

Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

(повне найменування вищого навчального закладу)

Інженерії машин, споруд і технологій

(назва факультету)

Харчової біотехнології і хімії

(повна назва кафедри)

ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА

до дипломного проекту (роботи)

магістр

(освітній ступінь (освітньо-кваліфікаційний рівень))

на тему

Гідроліз протеїнів сироватки молока протеазами

тваринного походження.

Виконав: студент VI курсу, групи МЛм

спеціальності (напряму підготовки) _____

181 “Харчові технології”

(шифр і назва спеціальності (напряму підготовки))

_____ **Берекета В.П.**
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник _____ **Юкало В.Г.**
(підпис) (прізвище та ініціали)

Нормоконтроль _____ **Покотило О.С.**
(підпис) (прізвище та ініціали)

Рецензент _____ **Зварич Н.М.**
(підпис) (прізвище та ініціали)

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

Факультет Інженерії машин, споруд і технологій

Кафедра Харчової біотехнології і хімії

Освітньо-кваліфікаційний рівень Магістр

Напрямок підготовки Харчові технології
(шифр і назва)

Спеціальність 181 "Харчові технології"
(шифр і назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри Покотило О.С.

«_____» 20_р.

ЗАВДАННЯ НА ДИПЛОМНИЙ ПРОЕКТ (РОБОТУ) СТУДЕНТУ

Берекеті Віті Петрівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема проекту (роботи) Гідроліз протеїнів сироватки молока протеазами тваринного походження

Керівник проекту (роботи) д.б.н., проф. Юкало В.Г.

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

Затверджені наказом по університету від 4/7 – 771 від 30.08.2019

2. Термін подання студентом проекту (роботи) _____

3. Вихідні дані до проекту (роботи) Спеціальна, періодична література та нормативна Документація з питань досліджень, методики та методи досліджень

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Реферат, Вступ, Мета і завдання роботи

Огляд літератури

Матеріал і методи досліджень

Власні дослідження

Обґрунтування економічної ефективності

Охорона праці, Безпека в надзвичайних ситуаціях, Екологія

Висновки і пропозиції виробництву

6. Консультанти розділів проекту (роботи)

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Охорона праці	Окіпний І.Б., к.т.н., доц.		
Безпека в надзвичайних ситуаціях	Клепчик В.М., ст.викл		
Екологія	Зварич Н.М., к.т.н., доц.		
Нормоконтроль	Покотило О.С., д.б.н., проф.		

7. Дата видачі завдання

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломного проекту (роботи)	Термін виконання етапів проекту (роботи)	Примітка
1.	Аналітичний огляд та патентний пошук інформації відповідно до теми магістерської роботи		
2.	Складання схеми досліджень		
3.	Опрацювання методики досліджень		
4.	Виконання експериментальних досліджень		
5.	Обґрунтування економічної ефективності виробництва		
6.	Збір інформації до виконання розділів «Охорона праці», «Безпека в надзвичайних ситуаціях» та «Екологія»		
7.	Закінчення написання розділів, написання висновків, автореферату		
8.	Розробка слайдів презентації		
9.	Подання магістерської роботи до захисту		

Студент

_____ (підпис)

Берекета В.П.

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник проекту (роботи)

_____ (підпис)

Юкало В.Г.

_____ (прізвище та ініціали)

Зміст

Реферат.....	
Вступ.....	
Мета і завдання роботи.....	
Розділ 1. Огляд літератури.....	
1.1. Загальна характеристика білків сироватки молока.....	
1.2. Використання протеїнів сироватки в харчових технологіях.....	
1.3. Гідролізати білків сироватки.....	
1.4. Біологічно активні пептиди білків сироватки.....	
Розділ 2. Матеріал і методи досліджень.....	
2.1. Характеристика концентрату сироваткових білків	
2.2. Визначення концентрації білків спектрофотометричним методом..	
2.3. Визначення протеолітичної активності спектрофотометричним методом.....	
2.4. Гель-фільтрація.....	
2.5. Електрофорез.....	
Розділ 3. Власні дослідження.....	
3.1. Результати досліджень продуктів протеолізу концентрату сироваткових білків.....	
3.1.1. Порівняння динаміки протеолізу концентрату сироваткових білків за дії різних протеолітичних препаратів.....	
3.1.2. Гель-фільтрація продуктів протеолізу концентрату сироваткових білків на сефадексі G-50.....	
3.1.3. Електрофорез в поліакриламідному гелі протеїнових фракцій концентрату сироваткових білків.....	
3.2. Обговорення результатів протеолізу концентрату сироваткових білків.....	

					18-154 19 ДР 000 ПЗ		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Берекета В.П.</i>			<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Южало В.Г.</i>					
<i>Реценз.</i>					<i>Зміст</i>		
<i>Н. Контр.</i>					<i>ТНТУ, МЛМ-61</i>		
<i>Затверд.</i>							

Розділ 4. Обґрунтування економічної ефективності виробництва гідролізатів сироваткових білків.....	
Розділ 5. Охорона праці.....	
5.1. Відповідальність посадових осіб і працівників за порушення законодавства про охорону праці.....	
5.2. Основні положення державного соціального страхування від нещасного випадку на виробництві та професійного захворювання.....	
Розділ 6. Безпека в надзвичайних ситуаціях.....	
Розділ 7. Екологія.....	
Висновки і пропозиції виробництву.....	
Список використаної літератури	
Апробація результатів магістерської роботи.....	

					<i>Зміст</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Реферат

Магістерська робота складається з вступу, таких розділів як «Огляд літератури», «Матеріал і методи досліджень», «Власні дослідження», «Обґрунтування економічної ефективності виробництва гідролізатів сироваткових білків», «Охорона праці», «Безпека в надзвичайних ситуаціях», «Екологія», висновків та списку використаної літератури.

Обсяг роботи: пояснювальна записка – 114 арк. формату А4, на яких 9 рисунків, 7 таблиць, та 108 найменувань використаних джерел, ілюстративний матеріал презентацій – 17 аркушів формату А4.

Об'єктом досліджень дипломної роботи є процес гідролізу білків сироватки молока протеазами тваринного походження.

У даній роботі використано такі методи як гель-фільтрація (на колонці з сефадексом G-50), експрес-електрофорез (в анодній системі однорідного поліакриламідного гелю) та спектрофотометричний метод визначення концентрації білків та протеолітичної активності (на спектрофотометрі).

За результатами гель-фільтрації з трьох ензимних препаратів найвищий вихід низькомолекулярних пептидів отримано за дії панкреатину, що свідчить про найвищу ймовірність утворення біоактивних пептидів. Вперше було встановлено умови протеолізу для утворення біоактивних пептидів.

Дослідження даної роботи призначенні для застосування в харчовій галузі промисловості, а самі результати можуть бути використані для розробки методів промислової переробки білків сироватки молока.

Виробництво гідролізатів сироваткових білків є економічно ефективним. Це пояснюється тим, що витрати на виробництво покриваються за порівняно недовгий період часу.

Ключові слова роботи: білки сироватки молока, гідролізати протеїнів сироватки молока, біологічно активні пептиди.

					18-154 19 ДР 000 ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Берекета В.П.			Реферат	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Южало В.Г.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.								
						ТНТУ, МЛМ-61		

Вступ

Актуальність теми дипломної роботи полягає у тому, що отримувані гідролізати володіють низькою алергенністю, швидкою засвоюваністю організмом, в їх складі можуть бути присутні різні фізіологічно активні пептиди, необхідні для регулювання ряду важливих функцій організму, а також пептиди, здатні утворювати міцні координаційні зв'язки з іонами кальцію і значно покращувати ефективність їх всмоктування. Також під час гідролізу можна отримувати біологічно активні пептиди, які володіють великою кількістю корисних властивостей. Гідролізати протеїнів сироватки молока застосовують для дитячого харчування, харчування спортсменів, парентерального харчування та ін. Сироватковий протеїн прискорює відновлення після фізичного навантаження і зміцнює імунну систему, а також стимулює термогенез, сприяє розщепленню жирів і зменшує відчуття голоду. Гідролізат же багаторазово підсилює корисні властивості сироваткового протеїну, перераховані вище, оскільки володіє здатністю швидше підвищувати рівень амінокислот в крові і дає більший підйом їх концентрації, ніж звичайний сироватковий білок.

З описаного вище напряму і залежить вибір теми дипломної роботи. Корисність продукту також можна пояснити тим, що білки сироватки молока містять оптимальний набір незамінних амінокислот, що практично співпадає з набором амінокислот в «ідеальному» білку.

Гідроліз в роботі був проведений за допомогою протеаз тваринного походження, а саме трипсину, хімотрипсину та панкреатину. З отриманих результатів при виконанні дипломної роботи було встановлено, що найвищою протеолітичною активністю володіє препарат панкреатин. Дослідження також показують на відмінності у ступені розщеплення білкових фракцій різними протеолітичними препаратами.

					18-154 19 ДР 000 ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Берекета В.П.			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Южало В.Г.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.								
						ТНТУ, МЛМ-61		

Мета і завдання роботи

Метою дипломної роботи є проведення гідролізу білків сироватки молока протеазами тваринного походження.

Завдання роботи:

1. Порівняти протеолітичну активність досліджуваних ферментних препаратів.
2. Провести гідроліз білків сироватки протеазами тваринного походження та описати продукти протеолізу, що утворились через певні відрізки часу, фракційний склад та молекулярно-масовий розподіл поліпептидів і пептидів у ньому.
3. Визначити середній вміст продуктів протеолізу в кожному секторі хроматограми.
4. Визначити залишкову кількість нерозщепленого β -лактоглобуліну і α -лактальбуміну після 120 хвилин гідролізу.

					18-154 19 ДР 000 ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Берекета В.П.			<i>Мета і завдання роботи</i>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Юкало В.Г.						
Реценз.						ТНТУ, МЛМ-61		
Н. Контр.								
Затверд.								

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика білків сироватки молока

Білки – високомолекулярні органічні сполуки, азотовмісні нерегулярні біополімери, побудовані з великої кількості залишків амінокислот, сполучених пептидними та іншими видами зв'язків [1]. Білки мають такий елементарний склад: вуглець – 51- 55 %; кисень – 21 – 23; водень – 6,6 – 7,3; азот – 15 – 18; сірка – 0,3 – 2,4 %. В склад деяких білків входять також фосфор (0,2 – 2 %), залізо та інші елементи [2].

