Збір інформації до виконання розділу «Екологія» та «Охорона праці і безпека в надзвичайних ситуаціях»	02.12.2019-08.12.2019	
7	Закінчення написання розділів	10.12.2019	
8	Подання дипломної роботи до захисту	20.12.2019	

Студент

\_\_\_\_\_ (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

\_\_\_\_\_ (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

## АНОТАЦІЯ

Процик Д.І. Отримання біологічно активних фосфопептидів з протеїнів молока. – Рукопис.

Дослідження на здобуття освітнього ступеня «магістр» зі спеціальності 181 «Харчові технології». – Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Тернопіль, 2019.

Дипломна робота присвячена виділенню біоактивних фосфопептидів з гідролізатів фосфопроетінів коров'ячого молока, отриманих за дії на них ферментного препарату тваринного походження «Панкреатин». Протеоліз фосфопроетінів молока проводили в умовах, що моделюють процеси їх перетворення в шлунково-кишковому тракті. Гель-фільтрацією на сефадексах встановлено молекулярні маси отриманих фосфопептидів. Встановлено, що основна їх частка за цим показником відповідає відомим природним фосфопептидам.

**Ключові слова:** протеїни молока, протеоліз, фосфопептиди, гель-фільтрація.

## ANNOTATION

Protsyk D.I. Bioactive phosphopeptides obtaining from milk proteins. – Manuscript.

Rasearch for obtaining an educational degree «Master» in specialty 181 «Food Technologies». – Ternopil Ivan Puluj National Technical University, 2019.

The master's work is devoted to the isolation of bioactive phosphopeptides from cow's milk phosphoproteins hydrolysates, obtained by the action of animal origin enzyme «Pancreatin». Milk phosphoproteins proteolysis was performed in the conditions which are modeling the processes of their digestion in the gastrointestinal tract. The molecular masses of the obtained phosphopeptides were established by gel filtration on Sephadexes. It is confirmed that the major part of them according to this indicator corresponds to known natural phosphopeptides.

**Key words:** milk proteins, proteolysis, phosphopeptides, gelfiltration.

					<i>ДР 18-550.00.00.000 ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Анотація</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Процик Д.І.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Консульт.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Затв.</i>		<i>Покотило</i>						
						<i>ТНТУ, ФМТ, зр. МЛмз-61</i>		

## ЗМІСТ

Вступ

Мета і завдання роботи.....

1. Огляд літератури.....

1.1. Природні біологічно активні пептиди.....

1.2. Біологічно активні пептиди з протеїнів молока.....

1.3. Біологічно активні казеїнові фосфопептиди.....

1.4. Вплив казеїнових фосфопептидів на засвоєння мінеральних речовин..

1.5. Отримання білкових гідролізатів.....

2. Матеріали і методи досліджень.....

3. Власні дослідження.....

3.1. Результати власних досліджень та їх обговорення.....

3.2. Розрахунок економічної ефективності проведених досліджень.....

4. Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях .....

5. Екологія.....

Висновки і пропозиції виробництву.....

Список використаної літератури.....

Додатки.....

Апробація результатів дипломної роботи

					<i>ДР 18-550.00.00.000 ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Процик Д.І.</i>			<i>Зміст</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркциф</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Консульт.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Затв.</i>		<i>Покотило О.С.</i>				<i>ТНТУ, ФМТ, зр. МЛмз-61</i>		

## ВСТУП

**Актуальність досліджень.** Протеїни у харчуванні людини відіграють важливу роль, оскільки вони є джерелом природних незамінних амінокислот, разом з тим спостерігається їх дефіцит в харчових продуктах.

Відкриття в складі природних харчових протеїнів біологічно активних пептидів з широким спектром біологічної дії призвело до суттєвих змін в розумінні ролі протеїнів в харчуванні людини. Такі біологічно активні пептиди можуть утворюватися в процесі нормального травлення і відігравати важливу роль не лише в забезпеченні організму амінокислотами, але й в регуляції фізіологічних функцій організму. Зокрема, вони позитивно впливають на нервову та імунну системи, систему згортання крові, можуть регулювати артеріальний тиск. Серед інших особливої уваги заслуговують біоактивні фосфопептиди. Ці пептиди відіграють важливу роль в мінеральному обміні, а саме в засвоєнні двовалентних іонів  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  та інших. Найбільш важливими властивостями казеїнових фосфопептидів (КФП) є їхня здатність зв'язувати кальцій і переводити його в розчинну форму. Є ряд зарубіжних публікацій, де описано важливість фосфопептидів і зроблені спроби їх виділення. В деяких країнах фосфопептиди використовують як добавки до продуктів харчування. В Україні до сьогоднішнього дня не розроблено методикау виділення таких біоактивних фосфопептидів. Виробництво таких фосфопептидів могло б призвести до створення нових функціональних продуктів, які так необхідні для населення України.

**Метою даної роботи** було виділити біологічно активні фосфопептиди з протеїнів казеїнового комплексу.

					<i>ДР 18-550.00.00.000 ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Вступ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Процик Д.І.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Консульт.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Затв.</i>		<i>Покотило О.С.</i>						
						<i>ТНТУ, ФМТ, зр. МЛмз-61</i>		







## МЕТА І ЗАВДАННЯ РОБОТИ

Метою даної роботи було виділити біологічно активні фосфопептиди з протеїнів казеїнового комплексу.

Для досягнення поставленої мети необхідно виконати наступні завдання:

1. Провести літературний та патентний пошук щодо біологічно активних пептидів з протеїнів молока, шляхів їх утворення.
2. Виділити протеїни – попередники біологічно активних пептидів з коров'ячого молока.
3. Провести протеоліз казеїнового субстрату ферментним препаратом тваринного походження – панкреатином і виділити казеїнові фосфопептиди.
4. Охарактеризувати молекулярну масу отриманих біологічно активних фосфопептидів.

					<i>ДР 18-550.00.00.002 ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Мета і завдання роботи</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркциві</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Процик Д.І.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Консульт.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Затв.</i>		<i>Покотило О.С.</i>						
						<i>ТНТУ, ФМТ, гр. МЛмз-61</i>		

# 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

## 1.1. Природні біологічно активні пептиди

Пептиди, а також поліпептиди виступають як полімерами амінокислот, у яких вони з'днані між собою пептидними зв'язками в ланцюги різної довжини [39, 45]. Ці ланцюги можуть містити від двох до декількох тисяч амінокислотних залишків. Поняття «пептид» запропонував Е. Фішер. Саме він розробив загальний метод синтезу пептидів.

Пептидний або амідний зв'язок виникає при взаємодії  $\alpha$ -аміногрупи однієї амінокислоти і  $\alpha$ -карбоксихільної групи іншої амінокислоти. Він дуже міцний, і за нормальних умов (37°C, нейтральне значення рН), не розривається вільно. Пептидний зв'язок руйнується при дії спеціальних протеолітичних ферментів, а саме протеаз і пептидгідролаз [7, 11, 33].

До складу молекул поліпептидів, крім амінокислот, можуть входити неамінокислотні фрагменти, наприклад вуглеводні залишки [60].

У пептидах кількість амінокислот сильно змінюється. Залежно від цього пептиди поділяють на:

- олігопептиди – це сполуки, молекули яких містять до десяти амінокислотних залишків. На кількість амінокислот у складі пептидів може вказувати їх назва, так дипептид містить 2 амінокислоти, трипептид – 3 і т.д.;
- поліпептиди – це сполуки, до складу яких входить більше десяти амінокислот.

Щодо якісного складу серед пептидів розглядають:

- гомомерні пептиди – це сполуки, що містять винятково з амінокислотних залишків;
- гетеромерні пептиди у своєму складі містять також небілкові компоненти.

					<i>ДР 18-550.00.00.000 ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Процик Д.І.</i>			<i>Огляд літератури</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Консульт.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Затв.</i>		<i>Покотило О.С.</i>						
						<i>ТНТУ, ФМТ, гр. М/Мз-61</i>		

В основі пептидів і поліпептидів знаходиться ланцюг атомів, які чергуються, утворюючи пептидний остов:  $-\text{NH}-\text{CH}-\text{OC}$ . Фрагмент  $-\text{CH}-$  разом з амінокислотним радикалом утворює групу атомів  $-\text{NH}-\text{C}(\text{R}_1)\text{H}-\text{OC}-$ . Її прийнято називати амінокислотним залишком. У пептидах N-кінцевий амінокислотний залишок має вільну  $\alpha$ -аміногрупу  $-\text{NH}$ , C-кінцевий амінокислотний залишок – вільну  $\alpha$ -карбоксильну групу  $\text{OC}-$ .

Пептиди відрізняються між собою амінокислотним складом. А в тому випадку, коли до складу їх входить однаковий набір амінокислот мають справу із різним їх розташування. Наприклад:

Про-Сер-Фен-Ала-Глі – Глі-Ала-Фен-Сер-Про.

Пори однаковий амінокислотний склад в такому випадку пептиди будуть відрізнятися своїми властивостями.

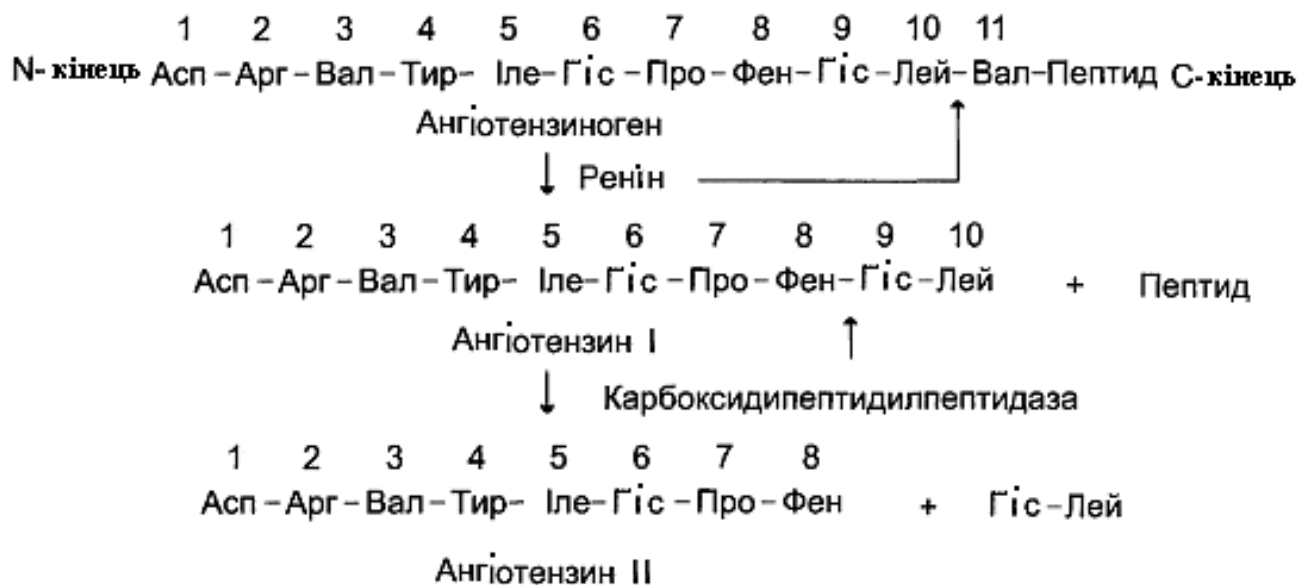
Крім того, що пептиди можна синтезувати, вони мають природне походження і звичайно викликають певний інтерес, у зв'язку з тим що, наприклад, в організмі людини беруть участь у регулюванні біологічних процесів, володіють високою фізіологічною активністю [7]. Природні пептиди також відрізняються за кількістю амінокислот, яких у їх у структурі може бути від трьох до п'ятдесяти.

Прикладом найменших природніх пептидів є трипептид глутатіон. В свою чергу енкефалін – пептид, утворений п'ятьма амінокислотами. Разом з тим більшість біологічно активних пептидів (зокрема пептидів, виявлених в організмі людини) складаються більше, ніж з десять амінокислот. Серед них нейропептид Y, який виступає регулятором апетиту, містить 36 амінокислот.

Як правило, пептидні гормони синтезуються з неактивних протеїнових попередників, в яких певні пептидні зв'язки руйнуються специфічними протеолітичними ферментами руйнують. Зокрема, ангіотензин II – це октапептид, який утворюється з великого протеїну плазми крові – «ангіотензиногену» в наслідок поетапної дії двох протеолітичних ферментів.

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

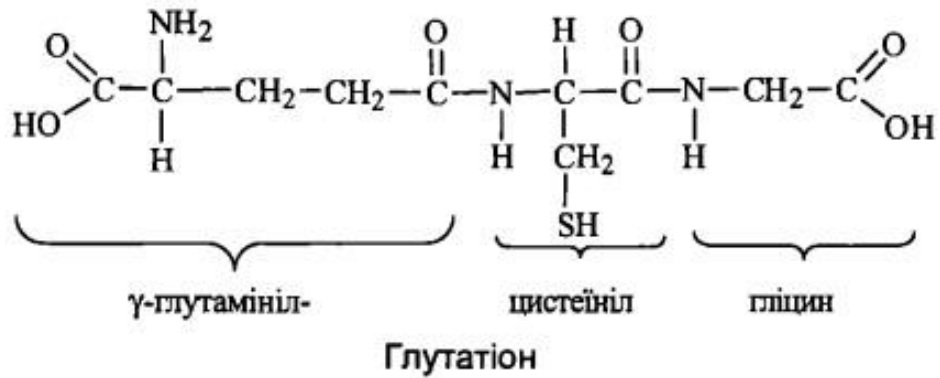
Першим є протеолітичний фермент ренін, який від ангіотензиногену з N-кінця відщеплює пептид довжинго в 10 амінокислот, а саме ангіотензин I. Після цього ще один протеолітичний фермент «карбоксидипептидил-пептидаза» від C-кінця ангіотензину I відщеплює 2 амінокислоти, що зумовлює утворення біологічно активного ангіотензину II, який є важливим у регулюванні водно-сольово обміну та артеріального тиску [20].



Особливим для біологічно активних пептидів є наявність пептидних зв'язків, котрих немає у протеїнів. Такий зв'язок утворюється якраз у глутатіоні, до складу якого входить глутамат, цистеїн і гліцин. У ньому N-кінцева амінокислота, якою є глутамат, сполучена з цистеїном через  $\gamma$ -карбоксильну групу свого бічного радикала, а не через  $\alpha$ -карбоксильну групу [23].

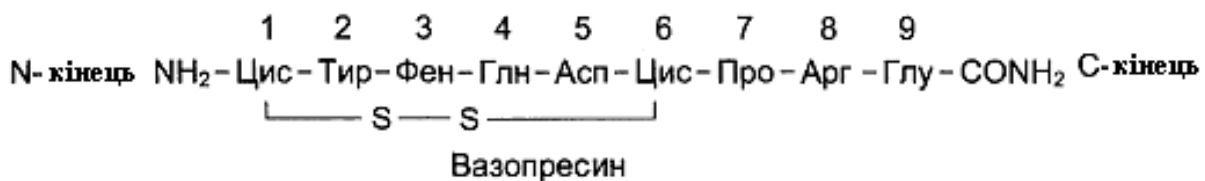
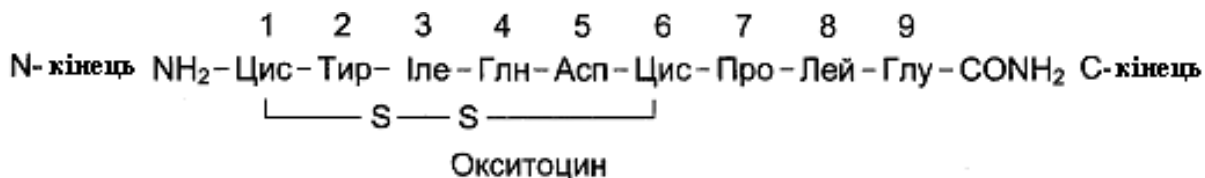
Глутатіон – значно поширений і вивчений пептид організму людини. Він в окисно-відновних реакціях використовується як донор і акцептор водню та необхідний для роботи ряду ензимів [29].

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		



Крім природи зв'язку на функцію пептидів впливає первинна структура, як зазначалося вище. Саме від такої послідовності залежать й функції пептидів. Наприклад, ангіотензин I за структурою дуже схожий на ангіотензин II (відмінністю є те, що він має дві додаткові амінокислоти з С-кінця). Але при цьому не володіє біологічною активністю [62]. Необхідно зазначити, що зміна в амінокислотному складі є причиною втрати одних біологічних властивостей і появи нових. Прикладом цього є особливості в структурі і властивостях двох пептидів *окситоцину* і *вазопресину* [7], які утворюються у гіпоталамусі при частковому протеолізу протеїнів-попередників. Далі по нервових волокнах з гіпоталамусу зазначені гормони всередині так званих «секреторних гранул» рухаються до нервових закінчень аксонів, котрі містяться у в задній частині гіпофізі. Після дії специфічних збуджень гормони вивільняються у кров. Окситоцин і вазопресин подібні за складом (містять по 9 амінокислотних залишків, з яких 7 є ідентичними) Попри подібність, ці гормони сильно різняться за своєю фізіологічною дією. Зокрема, окситоцин виділяється в кров жінки у період грудного вигодовування дитини, що спричиняє скорочення міоепітеліальних клітин в протоках молочної залози, зумовлюючи секрецію молока [20]. Також окситоцин діє на гладкі м'язи матки під час народження дитини, спричиняє її скорочення. Основна функція вазопресину – збільшення реабсорбції води в нирках, що сприяє зменшенню об'єму крові або артеріального тиску. В зв'язку з цим його ще називають антидіуретичним.

						Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		



Відкриті та досліджені на даний час природні пептиди, зазєжно від їх основної фізіологічної дієї, можна класифікувати на групи:

- пептиди з гормональною активністю (глюкагон, окситоцин, вазопресин, меланоцитстимулювальний гормон та ін.);
- регулятори артеріального тиску і тонузу судин (ангіотензин II, брадикінін);
- регулятори процесів травлення (холецистокінін, гастрин, вазоінтестинальний пептид та ін.);
- регулятори апетиту (β-ендорфіни, лептин, нейропептид Y);
- пептиди зі знеболювальним ефектом (енкефаліни та ендорфіни);
- регулятори вищої нервової діяльності, в біохімічних процесах, пов'язаних із механізмами сну, навчання, пам'яті, виникнення почуття страху і т.д.;
- пептиди-антиоксиданти (глутатіон).

Пептиди, як сильні біорегулятори можуть використовувати в ролі лікарських препаратів [3, 5, 16]. Проте їх швидке руйнування в організмі є основною перешкодою для терапевтичного використання.

Одним із найважливіших напрямів досліджень є не тільки вивчення структури пептидів, але й отримання можливих синтетичних аналогів природних пептидів з метою направленої зміни в їх структурі та функціях. Наприклад, синтезований пептид «1-дезаміно-8-D-аргінін-вазопресин» (ДАВ). У структурі цього пептиду (якщо порівнювати із вазопресином) відсутня N-кінцева аміногрупа, а замість L-аргініну в положенні «8» розташований D-аргінін. Цей синтезований пептид володіє лише антидіуретичною активність, є хімічно стійким і при введенні в організм може викликати тривалу

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

реакцію. Штучний аналог гормону в порівнянні із природним володіє більшою ефективністю під час лікування гормональної недостатності [7].

## 1.2. Біологічно активні пептиди з протеїнів молока

Одним з найважливіших джерел біологічно активних пептидів є молоко і молочні продукти [9, 27, 54]

Біологічно активні пептиди з протеїнів молока досліджувалися в наступних умовах їх утворення:

- розщеплення білків молока *in vitro* специфічними протеїназами;
- перетравлення *in vivo* під впливом шлунково-кишкових протеїназ/пептидаз;
- утворення при дії бактеріальних протеїназ та пептидаз при виробництві молочних продуктів.

Окремі предстаники досліджених біоактивні пептиди з білків молока наведені в таблиці 1.1

Таблиця 1.1

Біоактивні пептиди з протеїнів молока [69, 66]

Назва пептиду	Протеїни-попередники	Біологічні активність
Казоморфіни	$\alpha_{S1}$ -казеїн і $\beta$ -казеїн	Опіоїдні агоністи
Казокініни	$\alpha_{S1}$ -казеїн і $\beta$ -казеїн	Опіоїдні антагоністи
Казоксини	$\kappa$ -казеїн	Інгібітори АПФ*
Імунопептиди	$\alpha_{S1}$ -, $\beta$ - і $\kappa$ -казеїни	Імуномодуляторні дія
Казоцидин	$\alpha_{S2}$ -казеїн	Антимікробна дія
Ізрацидин	$\alpha_{S1}$ -казеїн	Антимікробна дія
Казоплателіни	$\kappa$ -казеїн	Антитромботична дія

*Огляд літератури*

Арк.