За складом білки поділяють на прості (протеїни), які містять у своєму складі тільки амінокислотні залишки, і складні (протеїди), які складаються, крім білка, з компонента небілкової природи.

Залежно від природи їх небілкової частини складні білки поділяють на групи [3]. Наприклад, ліпопротеїди окрім білка містять ліпіди, глікопротеїди – вуглець, фосфопротеїди – фосфорну кислоту.

В молоці міститься в середньому 3,5% білків, відхилення лежать в межах 2,9-4%. Білки, що входять в склад молока - складні, різноманітні за будовою, фізико-хімічними властивостями і біологічними функціями.

Амінокислотний склад білків. У складі білків виявлено 20 амінокислот [2].

Всі амінокислоти містять аміногрупу(NH_2), яка має лужні властивості, і карбоксильну групу(COOH) – кислі властивості. За будовою своїх радикалів R, або бокових ланцюгів, вони поділяються на ациклічні і циклічні. В залежності від кількості амінних або карбоксильних груп амінокислоти поділяються на нейтральні, кислі і лужні.

Нейтральні амінокислоти мають одну амінну і одну карбоксильну групи:

					18-154 19 ДР 001 ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Берекета В.П.			Огляд літератури	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Юкало В.Г.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.								
					ТНТУ, МЛМ-61			

Аланін (α - амінопропіонова кислота)

Серин (α - аміно- β - оксипропіонова кислота)

Цистеїн (α - аміно- β - тіопропіонова кислота)

Кислі амінокислоти мають дві карбоксильні групи і одну аміногрупу. До них відноситься глютамінова кислота (α - аміноглутарова кислота).

Лужні амінокислоти містять дві аміно- і одну карбоксильну групи. Наприклад, лізин (α , ϵ -діамінокапронова кислота).

Структура білків. З'єднання амінокислот в поліпептидний ланцюг відбувається за допомогою пептидного зв'язку. При сполученні двох амінокислот утворюється дипептид, трьох - трипептид, а багатьох – поліпептид [3].

Рівні організації білкової молекули.

Розрізняють чотири рівні організації структури білкових молекул: первинну, вторинну, третинну і четвертинну[37].

Первинна структура білка являє собою лінійний ланцюг залишків α -амінокислот, які розташовані у певній послідовності в поліпептидному ланцюзі і з'єднані між собою пептидними зв'язками. Таким чином, під первинною структурою білка розуміють кількість, склад і порядок розташування амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюзі. Кожен білок має специфічну структуру, котра визначається генетичною інформацією. Основу первинної структури складають ковалентні пептидні зв'язки [30] (рис.1.1, а).

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

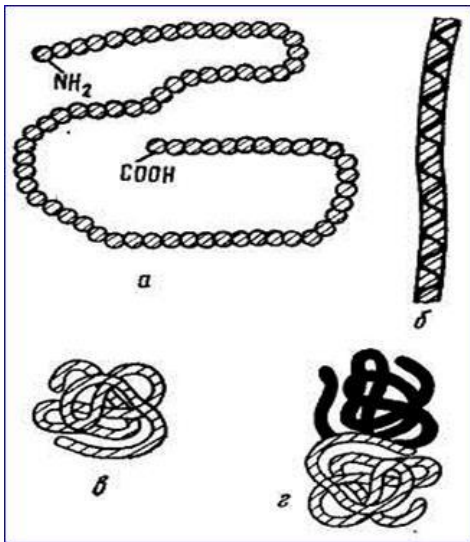


Рис. 1.1. Рівні організації структури білкових молекул

Вторинна структура являє собою впорядковану просторову конформацію поліпептидного ланцюга (рис. 1.1, б). Вона утворюється за рахунок водневих зв'язків між пептидними групами в одному поліпептидному ланцюзі або між сусідніми поліпептидними ланцюгами. При цьому конформація може набувати вигляду спіральних і шаруватоскладчастих структур. Вторинна структура представлена такими регулярними структурами, як α -спіраль, β -структура (складчастий шар або лист) та β -вигин. Певна частина поліпептидного ланцюга не має впорядкованої структури, такі ділянки називають аморфними, або безструктурними зонами. Отже, вторинна структура – це форма і ступінь спіралізації поліпептидного ланцюга в просторі (спіральна конформація) і утворення ділянок β -структур в одному поліпептидному ланцюзі або, в основному, між поліпептидними ланцюгами (шарувато-складчаста конформація) [30].

Третинна структура білків являє собою спосіб укладання поліпептидного ланцюга з елементами вторинної структури (α -спіралі і β -структури) у просторі, який досягається за рахунок взаємодії між радикалами залишків амінокислот (рис. 1.1, в). Для багатьох білків третинна структура еквівалентна повній просторовій структурі. Упакування третинної структури має свої закономірності, залежно від типу первинної структури поліпептидного ланцюга, від стану навколишнього середовища (водно-

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

сольовий склад, рН, температура, взаємодія білка з іншими речовинами тощо). Третинна структура білка визначає форму білкової молекули, утворюючи або глобулу (глобулярні білки) або достатньо витягнуті волокна (фібрилярні білки) [30]. Білки молока відносяться до глобулярних білків.

Білки, побудовані з одного поліпептидного ланцюга, мають тільки третинну структуру. Але багато білків складаються із декількох ідентичних або неідентичних поліпептидних ланцюгів, кожен з яких має свою третинну конформацію. Об'єднуючись, вони утворюють єдиний функціональний комплекс із вищим рівнем організації – четвертинну структуру білка (рис. 1.1, г).

Білки, які мають четвертинну структуру, називають олігомерними. Кожний окремий поліпептидний ланцюг у складі олігомерного білка зветься протомером, або субодиницею [30].

Властивості білків. Молекулярну масу білків дуже велика – від кількох тисяч до десятків мільйонів [1]. Внаслідок великого розміру білкових часток водні розчини їх являють собою колоїдну систему, яка складається із дисперсного середовища (розчинник) і дисперсної фази (частинки розчиненої речовини). Розміри колоїдних частинок коливаються від 1 до 200 нм (1 нанометр = 1×10^{-9} м). Стійкість колоїдних систем обумовлена наявністю на поверхні частинок електричного заряду і гідратної оболонки. Порушення цих факторів призводить до осадження (коагуляції) часточок.

Завдяки наявності в амінокислотних залишках груп, здатних до іонізації (COOH , NH_2), білкові молекули несуть негативні та позитивні заряди.

При пропусканні електричного струму білки переміщуються до катоду або аноду в залежності від заряду білкової молекули. Глобулярні білки за рахунок переважання в них залишків кислих амінокислот набувають в розчинах надлишок від'ємних зарядів. Тільки при визначеному рН спостерігається рівність негативних і позитивних зарядів, тобто електричний заряд білків в цілому буде дорівнювати 0. За цих умов білок знаходиться в ізоелектричному стані і білкова молекула не переміщується в електричному

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

полі. Величина рН розчину, при якому білок знаходиться в ізоелектричному стані, називають ізоелектричною точкою. Ізоелектрична точка більшості глобулярних білків знаходиться в слабкислому середовищі (рН =4,5 - 6,5).

В ізоелектричній точці сили електричного відштовхування між білковими глобулами мінімальні. Це призводить до того, що білки в ізоелектричній точці легко агрегують (збільшуються) і коагулюють. При рН нижче ізоелектричної точки проходить перезарядження білкових часток – вони набувають протилежний заряд і стають стійкими в розчині.

Коагуляцію можна виконати, додаючи в розчин білків дегідратуючі речовини (спирт, ацетон, сульфат амонію), які руйнують гідратну оболонку. При цьому проходить зворотне осадження білків. Тобто при видаленні цих речовин білки знову переходять в нативний стан.

Під дією різних фізико-хімічних факторів (наявність іонів важких металів, концентрованих кислот, лугів, високих температур, механічних впливів) змінюється структура білків і їх нативні властивості. Це явище одержало назву денатурації [2].

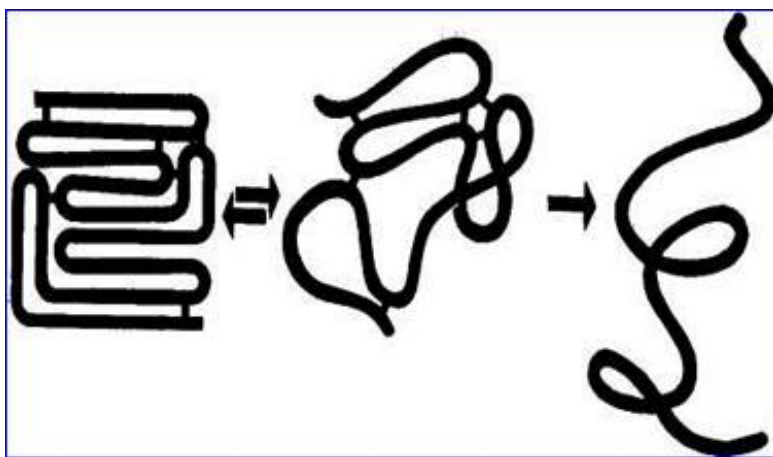


Рис. 1.2. Схема денатурації білків

Денатурація характеризується розвертанням поліпептидного ланцюга білка, який в нативній білковій молекулі був звернений (рис. 1.2.). В результаті розвертання поліпептидного ланцюга при руйнуванні третинної і вторинної структур на поверхню білкової молекули виходять гідрофобні групи. При цьому білок втрачає розчинність, агрегує і випадає в осад.

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

Казеїн є основним білком молока – його вміст складає 78-85% всіх білків, а масова частка в молоці коливається від 2,3 до 2,9 %.

Окрім казеїну в молоці містяться сироваткові білки, тобто білки, що залишаються в сироватці після осадження казеїну в ізоелектричній точці. Вони складають близько 20 % всіх білків молока [4]. До сироваткових відносять білки, які не коагулюють під дією хімозину та інших молокозгортальних ензимів і залишаються при виробництві сичужних сирів в сироватці [17]. До них належать β -лактоглобулін (52 %), α -лактоальбумін (23 %), імуноглобуліни (16 %), альбумін сироватки крові (8 %), лактоферин та інші мінорні білки [4].