Змн. Арк. № докцм. Підпис Дата

Фосфопептиди	$\alpha_{S1}$ -, $\alpha_{S2}$ -, $\beta$ - і $\kappa$ -казеїни	Зв'язування мінералів
--------------	---	-----------------------

### ***Опіюїдні пептиди***

Опіюїдні пептиди можуть проявляти як агоністичну, так і антагоністичну активність. Опіюїдні пептиди, тобто ліганди опіюїдних рецепторів ( $\mu$  -,  $\delta$ - або  $\kappa$ -типу), що мають агоністичну активність, походять від різних молочних протеїнів і виявляють інгібіторну налоксон-опіюїдну активність як у дослідженнях рецепторів, так і під час біологічних досліджень [41, 48]. Ліганди опіюїдних рецепторів казеїнового походження віносяться до екзогенних атипових опіюїдних пептидів. Атипові опіюїдні пептиди, з протеїнів молока, мають N-кінцеві послідовності, що відрізняються від послідовностей «типових» ендogenous опіюїдних пептидів. Основні екзогенні опіюїдні пептиди,  $\beta$ -казоморфіни, є фрагментами  $\beta$  -казеїну (f 60-70) і охарактеризовані як  $\mu$  -тип лігандів [47, 68 ].

Крім опіюїдної активності казоморфіни можуть впливати на різні обмінні процеси в організмі (ліпідний обмін, секреція гормонів та ін.).

### ***Пептиди з антигіпертензивною активністю***

Серед пептидів з протеїнів молока важливими є пептиди, що здатні гальмувати дію ангіотензин-перетворюючого ферменту (АПФ) [41]. Цей фермент був класично пов'язаний із системою ренін-ангіотензину, яка регулює периферичний кров'яний тиск. АПФ – це цинк-залежна карбоксидипептидаза. Фермент може підвищувати артеріальний тиск, перетворюючи ангіотензин I в потужний судинозвужувальний агент, ангіотензин II. АПФ також може каталізувати деградацію брадикініну, судинорозширювального пептиду та енкефалінів. Тому очевидно, що інгібуванням АПФ можна викликати антигіпертензивну дію, і як наслідок зниження ангіотензину II та супутнього збільшення активності брадикініну. АПФ є багатофункціональним ферментом, оскільки його інгібування може

										Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата	<i>Огляд літератури</i>					



призвести до антигіпертензивного, імуностимулюючого та нейроактивного ефекту. Інгібітори АПФ з казеїнів вперше виділили в 1982 р. Маруяма і співавт. з трипсинового гідролізату загального казеїну коров'ячого молока .

Антигіпертензивні властивості пептидів, утворених з протеїнів казеїнового комплексу молока, залежать від здатності цих пептидів досягати тканин-мішеней, долаючи при цьому природні бар'єри (дія ендотеліальних та циркуляторних пептидаз, можливість проникнення в кров'яне русло). У зв'язку з цим резистентність до розщеплення пептидазами є необхідною передумовою за перорального чи внутрішньовенного використання.

Фізіологічні ефекти казокінінів, уведених перорально, дають підстави вважати, що такі пептиди здатні в активній формі абсорбуватися в кишечнику. Це підтверджується даними про те, що ди- і трипептиди легше всмоктуються в кишечнику, ніж амінокислоти чи більші олігопептиди. Пептиди, які містять пролін, є стійкішими до деградації травними ензимами, а пептиди, які мають Про-Про-послідовність у С-термінальній ділянці молекули, резистентні до деградації пролінспецифічними пептидазами – пролідазами. У зв'язку із цим казокініни можуть бути стійкими до дії травних ензимів, здатні проникати в організм і виявляти антигіпертензивний ефект. Часткове розщеплення пептидів може призводити до підвищення АПЕ інгібіторної дії.

### ***Антитромботичні пептиди***

Серед біологічно активних пептидів, які утворюються з протеїнів казеїнового комплексу молока, є такі, які здатні впливати на процеси згортання крові. Утворення кров'яного згустку є важливим механізмом захисту від втрат крові, які виникають внаслідок пошкодження судин чи тканин [50]. Необхідно відзначити, що між процесами гемокоагуляції і згортання молока існує багато подібностей. Так, людський фібриноген ( $\gamma$ -ланцюг) має схожу первинну структуру з коров'ячим к-казеїном чи глікомакропептидом (ГМП), який з нього утворюється. У 1978 році Jolles та співавт. [56] припустили, що  $\gamma$ -ланцюг фібриногену та к-казеїн виникли від

						<i>Огляд літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата			

спільного попередника протягом останніх 450 млн. років. Існують структурні та функціональні подібності між  $\gamma$ -ланцюгом С-кінцевого додекапептиду (400-411), який приймає участь у процесі зв'язування з рецепторами тромбоцитів та різними пептидами з фрагменту 106-116 коров'ячого к-казеїну, які одержали назву "казоплателіни" (табл. 1.2).

Таблиця 1.2

Амінокислотні послідовності фібриногену і пептиду із коров'ячого к-казеїну [56]

Додекапептид $\gamma$ -ланцюга фібриногену	$^{400}\text{H-H-L-G-G-A-K-Q-A-G-D-V}^{411}$
$\gamma$ -ланцюг фібриногену	$^{169}\text{I-K-P-L-K-K-A-N-Q-Q-F}^{177}$
Ундекапептид к-казеїну	$^{106}\text{M-A-I-P-P-K-K-N-Q-D-K}^{116}$

Процеси розщеплення фібриногену тромбіном і розщеплення к-казеїну молокозгортальним ензимом хімозином теж володіють певною подібністю. Як згортання крові, так і згортання молока визначається процесами обмеженого протеолізу; тромбін розщеплює зв'язок між двома залишками Арг-Глі, внаслідок чого утворюється фібрин і фібринопептиди, а хімозин розщеплює унікальний зв'язок Фен-Мет, утворюючи пара-к-казеїн і ГМП. Короткі розчинні пептиди (фібринопептиди і казоглікопептиди) утворюються в обох процесах – згортання крові і молока, відповідно. Як фібрино-, так і казоглікопептиди мають різну амінокислотну послідовність, проте володіють загальним негативним зарядом і жоден з пептидів не містить залишків цистеїну чи триптофану.  $\epsilon$ -Аміногрупи лізину можливо залучені в процеси агрегації як фібрину, так і казеїну. Кальцій також відіграє важливу роль у другій фазі згортання молока і у процесі агрегації фібринових мономерів. Простетичні групи, утворені залишками цукрів, не відіграють

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

істотної важливої ролі в процесах згортання, проте вони гальмують активність хімозину чи тромбіну.

к-Казеїн гальмує тромбін-індуковану агрегацію і тромбін-індуковану секрецію серотоніну *in vitro*, досягаючи 50% гальмування при концентрації 10μМ. На відміну від к-казеїну, пара-к-казеїн не проявляє жодної активності. ГМП (106-116) гальмує як тромбін, так і АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів, спричиняючи 50% гальмування при концентрації 10 μМ і 250 μМ, відповідно. У експериментальній моделі *in vivo* на щурах з використанням направленою лазерного пучка, який викликав пошкодження в ендотелії брижової артерії, було показано, що внутрішньовенне введення ГМП призводило до 65% гальмування тромбогенезу [].

Гальмування агрегації тромбоцитів здійснюється за участі пептидів зі специфічною структурною конформацією. Наприклад, ГМП-похідні пептиди 106-112 і 113-116 (трипсиновий гідролізат) мають значно меншу інгібіторну дію, ніж повний фрагмент 106-116. Наявність лізинового залишку в послідовності 112-116 трипсинового гідролізату ГМП посилює його дію у 222 рази порівняно з фрагментом 113-116 [56].

### ***Імуномодуляторні пептиди***

Відомо, що годування грудним молоком полегшує фізичну передачу пасивного імунітету за допомогою ряду багатофункціональних факторів, які безпосередньо впливають на стійкість новонароджених до бактеріальних та вірусних інфекцій. До числа таких факторів включають казеїн.

Зокрема, було встановлено, що пептидні гідролізати α<sub>S1</sub>-казеїну впливають на функцію імунної системи [33]. Було встановлено, що як панкреатичний, так і трипсиновий гідролізати α<sub>S1</sub>-казеїну значно гальмують проліферацію лімфоцитів селезінки мишей і Пеєрових бляшок кролів, тоді як пептидні препарати, отримані за допомогою пепсину і хімотрипсину, не мали ефектів при їх введенні *in vitro* в культуру клітин, поділ яких стимулювався мітогенами [65]. Пізніше було виявлено, що пептиди, отримані у процесі

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

протеолізу  $\alpha_{S1}$ -казеїну пепсином і трипсином, суттєво пригнічували проліферацію людських периферичних кров'яних мононуклеоцитів людини *in vitro*, індуковану мітогеном [44]. На відміну від цього, обробка  $\alpha_{S1}$ -казеїну лише трипсином спричиняла вивільнення C-кінцевого залишку протеїну, представленого пептидом TTMPLY, який посилював продукцію антитіл і активував фагоцитоз *in vitro*.

При дії хімозину на  $\alpha_{S1}$ -казеїн утворюється імуностимулюючий пептид, що має назву ізрацидин, який відповідає N-кінцевій амінокислотній послідовності 1-23  $\alpha_{S1}$ -казеїну. Цей пептид підвищує резистентність мишей до інфекції, викликані *Staphilococcus aureus*. Крім цього, ізрацидин при внутрішньовенному введенні мишам стимулював фагоцитарну відповідь *in vivo* на інфекцію, спричинену *Candida albicans*. Також було показано, що введення ізрацидину у вим'я попереджає розвиток маститів у корів та овець. Фрагментам 90-95 і 90-96  $\alpha_{S1}$ -казеїну притаманні опіатні властивості, а ряд опіатних пептидів, зокрема  $\beta$ -ендорфінів, виявляють імуномодуляторні властивості *in vitro* та *in vivo*, зокрема посилюють проліферативну відповідь, підвищують активність природних кілерів та локомоцію нейтрофілів [53].

### 1.3. Біологічно активні казеїнові фосфопептиди

Казеїнові природні біоактивні фосфопептиди утворюються в процесі нормального травлення в шлунково-кишковому тракті переважно за дії протеолітичних ензимів підшлункового соку [64]. Основною функцією казеїнових фосфопептидів є участь у процесах транспортування і засвоєння іонів двохвалентних металів, зокрема, кальцію, цинку і феруму. Тому в даний час казеїнові фосфопептиди викликають значний інтерес як перспективні інгредієнти функціональних харчових продуктів [70, 71]. Аналіз первинної структури казеїнових фосфопротеїнів ( $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -казеїну) – попередників біологічно активних пептидів показує можливість утворення великої різноманітності фосфопептидів в залежності від специфічності протеолітичних ензимів і умов проведення протеолізу [46, 64].

					Огляд літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

Казеїнові фосфопептиди можуть бути отримані в результаті використання різних протеолітичних препаратів (тваринного, рослинного і мікробіологічного походження). Залежно від використаного ферментного препарату, вони можуть дуже відрізняються за своїми молекулярними масами, та біологічною активністю [40]. Також важливо врахувати умови утворення фосфопептидів (температура, рН середовища), оскільки це може відобразитися на їх властивостях.

#### **1.4. Вплив казеїнових фосфопептидів на засвоєння мінеральних речовин**

Посттрансляційне фосфорилювання казеїнів відбувається в молочній залозі під час біосинтезу молока. Специфічність казеїнкінази, яка каталізує утворення фосфосеринових залишків, пов'язана з ділянками казеїнів, багатих на залишки серину і глутамінової кислоти, які утворюють так звані триплетні зони — СерР-СерР-СерР-Глу-Глу. Такі або подібні послідовності містяться в  $\alpha_1$ -казеїні (66-70),  $\alpha_2$ -казеїні (8-12, 56-60, 129-133) і  $\beta$ -казеїні (15-19) [70]. Найважливішими властивостями казеїнових фосфопептидів (КФП) є здатність їх зв'язувати кальцій і переводити його в розчинну форму. КФП *in vitro* запобігають осадженню іонів кальцію за присутності фосфатів у лужному середовищі [57, 59]. Однак дефосфорильовані пептиди втрачали здатність зв'язувати кальцій, цинк і залізо [55].

Різні методи було використано для кількісної характеристики взаємодії іонів кальцію з КФП [53]. Було встановлено, що константа зв'язування кальцію може набувати значень від  $10^{-2}$ - $10^{-3}$   $M^{-1}$  до  $0,32$   $mM^{-1}$  для нефракціонованої суміші КФП і для очищеного пептиду  $\alpha_1$ -CN (f 59-79) 5P відповідно. N-термінальному фосфопептиду 13-CN (f 1-25) притаманна здатність зв'язувати 4 молі іонів заліза на 1 моль пептиду [53]. Що стосується кальцію, то до 40 молів іонів кальцію може зв'язувати 1 моль КФП [55]. Більш наочно це виглядає у вагових співвідношеннях. Показано, що від 7,4 до 24,0

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

мг  $\text{Ca}^{2+}$  може утворити розчинну сіль із 1 мг суміші КФП, отриманої в результаті протеолізу казеїну різними протеїназами [21]. Розчини фосфату кальцію концентрацією до 1 М залишаються стабільними за присутності фосфопептидів, виділених з  $\beta$ -казеїну — P-CN (f 1-25) 4P і p-CN (f 1-42) 5P []. Крім того, присутність КФП у розчині гальмує утворення кристалів гідроксіапатиту [61].

Висока доступність кальцію, який надходить у травний тракт з казеїнами у складі молочних продуктів, пояснюється здатністю КФП доставляти іони кальцію у розчинному вигляді до активних і пасивних транспортувальних систем кальцію у кишечнику. Підтвердженням цього слугують результати досліджень *in vivo*, які свідчать про можливість утворення КФП у травному тракті, а також їхню стійкість до протеолітичного розщеплення і дефосфорилування [46]. У дослідах на тваринах встановлено підвищення рівня засвоєння кальцію за присутності КФП, отриманих різними способами. Для дослідження властивостей і біологічної дії використовують КФП, одержані ензиматичним гідролізом загального казеїну або його фракцій [53]. Ідентифіковані КФП подано в табл. 1.4.

Таблиця 1.4

Казеїнові фосфопептиди

Первинна структура пептиду <sup>1</sup>	Фрагмент	Біологічна активність
DIGEEETEDQAMEDIM	$\alpha_{S1}$ -CN (f 143-58) 2P	Зв'язування мінералів
QMEAEIEIEEEEEIVPNBVEQK	$\alpha_{S1}$ -CN (f 59-79) 5P	Зв'язування мінералів, імуномодуляторна
KNTMENVEEEEEESII EQETYKQEKMAINPSK	$\alpha_{S2}$ -CN (f 1-32) 4P	Зв'язування мінералів, імуномодуляторна
GEEEEEEAEV	$\alpha_{S2}$ -CN (f 55-64) 4P	Зв'язування мінералів
FQEEEQQTDELQDK	P-CN (f 33-48) 1P	Зв'язування мінералів
RELEELNVPGEIVEELEEEEEESITRI NK	P-CN (f 1-25/28) 4P	Зв'язування мінералів

*Огляд літератури*

Арк.

Змн. Арк. № доцм. Підпис Дата

## 1.5. Отримання білкових гідролізатів

### 1.5.1. Загальні відомості про білкові гідролізати

При виробництві біологічно активних речовин із сировини, яка містить білок, важливим моментом є його глибока переробка, що передбачає розщеплення білкових молекул до відповідних мономерів. Перспективним в цьому відношенні є гідроліз білкової сировини з метою виробництва білкових гідролізатів – продуктів, які містять цінні біологічно активні сполуки: поліпептиди та вільні амінокислоти. В якості сировини для виробництва білкових гідролізатів можуть бути використані будь-які повноцінні за амінокислотним складом природні білки, джерелом яких є кров та її складові компоненти; тканини та органи тварин і рослин; відходи молочної і харчової промисловості; ветеринарні конфіскати; харчові і малоцінні в харчовому відношенні продукти, отримані при переробці різних видів тварин, птиці, риби; відходи виробництва м'ясокомбінатів. При отриманні білкових гідролізатів для медичних і ветеринарних цілей служать, в основному, білки тваринного походження: крові, м'язової тканини і внутрішніх органів, білкові оболонки, а також казеїни і білки молочної сироватки [9, 36, 38].

Гідролізати білкової сировини використовують з фармакологічними, медико-біологічними, косметичними, а також з харчовими цілями. Для гідролізу використовують практично будь-яку сировину. Багато видів сировини мають географічну прив'язаність; інші – є продуктами певних виробничих циклів. Так, гідроліз рибних відходів практикується в місцях рибної промисловості і переробки риби. В Грузії запропоновано способи гідролізу чайного листа, плодів тунгового дерева. На підприємствах медичної та біологічної промисловості гідролізують білкові відходи виробництва сироватки крові і сироваткових препаратів; на молокозаводах – казеїн і білки сироватки молока; на м'ясокомбінатах – відходи від розділення м'яса, ковбасного виробництва. Гідроліз білкової сировини є одним із способів її швидкої

*Огляд літератури*

Арк.

Змн. Арк. № доцм. Підпис Дата

переробки, гідроліз білкових відходів – одним із ефективних способів утилізації [37, 38].

В харчовій промисловості найбільш широко використовують гідролізати білків тваринного походження. Крім білків м'яса і риби використовують гідролізати білків крові та молока.

### 1.5.2. Методи гідролізу білків

Гідроліз білка можна здійснити трьома шляхами: дією лугів, кислот і протеолітичних ферментів [2]. При лужному гідролізі білків утворюються залишки лантйоніну і лізіноаланіну, які є токсичними для організму людини і тварин. При такому гідролізі руйнуються аргінін, лізин і цистин, тому для отримання гідролізатів його практично не використовують. Кислотний гідроліз білка є широко поширеним способом. Найчастіше білок гідролізують сірчаною або соляною кислотою. Залежно від концентрації використовуваної кислоти і температури гідролізу, час процесу може змінюватися від 3 до 24-х годин. Гідроліз сірчаною кислотою проводять 3 ... 5 годин при температурі 100 ... 130°C і тиску 2 ... 3 атмосфери; соляної - протягом 5 ... 24 годин при температурі кипіння розчину під невеликим тиском.

При кислотному гідролізі досягається велика глибина розщеплення білка і виключається можливість бактеріального забруднення гідролізату. Це особливо важливо в медицині, де гідролізати застосовуються, в основному, парентерально і необхідно виключити анафілактогенність, пірогенність та інші небажані наслідки. У медичній практиці широко застосовуються кислотні гідролізати: амінокровін, гідролізін Л-103, ЦОЛПК, інфузамін, геммос та інші.

Недоліком кислотного гідролізу є повне руйнування триптофану, часткове окиснення амінокислот (серину і треоніну), дезамінування амідних зв'язків аспарагіну і глутаміну з утворенням аміачного азоту, руйнування вітамінів, а також утворення гумінових речовин. Крім того, при нейтралізації кислотних гідролізатів утворюється велика кількість солей: хлоридів або

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		



сульфатів. Останні є особливо токсичними для організму. Тому кислотні гідролізати потребують подальшого очищення, для чого у виробництві зазвичай використовується іонообмінна хроматографія.

Щоб уникнути руйнування лабільних амінокислот у процесі отримання кислотних гідролізатів, деякі дослідники використовували м'які режими гідролізу в атмосфері інертного газу, а також додавали до реакційної суміші антиоксиданти, тіоспирти або похідні індолу. Кислотний і лужний гідроліз мають, крім зазначених, ще істотні обмеження, пов'язані з реактивністю середовища, що призводить до швидкої корозії устаткування і викликає необхідність дотримання жорстких вимог техніки безпеки для операторів. Таким чином, технологія кислотного гідролізу досить трудомістка і вимагає використання складної апаратури (іонообмінні колонки, ультрамембрани тощо) та додаткових етапів очищення одержуваних препаратів.

Як відомо, в організмі білок під дією травних ферментів розщеплюється до пептидів і амінокислот. Ферментативний протеоліз проводять ферментами тваринного походження, рослинними чи мікробними протеазами. Склад ензимних гідролізатів залежить, в першу чергу, від специфічності ензиму, а також від первинної структури білка, ступеня денатурації та тривалості гідролізу. Найбільш глибокі гідролізати можна отримувати з допомогою травного ензиму трипсину. Особливо це стосується білків м'яса і крові. Гідролізати казеїну містять більш крупні фрагменти і багатьма фірмами пропонується як препарат пептону чи як основа для культивування токсиноутворюючих мікроорганізмів [2].