Біологічна цінність білків молочної сироватки дуже висока – 112% відносно стандарту:

- сироваткові білки беруть участь у процесі кровотворення та в синтезі білків печінки;
- молочна сироватка містить невелику кількість молочного жиру, що має високу засвоюваність, що сприяє посиленню діяльності ферментів;
- до складу молочної сироватки входить повний набір вітамінів групи В, а також вітамін С, нікотинова кислота, холін, вітамін А, вітамін Е і біотин;
- молочна сироватка містить також кальцій, магній і пробіотичні бактерії [27].

Сироваткові білки (альбуміни і глобуліни) мають цінні біологічні властивості, вони містять оптимальний набір життєво необхідних амінокислот і з точки зору фізіології харчування наближаються до амінокислотної шкали «ідеального» білку, тобто білку, в якому співвідношення амінокислот відповідає потребам організму [22] (табл.1.1.)

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

Таблиця 1.1.

Вміст незамінних амінокислот в сироваткових білках і в «ідеальному» білку, мг в 100 г білка

Амінокислота	Сироваткові білки	«Ідеальний» білок
Ізолейцин	6,2	4
Лейцин	12,3	7
Лізин	9,1	5,5
Метіонін	2,3	3,5
Цистин	3,4	
Фенілаланін	4,4	6
Тирозин	3,8	
Треонін	5,2	4
Триптофан	2,2	1
Валін	5,7	5

Із усіх компонентів сироваточних білків промислове значення має β – лактоглобулін і α – лактальбумін, в сумі складають близько 70% (або 9-17% загальної кількості білків молока). Ці білки містяться в молоці в вигляді маленьких в порівнянні з казеїном часточок: β – лактоглобулін має розмір 25-50 нм, α – лактоальбумін 15-20 нм. Часточки білків несуть на поверхні сумарний від'ємний заряд, оточені дуже міцними гідратними оболонками, тому не коагулюють навіть в ізоелектричній точці.

β – Лактоглобулін і α –лактальбумін більш термостійкі в порівнянні з імуноглобулінами, але поступаються в цій властивості казеїну. При пастеризації молока швидше денатурує β -лактоглобулін, ніж α -лактальбумін. Денатурований β – лактоглобулін легко утворює агрегати і взаємодіє з міцелами казеїну, в складі яких переходить в згусток при кислотній або сичужній коагуляції білків молока.

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

Внаслідок теплової денатурації сироваткових білків і звільнення сульфгідрильних груп молоко набуває специфічного смаку «кип'яченого молока» або присмак пастеризації.

Глобуліни і альбуміни, як і казеїн продукуються епітелієм молочної залози, однак імуноглобуліни всмоктуються в молоко з крові корів [29].

β -Лактоглобулін становить 50-54% сироваткових білків або 7...12% загальної кількості білків молока. Молекула β -лактоглобуліну має два дисульфідні зв'язки (- S – S –) та одну сульфгідрильну групу (- SH), яка сприяє його швидкому агрегуванню після денатурації. У молоці він міститься у вигляді димеру молекулярною масою 18 000 кожного ланцюжка, має ізоелектричну точку зі значенням рН 5,1. У процесі нагрівання молока до 30 °С β -лактоглобулін розщеплюється на мономери, які під час подальшого нагрівання аґругують за рахунок утворення дисульфідного зв'язку. Теплова денатурація β -лактоглобуліну приводить до агрегації білка, і він коагулює майже повністю при 85...100 °С. У процесі пастеризації молока денатурований β -лактоглобулін разом із фосфатом кальцію випадає в осад у складі молочного каменя, а також має здатність утворювати комплекси з χ -фракцією казеїнових міцел і при цьому осаджуватись разом з ним у процесі коагуляції. Утворення у результаті теплового оброблення молока комплексу β -лактоглобулін – χ -казеїн значно погіршує атакованість χ -казеїну сичужним ферментом і впливає на стабільність казеїнових міцел [8].

α -Лактоальбумін. У сироваткових білках α -лактоальбумін займає друге місце після β -лактоглобуліну. Частка α -лактоальбуміну в сироваткових білках складає 20...25 % [24]. Поліпептидний ланцюг α -лактоальбуміну складається з 123 амінокислотних залишків і має молекулярну масу 14000. Молекула α -лактоальбуміну містить 4 дисульфідні зв'язки, що з'єднують залишки цистеїну [25]. В α -лактоальбуміні міститься велика кількість триптофану, який спільно з лізином і нікотиною кислотою необхідний для росту і розвитку кісткової і м'язової тканини зростаючого організму. Триптофан також спільно з нікотиною кислотою попереджає авітаміноз – пелагру. За останніми

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

даними, α -Лактоальбумін є металопротеїном, тобто має здатність зв'язувати іони кальцію, які відіграють важливу роль в стабілізації його третинної структури. α -Лактальбумін стійкий до нагрівання, він є найбільш термостабільною частиною сироваткових білків. Велика стійкість α -лактальбуміну до нагрівання обумовлюється оборотністю денатурації білка - після охолодження спостерігається відновлення його нативної структури за рахунок мимовільного повторного згортання ланцюгів. Цей процес називається ренатурацією. Для ретанурації α -лактальбуміну необхідні іони кальцію, які стабілізують його просторову структуру. Відкриттям останніх років є розшифровка біологічної ролі α -лактальбуміну. З'ясовано, що він є специфічним білком, необхідним для синтезу лактози з галактози і глюкози [26].

Альбумін легко засвоюють новонароджені діти завдяки утворенню більш ніжного згустку під впливом кислого шлункового соку, чим і пояснюється його підвищена кількість у материнському молоці [9].

Імуноглобуліни. В звичайному молоці імуноглобулінів міститься мало (близько 10 %), в молозиві вони складають основну частину (до 90 %) сироваткових білків.

Імуноглобуліни об'єднують групу високомолекулярних білків, що володіють властивостями антитіл. Антитіла - речовини, що утворюються в організмі тварини при введенні в нього різних чужорідних білків (антигенів) і нейтралізують їх шкідливу дію. Отже, виділення антитіл пов'язане з імунними реакціями організму. Імуноглобуліни молока мають різко виражені властивості аглютинінов (отлат. Agglutinare - приклеювати) - речовин, що викликають склеювання і випадання в осад мікробів і інших клітинних елементів [21].

Альбумін сироватки крові. Це білок з молекулярною масою близько 69 кДа, міститься в молоці в незначній кількості, але збільшується при захворюванні тварин на мастит.

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

Лактоферин являє собою глікопротеїд молекулярною масою близько 7,5 тис., має у своєму складі ферум. Білок виконує транспортну функцію - переносить ферум в організм новонародженого. Крім того, має захисні функції: зв'язуючи ферум, робить його недоступним для мікроорганізмів і таким чином затримує розвиток небажаної кишкової мікрофлори (*E. coli* та ін.). У молоці міститься у невеликій кількості – менш як 0,3 мг/см³, у молозиві - у 10...15 разів більше [8].

Білок оболонок жирових кульок. Встановлено, що оболонки жирових кульок складаються з суміші фосфоліпідів і білків, які називаються ліпопротеїнами і визначають стабільність жирової емульсії в молоці. Білок оболонок повністю осаджується при доливанні розчину хлориду кальцію і при нагріванні до 100 °С або при підкисленні середовища соляною кислотою до рН 3,9 - 4. У білках оболонок міститься 12 - 12,5 % азоту, 1,5 - 2,5 сірки і 0,3 - 0,4 % фосфору. Білок становить 64 - 71 % усієї речовини оболонок [28].

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

1.2. Використання протеїнів сироватки в харчових технологіях.

Висока харчова та дієтична цінність білків молочної сироватки обумовлює доцільність їх отримання і використання для безпосереднього споживання або як напівфабрикатів для збагачення харчових продуктів. Білки з молочної сироватки можна виділяти тепловою денатурацією безпосередньо або в суміші зі знежиреним молоком (маслянкою) зі зміною реакції середовища, висолюванням, адсорбцією на бентонітах, активованому вугіллі і смолах, електрофлотацією, електромагнітною обробкою і іншими способами. Більш доцільним є отримання білків в нативному стані, що забезпечується методами молекулярно-ситової фільтрації і сорбції-десорбції. Однак і в денатурованому стані засвоюваність і біологічна цінність сироваткових білків досить висока.

Стійкість макромолекул білків молочної сироватки обумовлена конформацією частинок, електричним зарядом і наявністю гідратної оболонки (сольватного шару). Відносячись за розмірами до колоїдних розчинів, білки молочної сироватки за своїм станом в системі відповідають істинним розчинам, термодинамічно стійкі і відповідають правилу фаз Гіббса. Для порушення стійкості системи - денатурації білка, найбільш ефективним є тепловий вплив на рівні 90 - 95 °С протягом 15 - 20 хвилин і зміна реакції середовища: для підсирної сироватки - підкислення до рН 4,4 - 4,6 (30 - 35 °Т) з розкисленням до рН 6,0 - 6,5 (10 - 15 °Т), для сирної сироватки - розкислення до рН 6,0 - 6,5 (10 - 15 °Т)[13].

Склад і властивості різних видів молочної сироватки наведено в табл. 1.2 [16].

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

Склад і властивості молочної сироватки

Показники	Молочна сироватка		
	підсирна	з сиру кисломолочного	казеїнова
Суша речовина, %, в тому числі:	4,5-7,2	4,2-7,4	4,5-7,5
молочний жир	0,05-0,5	0,05-0,4	0,02-0,1
Білок	0,5-1,1	0,5-1,4	0,5-1,5
Лактоза	3,9-4,9	3,2-5,1	3,5-5,2
мінеральні солі	0,3-0,8	0,5-0,8	0,3-0,9
Кислотність, °Т	15-25	50-85	50-120
Густина, кг/м ³	1018-1027	1019-1026	1020-1025

Після коагуляції сироваткові білки концентрують або методом відстоювання, або відцентровим способом на спеціальних сепараторах.

Засвоюваність денатурованих білків, за даними ряду дослідників, практично така ж, як нативних. Однак явище денатурації треба враховувати при подальшому використанні отриманих білків. При необхідності переведення в розчинний стан їх необхідно піддавати спеціальній обробці.

Ступінь коагуляції (і денатурації) білків молочної сироватки залежить від поєднання часу і температури витримки, а також рівня рН [14].

Інші методи (іонний обмін, гель-фільтрація, ліофілізація і виморожування, використання хімічних реагентів, коагуляція при підвищених температурах - 100 - 120 °С і тисках і ін.) використовують переважно в лабораторних дослідженнях і в промислових умовах поширення не отримали.

Виділені білки обробляють, збагачують різними добавками і використовують у виробництві продуктів харчування в пастоподібному або сухому вигляді.

Залежно від способу коагуляції і поділу білки молочної сироватки можуть бути отримані у вигляді альбумінного молока з вмістом 5 - 10% сухих

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

речовин, білкової маси з вмістом 15 - 20% сухих речовин і альбумінного сиру з вмістом 20 - 25% сухих речовин [16].

Альбумінно-сирні вироби

Молоко альбумінне (напівфабрикат). Альбумінне молоко виходить при мимовільному відстоюванні коагульованих пластівців білка і представляє продукт жовтувато-кремового кольору з консистенцією сметани, що складається з дрібних пластівців. Смак альбуміну молока кисломолочний, приємний, злегка терпкий. Сироваткових білків в ньому приблизно в 10 разів більше, ніж у коров'ячому молоці, а казеїну в 15 разів менше. Таке співвідношення є сприятливим і наближається до жіночого молока. Для збагачення альбуміну молока його заквашують чистими культурами молочнокислих бактерій, кефірними грибками і вводять наповнювачі - незбиране молоко, вершки, цукор, сиропи і соки [16].

Альбумінне молоко являє собою концентрат молочного білка - альбуміну і є напівфабрикатом, призначеним для використання на харчові цілі: при виробленні альбуміну сиру, ковбасних виробів і інших продуктів.

Молоко альбуміну можна виробляти з підсирної сироватки або сироватки з сиру кисломолочного шляхом теплової обробки його з подальшим виділенням альбуміну у вигляді згустку.[5]

Білкова маса. Білкова маса може бути отримана як з натуральної, так і підзгущеної сироватки при поділі суспензії на саморозвантажувальних сепараторах, а також ультрафільтрації сироватки. За консистенцією білкова маса нагадує густу сметану. Особливу цінність представляє білкова маса (концентрат, ретентант), отримана при ультрафільтраційній обробці молочної сироватки. Фракційний склад білків маси представлений в основному лактоглобуліном. За амінокислотним набором білкова маса не поступається сиру. Крім білкових речовин маса містить до 0,5% молочного жиру і 0,8 - 1,5% мінеральних солей. Вміст лактози коливається в межах 5 - 6%. Активна кислотність (рН) 4,5 - 5,5 од., титрована - 40 - 120 °Т.

Може бути використана при виробленні плавленого сиру,

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

кисломолочного, ковбасного копченого і інших сирів в кількості 7-10% маси компонентів суміші, передбачених за рецептурою, замість сиру знежиреного або жирного; при приготуванні дієтичних продуктів і м'ясних виробів [13].

Альбумінний сир. Альбумінний сир отримують з альбуміну молока шляхом додаткового зневоднення [16]. Білкову масу після освітлення сироватки охолоджують до 25 - 28 °С, заквашують з додаванням 5 – 8 % закваски до білкової маси. Закваску готують з використанням чистих культур молочнокислих стрептококів і молочнокислих паличок. Сквашену білкову масу викладають у лавсанові мішечки, де відбувається її самопресування до вмісту в сирі 26 % сухих речовин. Готовий продукт фасують у фляги або брикети [20].

Альбумінний сир призначений для безпосереднього вживання в їжу, а також на його основі можна приготувати цілу гаму дієтично повноцінних продуктів шляхом внесення наповнювачів.

Альбумін молочний харчовий. Виробляють з молочної знежиреної сироватки солоної або несоленої, одержуваної при виробництві сирів і сиру. Використовують в ковбасному виробництві, при приготуванні паштетів, а також для вироблення інших харчових продуктів. Альбумін молочний харчовий випускають двох видів - свіжий і заморожений [19].

Альбумінні сирки виробляють з альбумінного сиру або із додаванням сиру кисломолочного, виготовленого з коров'ячого молока, з додаванням смакових або ароматичних речовин. Сирок виробляють з ваніліном, какао, родзинками, корицею, сіллю.

Для приготування сирків у місильну машину закладають альбумінний сир, сир кисломолочний жирний і необхідні за рецептурою компоненти й перемішують з компонентами до однорідної маси, потім подають на фасування та охолодження [7].

Нова лікувально-поживна кисломолочна альбумінна паста, збагачена чистими культурами молочнокислих стрептококів. Для їх приготування використовують штами, що володіють високими антимікробними

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

властивостями і здатністю накопичувати в середовищі деякі вітамінні групи В (рибофлавін, тіамін, фолієву кислоту), а також аскорбінову кислоту, що надає продукту кисломолочний смак і аромат [19].

Паста дитяча. Виробляють з альбумінного сиру з додаванням сметани, смакових і ароматичних речовин. Залежно від застосування цих речовин пасту дитячу випускають з шипшиною, з вітаміном С і плодово-ягідну. Технологія виготовлення продукту включає приймання і підготовку сировини, внесення наповнювачів і перемішування, фасування, упакування, маркування, охолодження і зберігання [23].

Сироваткові пастоподібні сири. До сироваткових сирів можна віднести сири пастоподібні рекомбіновані «Біо-Тон». Виготовляються сири наступних видів: Дюймовочка – пастоподібний солодкий; Гострий – пастоподібний гострий.

В якості сировини при виробництві цих сирів використовують сироватку демінералізовану підсирну суху, сироватку підсирну згущену з масовою часткою сухих речовин 60 %, сироватку підсирну суху, молоко знежирене сухе, вершки пластичні з масовою часткою жиру 65 %, цукор-пісок, сироп полуничний або вишневий, крохмаль картопляний модифікований, аджику [36].

Альбумінний ацидофілін (молозиво). За своїм складом близький до коров'ячого молозива і є цінним продуктом для дитячого харчування. Обложені сироваткові білки не пресують, а пропускають в гарячому вигляді через фільтр з бязі до отримання альбумінно-білкової маси з вмістом сухих речовин 15 - 16% і кислотністю не більше 70 ° Т [19].

Сир кисломолочний альбумінний «Надуги». Сировиною для виготовлення сиру кисломолочного альбумінного «Надуги» є підсирна сироватка як у нативному, так і у сквашеному вигляді, а також смакові наповнювачі: м'ята сушена, сіль, аджика, цукор білий, джем плодово-ягідний [11].

Сири м'які сироваткові з біфідогенним фактором. До групи м'яких сирів

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

без дозрівання належить сирна маса Кавказ, яка виробляється термокислотою коагуляцією білків несепарованої підсирної сироватки, знежиреного молока та/або маслянки. Вдосконалення технології сирної маси Кавказ, розробленої А. Г. Храмцовим та І. У. Рамазановим, полягає у використанні закваски молочнокислих паличок *Lb. acidophilus*, що входить до складу БАД «Біоактон» - пробіотик і концентрат лактулози – пребіотик, у комплексі – синбіотики.

Одержана сирна маса Кавказ різниться внесеними наповнювачами і випускається в такому асортименті: солодка з ваніліном, солодка з родзинками, солодка з лактулозою, солодка плодово-ягідна, солонка з хрінном, солонка із зеленню [18].

Напій «Альбус». Виготовляють з сквашеного альбумінного молока, виділеного з підсирної сироватки чи сироватки з сиру кисломолочного, в суміші з різними соками. Призначений для безпосереднього вживання в їжу.

Напій «Альбус» виробляють наступних видів: солодкий; з яблучно-виноградним соком; з яблучно-сливовим соком; з малиновим соком; з виноградним соком.

Виробництво напою включає наступні процеси: приймання і підготовку сировини; інтенсивне перемішування альбумінного молока; заквашування і сквашування альбумінного молока; внесення фруктових наповнювачів; охолодження; фасування; зберігання та реалізацію [12].

Альбумінно-казеїнові концентрати

Сирна маса для м'яких сирів без дозрівання. Виробляється з несепарованої підсирної сироватки несоленої з вмістом солі не більше 1,5% з додаванням знежиреного молока або наповнювачів (цукор і родзинки, цукор і ванілін) [19].

Сирна маса для плавлення виробляється з молочної сироватки кислотністю 21 - 25 °Т і знежиреного молока кислотністю не більше 20 °Т. Її використовують у виробництві плавлених сирів і ковбасних виробів в якості білкової добавки.

Технологія сирної маси для плавлення включає підготовку сировини і

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

теплове оброблення, відділення білка і охолодження, фасування і маркування, транспортування і зберігання [15].

Концентрат молочно-білковий вуглеводний (КМБВ). Його отримують з суміші молочної сироватки та альбуміну молока або білкової маси шляхом пастеризації, диспергування, згущення і сушіння і випускають в згущеному або сухому вигляді.

Напрями використання: харчова промисловість (зокрема, виробництво майонезів), м'ясна промисловість [19].

Білкова емульсія. Шляхом комплексного використання білково-вуглеводної сировини і рослинних олій розроблені способи отримання емульсій, призначених для застосування при виробництві плавлених сирів різних видів. Запропоновано два види білково-жирових емульсій - 50 і 60% - вої жирності, масова частка сухих речовин відповідно 73 і 75% (табл. 1.3.)

Таблиця 1.3.

Склад білкових емульсій

Вид суміші	Емульсія, кг	
	50%-вої жирності	60%-вої Жирності
Сироватка (суха) молочна з масовою часткою сухих речовин 96 %	200	180
Концентрат сироватковий білковий з масовою часткою сухих речовин 96 %	250	220
Масло рослинне: соняшникове, гірчичне, кукурудзяне, арахісове, салатне, бавовняне, соєве, оливкове	500	600
Вода питна	250	220

Рекомендовано використовувати емульсії розробленого складу для заміни вершкового масла - до 25% в сирах, до 50% в кускових з наповнювачами, до 80% в ковбасних копчених, до 50% в пастоподібних без зміни основної технологічної схеми виробництва. Це дозволяє отримати продукцію, економлячи сирну масу, яка не поступається традиційній за

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

органолептичними властивостями, харчової цінності та стійкості в зберіганні. Застосування емульсій на основі рослинних олій при виробництві плавлених сирів сприяє їх збагачення поліненасиченими жирними кислотами. Вміст незалежної лінолевої кислоти збільшується практично в 2 рази, поліпшується співвідношення лінолевої і олеїнової кислот, що наближає жир плавлених сирів за складом до еталонного жиру [19].

Суші білкові концентрати.