Ряд органічних сполук активують ферментативний гідроліз. До числа таких активаторів відносяться субстратоподібні сполуки, які імітують окремі фрагменти субстрату.

Результати досліджень залежності ступеня ферментативного гідролізу від концентрації білка у водному середовищі свідчать, що зменшення концентрації білка покращує ступінь гідролізу [21].

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

Найчастіше використовують ферментну систему – панкреатин. Основними ферментами панкреатину є трипсин та хімотрипсин. Аналіз пептидних фракцій із панкреатинних гідролізатів білків м'яса і крові виявив аналогію в їх амінокислотному складі. Повноцінними вважають гідролізати, які містять повний збалансований набір амінокислот. В гідролізатах, що призначені для дієтичних, медичних і ветеринарних цілей, важливим є співвідношення незамінних амінокислот при наявності в оптимальних співвідношеннях замінним. Панкреатинний гідроліз співставляється процесам, що проходять в живому організмі, наприклад, при активуванні ферментів і гормонів. За молекулярною масою казеїну та інших молочних білків можна зробити висновок, що білкова молекула є складним з'єднанням. Молекули білків під впливом лугів, кислот, а особливо ферментів протеаз гідролізують з утворенням речовин меншої молярної маси, аж до амінокислот. Природно при гідролізі білка не відразу виходять кінцеві продукти розпаду, а утворюються проміжні сполуки [2].

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

## 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В роботі використовували свіже незбиране молоко, з якого виділяли фосфопротеїни. Їх використовували для ферментативного протеолізу та виділення природніх біоактивних фосфопептидів.

Для проведення протеолізу було використано ферментний препарат панкреатин виробництва ПрАТ «Технолог» (Україна).

Для приготування поліакриламідного гелю (ПААГ) і буферів при проведенні електрофоретичних досліджень були використані реактиви фірми «Reanal» (Угорщина).

При проведенні гель-фільтрації використовували сефадекси фірми «Pharmacia» (Швеція).

Також у роботі використовували реактиви вітчизняного виробництва – «Х.Ч.» і «Ч.Д.А.».

### 2.1. Визначення фізико-хімічних показників молока

#### 2.1.1. Визначення активної кислотності

*Активну кислотність* визначали потенціометрично (ДСТУ 8550:2015). У склянку місткістю 50-100 см<sup>3</sup> вносили 40±5 см<sup>3</sup> молока, температура якого становила 20±2 см<sup>3</sup>. У підготовлену пробу занурювали електроди потенціометра, слідкуючи за тим, щоб вони не торкалися стінок і дна склянки. Через 10-15 с записували покази за шкалою приладу.

					<i>ДР 18-550.00.00.002 ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Матеріали і методи дослідження</i>					
<i>Розроб.</i>		<i>Процик Д.І.</i>						<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>								
<i>Консульт.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>								
<i>Затв.</i>		<i>Покотило О.С.</i>								
					<i>ТНТУ, ФМТ, зр. МЛмз-61</i>					

### 2.1.2. Визначення вмісту протеїнів

У роботі був використаний метод Лоурі, який оснований на утворенні забарвлених продуктів ароматичних кислот з реактивом Фоліна у комплексі з біуретовою реакцією, яка є якісною на пептидні зв'язки. Цьому методу властива висока чутливість – 10...100 мкг протеїнів у досліджуваному зразку. Необхідно врахувати, що на появу забарвлення можуть впливати компоненти буферних систем, окремі відновники (цистеїн, дитіотреїтол), комплекси (ЕДТА в концентрації 0,5 мМ). Зважаючи на це, при побудові калібрувального графіку під час визначення концентрації за методом Лоурі у розчинник для стандартного протеїну потрібно вносити всі компоненти, які містяться в аналізованій пробі протеїну. Інтенсивність забарвлення аналізують колориметрично за допомогою фотометра КФК-3.

#### *Порядок визначення концентрації:*

- 1) побудова калібрувального графіку з використанням стандартного протеїну;
- 2) вимірювання оптичної густини досліджуваного розчину і визначення за калібрувальним графіком концентрації протеїнів.

#### *Необхідні реактиви:*

- 1) реактив I – 10% розчин  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  у 0,5 М  $\text{NaOH}$ ;
- 2) реактив II – 0,5 % розчин  $\text{CuSO}_4$ ;
- 3) реактив III – готували безпосередньо перед визначенням змішуванням десяти об'ємів реактиву I, одного об'єму реактиву II і 40 об'ємів води дистильованої;

4) реактив Фоліна;

5) стандартний розчин, який містить 2 мг/см<sup>3</sup> протеїну

До 0,6 см<sup>3</sup> досліджуваних розчинів додавали 3 см<sup>3</sup> розчину III. Суміш перемішували і залишали на 10 хвилин при кімнатній температурі. Після цього додавали 0,3 см<sup>3</sup> реактиву Фоліна, знову перемішували. Через 30 хвилин визначали оптичну густину на фотометрі КФК-3 при довжині хвилі 750 нм. Як розчин для порівняння – контроль готували наступним чином: до 0,6 см<sup>3</sup>

					<i>Матеріали і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

дистильованої води додавали ті ж реагенти, що й до досліджуваного розчину, дотримуючись зазначених послідовності і кількостей. Вміст протеїнів у досліджуваних зразках визначали, користуючись калібрувальним графіком. Для його побудови шляхом розведення стандартного розчину протеїну концентрацією  $2 \text{ мг/см}^3$  приготувляли серію робочих розчинів із концентраціями, зазначеними у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Компоненти розчину протеїну для побудови калібрувального графіку

№ проби	Об'єм стандартного розчину протеїну, $\text{см}^3$	Об'єм дистильованої води, $\text{см}^3$	Концентрація протеїну, $\text{мг/см}^3$
1	0,1	3,9	0,05
2	0,2	3,8	0,10
3	0,3	3,7	0,15
4	0,4	3,6	0,20
5	0,5	3,5	0,25
6	0,8	3,2	0,40
7	0,9	3,1	0,50

До  $0,6 \text{ см}^3$  кожного розчину протеїну заданої концентрації додавали реактив III і реактив Фоліна, як вказано вище. Для забарвлених продуктів реакції визначали оптичну густину проти контролю при довжині хвилі  $750 \text{ нм}$ . Отримані значення оптичної густини використовували для побудови калібрувального графіку, відкладаючи відомі концентрації розчину протеїну в  $\text{мг/см}^3$  на осі абсцис, а виміряне значення оптичної густини для цього розчину – на осі ординат.

Щоб визначити концентрацію протеїнів у досліджуваному зразку на осі ординат відкладали виміряне для нього значення оптичної густини, через яке проводили горизонтальну лінію до перетину з калібрувальною кривою. Потім з

					<i>Матеріали і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ доцм.	Підпис	Дата		

отриманої точки перетину на вісь абсцис опускали перпендикуляр. Точка перетину даного перпендикуляру із віссю абсцисс відповідає вмісту протеїну у досліджуваному розчині (в мг/см<sup>3</sup>).

## 2.2. Електрофорез в поліакриламідному гелі

Для проведення електрофорезу фосфопротеїнів і продуктів їх протеолізу в однорідній системі ПААГ було взято за основу електрофоретичну систему Д.Девіса і А.Лоу. Нами були зроблені певні доповнення, які стосувалися складу гелю і буферів.

Для отримання ПААГ готували розчин наступного складу:

<i>Компоненти гелю</i>	<i>Буфер для гелю (pH 7,9)</i>	<i>Розчин каталізатора та ініціатора</i>
АА -13,5 г	Тріс - 0,609 г	Персульфат амонію
МБА - 0,75 мл	ЕДТА - 0,2 г	(ПСА) - підбирали експериментально
	Веронал - 1,1 г	ТЕМЕД - 0,05 мл
	2-меркаптоетанол-0,07	
	Сечовина - 54 г	
_____	_____	_____
до 100 мл Н <sub>2</sub> О	до 100 мл Н <sub>2</sub> О	до 10 мл Н <sub>2</sub> О
1 частина	2 частини	1 частина

					<i>Матеріали і методи досліджень</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Крім того готували електродний буфер і буфер для приготування зразків казеїнів:

*Електродний буфер (pH 7,9)*

Тріс - 6,09 г

ЕДТА - 2,0 г

Веронал - 11,0 г

*Буфер для зразків (pH 7,9)*

Тріс - 30,5 г

ЕДТА - 10,0 г

Веронал - 55 г

2-меркаптоетанол – 7,0 г

Сечовина - 13,5 г

до 1000 мл H<sub>2</sub>O

до 50 мл H<sub>2</sub>O

Для проведення електрофорезу використовували прилад типу Стадієра, виготовлений із органічного скла.

Робочу камеру з гелем вставляли в нижню буферну камеру. В буферні камери і верхню частину робочої камери заливали електродний буфер.

Пробу вносили в стартові комірки в кількості 0,015 мл з допомогою мірного капіляру під буфер. Проби повинні рівномірно осісти на дно комірки. Від цього в значній мірі залежить якість розділення. Після нанесення проби з'єднували буферні розчини в робочій і верхній електродній камерах смужкою фільтрувального паперу і підключали електроди до джерела живлення. Електрофорез проводили при постійній силі струму – 50мА. Коли сигнальний барвник досягнув нижньої лінії гелю – відключали струм і діставали пластинку гелю для фіксації і забарвлення.

Після закінчення електрофорезу камеру розклеювали при нагріванні, обережно діставали пластинку гелю, розміщували її в кристалізаторі, заливали 1% розчином барвника (амідочорний 10 Б) в 7% оцтовій кислоті і витримували 30-40 хвилин. В результаті білки фіксувались в гелі і забарвлювались. Барвник, який не зв'язався з білками, відмивали сумішшю 7% оцтової кислоти і 20% етанолу, періодично змінюючи розчин, до повністю прозорого фону.

Результати електрофорезу оформляли у вигляді електрофореграм.

					<i>Матеріали і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

### 2.3. Гель-фільтрація на сефадексах

Гель-фільтрацію проводили на сефадексах фірми «Pharmacia», виготовлених на основі декстрану. Декстран являє собою полісахарид, побудований із залишків глюкози, який одержують при вирощуванні мікроорганізмів *Leuconostoc mersenteroides* на сахарозі. Сефадекси стійкі до температури, розведених кислот та лугів, не розчиняються в органічних розчинниках. Гель-фільтрація дозволяє швидко і ефективно проводити розділення і очищення протеїнів.

*Підготовка колонки.* Для проведення гель-фільтрації використовували колонку фірми «Reanal». Її встановлювали у штативі строго вертикально, під'єднували сполучні трубочки малого діаметра і встановлювали на нижній адаптер паперовий фільтр для підтримки гелю у колонці.

*Підготовка гелю* включала декантацію і набухання в розчині, який використовувався як елюент. Для цього необхідну кількість гелю (відповідно до об'єму колонки) висипали при перемішуванні в надлишок елюенту. Після осадження гелю надосадову рідину, що містила пошкоджені гранули, зливали. Операцію повторювали тричі.

Для заповнення колонки гелем виймали верхній адаптер і встановлювали лійку з мішалкою. В лійку наливали суспензію декантованих гранул гелю і включали мішалку. Гель рівномірно осідав на дно колонки. Після заповнення колонки гелем встановлювали верхній адаптер і з'єднували його через розподільний краник з буферним резервуаром і ємністю для проби.

Перед нанесенням взірця колонку промивали трьома об'ємами елюенту. При цьому встановлювали необхідну для процесу гель-фільтрації швидкість витікання. Взірець фосфопроїнів і фосфопептидів наносили на верхню частину сефадексу, фіксували верхній адаптер та починали відбирати фракції певного об'єму в градуйовані пробірки.

Вміст фосфопроїнів та фосфопептидів у фракціях аналізували спектрофотометрично. Результати гель-фільтрації представляли у вигляді хроматограм.

					<i>Матеріали і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ доцм.	Підпис	Дата		



### 3. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 3.1. Результати власних досліджень та їх обговорення

##### 3.1.1. Виділення протеїнів - попередників біологічно активних фосфопептидів

У коров'ячому молоці більше 20 різних протеїнів. Всі чисельні протеїни можна розділити на дві великі групи : протеїни казеїнового комплексу і протеїни сироватки. Казеїн є основним протеїном і складає 78-85 % від всіх протеїнів. Завдяки наявності у складі залишків фосфорної кислоти казеїн відноситься до фосфопропротеїнів. У свіжому молоці ці фосфопептиди перебувають у вигляді колоїдних частинок , або так званих міцел. Міцели мають діаметр 40-300 нм і в свою чергу складаються із ще дрібніших частинок – субміцел (діаметр 10-15 нм), які формуються із молекул різних фракцій казеїну ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -казеїнів, які відрізняються складом і фізико-хімічними властивостями). На своїй поверхні ці міцели мають заряд (причому сумарний заряд частинок має негативний заряд) і як наслідок оточені гідратною оболонкою. Через це міцели не наближаються одна до одної, не злипаються і не коагулюють в розчині. Тобто ці частинки у свіжому молоці досить стійкі. Тому при виділенні фосфопропротеїнів із коров'ячого молока необхідно досягнути дестабілізації таких частинок і добитися їх злипання з утворенням осаду, який потім можна відділити фільтруванням або центрифугуванням.

Розчинність протеїнів можна змінювати змінюючи рН, іонну силу, концентрацію деяких органічних розчинників, температуру. Так відомо, що розчинність протеїнів найменша при значеннях рН розчину, близьких до їх ізоелектричної точки, коли загальний заряд протеїну рівний нулю.

					<i>ДР 18-550.00.00.003 ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Власні дослідження</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Процик Д.І.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Консульт.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Затв.</i>		<i>Покотило О.С.</i>						
						<i>ТНТУ, ФМТ, гр. МЛмз-61</i>		

Це приводить до зближення протеїнових молекул в розчині і утворення агрегатів, які вже після цього можна осадити, наприклад центрифугуванням. Саме Ізоелектричне осадження нами обране для отримання препарату фосфопротеїнів із коров'ячого молока.

Свіже молоко містить у своєму складі ліпіди, тому перший етап виділення фосфопротеїнів передбачав отримання знежиреного молока. Він включав дві стадії, які відбувалися при двох різних температурах. Це забезпечувало краще відділення ліпідів молока при менших втратах фосфопротеїнів. Відділення ліпідів проводили за схемою, показаною на рис. 3.1. Із отриманого знежиреного молока осадження фосфопротеїнів проводили з використанням соляної кислоти, довівши рН до значення 4,6, що відповідає ізоелектричній точці фосфопротеїнів коров'ячого молока.

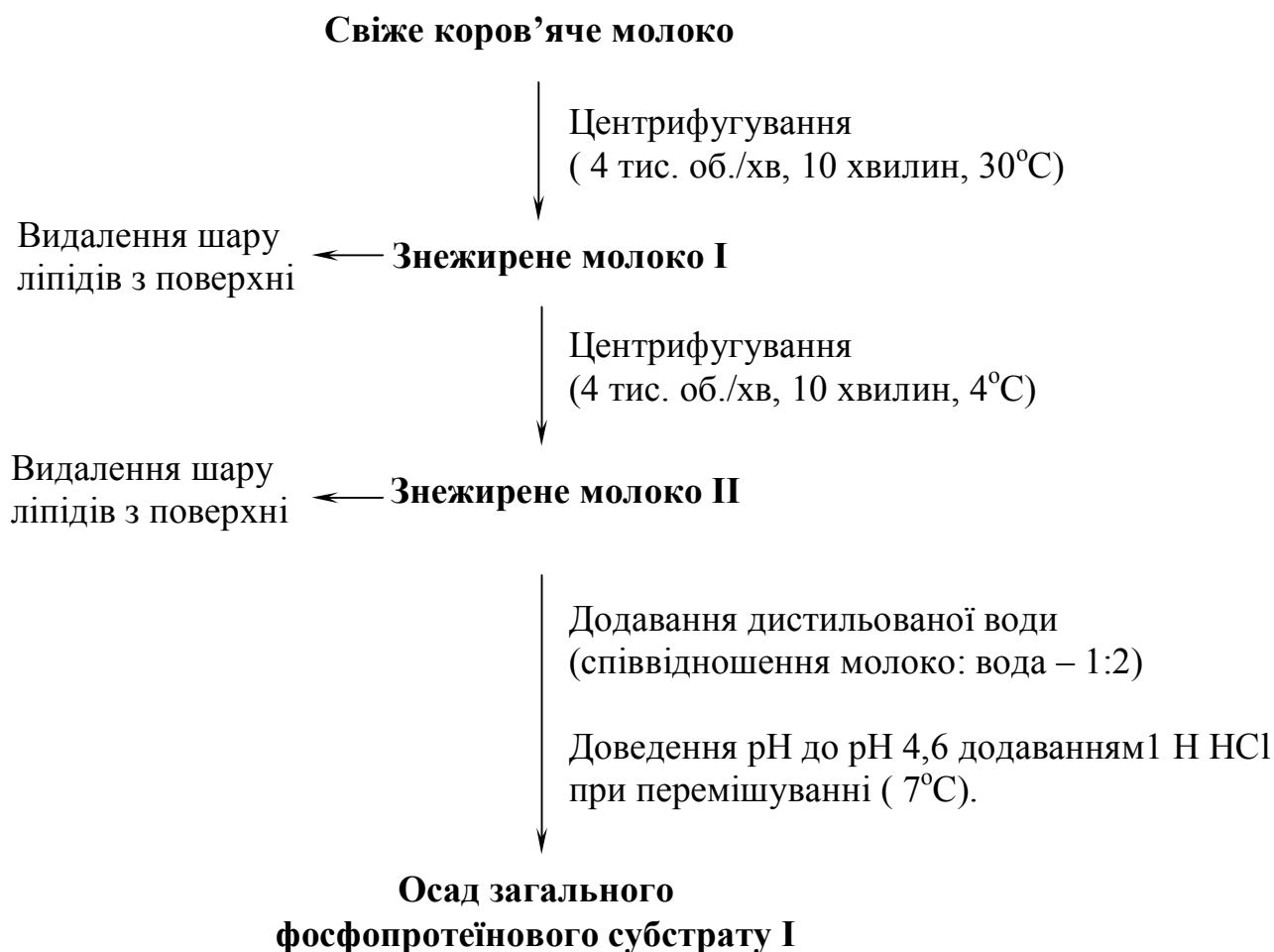


Рисунок 3.1. Схема отримання знежиреного молока і осадження загального фосфопротеїнового субстрату I

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

Отриманий загальний фосфопротеїновий субстрат I для встановлення фракційного складу піддавали електрофоретичному аналізу. Розділення проводили з використанням лужної електрофоретичної системи у вертикальних пластинках однорідного поліакриламідного гелю. Результати електрофорезу (рис. 4.2) показали наявність в осаді загального фосфопротеїнового субстрату протеїнів сироватки молока, які були затримані коагульованими частинками фосфопротеїнів. Зокрема, на електрофореграмі ми спостерігали залишки  $\beta$ -лактоглобулінової фракції. Інші сироваткові фракції, очевидно, могли приховуватися за фосфопротеїновими.

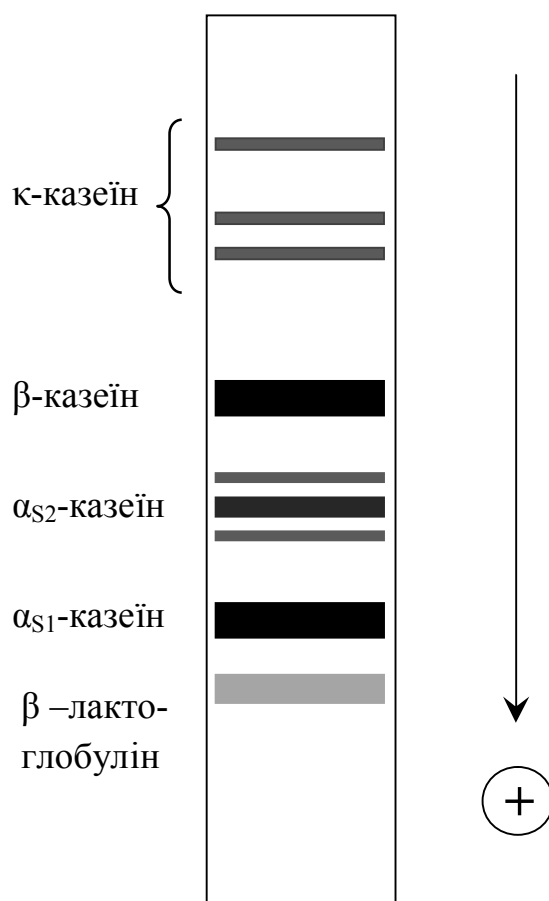


Рисунок 3.2. Електрофореграма осаду загального фосфопротеїнового субстрату I, отримана в лужній системі ПАГ

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

Для очищення фосфопротеїнового субстрату I від залишків сироваткових білків доцільно провести їх переосадження його в ізоелектричній точці, як показано на рис. 3.3. Для цього осад загального фосфопротеїнового субстрату I знову розчиняли додаванням 1 Н розчину натрію гідроксиду до значення 7,5. Як видно на схемі третє осадження проводили додаванням розчину оцтової кислоти. Це було зроблено з метою інактивування природних протеаз молока, які можуть зберігати активність у виділеному загальному фосфопротеїновому субстраті, тим самим зумовлюючи його протеоліз ще на момент зберігання перед подальшим використанням.