Концентрат сухих білків з підсирної сироватки. Призначений для використання у виробництві ковбасних і кондитерських виробів. Технологія виготовлення концентрату сухих білків підсирної сироватки включає збір знежиреної сироватки і коагуляцію сироваткових білків, виділення коагульованих білків сироватки у вигляді білкової маси, збір і перемішування білкової маси, її сушіння, фасування концентрату сухих білків підсирної сироватки і зберігання готового продукту [19].

Порошок сироватковий. Виробляють з концентрату білка, отриманого при переробці молочної сироватки (несолоної) на молочний цукор-сирець, шляхом його ферментативної обробки або без неї. Порошок призначений для використання в препаратах косметики. Залежно від технологічної обробки концентрату білка сироватки порошок виробляється наступних видів: сироватковий; сироватковий ферментований [19].

Сироватковий білковий концентрат (КСБ-УФ) виготовляють із підсирної сироватки із застосуванням ультрафільтрації.

Сироватковий білковий концентрат використовують для збагачення білкового комплексу молочних і м'ясних продуктів.

Послідовність технологічного процесу виробництва: приймання сироватки, очищення від казеїнового пилу, сепарування, пастеризація знежиреної сироватки, охолодження, ультрафільтрація з отриманням концентрату з масовою часткою сухих речовин 18 – 19 %, розпилювальне сушіння концентрату, охолодження, пакування, зберігання [6].

Розчинний сироватковий білок. Сухий розчинний сироватковий білок

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

(РСБ) є компонентом для виробництва дитячих, дієтичних молочних та інших харчових продуктів. Отримують його з підсирної сироватки обробкою методом діафільтрації з подальшим висушуванням на розпилювальній сушарці.

Додавання сухого розчинного сироваткового білка в молочні та інші харчові продукти збагачує їх легкозасвоюваними біологічно повноцінними білками, поліпшує консистенцію, не змінюючи при цьому смаку основного продукту.

Послідовність операцій технологічного процесу виробництва сухого розчинного сироваткового білка: приймання сировини; очищення; підігрівання; сепарування; пастеризація; охолодження; ультрафільтрація; діафільтрація; висушування; пакування; маркування та зберігання [10].

Концентрат альбумінно-казеїновий. Виробляють з суміші молочної сироватки та знежиреного молока шляхом спільного термокислотного осадження казеїну і сироваткових білків з наступним промиванням, подрібненням і сушінням розпилювальним способом. Концентрат призначений для використання в якості білкового збагачувача в раціоні харчування дітей грудного та раннього віку з явищами гіпотрофії [19].

Сухі концентрати молочних білків. Виробляють з знежиреного молока, або підсирної сироватки, або їх суміші при співвідношенні казеїну і сироваткових білків 50:50 (з смаковими добавками або без них) методом мембранної фільтрації з подальшим згущенням і сушінням. Концентрати призначені для використання в якості білкової основи при виготовленні продуктів для ентерального харчування і спеціальних замінників жіночого молока, а також у складі харчових модулів. Розроблено кілька видів концентратів: з знежиреного молока; з знежиреного молока і підсирної сироватки; з підсирної сироватки; зі знежиреного молока, мінеральних солей зі смаковими добавками і без них; зі знежиреного молока, підсирної сироватки, мінеральних солей зі смаковими добавками і без них; з підсирної сироватки, мінеральних солей зі смаковими добавками і без них. В якості

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

смакових ароматичних добавок використовують ванілін, цикорій розчинний і інші ароматизатори, дозволені для застосування [19].

Сухі гідролізати молочних білків. Виробляють з знежиреного молока, або підсирної сироватки, або їх суміші при співвідношенні казеїну з сироватковим білком 50:50 шляхом ферментативного гідролізу за допомогою панкреатину, виділення пептидної фракції методом ультра або нанофільтрації з подальшим згущенням і сушінням. Їх використовують в якості білкової основи при виробництві продуктів для лікувального і дієтичного харчування. Сухі концентрати і сухі гідролізати молочних білків високоякісні білкові модулі, на основі яких можна створити виробництво продуктів харчування високою харчовою і біологічною цінністю для здорових і хворих дітей, а також комбінованих продуктів різного призначення, що забезпечить ефективне використання знежиреного молока і молочної сироватки [19].

Сири. В даний час білкову масу, що виробляється з підсирної сироватки, а також згущене і суху сироватку застосовують для збагачення сироватковими білками сичужних та плавлених сирів і інших харчових продуктів. При виробництві плавлених сирів рекомендується додавати її в кількості 7 - 10% маси компонентів замість знежиреного сиру і нежирного сиру. Встановлено, що сири, вироблені з використанням сироваткових білків, мають чистий кисломолочний смак, характеризуються підвищеним вмістом розчинного азоту. Консистенція плавлених сирів, вироблених з додаванням сироваткових білків, стає ніжнішою [19].

Сир «Рикотта» – традиційний італійський сир, який отримують при обробленні підсирної сироватки шляхом виділення білка, під дією високих температур та лимонної або оцтової кислот. Сир «Рикотта» складається головним чином із лактоальбуміну, мінеральних солей, лактози і води та відноситься до свіжих сирів за рахунок м'якого солодкуватого смаку, кремоподібної, але в той же час злегка зернистої консистенції [23].

Сир адигейський. Має ніжну консистенцію і низький вміст солі (2%). Випускають в свіжому і копченому вигляді. Технологічний процес

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

виробництва полягає в наступному: в молоко температурою 90 - 95 ° С при постійному помішуванні додають 3 - 10% сироватки кислотністю 80 - 85 ° Т. Білковий згусток при 83 - 85 ° С витримують протягом 5 хв, видаляють з нього половину сироватки і викладають для формування в конічні плетені кошики, для самопресування сиру. Потім сирну масу перекладають у форми і здійснюють суху посолку з розрахунку 3 - 4% солі від кількості сирної маси. У наступні 10 - 20 год, перевертаючи сир один раз, проводять підпресовку. Після обсушування протягом 40 - 48 год при 20 - 25 °С сир направляють на дозрівання при 6-8 °С протягом 3 днів, після чого сир реалізують. При виробленні копченого адигейського сиру його поміщають в копильну камеру і витримують протягом 5 діб при 25 - 30 ° С; упаковують і реалізують з терміном дозрівання 13-15 днів [19].

Сир ставропольський. Відносять до групи сирів розсолів і виробляють з пастеризованого коров'ячого молока з використанням сироваткових білків. Сироваткові білки вносять в суміш, пастеризовану і охолоджену до температури згортання (32 - 34 °С), з розрахунку 4 - 7 г сухих речовин на 1 кг суміші [19].

Десерти

Желе молочно-білкове «Альбіка». Виробляють з сквашеного альбумінного молока, одержуваного з підсирної або сирної сироватки, в суміші з різними наповнювачами і стабілізаторами. Залежно від використовуваних наповнювачів желе виробляють наступних видів: молочно-білкове; молочно-білкове з фруктовим наповнювачем; з овочевими наповнювачами; з какао-порошком [19].

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

1.3. Гідролізати білків сироватки

Гідроліз – це процес розщеплення білків на більш прості продукти (полі- і дипептиди) і в кінцевому випадку на амінокислоти [78]. Ця реакція каталізується протеолітичними ферментами.

Гідроліз білків, по суті, зводиться до гідролізу поліпептидних зв'язків. До цього ж зводиться перетравлення білків. Під час травлення їжі білкові молекули гідролізують на амінокислоти, які, розчиняючись у водному середовищі, проникають у кров і надходять до всіх тканин і клітин організму. Тут найбільше амінокислот витрачається на синтез білків різних органів і тканин, частина — на синтез гормонів, ферментів та інших біологічно важливих речовин, а решта витрачається як енергетичний матеріал [79].

Дослідження показали, що сироватковий протеїн прискорює відновлення після фізичного навантаження і зміцнює імунну систему, а також стимулює термогенез, сприяє розщепленню жирів і зменшує відчуття голоду.

Гідролізат багаторазово підсилює корисні властивості сироваткового протеїну, перераховані вище, оскільки володіє здатністю швидше підвищувати рівень амінокислот в крові і дає більший підйом їх концентрації, ніж звичайна сироватка.

Стрімке зростання концентрації амінокислот у крові, що викликається гідролізатом, не тільки стимулює синтез м'язового протеїну, але і підсилює окислення амінокислот – розпад амінокислотних молекул з виділенням енергії.

Тобто, гідроліз сироваткових білків актуальний через декілька причин. По-перше, суміші пептидів різної довжини всмоктуються в травній системі швидше і краще, ніж еквівалентні за складом суміші амінокислот [31]. По-друге, в складі білкових гідролізатів можуть бути присутні різні фізіологічно активні пептиди, необхідні для регулювання ряду важливих функцій організму. По-третє, можливий позитивний вплив пептидів на засвоєння деяких есенціальних мікронутрієнтів, а саме іонів металів. В складі ферментативних гідролізатів казеїну і білків молочної сироватки присутні

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

пептиди, здатні утворювати міцні координаційні зв'язки з іонами кальцію і значно покращувати ефективність їх всмоктування [32]. По-четверте, ферментативні гідролізати білку в складі спеціалізованих гіпоалергенних продуктів мають певні технологічні (функціональні) переваги над сумішами амінокислот.

Гідроліз сироваткових білків може бути виконаний хімічним (під дією мінеральних кислот і лугів при підвищених температурах) і ферментативним (з використанням препаратів протеолітичних ферментів) способами. Під час кислотного гідролізу розщеплюються всі типи пептидних зв'язків між різними амінокислотними залишками, і тому можливе практично повне розщеплення білка. Проте кислотний гідроліз як технологічний процес має ряд недоліків (частковий або повний розклад ряду амінокислот, утворення меланоїдинів, необхідність нейтралізації кислоти) [33].

При лужному гідролізі білка проходить рацемізація амінокислот, в результаті чого отриманий гідролізат втрачає біологічну цінність. В харчових виробництвах лужний гідроліз білку не застосовується. Існуючі методики отримання лужних гідролізатів білків направлені в основному на отримання препаратів технічного (не харчового) призначення.

Перевагою ферментативного гідролізу білка є, в першу чергу те, що цей процес проходить з великою швидкістю при відносно м'яких умовах: атмосферному тиску і температурі не вище 70 °С (як правило, 37 – 50 °С), тому він практично не супроводжується пошкодженням амінокислот і зниженням біологічної цінності. Основними продуктами ферментативного гідролізу практично завжди є пептиди, а фракція вільних амінокислот, як правило, відносно невелика.