Виділений препарат фосфопротеїнів також досліджували електрофоретично у попередньо вказаній системі. Результати показані на рис. 3.4. Як показано на електрофореграмі, у виділеному зразку загального фосфопротеїнового субстрату III присутні всі електрофоретично чисті фракції фосфопротеїнів коров'ячого молока ( $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - і  $\kappa$ -казеїни) відповідно до їх сучасної класифікації.

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

**Осад загального фосфопротейінового субстрату I**

↓  
Промивання і диспергування у воді  
Додавання 1 Н NaOH (до pH≤7,5), перемішування

**Розчин загального фосфопротейінового субстрату I**

↓  
Змішування із водою у співвідношенні 1:2.  
Додавання 1 Н HCl (до pH 4,6), перемішування  
Центрифугування (3 тис. об./хв, 15 хвилин)

**Осад загального фосфопротейінового субстрату II**

↓  
Промивання і диспергування у воді  
Додавання 1 Н NaOH (pH≤7,5), перемішування

**Розчин загального фосфопротейінового субстрату II**

↓  
Додавання оцтової кислоти (до pH 4,0)  
Інкубування протягом 5 годин (4°C)  
Центрифугування (3 тис. об./хв, 15 хвилин)

**Осад загального фосфопротейінового субстрату III**

↓  
Промивання і диспергування у воді  
Додавання 1 Н NaOH (до pH≤7,5)  
Висушування

**Сухий загальний фосфопротейіновий субстрат III**

Рисунок 3.3. Схема переосадження загального фосфопротейінового субстрату I

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

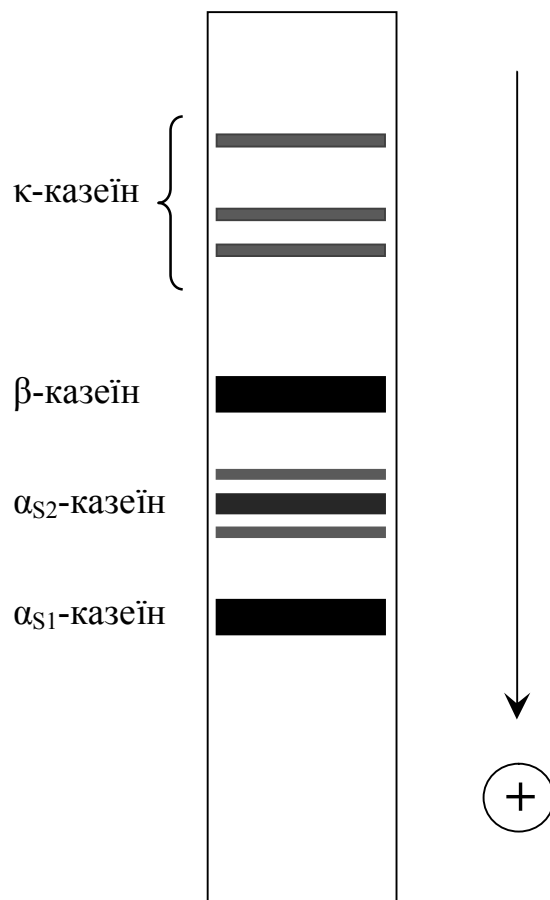


Рисунок 3.4. Електрофореграма осаду загального фосфопротеїнового субстрату ІІІ, отримана в лужній системі ПАГ

Отриманий висушений загальний фосфопротеїновий субстрат зберігали при температурі 4°C і використовували у подальшому для протеолізу та виділення біологічно активних фосфопептидів.

### 3.1.2. Протеоліз загального фосфопротейнового субстрату ензимним препаратом «Панкреатин»

Наступним етапом нашого дослідження було проведення протеолізу. Отриманий загальний фосфопротейновий субстрат піддавали розщепленню за дії панкреатину.

Панкреатин – це ензимний препарат, що містить усі ензими (амілази, ліпази, протеази), які знаходяться в підшлунковій залозі. Вона володіє зовнішньосекреторною та ендокринною функціями. Промисловістю випускається два види панкреатину із підшлункової залози ВРХ: технічний і медичний. Для отримання медичного підшлункову залозу розморожують, витримують при температурі 20°C протягом 8-10 годин, подрібнюють. Потім змішують з водою і пропускають через колоїдний млин. Для екстрагування ензимів до отриманої гомогенної маси додають розчин оцтової кислоти концентрацією 3,6 % у кількості 50 % від вихідної маси сировини. Через годину рідку фазу відділяють на суперцентрифuzі і подають для висушування на розпилювальну сушарку. Одержаний сухий препарат панкреатину знежирюють екстрагуванням бензином з подальшим висушуванням при 30-35°C і просіюванням. Стандартизують за активністю лактозою або цукровою пудрою. Панкреатин медичний має білувато-сіре забарвлення, мало розчинний у воді, активність 25-33 од./г препарату.

Панкреатин технічний отримують так, як і медичний: підшлункову залозу подрібнюють, екстрагують, рідкий екстракт сушать у розпилювальній сушарці. Отриманий сухий препарат не знежирюють. Стандартизацію до певної активності проводять сульфатом амонію.

У даній роботі нами було використано медичний панкреатин, виготовлений ПрАТ «Технолог» (Україна).

Із загального фосфопротейнового субстрату розчиненням у дистильованій воді готували 200 мл розчину концентрацією 2 %. Значення рН додаванням 1 Н розчину NaOH доводили 7,9. Розчин фосфопротейнового субстрату

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

термостатували до досягнення температури 37°C. Після цього вносили ензимний препарат «Панкреатин», враховуючи те, що необхідно було досягнути співвідношення «ензим:субстрат» на рівні 1:20. При такому співвідношенні забезпечується достатньо глибокий протеоліз фосфопротейнів молока з утворенням переважаючої кількості низькомолекулярних фосфопептидів. Подальший протеліз протягом трьох годин проводили у термостаті при температурі 37°C, підтримуючи рН реакційної суміші рівним 7,9 (при необхідності вносили 1 Н розчин натрію гідроксиду). Важливим показником ензиматичного розщеплення протеїнів є ступінь протеолізу. Його визначали через кожні 60 хвилин. Для цього до відібраного взірця реакційної суміші після 60-ти, 120-ти, 180-ти хвилин протеолізу додавали 10 %-ний розчин трихлороцтової кислоти у співвідношенні 1:1 для осадження нерозщеплених фосфопротейнів. Утворений осад відфільтровували з використанням паперового фільтру високої щільності. Фільтрат, який містить розчинні продукти протеолізу, розводили в десять раз 5 %-ною оцтовою кислотою (1 частину фільтрату змішували з 9 об'ємами розчину оцтової кислоти). У приготовленому розведеному субстраті на спектрофотометрі СФ-46 визначали оптичну густину при довжині хвилі  $\lambda=280$  нм. Оцінювання ходу протелізу здійснювали на основі середніх значень п'яти вимірювань. Результати подані на рис. 3.5.

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		



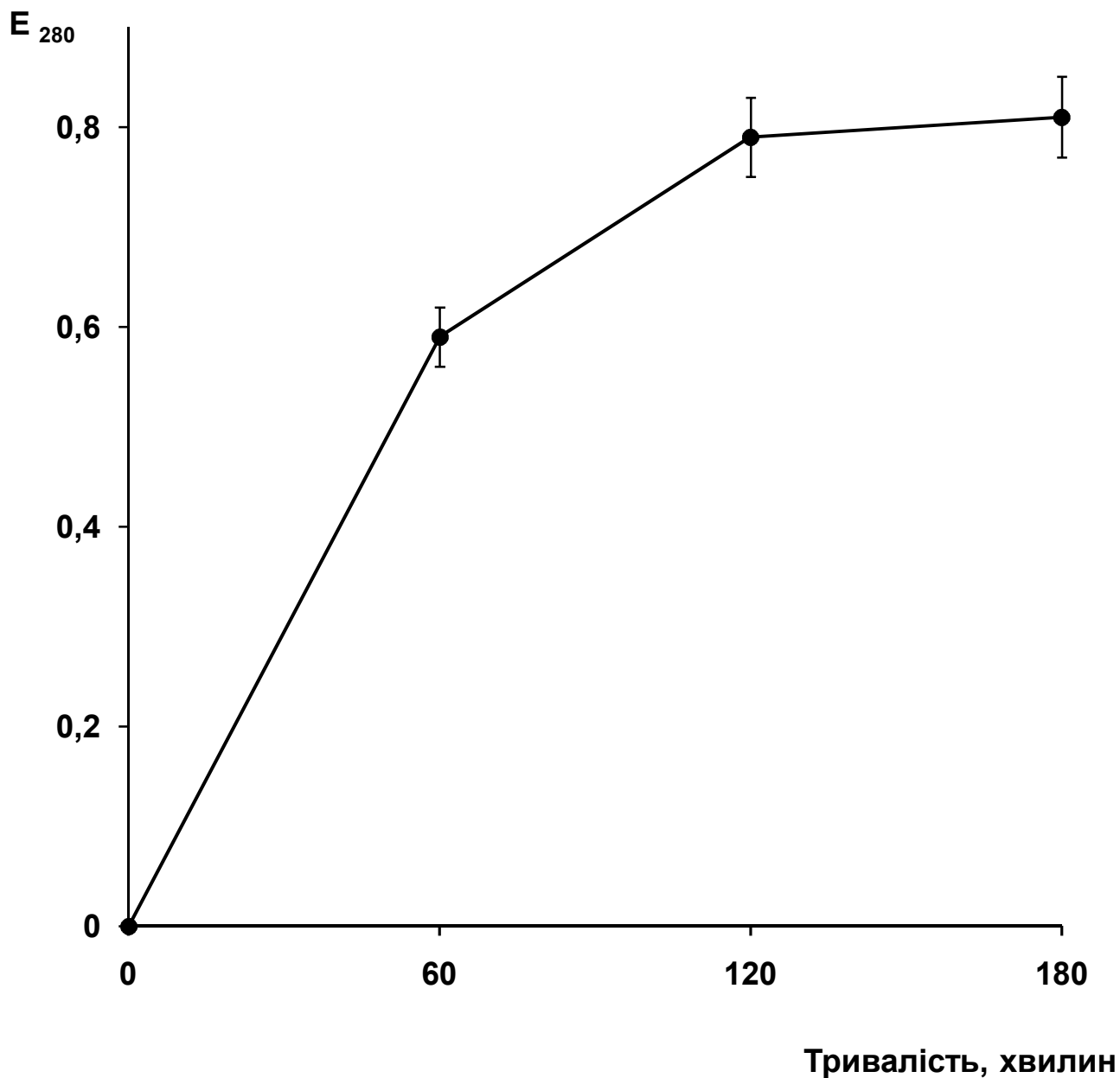


Рисунок 3.5. Протеоліз загального фосфопротеїнового субстрату за дії панкреатину

Як видно із графіку найінтенсивніше протеоліз проходить впродовж 120-ти хвилин від моменту внесення ензимного препарату у фосфопротеїновий субстрат. У період між 120- і 180-ю хвилинами спостерігається незначне зростання ступеню протеолізу.

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

На 180 хвилині протеолізу із реакційної суміші відбирали 5 проб для виділення фосфопептидів. Порядок їх отримання показаний на рис. 3.6.

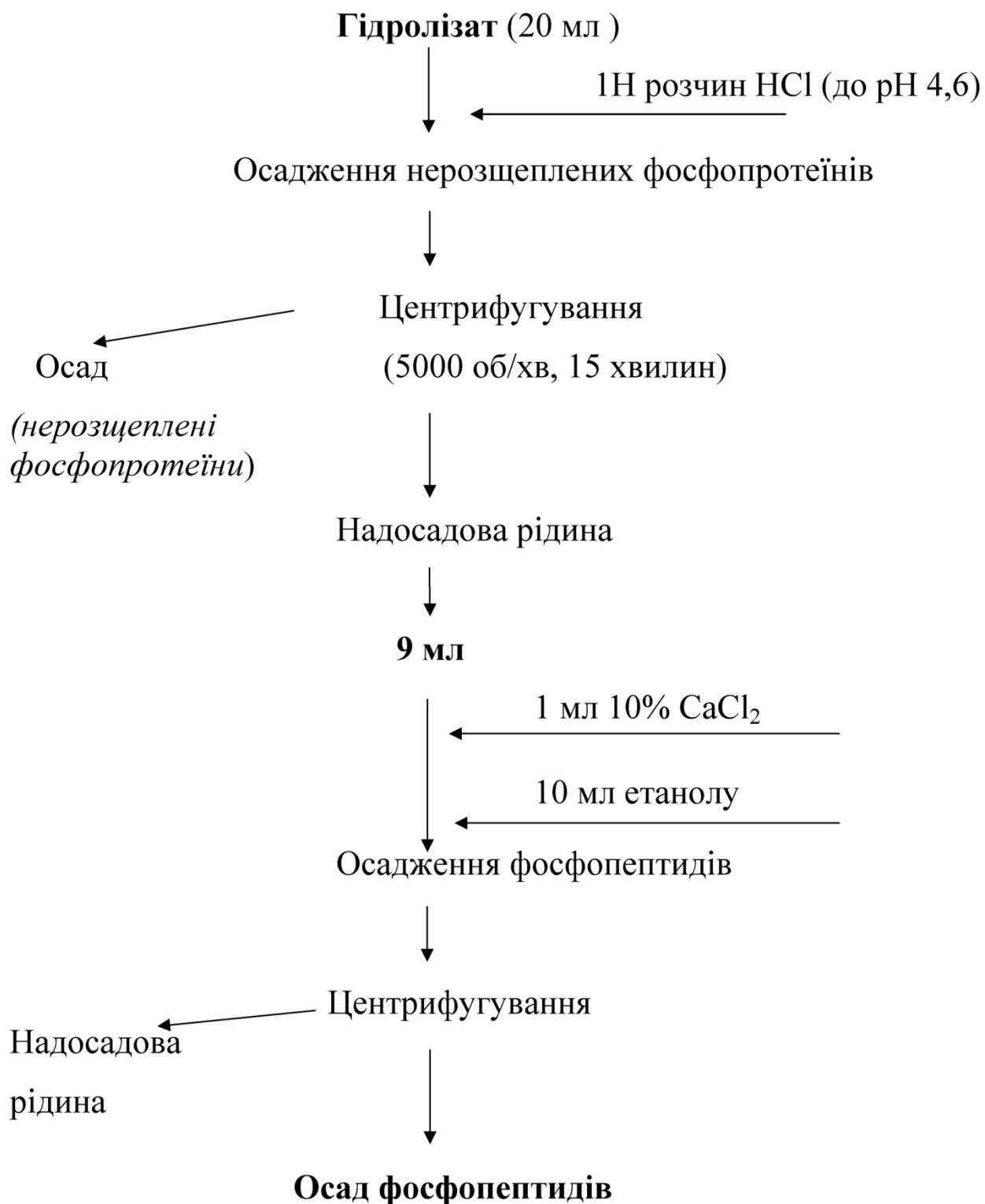


Рисунок 3.6. Схема осадження фосфопептидів з панкреатинowego гідролізату

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

Осад фосфопептидів, отриманий після відцентрифугування, промивали етанолом, висушували до постійної маси і зважували. Результати зважування для п'яти паралельно виділених проб фосфопептидів зведені у таблицю 3.1

Таблиця 3.1

Вихід фосфопептидів після протеолізу загального фосфопротеїнового субстрату панкреатином

Позначення проби	Кількість фосфопептидів, мг	Вихід фосфопептидів, %
Проба №1	21,1	11,72
Проба №2	20,8	11,56
Проба №3	19,9	11,06
Проба №4	21,2	11,77
Проба №5	21,0	11,67
<i>Середнє значення</i>	<i>20,94</i>	<i>11,56</i>

Відібрані на різних етапах протеолізу (на п'ятнадцятій, шістдесятій, стодвадцятій хвилинах) гідролізати загального фосфопротеїнового субстрату використовували також для електрофоретичного аналізу. Для припинення гідролізу проби заморожували.

До гідролізатів додавали рівний об'єм подвійного електрофоретичного буферу для проб, вносили бромфеноловий синій і сахарозу для збільшення густини. Електрофорез здійснювали у вертикальних пластинках поліакриламідного гелю в анодній системі (деталі описані в розділі «Матеріали і методи досліджень»). Після завершення електрофорезу пластинки забарвлювали амідочорним 10В концентрацією 0,5 %, фіксували і відмивали залишки барвника загальноприйнятими методами. Електрофореграми після відмивання фотографували. Результати електрофоретичного аналізу показані на рис. 3.7.

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

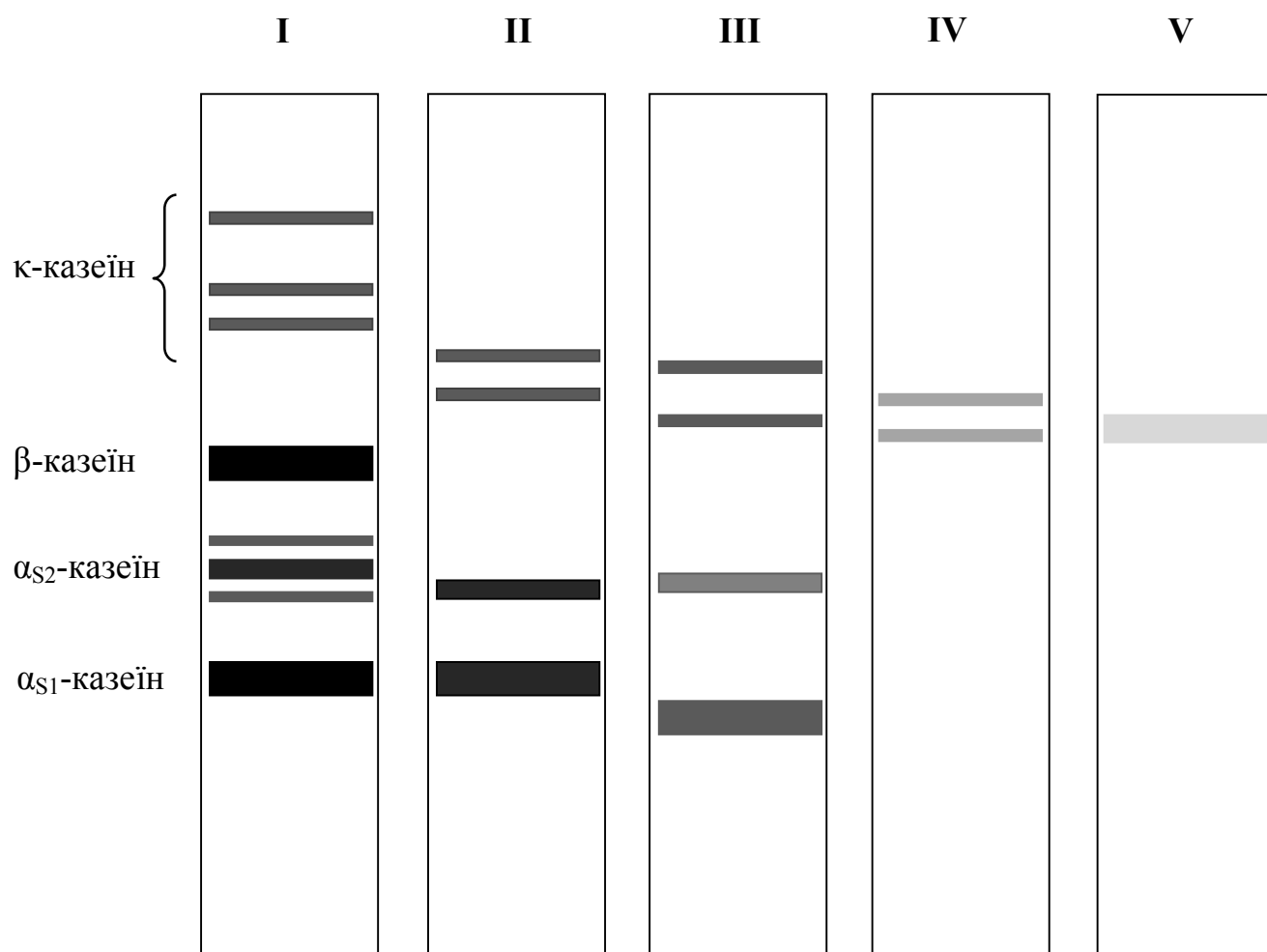


Рисунок 3.7. Електрофореграма загального фосфопротеїнового субстрату (I) і його панкреатинових гідролізатів, відібраних після 15-ї (II), 30-ї (III), 60-ї (IV) та 180-ї (V) хвилин протеолізу

Виділені на 180-й хвилині фосфопептиди аналізували гелі-фільтрацією на сефадексі G-25 (fine). Для отримання фосфопептидів використовували 9 мл гідролізату. Така його кількість дозволяє аналізувати відібрані хроматографічні фракції спектрофотометрично без додаткового їх розведення. Результати гелі-фільтрації показані на рис. 3.8. Для встановлення вільного об'єму використаної колонки показано також хроматографічний профіль загального фосфопротеїнового субстрату.

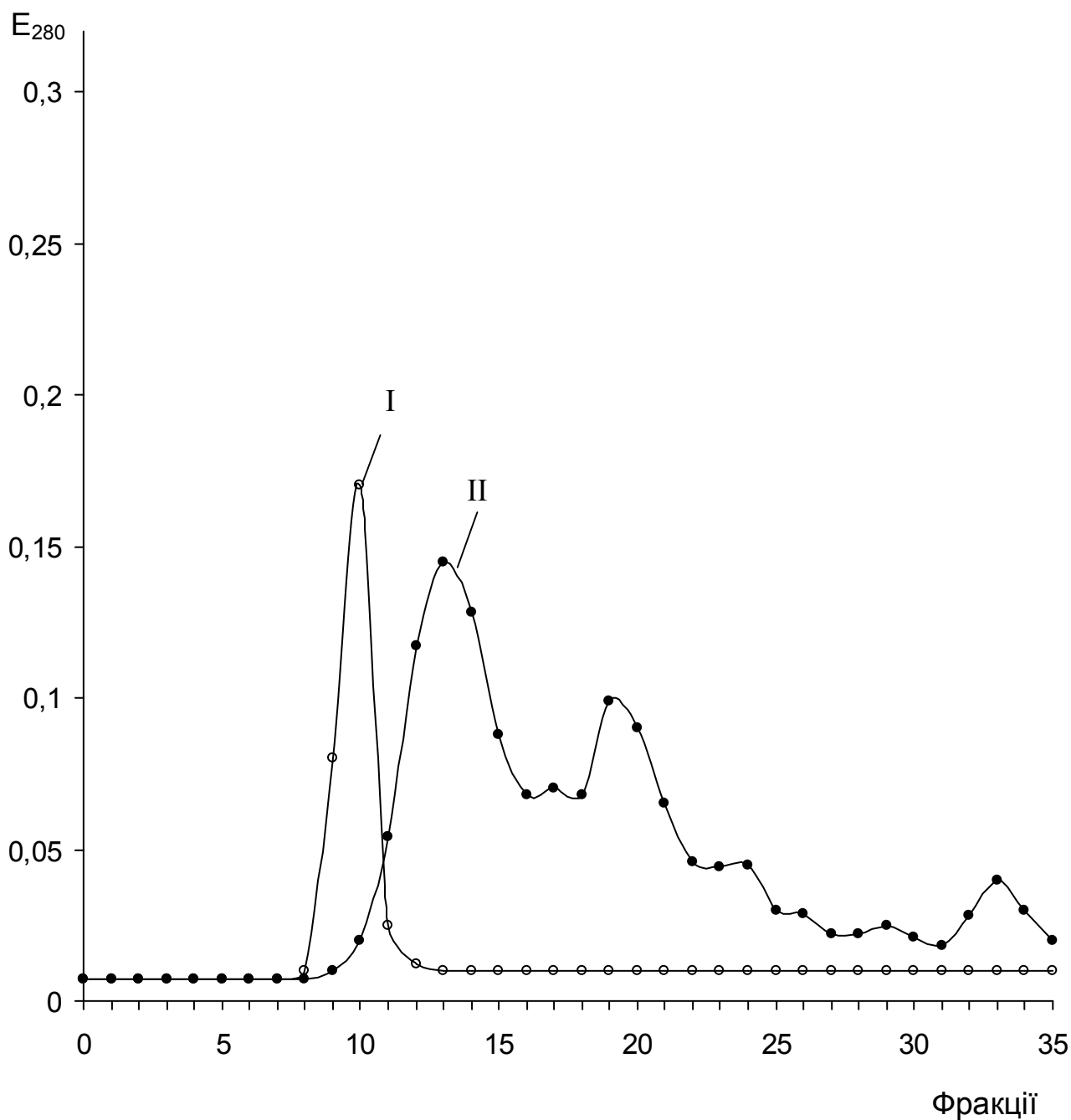


Рисунок 3.8. Хроматограма субстрату фосфопротеїнів (I) і фосфопептидів, отриманих за дії панкреатину (II)

Результати гелі-фільтрації вказують, що значна частка фосфопептидів (близько 30%) має молекулярну масу до 1000 Да. Вцілому профіль хроматограми панкреатинового гідролізату зміщений у сторону низькомолекулярних пептидів.

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

### 3.1.3. Визначення молекулярних мас фосфопептидів

Гель-фільтрація або гель-проникна хроматографія – це метод розділення суміші речовин з різними молекулярними масами шляхом так званого фільтрування через пористі гелі. Гель-фільтрація проводиться на хроматографічних колонках, які заповнені набухлим гранульованим гелеподібним наповнювачем. Він утворений частинками, які пронизані порами певного діаметру, що змінюється залежно від виду і марки сорбенту. Коли молекули розділюваної суміші за розміром більші від діаметру цих пор, то вони не здатні проникати в гранули гелю і без перешкод проходять по колонці, вимиваючись елюентом. А молекули з меншим діаметром зворотно дифундують у пори сорбенту, тому рух їх уповільнюється і з колонки вони виходять пізніше.

У ролі сорбентів, які найчастіше використовують для розділення білків, найчастіше використовують різні сефадекси, наприклад G-10, G-25, G-50, G-75, G-100, які побудовані з лінійних полімерних ланцюгів полісахариду декстрану, з'єднаних через певні проміжки поперечними зв'язками і утворюють своєрідні молекулярні сита. Характеристика сефадексів наведена у табл. 3.2.

Таблиця 3.2.

Характеристика сефадексів

Тип і категорія сефадексу	Величина гранул сухого гелю, мкм	Повний об'єм гелю, мл/г	Інтервал фракціонування за молекулярній масі	
			пептиди і глобулярні білки	полісахариди (декстрини)
1	2	3	4	5
G-10	40-120	2-3	700	700
G-15	40-120	2,5-3,5	1500	1500
G-25 Coarse	100-300	4-6	1000-5000	100-5000
Medium	50-150			
Fine	20-80			
Superfine	10-40			

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

Продовження табл. 3.2

1	2	3	4	5
G-50 Coarse	100-300	9-11	1500-30000	500-10000
Medium	50-150			
Fine	20-80			
Superfine	10-40			

Для оцінки молекулярної маси фосфопептидів, виділених із загального фосфопротейінового субстрату, проводили гель-фільтрацію, використовуючи набір сефадексів. При цьому враховували молекулярні маси відомих природних фосфопептидів. Зважаючи на це, нами для аналізу були вибрані три сефадекси фірми «Pharmacia»: «G-10», «G-15» і «G-25 *fine*». Саме їх характеристики подані у табл. 3.2.

Межа виключення пептидів і глобулярних протеїнів становить:

- сефадекс G-10 – 700 Да;
- сефадекс G-15 – 1500 Да;
- сефадекс G-25 – 5000 Да.

Гель-фільтрацію проводили на колонках фірми «Reanal». Препарати фосфопептидів розчиняли в 5 %-ній оцтовій кислоті і наносили на колонку. Як розчинник для елюювання використовували цей же 5 %-ний розчин оцтової кислоти. Впродовж гель-фільтрації у кожен фракцію відбирали по 5 мл елюату. Концентрацію фосфопептидів у кожній з відібраних фракцій визначали спектофотометрично. Крім того, для кожного сефадексу визначали вільний об'єм з використанням загального фосфопротейінового субстрату. Результати гельфільтрації на відповідних сефадексах показані на рис. 3.9, 3.10 і 3.11.

Всі фракції на побудованих хроматограмах у кожному випадку розділяли ділили на дві частини (на рисунках показано пунктирною лінією). Отримані фракції фосфопептидів, які відповідають правій частині графіку, об'єднували, після чого висушували при 70°C до постійної маси і зважували.

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

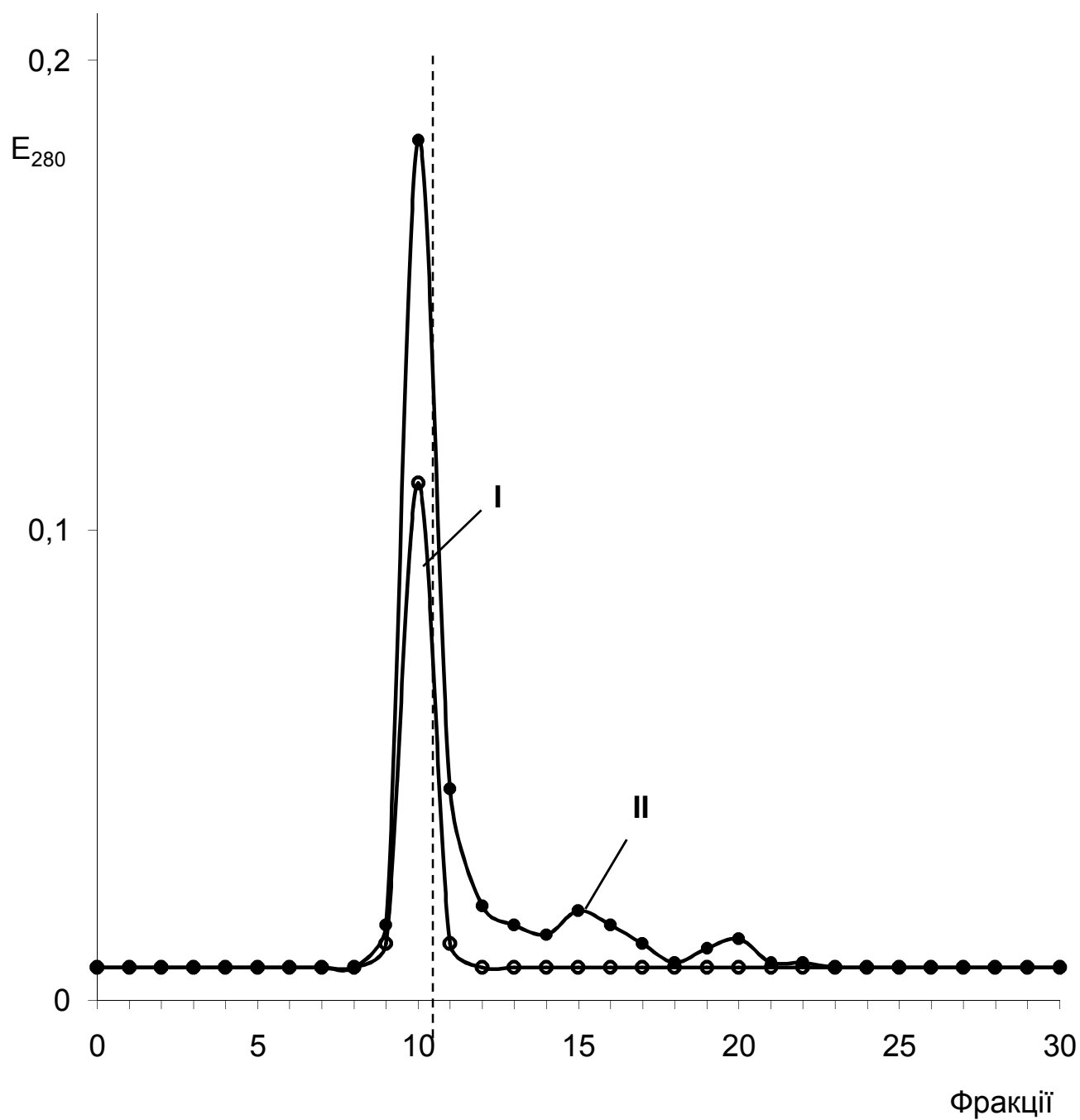


Рисунок 3.9. Хроматограма фосфопротеїнового субстрату (I) і препарату фосфопептидів (II), яку було отримано при проведенні гель-фільтрації на сефадексі G-10



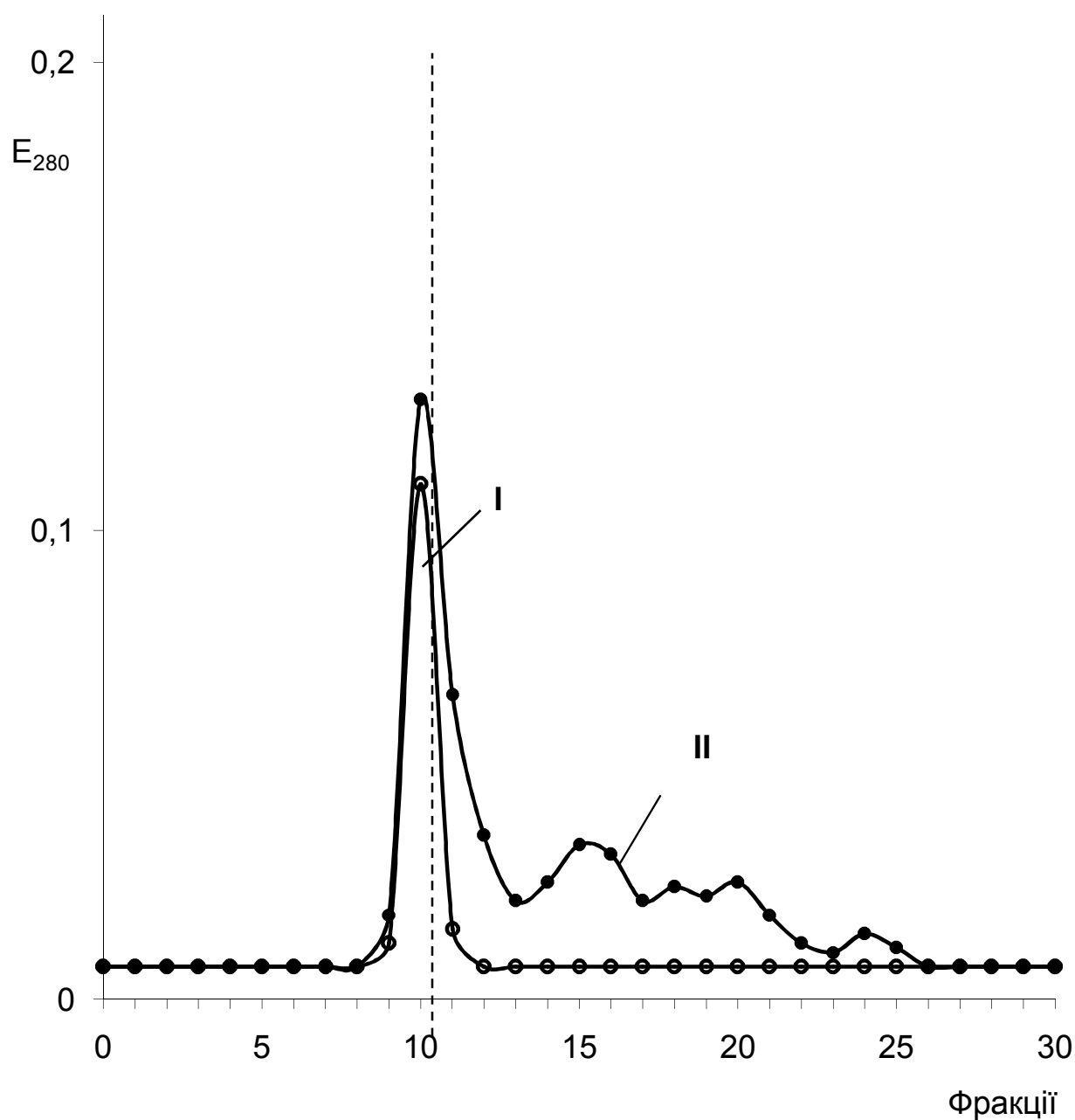


Рисунок 3.10 Хроматограма фракціонування загального фосфопротеїнового субстрату (I) і препарату фосфопептидів (II), яку отримали під час гелі-фільтрації з використанням сефадексу G-15

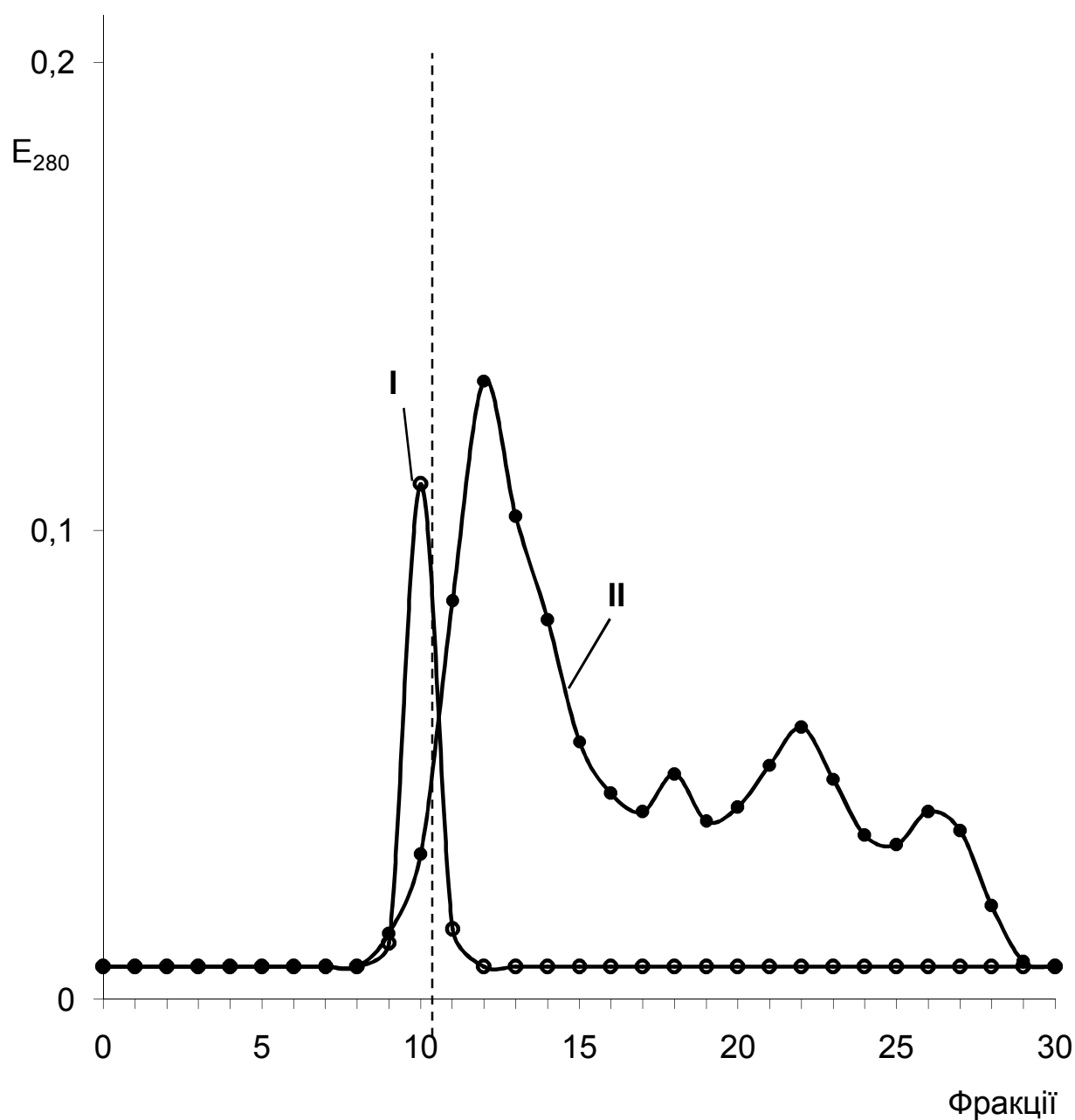


Рисунок 3.11. Хроматограма розділення загального фосфопротейнового субстрату (I) і препарату фосфопептидів (II), одержана гелі-фільтрацією з використанням сефадексу G-25

В результаті проведених гелі-фільтрацій було встановлено відсоток фосфопептидів, молекулярна маса яких попадає у наступні діапазони:

- менше 700 Да;
- від 700 до 1500 Да;
- від 1500 до 5000 Да;
- більше 5000 Да.

Дані розрахунків представлені на рис. 3.12.