Серед речовин, які сприяють ферментативній модифікації харчових білків, вагоме місце займають протеолітичні ферментні препарати різного походження, під впливом яких в білковій молекулі проходить специфічне розщеплення пептидних зв'язків, в результаті змінюється молекулярна маса білка, підвищується його гідрофобність і засвоєння організмом [34].

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

Найбільш широким і перспективним джерелом протеїназ є мікроорганізми, які відносяться до родів *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*. Протеїнази тваринного походження, як і мікробіологічні препарати, мають перспективи для їх використання в гідролізі білків молочної сироватки.

Біологічно повноцінні гідролізати молочного білка отримують шляхом застосування комбінацій протеаз тваринного походження і препаратів мікробного синтезу, зокрема панкреатину і протосубтиліну [35]. В залежності від застосовуваних ферментних препаратів або різних їх комбінацій з допомогою регулювання їх температурних режимів гідролізу і його тривалості можна отримати ферментні препарати сироваткових білків різного функціонального призначення [34].

Інгібітори протеаз – низькомолекулярні прості білки, які утворюють комплекси з ферментами (трипсином, хімотрипсином), зменшують їх активність і знижують перетравлення та засвоєння білків за рахунок втрати незамінних амінокислот.

Протеоліз протеїнів сироватки молока здійснюють з метою отримання низькоалергенних та легкозасвоюваних гідролізатів, а також різних біологічно активних пептидів. Гідролізати протеїнів сироватки молока застосовують для дитячого харчування, харчування спортсменів, парентерального харчування та ін. [81].

Протеази не каталізують гідроліз всіх видів білків. Їхня дія стереоселективна: поширюється тільки на білки з певною третинною структурою. Тому що необхідна певна орієнтація молекули, щоб амідна група перебувала у визначеному місці для каталізу. Ця специфіка зберігає цілісність інших білків, таких як гормони, і, отже, біологічна система продовжує функціонувати в звичайному режимі.

Для гідролізу білків використовують різноманітні ферментні препарати: хімотрипсин, термолізін, пепсин, папаїн, ептазу, α -протеази, виділені з культури *Crotalus atrox* та *Sorangim sp* тощо. Усі вони діють на білки

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

специфічно, у специфічних умовах з одержанням з одного і того самого білка різних продуктів гідролізу, тому в кожному конкретному випадку потрібно вивчати процес гідролізу і знаходити оптимальні умови процесу.

Наявність оптимального діапазону температур ферментативного гідролізу можна пояснити тим, що за низьких температур активність протеази ще не проявляється повною мірою, а за високих температур фермент інактивується, оскільки він є білком і четвертинна структура білка незворотно руйнується (відбувається процес денатурації) [82].

За характером дії протеази діляться на дві групи: екзопептидази (за старою класифікацією - пептидази) і ендопептидази (або протеїнази). Екзопептидази гідролізують дипептиди, а також пептидні зв'язки поліпептидів і білків, утворені кінцевими амінокислотними залишками. Ендопептидази - ферменти, що гідролізують внутрішні пептидні зв'язки білкової молекули. Специфічність їх дії залежить від структури радикалів, прилеглих до пептидного зв'язку. Так, наприклад, пепсин краще розриває зв'язки, утворені аміногрупою ароматичної амінокислоти та карбоксильної групою аспарагінової або глутамінової кислоти, а хімотрипсин більш легко розриває пептидні зв'язки, в утворенні яких бере участь карбоксильна група тирозину або фенілаланіну.

Протеолітичними ферментами тваринного походження є пепсин, ренін і трипсин.

Протеази шлунково-кишкового тракту виділяються в неактивній формі у вигляді проферментів або зимогенів. Під дією різних факторів (рН середовища, дії інших ферментів і ін) потім вони переходять в активну форму. Велика кількість протеаз виділено в даний час в кристалічному вигляді.

Трипсин виробляється підшлунковою залозою великої рогатої худоби і свиней. Випускається у вигляді препарату, відомого під назвою панкреатину. Трипсин міститься в соку підшлункової залози в неактивній формі – у вигляді протоферменту трипсиногену. Його активація відбувається під дією ферменту кишкового соку – ентерокинази. Для процесу активування необхідні іони Ca^{2+} .

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

Процес перетворення трипсиногену на трипсин здійснюється шляхом відщеплення невеликого пептиду з N-кінця пептидного ланцюга ферменту.

Трипсин гідролізує як нерозщеплені в шлунку білки, так і високомолекулярні пептиди, діючи головним чином на пептидні зв'язки між аргініном і лізином. Оптимум рН для трипсину становить 7,0 – 8,0. Трипсин виконує порівняно неглибокий гідроліз білка, утворює поліпептиди і невелику кількість вільних амінокислот.

Активність трипсину може знижуватися під впливом деяких інгібіторів. До них належать основні пептиди з молекулярною масою 9000 Да. Вони виявлені в підшлунковій залозі, крові, легенях, у бобах сої. Знижує активність трипсину і мукопротеїн, що міститься в сирих яйцях [37].

Хімотрипсин – другий протеолітичний фермент підшлункової залози. Він також секретується в неактивній формі, у вигляді хімотрипсиногену. Під дією трипсину хімотрипсиноген переходить в активний фермент – хімотрипсин. Дія хімотрипсину подібна до дії трипсину. Оптимум рН для обох ферментів приблизно однаковий, хімотрипсин діє на білки і поліпептиди, що містять ароматичні амінокислоти (тирозин, фенілаланін, триптофан), а також на пептидні зв'язки, що не піддаються впливу трипсину (метіонін, лейцин).

Пептиди, що утворилися в результаті дії на білки пепсину, трипсину і хімотрипсину в нижній відділах тонкої кишки, піддаються подальшому розщепленню. Даний процес здійснюють карбоксипептидази, амінопептидази. Ці ферменти належать до металоферментів. Механізм їх дії полягає у відщепленні від пептидів кінцевих амінокислот, що мають вільну амінну або карбоксильну групу [37].

Сироваткові білки не гідролізуються плазміном і сичуговим ферментом, у порівнянні з казеїном менш чутливі до кальцію, але більше чутливі до нагрівання.

Використання ферментації з трипсином, панкреатином або проторизином посилює смакові якості продукту за рахунок збільшення кількості дрібнодиспергованих глобул сироваткового білка [80].

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

1.4. Біологічно активні пептиди білків сироватки

Основними функціями біоактивних пептидів є забезпечення амінокислотного живлення ссавців на початкових етапах розвитку, транспорт жирних кислот і ретинолу, участь у синтезі лактози, транспортуванні іонів кальцію і заліза, імунний захист, антимікробна дія та ін. В останні роки встановлено, що протеїни сироватки молока, подібно до казеїнів, є попередниками низки біологічно активних пептидів. Серед продуктів протеолітичного розщеплення β -лактоглобуліну, α -лактоальбуміну, лактоферину та альбуміну сироватки молока виявлено інгібітори ангіотензинперетворювального ензиму, опіодні пептиди — агоністи опіатних рецепторів, антимікробні пептиди, пептиди з імуномодуляторною та гіпохолестеролемічною дією, а також пептиди, що впливають на моторику кишечника. Аналізуються дані щодо можливої участі пептидів протеїнів сироватки молока в реалізації таких біологічних функцій, як засвоєння іонів кальцію, антиоксидантна дія, регулювання апетиту, антиканцерогенна активність. На сьогодні одержано обмежену кількість продуктів з біоактивними пептидами протеїнів сироватки молока. Для ширшого застосування їх потрібні подальші дослідження будови, механізму дії, шляхів і способів виділення. Створення функціональних продуктів на основі біоактивних пептидів із протеїнів сироватки молока дасть змогу більш раціонально використовувати цей побічний продукт молочної промисловості.

На відміну від казеїнів, ці протеїни сироватки виконують низку важливих функцій, а саме: транспортування жирних кислот і ретинолу, антиоксидантна дія (β -лактоглобулін); участь у синтезі лактози в секреторних клітинах молочної залози, транспортування іонів кальцію, імуномодуляторна та антиканцерогенна дія (α -лактоальбумін); імунний захист (імуноглобуліни); транспортувальна функція (альбуміни сироватки); зв'язування іонів заліза, антимікробна та антиоксидантна дія (лактоферин).

За даними фінських дослідників, до попередників біоактивних пептидів із протеїнів сироватки молока корів можна віднести β -лактоглобулін, α -

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

лактоальбумін та лактоферин [38]. До потенційних попередників також належать імуноглобуліни.

Відкриття біоактивних пептидів, утворюваних у процесі протеолізу протеїнів сироватки молока, відбулося пізніше, ніж у казеїнів. Порівняно з казеїнами на сьогодні серед продуктів протеолізу протеїнів сироватки було відкрито менше пептидів із певною біологічною активністю. Найбільший відсоток амінокислот, які входять до складу біоактивних пептидів, виявлено в β -лактоглобуліні (51%) та α -лактоальбуміні (39%). Послідовності амінокислотних залишків, що відповідають біоактивним пептидам у цих протеїнах, розподілені рівномірно вздовж поліпептидного ланцюга. У молекулі лактоферину виявлено лише дев'ять біоактивних пептидів, які включають 9,4% усіх амінокислотних залишків. Вісім із них розміщені в ділянці між першим і 48-м амінокислотним залишком. Найменше амінокислотних залишків — у складі біоактивних пептидів молекули альбуміну сироватки — 2,6%. За видами біологічної дії серед біоактивних пептидів протеїнів сироватки молока знайдено інгібітори ангіотензинперетворювального ензиму (АПЕ), пептиди з опіюдною та бактерицидною дією, імуномодуляторні та гіпохолестеролемічні, а також пептиди, що впливають на моторику кишечника (рис. 1.3). Встановлено, що β -лактоглобулін є попередником усіх перелічених видів біоактивних пептидів окрім імуномодуляторних. Серед біоактивних пептидів, утворених з α -лактоальбуміну, відсутні пептиди з гіпохолестеролемічною дією та пептиди, що впливають на моторику кишечника, і лише два види біологічної активності притаманні пептидам з лактоферину (бактерицидні й імуномодуляторні).