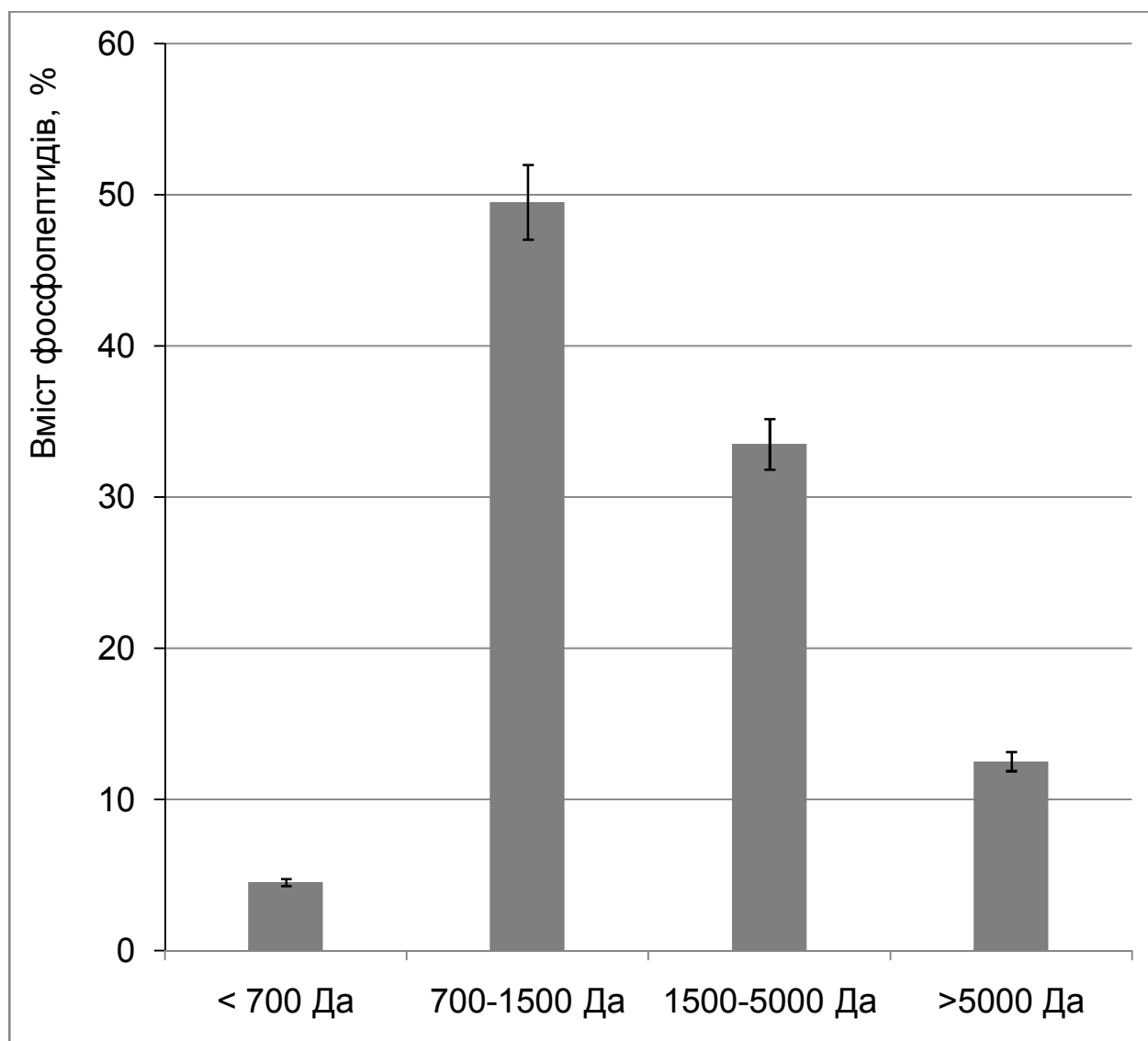


Рисунок 3.12. Молекулярні маси фосфопептидів за даними гелі-фільтрації на сефадексах G-10, G-15 і G-25

Отже, основна частина виділених в запропонованих умовах фосфопептидів має молекулярну масу в межах 700-1500 Да. На їх частку припадає близько 50 %. Також досить багато фосфопептидів мають молекулярну масу від 1500 до 5000 Да. Вони складають 33,5 %. За даними літературних джерел природні біологічно активні фосфопептиди за молекулярними масами потрапляють саме у ці діапазони.

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

### 3.2. Розрахунок економічної ефективності

Ефективність розробки складається з економічної й соціальної ефективності. З погляду соціальної ефективності виробництво біологічно активних фосфопептидів дозволить вирішити проблему дефіциту у раціоні населення України різних макро- і мікроелементів. Основою економічної ефективності нової продукції та технології є, передусім, прибуток, який може одержати підприємство від впровадження у виробництво цього виду продукції.

Розрахунок собівартості здійснювався на підставі чинного законодавства України (нормативних актів, прийнятих і затверджених у відповідному порядку). Виробництво нових видів продукції завжди пов'язане з наявністю певного економічного ризику для виробника. Це зумовлено специфікою самого споживчого ринку, для якого характерними є динамічність, невизначеність, наявність конкурентів і висока залежність від споживчого попиту. За таких умов ефективне споживання нової продукції та забезпечення, таким чином, ефективності її виробництва залежить від обґрунтованої цінової політики підприємства, яке може використовувати різні методи ціноутворення – витратні, ринкові, економетричні.

Для розрахунку ціни реалізації препаратів функціональних фосфопептидів з білків казеїнового комплексу молока необхідно розрахунковим методом визначити собівартість і відпускну ціну. При цьому попередньо розраховується вартість сировини та матеріалів з врахуванням закупівельних цін кожного із компонентів. Результати розрахунку вартості сировини та матеріалів представлено в табл. 3.3.

					<i>Розрахунок економічної ефективності</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Розрахунок вартості сировини та матеріалів на 1 кг біологічно активних  
фосфопептидів

Назва сировини і матеріалів	Норма витрат на 1 кг готової продукції, кг	Ціна за 1 кг, грн	Вартість, грн
Молоко знежирене	250	3,2	800,0
Ферментний препарат панкреатин	0,07	1270,0	88,9
Натрію гідроксид	0,1	32,5	3,25
Кислота хлоридна	0,2	24,0	4,8
Кальцію хлорид	0,9	12,0	10,8
Всього			907,65
Пакувальні матеріали			70,0
Разом			977,65

Калькулювання собівартості розробленого препарату біоактивних фосфопептидів з білків казеїнового комплексу здійснювали за наступною номенклатурою статей витрат.

*Стаття 1.* Вартість сировини і матеріалів. В даній статті враховується закупівельна вартість сировини і матеріалів, затрачених для виробництва функціональних фосфопептидів без ПДВ.

*Стаття 2.* Зворотні відходи. Під час виробництва функціональних відсутні, тобто не враховуються.

*Стаття 3.* Паливо та енергія на технологічні цілі. У цій статті враховують ціну затрачених під час виробництва КФП на технологічні та інші цілі палива та енергії. Їх витрати складають 1% від вартості сировини і матеріалів.

*Стаття 4.* Основна зарплата. В даній статті розраховуються витрати оплати праці виробничого персоналу в розмірі 2% від вартості сировини і матеріалів.

										Арк.
<i>Розрахунок економічної ефективності</i>										
Змн.	Арк.	№ доцм.	Підпис	Дата						











## 4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ

### 4.1. Охорона праці

#### 4.1.1. Охорона праці жінок, неповнолітніх та інвалідів

Враховуючи фізіологічні, психологічні, вікові та інші особливості, правове регулювання трудових відносин молоді, жінок та інвалідів має певні відмінності щодо інших категорій працівників. За загальним правилом, на роботу приймаються особи, яким виповнилося 16 років. Як виняток, за згодою одного із батьків або особи, що його замінює, можуть прийматись на роботу особи, які досягли п'ятнадцяти років. Крім того, допускається прийняття на роботу учнів загальноосвітніх шкіл, професійно-технічних і середніх спеціальних навчальних закладів для виконання легкої праці, що не завдає шкоди здоров'ю і не порушує процесу навчання, у вільний від навчання час по досягненні ними чотирнадцятирічного віку за згодою одного з батьків або особи, що його замінює. На кожному підприємстві, в установі, організації має вестися спеціальний облік неповнолітніх працівників, які не досягли вісімнадцяти років, із зазначенням дати їх народження.

Неповнолітні у трудових правовідносинах прирівнюються у правах до повнолітніх, а в галузі охорони праці, робочого часу, відпусток та деяких інших умов праці користуються пільгами, встановленими законодавством України [14].

#### **Основними особливостями праці неповнолітніх є:**

- їм не встановлюється випробувальний строк при першому прийнятті на роботу;
- їх забороняється залучати на важких роботах і на роботах з шкідливими або небезпечними умовами праці, а також на підземних роботах;

					<i>ДР 18-550.00.00.004 ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Процик Д.І.</i>			<i>Охорона праці</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркцнів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Консульт.</i>		<i>Окіпний І.Б.</i>						
<i>Затв.</i>		<i>Покотило О.С.</i>						
						<i>ТНТУ, ФМТ, гр. М/мз-61</i>		

- їх забороняється залучати до підіймання і переміщення речей, маса яких перевищує встановлені для них граничні норми;
- усі особи, молодші вісімнадцяти років, приймаються на роботу лише після попереднього медичного огляду і в подальшому, до досягнення 21 року, щороку підлягають обов'язковому медичному оглядові;
- їх забороняється залучати до нічних, надурочних робіт і робіт у вихідні дні;
- щорічні відпустки неповнолітнім працівникам надаються у зручний для них час, а у перший рік роботи відпустки надаються за їх заявою до настання шестимісячного терміну безперервної роботи на даному підприємстві, в установі, організації;
- звільнення неповнолітніх працівників з ініціативи власника або уповноваженого ним органу допускається, крім додержання загального порядку звільнення, тільки за згодою районної (міської) комісії в справах неповнолітніх;
- звільнення неповнолітнього можливе не лише з власної ініціативи, але і з ініціативи батьків, усиновителів і піклувальників неповнолітнього, а також державних органів та посадових осіб, на яких покладено нагляд і контроль за додержанням законодавства про працю у випадку, коли виконання трудового договору з неповнолітнім, у тому числі й строкового загрожує здоров'ю неповнолітнього або порушує його законні інтереси.

***Правове регулювання праці жінок має такі особливості:***

- забороняється застосування праці жінок на важких роботах і на роботах із шкідливими або небезпечними умовами праці, а також на підземних роботах, крім деяких підземних робіт (не-фізичних робіт або робіт по санітарному та побутовому обслуговуванню);
- забороняється залучення жінок до підіймання і переміщення речей, маса яких перевищує встановлені для них граничні норми;

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата		

- не допускається залучення жінок до робіт у нічний час, за винятком тих галузей народного господарства, де це викликається особливою необхідністю і дозволяється як тимчасовий захід;
- не допускається залучення до робіт у нічний час, до надурочних робіт і робіт у вихідні дні і направлення у відрядження вагітних жінок і жінок, що мають дітей віком до трьох років;
- жінки, що мають дітей віком від трьох до чотирнадцяти років або дітей-інвалідів, не можуть залучатись до надурочних робіт або направлятись у відрядження без їх згоди;
- вагітним жінкам відповідно до медичного висновку знижуються норми виробітку, норми обслуговування або вони переводяться на іншу роботу, яка є легшою і виключає вплив несприятливих виробничих факторів, із збереженням середнього заробітку за попередньою роботою;
- жінки, які мають дітей віком до трьох років, в разі неможливості виконання попередньої роботи переводяться на іншу роботу із збереженням середнього заробітку за попередньою роботою до досягнення дитиною віку трьох років;
- на підставі медичного висновку жінкам надається оплачувана відпустка у зв'язку з вагітністю та пологами тривалістю 70 календарних днів до пологів і 56 (у разі народження двох і більше дітей та у разі ускладнення пологів - 70) календарних днів після пологів, починаючи з дня пологів;
- у разі, якщо дитина потребує домашнього догляду, жінці в обов'язковому порядку надається відпустка без збереження заробітної плати тривалістю, визначеною у медичному висновку, але не більш як до досягнення дитиною шестирічного віку;
- за бажанням жінки у період перебування її у відпустці для догляду за дитиною вона може працювати на умовах неповного робочого часу або вдома, при цьому за нею зберігається право на одержання допомоги в період

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		



- відмова в укладенні трудового договору або в просуванні по службі, звільнення за ініціативою адміністрації, переведення інваліда на іншу роботу без його згоди з мотивів інвалідності не допускається, за винятком випадків, коли за висновком меди-ко-соціальної експертизи стан його здоров'я перешкоджає виконанню професійних обов'язків, загрожує здоров'ю і безпеці праці інших осіб, або продовження трудової діяльності чи зміна її характеру та обсягу загрожує погіршенню здоров'я інвалідів;
- працевлаштування інвалідів здійснюється органами Міністерства праці і соціальної політики України, органами місцевого самоврядування, громадськими організаціями інвалідів;
- підбір робочого місця здійснюється переважно на підприємстві, де настала інвалідність, з урахуванням побажань інваліда, наявних у нього професійних навичок і знань, а також рекомендацій медико-соціальної експертизи;
- нормативи робочих місць, призначених для працевлаштування інвалідів, визначаються для всіх підприємств, установ і організацій (незалежно від форм власності та господарювання) у розмірі не менше чотирьох відсотків від загальної чисельності працюючих; якщо працює від 15 до 25 чоловік - встановлюється норматив у кількості одного робочого місця;
- при відмові у прийнятті на роботу, ненаданні роботи за спеціальністю інваліду, направленому за розподілом після закінчення навчального закладу, або при недодержанні інших умов трудового договору і законодавства про працю адміністрація підприємства, установи і організації відшкодовує витрати на його проїзд до місця роботи.

#### 4.1.2. Обов'язкові медичні огляди працівників певних категорій

На всебічну охорону праці спрямовані також норми, які передбачають при влаштуванні на роботу і в процесі роботи обов'язкові та періодичні медичні

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

огляди працівників [26, 28]. Відповідно до ст. 17 Закону України «Про охорону праці» та ч. 1 ст. 169 КЗпП роботодавець зобов'язаний за свої кошти забезпечити фінансування та організувати проведення попереднього (при прийнятті на роботу) і періодичних (протягом трудової діяльності) медичних оглядів працівників, зайнятих на важких роботах, роботах із шкідливими чи небезпечними умовами праці, або таких, де є потреба у професійному доборі, а також щорічного обов'язкового медичного огляду осіб віком до 21 року. Здійснення медичних оглядів покладається на медичні заклади, працівники яких несуть відповідальність згідно із законодавством за відповідність медичного висновку фактичному стану здоров'я працівника. Порядок проведення медичних оглядів працівників певних категорій, затверджено наказом Міністерства охорони здоров'я України від 21 травня 2007 р. №246. Перелік професій, виробництв та організацій, працівники яких підлягають обов'язковим профілактичним медичним оглядам та порядок проведення цих оглядів та видачі особистих медичних книжок затверджено Постановою Кабінету Міністрів України від 23 травня 2001 р. № 559 із змінами та доповненнями. Відповідно до Положення про порядок видачі посвідчень водія та допуску громадян до керування транспортними засобами, затвердженого Кабінетом Міністрів України 8 травня 1993 р., усі водії транспортних засобів підлягають обов'язковому періодичному медичному огляду у встановлені строки.

Працівник зобов'язаний проходити у встановленому порядку попередні та періодичні медичні огляди, тому роботодавець має право притягнути працівника, який ухиляється від обов'язкового медичного огляду, до дисциплінарної відповідальності і зобов'язаний відсторонити його від роботи без збереження заробітної плати (ст. 46 КЗпП). Роботодавець на прохання працівника або за своєю ініціативою організує позачерговий медичний огляд,

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата		



якщо працівник вважає, що погіршення стану його здоров'я пов'язане з умовами праці. За час проходження медичного огляду за працівником зберігається місце роботи (посада) і середній заробіток.

#### 4.1.3. Фінансування охорони праці на підприємстві

Відповідно до ст. 19 Закону України «Про охорону праці» фінансування заходів з охорони праці на підприємстві здійснюється роботодавцем. Для підприємств, незалежно від форм власності, або фізичних осіб, які використовують найману працю, витрати на охорону праці становлять не менше 0,5 % від суми реалізованої продукції, а для підприємств, що утримуються за рахунок бюджету, такі витрати передбачаються в Державному або місцевих бюджетах і становлять не менше 0,2 % від фонду оплати праці. Суми витрат з охорони праці, що належать до валових витрат юридичної чи фізичної особи, яка відповідно до законодавства використовує найману працю, визначаються згідно з переліком заходів та засобів з охорони праці, що затверджується Кабінетом Міністрів України. Фінансування профілактичних заходів з охорони праці, виконання загальнодержавної, галузевих та регіональних програм поліпшення стану безпеки, гігієни праці та виробничого середовища, інших державних програм, спрямованих на запобігання нещасним випадкам та професійним захворюванням, передбачається, поряд з іншими джерелами фінансування, визначеними законодавством, у Державному і місцевих бюджетах, що виділяються окремим рядком.

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

## 4.2. Безпека в надзвичайних ситуаціях

### Вплив агресивного середовища на життєдіяльність працівників молокозаводу

**Вступ.** Нормальна життєдіяльність людини вагомо залежить від умов зовнішнього середовища, зокрема виробничого. Адже в процесі трудової діяльності на організм людини чиниться своєрідний «тиск» несприятливими виробничими факторами, що прямо чи опосередковано впливають на її здоров'я та працездатність. Серед виробничих факторів прийнято розрізняти небезпечні та шкідливі.

Небезпечний виробничий фактор – виробничий фактор, дія якого за певних умов може призвести до травм або іншого раптового погіршення здоров'я працівника.

Шкідливий виробничий фактор – виробничий фактор, вплив якого може призвести до погіршення стану здоров'я, зниження працездатності працівника.

Небезпечні та шкідливі виробничі фактори за природою дії поділяються на такі групи: фізичні, хімічні, біологічні та психофізіологічні.

До фізичних небезпечних та шкідливих виробничих факторів належать: рухомі машини та механізми; пересувні частини виробничого устаткування; підвищена запиленість та загазованість повітря робочої зони; підвищена чи понижена температура поверхонь устаткування, матеріалів чи повітря робочої зони; підвищений рівень шуму, вібрацій, інфразвукових коливань, ультразвуку, іонізуючих випромінювань, статичної електрики, електромагнітних випромінювань, ультрафіолетової чи інфрачервоної радіації; підвищені чи понижені барометричний тиск, вологість, іонізація та рухомість повітря; небезпечне значення напруги в електричному колі; підвищена напруженість електричного чи магнітного полів; відсутність чи нестача природного світла; недостатня освітленість робочої зони; підвищена яскравість світла; пряме та відбите випромінювання, що створює засліплюючу дію.

					<i>ДР 18-550.00.00.004 ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>Безпека в надзвичайних ситуаціях</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Процик Д.І.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Консульт.</i>		<i>Стадник І.Я.</i>						
<i>Затв.</i>		<i>Покотило О.С.</i>						
						<i>ТНТУ, ФМТ, зр. МЛмз-61</i>		

До хімічних небезпечних та шкідливих виробничих факторів належать хімічні речовини, які за характером дії на організм людини поділяються на:

- загальнотоксичні, що викликають отруєння всього організму;
- подразнюючі, що викликають подразнення дихального тракту та слизових оболонок;
- сенсibiliзуючі, що діють як алергени;
- канцерогенні, що викликають ракові захворювання;
- мутагенні, що призводять до змін наслідкової інформації;
- такі, що впливають на репродуктивну (дітонароджувальну) функцію.

До біологічних небезпечних та шкідливих виробничих факторів належать патогенні мікроорганізми (бактерії, віруси, мікроскопічні грибки та ін.) та продукти їх життєдіяльності, а також макроорганізми (рослини та тварини).

До психофізіологічних небезпечних та шкідливих виробничих факторів належать фізичні (статичні та динамічні) і нервово-психічні перевантаження (розумове перенапруження, перенапруження органів чуття, монотонність праці, емоційні перевантаження).

Один і той же небезпечний і шкідливий виробничий фактор за природою своєї дії може належати одночасно до різних груп.

Залежно від наслідків впливу на працюючих шкідливих та небезпечних виробничих факторів розрізняють виробничі травми, професійні захворювання та професійні отруєння, внаслідок яких може відбутись зниження або втрата працездатності (тимчасова чи постійна, повна чи часткова), можливий і фатальний кінець.

Виробнича травма – порушення анатомічної цілісності організму людини або його функцій внаслідок дії виробничих факторів.

Професійне захворювання – патологічний стан людини, обумовлений роботою і пов'язаний з надмірним напруженням організму або несприятливою дією шкідливих виробничих факторів.

Професійне отруєння – це порушення стану здоров'я в результаті дії шкідливих речовин при їх проникненні в організм людини у виробничих

					<i>Безпека в надзвичайних ситуаціях</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

умовах. Довготривалий вплив незначних доз шкідливих речовин (однак дещо вищих за ГДК) призводить до хронічних отруень. Проникнення в організм великої кількості шкідливих речовин за короткий час (не більше доби) спричинює гострі отруєння.

### ***Вплив шкідливих речовин на організм людини на молокозаводі***

Для створення нормальних умов виробничої діяльності необхідно забезпечити не лише комфортні метеорологічні умови, а й необхідну чистоту повітря. Внаслідок виробничої діяльності у повітряне середовище приміщень можуть надходити різноманітні шкідливі речовини, що використовуються в технологічних процесах.

Шкідливі речовини можуть проникати в організм людини через органи дихання, органи травлення, а також шкіру та слизові оболонки. Через дихальні шляхи потрапляють пари, газо- та пилоподібні речовини, через шкіру переважно рідкі речовини [6, 25]. Через шлунково-кишкові шляхи потрапляють речовини під час ковтання або при внесенні їх в рот забрудненими руками.

Основним шляхом надходження промислових шкідливих речовин в організм людини є дихальні шляхи. Завдяки величезній (понад 90 м<sup>2</sup>) всмоктувальній поверхні легенів утворюються сприятливі умови для потрапляння шкідливих речовин у кров.

Найбільш поширеними і небезпечними речовинами, що використовуються у промисловості і побуті, є аміак і хлор. Аміак використовується у промислових побутових холодильниках на молокозаводах, там, де є необхідність в охолодженій продукції. При малих концентраціях він діє на людину збуджуючи, при великих – може призвести до інвалідності.

Найкращі методи захисту в даних випадках – це застосування ізолюючого протигазу, респіратору, захисного костюма типу Л-1, гумових чобіт, рукавичок.

Значно поширений промисловий продукт – хлор використовується для знезараження питної води, вибілювання тканин та як сировина для багатьох хімічних підприємств. У зв'язку з його використанням трапляється чимало випадків отруєння. У разі потрапляння хлору на шкіру виникають опіки.

					<i>Безпека в надзвичайних ситуаціях</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ доцм.	Підпис	Дата		

Запобігти враженню хлором можна за допомогою застосування індивідуальних засобів захисту – протигазу, кисневого ізолюючого приладу, спеціального захисного костюма, гумових чобіт, рукавиць.

Шкідливі речовини, що потрапили тим, чи іншим шляхом в організм можуть викликати отруєння (гострі чи хронічні). Ступінь отруєння залежить від токсичності речовини, її кількості, часу дії, шляху проникнення, метеорологічних умов, індивідуальних особливостей організму. Гострі отруєння виникають в результаті одноразової дії великих доз шкідливих речовин (чадний газ, метан, сірководень) [19].

Хронічні отруєння розвиваються внаслідок тривалої дії на людину невеликих концентрацій шкідливих речовин (свинець, ртуть, марганець) [30]. Шкідливі речовини, потрапивши в організм, розподіляються в ньому нерівномірно. Найбільша кількість свинцю накопичується в кістках, фтору – в зубах, марганцю – в печінці. Такі речовини мають властивість утворювати в організмі так зване “депо” і затримуватись в ньому тривалий час.

При хронічному отруєнні шкідливі речовини можуть не лише накопичуватись в організмі (матеріальна кумуляція), але й викликати «накопичення» функціональних ефектів (функціональна кумуляція).

Ступінь несприятливого впливу шкідливих речовин, що присутні в повітрі робочої зони, визначається також низкою інших чинників. Наприклад, підвищена температура і вологість, як і значне м'язове напруження, в більшості випадків, підсилюють дію шкідливих речовин.

Джерелами шуму є: всі види транспорту, насоси, сепаратори та інше обладнання молокопереробних підприємств, тощо. З шумом пов'язані деякі технологічні процеси — осушування сироватки, маслянки та знежиреного молока тощо.

Шум несприятливо впливає на людину. У робітників, які мають справу з гуркотливими машинами та механізмами, виникають стійкі порушення слуху, що нерідко призводить до професійних захворювань (глухуватості і глухоти).

					<i>Безпека в надзвичайних ситуаціях</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Найбільша втрата слуху спостерігається протягом перших десяти років роботи, і з плином часу ця небезпека зростає.

**Висновки.** Знання основних закономірностей фізіологічних змін у функціональному стані організму працівника, що відбуваються під час виконання трудової діяльності, визначення основних видів та класифікаційних ознак провідних форм трудової діяльності створює передумови до покращення умов праці: використання нового обладнання, використання засобів індивідуального захисту, очистки повітря на підприємстві, тощо. Проведення поглибленого вивчення особливостей впливу численних чинників виробничого середовища на організм людини, дозволяє чітко визначити та об'єктивно обґрунтувати адекватні та ефективні заходи профілактичного змісту і характеру.

Отже, для покращення роботи працівників на молокозаводі необхідно проводити наступні заходи:

- вилучення шкідливих речовин з технологічних процесів, заміна шкідливих речовин менш шкідливими і т. п. Наприклад, свинцеві білила замінені на цинкові, метиловий спирт – іншими спиртами, органічні розчинники для знежирювання – миючими розчинами на основі води;
- удосконалення технологічних процесів та устаткування (застосовування замкнутих технологічних циклів, неперервних технологічних процесів, мокрих способів переробки пиломатеріалів тощо);
- автоматизація і дистанційне управління технологічними процесами та обладнанням, що виключає безпосередній контакт працюючих з шкідливими речовинами;
- герметизація виробничого устаткування, робота технологічного устаткування під розрідженням, локалізація шкідливих виділень за рахунок місцевої вентиляції, аспіраційнихукриттів;
- нормальне функціонування систем опалення, загальнообмінної вентиляції, кондиціонування повітря, очистки викидів в атмосферу;

					<i>Безпека в надзвичайних ситуаціях</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ доцм.	Підпис	Дата		

- попередні та періодичні медичні огляди робітників, які працюють у шкідливих умовах, профілактичне харчування, дотримання правил особистої гігієни;
- контроль за вмістом шкідливих речовин у повітрі робочої зони;
- використання засобів індивідуального захисту.

					<i>Безпека в надзвичайних ситуаціях</i>	<i>Арк.</i>
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

## 5. ЕКОЛОГІЯ

### 5.1. Екологізація підприємств молочної галузі

Охорона навколишнього середовища – одне із найважливіших завдань, які стоять перед інженерно-технічними працівниками в процесі їх виробничої діяльності. Природоохоронна робота підприємств може проводитись у двох напрямках: очищення шкідливих викидів та усунення причин забруднень. Очевидно, що більш перспективним є другий напрямок. Його реалізація вимагає впровадження безвідходних технологій виробництва, які дозволяють комплексно використовувати вихідну сировину та утилізувати максимальну кількість шкідливих речовин [1, 12].

Питання створення екологічно чистих виробництв і модернізації вже існуючих молокопереробних підприємств є одними з найважливіших, які необхідно вирішити для збереження природи, а також підвищення ефективності роботи підприємств. Молочна промисловість – галузь, підприємства якої вимагають проведення ряду модернізаційних робіт для підвищення екологічності виробництва [15, 17]. Викид шкідливих речовин на підприємствах переробки молока пов'язаний з двома основними факторами: велика кількість водоспоживання та водовідведення і підвищене виділення вуглекислого газу, одержуваного в результаті виробництва. Відведена вода підприємств переробки молока містить велику кількість фізико-хімічних, а також біологічних забруднювачів, які вимагають проведення очисних заходів. У зв'язку з різною структурою і технологій переробки молока вироблення єдиного рішення по очищення вод є дуже важкою. Існують три напрямки розробки заходів щодо екологізації підприємств молочної виробництва:

- створення раціональних, ресурсозберігаючих технологій з глибокої, повної та комплексної переробкою основного і побічного потоків відходів;

					<i>ДР 18-550.00.00.005 ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Екологія</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркцнів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Процик Д.І.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Сторож Л.А.</i>						
<i>Консульт.</i>		<i>Лясота О.М.</i>						
<i>Затв.</i>		<i>Покотило О.С.</i>						
						<i>ТНТУ, ФМТ, зр. МЛмз-61</i>		



- збір і переробка відходів – вторсировини на харчові та кормові цілі;
- очищення та знешкодження невикористовуваних відходів згідно природоохоронним вимогам.

Останнім часом кількома науковими організаціями спільно з підприємствами переробки молока проведено ряд робіт у даному напрямку. Одним з рішень проблеми стала розробка рекомендацій зі збирання та переробки відходів виробництва з використанням їх на кормові цілі, що забезпечують зниження забрудненості стічних вод на 25-30%. Дана схема збору відходів була впроваджена в проекти низки підприємств. Додатково створені раціональні системи водного господарства підприємств з високим рівнем (до 95%) використання оборотно-повторних систем водопостачання та очищенням малозабруднених стічних вод. Розроблено системи екологічних нормативів з використанням комп'ютерних технологій, які дозволяють найкращим чином відстежити ступінь забруднення та очищення вод, впроваджені у проекти на діючих підприємствах. Теоретично обгрунтовані і вивчені в промислових умовах перспективні типи очисних споруд для повної біологічної очистки з продовженої аерацією, що враховують особливості молочного виробництва – сезонний характер, коливання обсягів стоків, рівні їх забруднення [4, 18]. У складі споруд для доочищення використані біологічні ставки, які вже застосовувалися в молочних галузях.

Науково обгрунтована можливість використання природних екологічних систем для повної біологічної очистки стічних вод молочного виробництва з метою подальшого впровадження в переробку [31]. Одним з вдалих рішень утилізації стічних вод молочної промисловості є використання їх в зрошувальних системах, що дозволяє поєднувати ефективно їх очищення з підвищенням врожайності сільськогосподарських культур і запобігає забрудненню водоймищ.

Крім цього для вирішення екологічних проблем молочного виробництва розробляються різні схеми для очищення вод. Наприклад, нові компактні споруди для фізико-хімічного очищення, що поєднують процеси усереднення,

					<i>Екологія</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

витрат і складу та одночасної очистки стічних вод з виділенням зважених речовин і жирів, які можна використовувати на підприємствах різної продуктивності. До складу споруд для попереднього очищення (з використанням коагулянтів) входить вузол переробки відходів анаеробними методами.

Особливо актуальною в даний час є проблема створення галузевої системи контролю основних екологічних показників: водоспоживання, водовідведення, забруднення стічних вод, рівня відходів виробництва. Промисловість платить великі штрафи за перевищення екологічних нормативів, що є в даний момент більш дешевим способом «дотримання» екологічних вимог. Але контроль екологічних показників самими підприємствами дозволив би не тільки уникнути необґрунтованих штрафів, а й здійснювати раціональне використання сировинних ресурсів, енергії, води та ін, а також оцінювати екологічну безпеку виробництва.

Крім стічних вод, у виробництві молока великої шкоди екології завдає виділення вуглекислого газу, але дана проблема більшою мірою поки розглядається в країнах Заходу [6, 13]. При виробництві одного літра молока виділяється близько 1 кг вуглекислого газу ( $\text{CO}_2$ ), до 85% парникових газів виробляють ферми. Виробництво одного літра молока обходиться екології викидом 940 г еквівалента  $\text{CO}_2$ , а з виділяються на фермах парникових газів 59% припадає на метан, 24% на нітрати і 17% – на той же вуглекислий газ. Дослідження західних вчених підтвердили підозри, що саме молочні ферми виробляють більшу частину парникових газів. До питань вирішення екологічних проблем, у тому числі і в молочній промисловості, необхідно підходити комплексно і з використанням можливостей суміжних галузей, що дозволить домогтися максимального ефекту не тільки для одного виду підприємств.

					<i>Екологія</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

## 5.2. Утилізація відходів переробки молока

В багатьох підприємств харчової промисловості в багатьох випадках відходи є цінною сировиною в інших виробництвах. Зокрема в молочній промисловості такою вторинною сировиною є сироватка. На багатьох підприємствах впроваджені технології її переробки, проте на виробництвах не великої потужності вона поступає в стічні води. Крім сироватки стічні води молочних підприємств включають стоки, отримані при митті технологічного обладнання та побутові стоки.

Саме вмістом здатних до окислення органічних речовин, серед яких переважає білок, обумовлена сильна забруднююча здатність відходів молочного виробництва. Основна частина органічних речовин потрапляє у відходи із сироваткою [38]. Встановлено, що для окислення органічних сполук, що містяться в 25 тоннах молочної сироватки, потрібно стільки ж кисню як для окислення побутових відходів міста з населенням 40000 чоловік. При цьому об'єми отримуваної сироватки є значними — так при виробництві твердих сирів її вихід становить близько 90% від об'єму перероблюваного молока. Проблема забруднення навколишнього середовища відходами молокопереробних підприємств ускладнюється на фоні низького рівня переробки молочної сироватки, адже основний її об'єм потрапляє у стічні води, створюючи навантаження на очисні споруди та погіршуючи стан довкілля.

При сепаруванні молока і виробництві масла в знежирене молоко і маслянку переходить 75% сухої речовини, до 97% білків, значна частина вуглеводів молока, мінеральних речовин, вітаміни; при виготовленні сиру і казеїну - до 50% сухої речовини (біля 93% вуглеводів, 24-26% білків і 2-5% жиру), що містяться в молоці.

В сироватці залишається майже весь молочний цукор, водорозчинні вітаміни молока, більша частина мінеральних речовин, в тому числі повністю сироваткові білки.

За своєю масою ресурси побічних продуктів в молочній промисловості складають в середньому 2/3 всього об'єму молока, що переробляється.

					<i>Екологія</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

Зниження вартості основних продуктів харчування, які виробляє молочна промисловість можливе за рахунок раціонального використання та переробки вторинних продуктів.

На підприємствах не повністю використовують вторинні продукти, такі як сироватку та маслянку і частину із них повертають сільському господарству для відгодівлі худоби.

Раціональними шляхами використання вторинних продуктів переробки молока є виготовлення білкових і сухих концентратів, покращення ними органолептичних властивостей кисломолочних продуктів.

Збільшення виробництва, розширення асортименту, покращення смакових та поживних якостей молочних продуктів залежить не тільки від кількості молока, що надійшло на переробку, але й від якості і зниження втрат. Успішне вирішення цих задач значною мірою залежить від чіткого виконання технологічних вимог в усьому ланцюгу виробничих процесів.

На сьогодні існує більше десятка способів утилізації сироватки з використанням як біологічних так і мембранних методів обробки [32]. Це теплова обробка, консервування, сепарування, метод екструзії, використання її у виробництві різноманітних харчових продуктів, медичних препаратів та технічних матеріалів. З огляду на широке застосування молочної сироватки може скластись хибне враження про вирішення проблеми утилізації.

Сироватка має значну концентрацію органічних сполук, що потребують для свого окиснення великої кількості кисню, тобто характеризується високою біологічною активністю [37]. З питань використання сироватки в необробленому вигляді для згодовування сільськогосподарським тваринам проведено порівняно велику кількість досліджень. Безпосереднє використання сироватки з метою компенсації тваринного білка визнано економічно недоцільним. Попереднє сушіння сироватки з наступним використанням її в кормових цілях також є економічно недоцільним, тому що, за літературними джерелами, в організмі тварин вона засвоюється лише на 20 %. Особливий інтерес молочна сироватка становить як джерело вторинних сировинних

					<i>Екологія</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ доцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

ресурсів (ВСР) і збагачувач кормів, оскільки за хімічним складом і енергетичною цінністю видно, що вона містить близько 50 % сухих речовин молока. Проведеними дослідженнями встановлено, що в молочній сироватці міститься понад 30 макро- та мікроелементів, а також практично всі вітаміни молока. Як відомо, білковий, вуглеводний і ліпідний комплекси молочної сироватки, амінокислотний склад її білків, вміст вітамінів свідчать про її високу біологічну цінність. Промислова переробка молочної сироватки здійснюється у двох основних напрямках: комплексне використання всього сухого залишку і вилучення окремих компонентів.

					<i>Екологія</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ доцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

## ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ

1. В результаті проведених досліджень було виділено фосфопротеїновий субстрат із знежиреного коров'ячого молока шляхом осадження в ізоелектричні точки. Для повного відділення інших небілкових компонентів було проведено переосадження і проаналізовано фракційний склад субстрату. У ньому виявлено всі електрофоретично чисті фракції фосфопротеїнів коров'ячого молока:  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - і  $\kappa$ -казеїни відповідно до сучасної класифікації.

2. Проведено протеоліз отриманого фосфопротеїнового субстрату в умовах, які відповідають процесам нормального травлення протеїнів молока: температура 37°C і рН середовища 7,9. Як ферментний препарат використано панкреатин. Встановлено, що найвища швидкість протеолізу спостерігається протягом перших 120 хв процесу. Із отриманого на 180-й хв.гідролізату виділяли фосфопептиди.

3. Проведено розділення отриманого прерарату фосфопептидів з використанням набору сефадексів. Встановлено, що основна частка виділених в запропонованих умовах фосфопептидів має молекулярну масу в межах 700-1500 Да – 50 %; 33, % припадає на фосфопептиди з молекулярною масою від 1500 до 5000 Да, що властиво для природних біологічно активних пептидів.

					<i>ДР 18-550.00.00.000 ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Процик Д.І.</i>				<i>Висновки</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Сторож Л.А.</i>							
<i>Консульт.</i>	<i>Сторож Л.А.</i>					<i>ТНТУ, ФМТ, зр. МЛмз-61</i>		
<i>Затв.</i>	<i>Покотило О.С.</i>							

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Апостолук С.О., Джигерей В.С., Апостолук А.С. Промислова екологія: навч. посіб. К. : Знання, 2005. 474.
2. Антонов К.К. Химия протеолиза. М: Наука, 1991. 504 с.
3. Аряев М.Л., Клименко В.А., Кожем'яка А.І., Фьоклін В.О. Атопічний дерматит у дітей. К., 2006. 88 с.
4. Барышников И.И. Экологическа токсикология: В 2 ч. / И.И. Барышников, А.О. Лойт, М.Ф Савченков. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1991. Ч. I, 164 с.
5. Боровик Т.Э., Ладодо К.С., Рославцева Е.А. и др. Современные взгляды на организацию прикорма детей с пищевой аллергией. *Вопр. дет. диетол.* 2003. Т.1, №1. С. 79–82.
6. Вредные вещества в окружающей среде. Кислородсодержащие органические соединения; под. ред. В.А. Филова, Б.А. Ивина, Ю.И. Мусийчука: СПб.: Профессионал. 2004. 344 с.
7. Ганонг В. Ф. Фізіологія людини: Пер. з англ. Львів: БаК, 2002. 784 с.
8. Голиков С.Н. Общие механизмы токсического действия / С.Н. Голиков, И.В.Саноцкий, Л.А. Тиунов М.: Медицина, 1986. 280 с.
9. Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов. СПб: Гиорд, 2001. 320 с.
10. Гріщенко Г.В. Розробка технології сухих сумішей з гідролізованим білком для дитячого харчування (автореферат). Київ, 2007.
11. Губський Ю.І. Біологічна хімія: Підручник. Київ Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. 508с.
12. Джигирей В.С. Екологія та охорона навколишнього природного середовища Київ: Знання, 2004. 310 с.
13. Дмитренко І.П. Джерела утворення та надходження діоксинів в організм людини. *Екологічний вісник.* 2005 №5. С. 10-11.
14. Долин П. А. Справочник по технике безопасности. М.: Энергоатомиздат, 1985. 824 с.