Лактокініни — пептиди з антигіпертензивною дією

Серед біологічно активних пептидів із протеїнів сироватки молока, як і у випадку казеїнів, найчастіше трапляються пептиди, здатні гальмувати дію АПЕ. Такі пептиди, виявлені серед продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока, дістали назву лактокінінів [39]. Біологічна дія АПЕ полягає, зокрема, у перетворенні декапептиду ангіотензину I на октапептид ангіотензин II, який

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

є активним вазоконстриктором. Також АПЕ відщеплює С-термінальний дипептид у брадикініну, що призводить до втрати його вазодилаторних властивостей [40, 41]. Надмірна активність АПЕ спричинює артеріальну гіпертензію, яка є основним фактором ризику в розвитку багатьох серцевосудинних захворювань [42]. Серед інших засобів для лікування і профілактики гіпертензії важлива роль належить інгібіторам АПЕ [43]. Дію інгібіторів АПЕ *in vitro* прийнято характеризувати показником IC50, який відповідає значенню концентрації інгібітора, необхідної для гальмування 50% активності АПЕ.

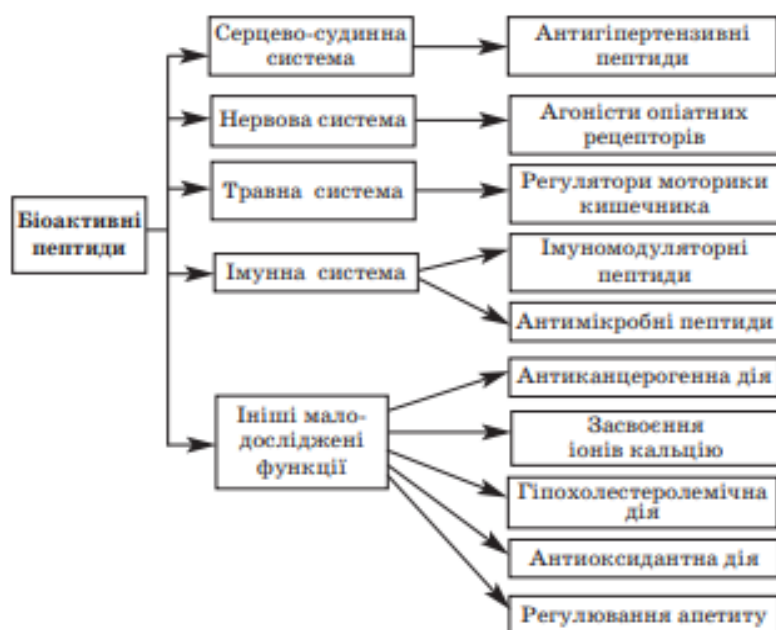


Рис. 1.3. Функції біоактивних пептидів протеїнів сироватки молока

Найчастіше іАПЕ — це невеликі пептиди, що містять від 2 до 12 амінокислотних залишків. Взаємодія пептидних інгібіторів з АПЕ суттєво залежить від трьох С-кінцевих амінокислотних залишків у складі пептиду. Наявність залишків проліну або інших гідрофобних амінокислот посилює їхню інгібіторну дію. Важливу роль можуть також відігравати позитивно заряджені групи лізину і аргініну, розміщені в С-кінцевій ділянці іАПЕ. Конфігурація N-кінцевих залишків у іАПЕ мало впливає на інгібіторну дію пептидів [44]. Враховуючи отримані результати, Gobbetti et al. [45] стверджують, що для повного гальмування АПЕ необхідна суміш інгібіторних пептидів різної будови для взаємодії з каталітичними центрами АПЕ.

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

Очевидно, що в даному разі гальмування відбувається за змішаним типом. Для одержання інгібіторів АПЕ було проведено низку досліджень з протеолізу протеїнів сироватки молока з використанням ензимів шлунково-кишкового тракту. Зокрема, фінські вчені здійснили широкомасштабні дослідження продуктів протеолізу окремих фракцій протеїнів сироватки молока α -лактоальбуміну і β -лактоглобуліну ензимними препаратами пепсину, панкреатину, трипсину, хімотрипсину, еластази, карбоксипептидази, взятих окремо або в комбінаціях [46]. Індивідуальні пептиди з АПЕ-інгібіторною дією виділяли із загальних гідролізатів хроматографією з подальшим визначенням первинної структури. Таким чином, у гідролізатах з α -лактоглобуліну було ідентифіковано іАПЕ, які відповідають фрагментам α -LA — f 50–52, f 99–108, f 104–108, а з гідролізатів β -лактоглобуліну — β -LG — f 22-25, f 32-40, f 81-83, f 94-100, f 106-111 і f 142-146 [46]. Найчастіше для отримання іАПЕ серед ензимів шлунково-кишкового тракту використовують трипсин, який забезпечує високий вихід пептидних іАПЕ із протеїнів сироватки молока. Найнижчу інгібіторну активність мали продукти протеолізу протеїнів сироватки еластазою [46, 47]. Окрім протеаз травного тракту ссавців для одержання іАПЕ застосовували ензими мікроорганізмів. Це дало змогу виділити нові види інгібіторних пептидів. Так, за дії протеїнази К було виділено інгібіторний пептид з β -лактоглобуліну (f 78-80) з низьким значенням IC50, а також іАПЕ з альбуміну сироватки молока (f 221-222) [48]. Найактивніший іАПЕ було знайдено серед продуктів протеолізу β -лактоглобуліну комплексним протеолітичним препаратом (Protease N Amano), виділеним із *Bacillus subtilis* [49]. На основі гідролізованого ізоляту з протеїнів сироватки молока компанія Daisco (США) виробляє комерційний продукт Bio Zate [50]. Основною його біоактивною речовиною є антигіпертензивні пептиди з β -лактоглобуліну.

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

Бактерицидні, фунгіцидні та антивірусні пептиди

За кількістю відкритих біоактивних пептидів із протеїнів сироватки молока на другому місці — антимікробні пептиди. Джерелом цих пептидів є передусім лактоферин, а також α -лактоальбумін і β -лактоглобулін.

Ще в 1892 р. П. Ерліх вказував на наявність у молоці захисних речовин. Пізніше було встановлено, що до них належать протеїни: імуноглобуліни, лізоцим і лактоферин [51]. У 1930 р. Jones і Simms [52] виділили з підсирної сироватки коров'ячого молока лактенін, який був стійким до дії трипсину і гальмував розвиток стрептококів. Будова та походження цього пептиду залишаються невідомими. У випадку лактоферину продукти його ензиматичного розщеплення виявляють більшу бактерицидну дію, ніж нативний лактоферин, а в інтактних α -лактоальбуміну і β -лактоглобуліну вона взагалі відсутня. Одним з найважливіших антимікробних пептидів є фрагмент лактоферину (f 14- 41/42), який отримав назву лактоферицин [53]. Лактоферицин утворюється за дії пепсину на лактоферин у кислому середовищі [54]. Цей пептид є стійким до високих температур і виявляє антимікробну дію в широкому діапазоні значень рН середовища [55]. Показано, що за відносно низьких концентрацій лактоферицин пригнічує розвиток багатьох видів грамнегативних (*E. coli*, *Salmonella* spp., *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*) і грампозитивних (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *E. faecalis*, *Streptococcus* spp.) бактерій, дріжджів, грибів (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.), а також йому притаманна антивірусна дія (на віруси гепатиту С, герпесу, аденовіруси) [56]. Варто зазначити, що штами молочнокислих бактерій, зокрема видів *Lc. lactis* та *Lb. casei*, є стійкими до дії лактоферицину [57]. Залежно від виду мікроорганізму автори пропонують різні механізми бактерицидної і фунгіцидної дії лактоферицину: зв'язування з поверхнею бактеріальної клітини (*B. subtilis*, *E. coli*) і руйнування клітинної мембрани бактерій, зміна ультраструктури мікроскопічних грибів (*Aspergillus* spp.), взаємодія з фосфоліпідами бактеріальних мембран, формування додаткових іонних каналів у мембранах, вивільнення ліпополісахаридів із клітинної стінки

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

грамнегативних бактерій [56]. Вивчення залежності активності фрагментів лактоферицину показало, що бактерицидні, фунгіцидні й антивірусні властивості пов'язані зі співвідношенням залишків триптофану та аргініну [58]. Інший важливий антимікробний пептид лактоферампін (f 265-284) було ідентифіковано у складі домену N1 лактоферину [59, 60]. Подібно до лактоферицину йому притаманний широкий спектр бактерицидної і фунгіцидної дії. Відщеплення трьох N-кінцевих амінокислотних залишків сприяє підвищенню його антимікробної дії. Окрім лактоферицину і лактоферампіну в продуктах протеолізу лактоферину знайдено й інші пептиди, які виявляли свою активність проти багатьох патогенних мікроорганізмів і вірусів. Їхні послідовності розташовані в N-кінцевому фрагменті лактоферину (f1–48). Враховуючи, що первинна структура α -лактоальбуміну майже на 40% гомологічна до структури лізоциму, ці протеїни еволюціонували від спільного протеїну (предка) і мають ідентичну екзон-інтронну будову, багато дослідників сподівались виявити значну антимікробну дію α -лактоальбуміну або продуктів його протеолізу [51]. Проте антимікробну активність інтактного α -лактоальбуміну, а також продуктів його протеолізу пепсином не встановлено. Два бактерицидні пептиди (LDT1, LDT2) було ідентифіковано за дії на α -лактоальбумін трипсину і один — хімотрипсину (LDC) [61]. Пептиди LDT2 і LDC складаються з двох фрагментів, з'єднаних між собою дисульфідними зв'язками. Роз'єднані фрагменти LDT2 і LDC не виявляють бактерицидної дії. Усі три пептиди є аніонними (pI — 4,5-6,1) і пригнічують розвиток грампозитивних бактерій. Найактивнішим є пептид LDT2, а найслабшим — LDT1. Слід також зазначити, що бактерицидні пептиди було одержано із залишків α -лактоальбуміну, які не є гомологічними до лізоциму [51]. Серед продуктів протеолізу β -лактоглобуліну трипсином було відкрито і охарактеризовано чотири бактерицидні пептиди (LGDT1, LGDT2, LGDT3, LGDT4). Тестування показали, що всі ці пептиди пригнічують розвиток лише грампозитивних бактерій [62]. Заміна у синтетичному пептиді LGDT3 аспарагінової кислоти (f

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

98) на аргінін та приєднання до С-термінального амінокислотного залишку лізину призводять до утворення катіонного пептиду Val-Leu-Val-Leu-AspThr-Arg-Tyr-Lys-Lys із позитивним зарядом. Цей синтетичний пептид виявляє бактерицидну дію щодо грамнегативних і меншою мірою — грампозитивних бактерій. Цим самим автором було встановлено, що гомологічна послідовність до пептиду LGDT3 є у складі протеїну, пов'язаного з кольоровим зором людини, — опсину (f 55–64) [63]. Синтетичний пептид гомолог опсину (f 55–64) пригнічував ріст грамнегативних і грампозитивних бактерій і справляв фунгіцидну дію.