					<i>Список використаної літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

15. Екологія довкілля. Охорона природи: навчальний посібник для студентів вузів / В. Грицик, Ю. Канарський, Я. Бедрій. К.: Кондор, 2009. 290 с.
16. Эксль Б.-М., Нетребенко О.К. Гипоаллергенное питание у детей первого года жизни [Текст] / О.К. Нетребенко, Б.М. Эксль // Педиатрия. – 2003. – №2. – С. 42–45.
17. Запольський А. К. Екологізація харчових виробництв: Підручник для студентів ВНЗ. К: Вища школа, 2005. 428 с.
18. Исидоров В.А. Экологическая химия: учебное пособие для вузов / В.А. Исидоров – СПб.: Химиздат, 2001. 304 с.
19. Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков. *Соросовский Образовательный журнал*. 1999. № 1. С. 8-12.
20. Ленинджер А. Основы биохимии : в 3 т. / А. Ленинджер; пер. с англ. В. В. Борисова, М.Д. Гроздовой, С.Н. Преображенского [под ред. В.А. Энгельгардта, Я. М. Варшавского]. М. : Мир, 1985. 1055 с.
21. Максимюк Н.Н., Марьяновская Ю.В. О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов. *Фундаментальные исследования*. 2009. № 1. С. 34-35.
22. Мусієнко М.М. Екологія. Охорона природи: словник-довідник / М.М. Мусієнко, В.В. Серебряков, О.В. Брайон. К.: Знання, 2002. 550 с.
23. Овчинников Ю.О. Биоорганическая химия. М.: Просвітництво, 1987. 815с.
24. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536с.
25. Охорона праці та промислова безпека: навч. посіб. / [ К.Н. Ткачук, В.В. Зацарний, Р.В. Сабарно, С.Ф. Каштанов та ін.]; за ред. К.Н. Ткачука і В.В. Зацарного. К., 2009. 454 с.
26. Протоєрейський О.С. Охорона праці в галузі: навч. посіб./О.С. Протоєрейський, О.І. Запорожець. К.: Книжкове вид-во НАУ, 2005. 268с.
27. Рогожин В.В. Біохімія молока та молочних продуктів / В.В. Рогожин. СПб: ГІОРД, 2006.

					<i>Список використаної літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ доцм.	Підпис	Дата		



28. Сегда Д. Г., Гендзюк М. П., Степанець І. Ф. Вендиченський В.Н., Литвененко А. М., Іваненко О. В. Основи охорони праці. К.: Основа, 2000. 416 с.
29. Связь между химическим строением и детоксицирующей активностью некоторых синтетических полимеров, содержащих третичные аминогруппы, при интоксикации эпихлоргидрином / И.Ю. Высоцкий, И.П. Федорова, В.Д. Лукьянчук и др. *Физиологически активные вещества*. 1995. Вып. 26. С. 39-44.
30. Сидорин Г.И. Об адаптации к действию химических веществ / Г.И. Сидорин, Л.В. Луковникова // II съезд токсикологов России: тез. докл. Москва, 10 - 13 ноября 2003 г. М., 2003. С. 240-242.
31. Сидоренко Л.І. Сучасна екологія. Наукові, етичні та філософські ракурси: навчальний посібник. Київ, 2002. 150 с.
32. Телитченко М.М., Остроумов С.А. Введение в проблемы биохимической экологии. М.: Наука, 1990. 288 с.
33. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты: получение, состав, применение. *Аграрная наука*. 2000.
34. Фрумин Г.Т. Экологическая химия и экологическая токсикология. СПб.: изд. РГГМУ, 2000. - 198 с.
35. Химический синтез пептидов / Гершкович А. А., Кибирев В. К.; Отв. ред. Серебряный С. Б.; АН Украины. Ин-т биоорган, химии и нефтехимии. Киев : Наук, думка, 1992. 360 с.
36. Хімія молочної сировини: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / О.П Чагаровський, Н.А Ткаченко, Т.А Лисогор. – Одеса.: «Сімекс-прінт», 2013. 268с.
37. Храмцов А.Г. Деминерализация лактозосодержащего сырья методом электродиализа. Обзорная информация / А.Г. Храмцов, И.А. Евдокимов, Г.С. Варданян, А.И. Терновой. *АгроНИИТЭИММП*. 1992. С. 32.
38. Храмцов А.Г. Науково-технічні аспекти раціонального використання молочної сироватки. Мол. пром-сть, 1993. №2. С.2-4.

					<i>Список використаної літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

39. Шугалей И. В., Гарабаджиу А. В., Целинский И. В. Химия белка: учебное пособие / СПб. : Проспект науки, 2011. 200с.
40. Юкало А.В. Біоактивні пептиди протеїнів сироватки молока корів (*Bos taurus*) / А. В. Юкало, К. Є. Дацишин, В. Г. Юкало. *Biotechnologia Acta*. 2013. Т. 6, № 5. С. 49-61.
41. Юкало А.В. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів / А. В.Юкало, Л. А. Сторож, В. Г. Юкало // *Біотехнологія*. 2012. 5, № 4. С. 21-33.
42. Юкало В. Г. Електрофорез білків молока. *Медична хімія*. 2000. № 4. С. 79–82.
43. Юкало В. Г. Електрофорез білків казеїнового комплексу в анодній системі поліакриламідного гелю. *Вет. біотехнол.* 2007. № 11. С. 246-251.
44. Юрин В.М. Основы ксенобиологии. Минск: Новое знание, 2002. 268 с.
45. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем. М.: Мир, 1985. 456 с.
46. Verrocal R., Chanton S., Juillerat M. et al. Tryptic phosphopeptides from whole casein II. Physicochemical properties related to the solubilisation of calcium. *J.Dairy Res.* 1989. Vol.56. P.335-341.
47. Brandsch M., Brust P., Neubert K. B. Casomorphins - chemical signals of intestinal transport system. Weinheim: VCH, 1994. P. 207-219.
48. Brantl V., Neubert K. Opioid peptides derived from food proteins *Trends Pharmacol. Sci.* 1986. V. 7, N 1. P. 6-7.
49. Brommage R., Jullerat M., Jost R. Influence of casein phosphopeptides and lactulose on intestinal calcium absorption in adult female rats. *Leit.* 1991. Vol. 71. P.173-180.
50. Chabance B., Marteau P., Rambaud J.C. et al. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie.* 1998. Vol.80, №2. P.155-165.
51. Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A. Nomenclature of proteins of cow`s milk: Fifth revision. *J Dairy Sci.* 1984. Vol.67, №8. P.1599-1631.

					<i>Список використаної літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

52. Farrell H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T. Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision. *J. Dairy Sci.* V. 87, № 6. P. 1641-1674.
53. FitzGerald R.J. Potential uses of caseinophosphopeptides. *Int. Dairy J.* 1998. Vol.8. P.451-457.
54. Haque E., Chand R., Kapila S. Biofunctional Properties of Bioactive Peptides of Milk Origin. *Food Rev. Intern.* 2009. V. 25, № 1. P. 28-43.
55. Holt C., Timmins P.A., Errington N., Leaver J. A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by beta-casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron scattering measurements. *Eur. J. Biochem.* 1998. Vol. 252. P. 73-78.
56. Jolles P., Loucheux Lefebvre M. H., Henschen A. Structural relatedness of  $\kappa$ -casein and fibrinogen  $\gamma$ -chain. *J. Molec. Evol.* 1978. V. 11. P. 271-277.
57. Jullerat M., Beachler R., Berrocal R. Tryptic phosphopeptides from whole casein I. Preparation and analysis by FPLC. *J. Dairy Res.* 1989. Vol. 56. P.603-611.
58. Kayser H., Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* 1996. V. 383, № 1-2. P. 18-20.
59. Kopra N., Seholz-Ahrens K.E., Barth C.A. Effect of casein phosphopeptides on utilization of calcium in vitamin D-replete and vitamin D-deficient rats. *Milchwiss.* 1992. Vol.47. P.488-493.
60. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: *Production and functionality.* *International Dairy Journal.* 2006. V. 16. P. 945-960.
61. Lee Y.S., Noguchi T., Naito H. Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet. *Brit. J. Nutrit.* 1980. Vol.43. P.457-467.
62. Maeno M., Yamamoto N., Takano T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP 790. *J. Dairy Sci.* 1996. V. 79, N 8. P. 1316-1321.

					<i>Список використаної літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

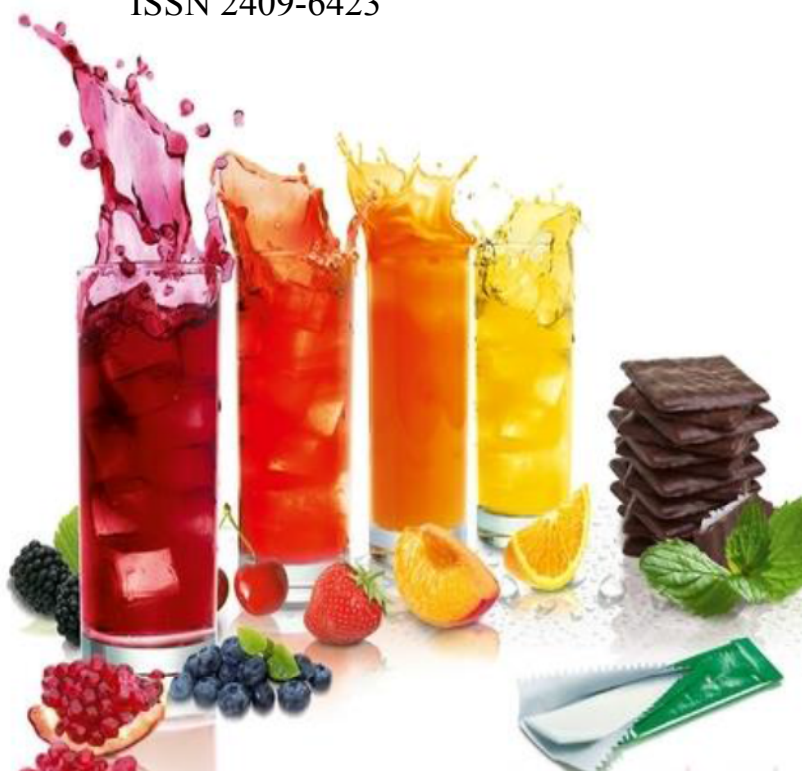
63. Mahmud R., Matn M. A., Otani H. Mitogenic effect of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and its proteolytic digests on mouse spleen resting cells. *Pakist. J. Biol. Sci.* - 2004. V. 7, N 12. P. 2047-2050.
64. Mc Donagh D., FitzGerald R.J. Production of caseinophosphopeptides (CPPs) from sodium caseinate using a range of commercial protease preparation. *Int. Dairy J.* 1998. Vol.8. P.39-45.
65. Miyauchi H., Kaino A., Shinoda I. et al. Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolyzate on murine splenocytes and Peyer's patch cells. *J. Dairy Sci.* 1997. V. 8, № 10. P. 2330-2339.
66. Pihlanto-Leppala A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins *Trend. Food Sci. Technol.* 2001. V. 11, N 9-10. P. 347-356.
67. Pointellart A., Gueguen L. Absence d'effet de l'incorporation d'un phosphopeptide du lait sur l'utilisation du calcium et du phosphore chez le jeune porc. *Reproduc. Nutr. Develop.* 1989. Vol.29. P.477-486.
68. Schusdziarra V., Schick R., Dela Fuente A. Effect of  $\beta$ -casomorphins and analogs on insuline release in dogs. *Endocrinology.* 1983. V. 112. P. 1948-1951.
69. Silva S.V., Malcata F.X. Caseins as source of bioactive peptides. *Intern. Dairy J.* 2005. V. 15. P. 1-15.
70. West, D.W. Structure and function of the phosphorylated residues of casein. *J. Dairy Res.* – 1986. – V. 53: – 333-352.
71. H. Zong H. Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides / H. Zong, L. Peng, S. Zhang et al. *European Food Research and Technology.* 2012. V. 235, № 5. P. 811-816.

					<i>Список використаної літератури</i>	Арк.
ЗМН.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

# ДОДАТКИ

					<i>Додатки</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

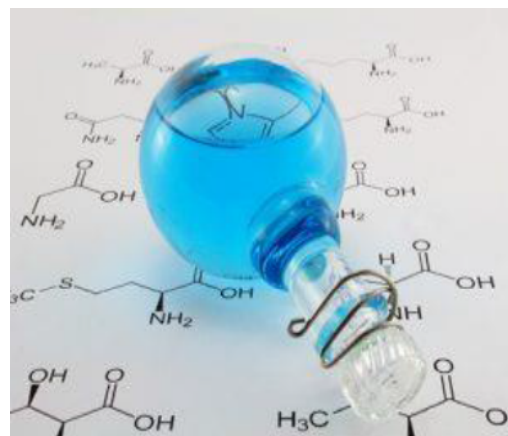
ISSN 2409-6423



# **ХІМІЯ, БІО- І НАНОТЕХНОЛОГІЇ, ЕКОЛОГІЯ ТА ЕКОНОМІКА В ХАРЧОВІЙ ТА КОСМЕТИЧНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ**

**Збірник матеріалів  
VII міжнародної  
науково-практичної  
конференції**

7-8 листопада 2019



5. Gurusami Mariappan, Rejaul Korim, Nand Madhwa Joshi, Faruk Alam, Rajib Hazarika, Deepak Kumar, Tiewlasubon. Synthesis and biological evaluation of formazan derivatives // Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & research. – 2010. – Vol. 1. – Issue 4. – P. 396-400.

6. Revanasiddappa B. C., Subrahmanyam E. V. S. Synthesis and biological studies of some novel formazans // Oriental Journal of chemistry. – 2010. – Vol. 26. – № 1. – P. 243-246.

7. Amarish B. Samel, Nandini R. Pai Synthesis and Antimicrobial Activity of some novel Formazan Derivatives. // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. – 2010. – Vol. 2. – № 4. – P. 60-67.

8. Ayşe Şahin Yağlıoğlu, Hülia Şenöz Synthesis of novel 5-substituted phenyl-3-(p-isopropylphenyl)-1-phenylphormazan and their biological activities. // Turkish Journal of Chemistry. – 2017. – Vol. 41. – P. 883-891.

9. Немченко Н. В., Пунько В. С., Калашнікова Т. О., Мироненко Л. С., Дістанов В. Б. Синтез та дослідження похідних формазанів – потенційних біологічно активних речовин. // Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів». – Харків: НФаУ. – Т. 2. – 2018. – С. 209-210.

10. Дістанов В. Б., Немченко Н. В., Фалалєєва Т. В., Мироненко Л. С. Синтез нових похідних формазанів – потенційних біологічно активних речовин // Тези доповідей IV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні проблеми науково-промислового комплексу регіонів – 2018». – Рубіжне: Інститут хімічних технологій Східноукраїнського національного університету імені Володимира Даля. – 2018. – С. 26-30.

11. Голубенко Є. А., Пунько В. С., Івченко П. П., Мироненко Л. С., Калашнікова Т. О., Дістанов В. Б. Арилгідразони – прекурсори для синтезу формазанів // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів». – Харків: НФУ. – 2019. – С. 67-68.

12. Дістанов В. Б., Голубенко Є. А., Породнов А. О., Фалалєєва Т. В., Мироненко Л. С. Розробка принципової схеми отримання гідразонів і формазанів. // Матеріали доповідей V Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні проблеми науково-промислового комплексу регіонів – 2019». – Рубіжне: Інститут хімічних технологій Східноукраїнського національного університету імені Володимира Даля. – 2019. – С. 22-26.

## **БІОТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ТА ВИКОРИСТАННЯ КАЗЕЇНОВИХ ФОСФОПЕПТИДІВ**

**Сторож Л.А., Маліцька Н.І., Процик Д.І., Юкало В.Г.**

*Тернопільський національний технічний університет імені Івана  
Пулюя, м. Тернопіль, biotech@tu.edu.te.ua*

У 80- і 90-ті роки минулого століття було проведено ряд досліджень ферментативних гідролізатів казеїнів, отриманих *in vitro*, гастроінтестинальних гідролізатів, отриманих *in vivo*, а також синтетичних пептидів, які відповідали первинній структурі казеїнів. У результаті було виявлено ряд біологічно активних пептидів, які можуть утворюватись при розщепленні різних фракцій білків казеїнового комплексу. Такі пептиди впливають на функцію різних фізіологічних систем організму. Зокрема, були ідентифіковані агоністи та антагоністи опіатних рецепторів, інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту, антитромботичні пептиди, імуномодуляторні пептиди, біоактивні фосфопептиди, пептиди, які пригнічують розвиток патогенних мікроорганізмів<sup>o</sup>[1].

Вперше на біологічну функцію фосфопептидів у своїх роботах вказав Міленде. Він дослідив і описав незалежну від вітаміну D кальцифікацію кісток при застосуванні казеїнових фосфопептидів у дітей, які хворіли рахітом. В подальших численних роботах було підтверджено здатність казеїнових фосфопептидів зв'язувати елементи кальцій, магній, ферум, а також мікроелементи (цинк, нікель, кобальт, селен). Казеїнові фосфопептиди потенційно можуть бути застосовані для профілактики остеопорозу, рекальцифікації кісток після переломів, при лікуванні рахіту, для запобігання розвитку карієсу. Також показано, що казеїнові фосфопептиди можуть бути корисними при анемії, при недостатці ряду мікроелементів (Zn, Cu, Cr, Co, Mn, Se), при дефіциті магнію у вагітних жінок і людей похилого віку, для підвищення рівня фосфору при гуманізації молока, регулюванні секреції шлункового соку, регулюванні кров'яного тиску, як антиоксиданти, імуностимулятори та радіопротектори [2].

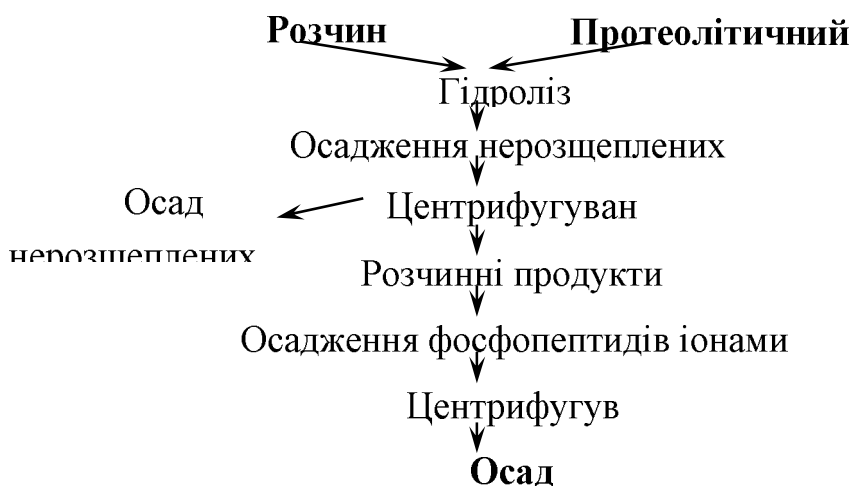
На сьогоднішній день вже виробляється декілька функціональних інгредієнтів і харчових продуктів з використанням фосфопептидів. В Україні ж такі продукти не виробляються.

У зв'язку з цим метою роботи була розробка біотехнології кисломолочного продукту з казеїновими фосфопептидами. Основними завданнями роботи було виділення природних фосфопептидів з гідролізатів казеїну і використання їх в технології кисломолочного продукту.

В роботі використано свіже коров'яче молоко кислотністю 16...18°Т, казеїн виділяли ізоелектричним осадженням, для отримання гідролізатів використовували панкреатин фірми ПАТ «Технолог» (Україна). Фракційний склад казеїну і гідролізатів визначали електрофорезом у пластинках поліакриламідного гелю [3]. Концентрацію білків і пептидів визначали спектрофотометрично при довжині хвилі  $\lambda=280$  нм з використанням відповідних коефіцієнтів поглинання [4].

Природні казеїнові фосфопептиди виділяли, як показано на схемі:





Висушений осад фосфопептидів використовували для збагачення кисломолочного продукту. За основу була взята технологія кефірного продукту, розроблена раніше [5]. Встановлено оптимальні кількості фосфопептидів в складі продукту. Охарактеризовано фізико-хімічні та органолептичні показники кефірного продукту з додаванням казеїнових фосфопептидів. Наступним етапом буде дослідження впливу розробленого кефірного продукту на засвоєння іонів кальцію та інших двовалентних металів в організмі тварин і людини.

### Література

1. Юкало А. В., Сторож Л. А., Юкало В. Г. Білки казеїнового комплексу молока корови (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів. *Біотехнологія*. 2012. Т. 5, № 4. С. 21–33.
2. *Dairy Chemistry and Biochemistry* / Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. New York: Springer. 2015. 584 p.
3. Yukalo V., Datsyshyn K., Storozh L. Electrophoretic system for express analysis of whey protein fractions. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2019. 2/11 (98). P. 37–44.
4. Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Swaisgood, H.E. Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision. *Journal of Dairy Science*. 2004. Vol. 87, № 6. 1641–1674.
5. Степанова Л. И. Справочник технолога молочного производства. Технология и рецептуры. В трех томах. Т.1. Цельномолочные продукты. СПб: ГИОДР, 1999. 384 с.

## АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ НОВИХ БІОЦИДІВ ТІОСУЛЬФОНАТНОЇ СТРУКТУРИ

<sup>1</sup>Мартирисян І.А., <sup>2</sup>Пахольук О.В.

<sup>1</sup>Національна академія харчових технологій, м. Одеса, [miaviva@ukr.net](mailto:miaviva@ukr.net)

<sup>2</sup>Національний технічний університет, м. Луцьк,  
[o.pakholiuk@lntu.edu.ua](mailto:o.pakholiuk@lntu.edu.ua)