Імуномодуляторні пептиди

Імуномодуляторні пептиди можуть підсилювати функціонування імунних клітин, що виявляється в активації і проліферації лімфоцитів, синтезі антитіл, активності природних клітин кілерів, регуляції утворення цитокінів. Вони також можуть знижувати прояви алергічної реакції і підвищувати імунітет клітин слизової шлунково-кишкового тракту [64, 65]. Значну кількість робіт присвячено впливу протеїнів сироватки молока на проліферацію лімфоцитів. Що стосується продуктів протеолізу протеїнів сироватки, то дослідження було проведено переважно на сумішах пептидів і лише в окремих випадках вивчали імуномодуляторну дію індивідуальних пептидів. Так, було показано, що мітогенна активність β -лактоглобуліну стосовно клітин селезінки миші зростає після тригодинного протеолізу пепсином, трипсином, хімотрипсином або панкреатином, що підтверджує значення пептидів у цьому процесі [66]. Цими самими авторами було показано суттєве збільшення росту β -лімфоцитів людини лінії U266 за дії панкреатичного гідролізату β -лактоглобуліну. Miyauchi et al. [67] встановили активізацію проліферації β -лімфоцитів, а також клітин псерових бляшок пепсиновим гідролізатом лактоферину. Пепсиновий гідролізат лактоферину гальмував бластогенез, спричинений мітогенами. Це свідчить про те, що пепсиновий гідролізат лактоферину містить як імуностимулювальні, так й імуноінгібіторні пептиди [64]. Kayser і Meisel [68] синтезували два пептиди — Tyr-Gly і Tyr-Gly-Gly, ідентичні фрагментам α -

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

лактоальбуміну f18–19, f 50–51 і f 18–20. Ці пептиди виявляли виражену стимулювальну дію на проліферацію периферійних лімфоцитів крові людини [68]. Пепсиновий гідролізат лактоферину здатен впливати на синтез антитіл. Зокрема, встановлено підвищення продукції імуноглобулінів (Ig M, Ig G і Ig A) у культурі клітин селезінки миші, а також утворення Ig A у клітинах перових бляшок [67]. Стимулювальну дію на синтез антитіл клітинами селезінки підтверджено *in vivo* за згодовування мишам панкреатичного гідролізату концентрату протеїнів сироватки молока. Пепсинові гідролізати лактоферину також досліджували на здатність впливати на синтез антитіл у мишей, імунізованих токсином холери [67]. Показано, що порівняно з контрольною групою тварин рівень специфічних антитіл Ig A був значно вищим. Щодо модуляції неспецифічної імунної відповіді встановлено, що синтетичний пептид, який є фрагментом α -лактоальбуміну (f 51–53), може підвищувати фагоцитоз еритроцитів вівці перитонеальними макрофагами миші, а також захищає організм миші від летальної інфекції *Klebsiella pneumoniae*. Цей пептид стимулює дозозалежне приєднання старих еритроцитів до клітин моноцитарних макрофагів людини і здійснюваний ними фагоцитоз [64]. У літературі описано дослідження впливу суміші, а також індивідуальних протеїнів сироватки молока на модуляцію експресії цитокінінів, активність гранулоцитів і природних клітин-кілерів [55, 64]. Щодо впливу окремих пептидів, то такі дані відсутні за винятком інгібіторної дії лактоферицину на експресію цитокінінів моноцитарними клітинами людини [69, 70]. На сьогодні не створено комерційних функціональних продуктів або інгредієнтів на базі імуномодуляторних пептидів із протеїнів сироватки молока.

Лакторфіни — пептиди з опіюдною дією

Екзорфіни із протеїнів сироватки молока належать до нетипових опіюдних пептидів і отримали назву лакторфінів [65]. Типові опіюдні пептиди, які утворюються з проенкефаліну та продинорфіну, мають сталу N-термінальну послідовність Tyr-Gly-GlyPhe. N-термінальний залишок відомих лакторфінів відрізняється від послідовності типових опіюдних пептидів. Ця

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

послідовність амінокислотних залишків (N-термінальний Tyr і Phe у третьому або четвертому положенні) відіграє важливу роль у зв'язуванні лакторфінів опіоїдними рецепторами клітин кишкового епітелію. Серед продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока було відкрито три лакторфіни [71]. Це — α -лакторфін з α -лактоглобуліну (f 50–53), β -лакторфін із β -лактоглобуліну (f 102–105) і серофін з альбуміну сироватки (f 399–404). Усі ці пептиди належать до агоністів опіоїдних рецепторів μ -типу, і їхня біологічна дія подібна до дії ендогенних лігандів. Дані щодо біологічної активності лакторфінів неповні й не систематизовані [42]. Відомо, що опіоїдні ліганди впливають на емоційний стан, діють як анальгетики, подовжують термін травлення завдяки гальмуванню перистальтики і рухливості кишечника, виявляють антисекреторну дію, впливаючи на інтестинальний транспорт електролітів [58].

Інші види біологічної дії пептидів із протеїнів сироватки молока

Окремі пептиди, виділені з продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока, виявляють два або декілька видів біологічної активності. Так, наприклад, альбутензин і β -лактотензин є одночасно інгібіторами АПЕ і стимуляторами скорочення гладеньких м'язів кишечника [50]. Мультифункціональні властивості притаманні β -лакторфіну, який справляє опіоїдну дію і є активним інгібітором АПЕ [72]. Лактоферицин окрім бактерицидної та імуномодуляторної дії впливає на розвиток клітин злоякісних пухлин [64]. Показано, що цей пептид передусім індукує апоптоз у таких клітинах людини (ТНР-1), а також гальмує розвиток метастазів із клітин меланоми і лімфоми мишей. Наведені приклади свідчать про те, що поняття «мультифункціональність» є характерним не лише для багатьох протеїнів, але й для природних біоактивних пептидів. Окрім розглянутих видів біологічної активності виявлено інші види впливу продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока на функції організму. Так, використовуючи клітини лінії СНО-СаТ1, японські вчені показали дозозалежний ефект пептидів на засвоєння іонів кальцію [73]. Було встановлено, що за біологічну дію

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

відповідає пептид Pe-Pro-Ala. Синтетичний пептид такої структури (β -LG, f 78–80) знижував рівень засвоєння іонів кальцію у тварин. Серед продуктів протеолізу β -лактоглобуліну трипсином ідентифіковано пептиди з гіпохолестеролемічною дією [74]. Відповідно до принципу молекулярної економії, який був сформульований Ленінджером [75], протеїнам молока окрім основної функції (забезпечення амінокислотами) притаманні й інші, що пов'язані з виживанням новонароджених ссавців. Ці функції реалізуються як на рівні протеїнів, так і пептидів, які утворюються під час процесів травлення в шлунково-кишковому тракті. Це стосується лише природних харчових протеїнів, до яких належать протеїни молока, зокрема сироватки. З урахуванням сучасних даних можна сформулювати поняття «додаткові функції» харчових протеїнів, які не є основними, однак мають певні переваги і відіграють позитивну роль на ранніх етапах розвитку організму. Підтвердженням цього може бути таке:

1. Наявність великої кількості біоактивних пептидів серед продуктів розщеплення протеїнів молока травними протеазами, що дає підстави вважати ці протеїни прогормонами [76].

2. Послідовності амінокислотних залишків, які відповідають біоактивним пептидам, займають значну частину первинної структури протеїнів молока (β -LG — 51%, α LA — 39%, казеїни — 70%). В інших протеїнах такі послідовності трапляються значно рідше, і біоактивні пептиди, очевидно, утворюються випадково [77].

3. У новонароджених біоактивні пептиди можуть виявляти біологічну активність не тільки в шлунково-кишковому тракті, але й проникати в кров'яне русло завдяки особливостям процесів абсорбції продуктів розщеплення протеїнів.

4. У багатьох випадках біоактивні пептиди виявляють стійкість до дії протеаз травного тракту та крові.

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

5. Біоактивні пептиди із протеїнів молока утворюються у відносно великих кількостях, що збільшує ймовірність біологічної активності в інтактних молекул.

Важливість процесу утворення біоактивних пептидів із протеїнів молока не викликає сумніву і це слід брати до уваги у разі визначення біологічної цінності харчових протеїнів, а також у виробництві харчових продуктів, які містять протеїни молока або продукти їх протеолізу. Багаторічний емпіричний досвід вживання молочних ферментованих продуктів свідчить про їх позитивний вплив на здоров'я і тривалість життя людини. Для ширшого використання біоактивних пептидів із протеїнів сироватки молока необхідні подальші дослідження їхньої структури, розроблення ефективних способів їх одержання шляхом модифікації технологій з використанням відповідних ензимів або мікроорганізмів заквасок, а також виявлення і обґрунтування біомаркерів, за якими можна оцінювати дію біоактивних пептидів на організм [50, 38]. Після проведення відповідних досліджень і обґрунтувань біоактивні пептиди з протеїнів сироватки молока можуть стати важливими компонентами у функціональних продуктах.

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

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика концентрату сироваткових білків

Як матеріал для проведення гідролізу ми використовуємо «Концентрат сироваткових білків». Для цього ми попередньо готуємо його водний розчин.

КСБ (концентрат сироваткових білків) виробляється з молочної сироватки, шляхом обробки її методом ультрафільтрації/діафільтрації. У процесі ультрафільтрації сироватка розділяється на ультраконцентрат, збагачений сироватковими білками, і ультрафільтрат, що складається з води і низькомолекулярних речовин сироватки. Ультраконцентрат згущують і висушують на розпилювальній сушильній установці.

Готовий концентрат сироваткового білка являє собою однорідний тонкодисперсний порошок від білого до кремового кольору, має специфічний сироватковий, злегка солодкуватий смак, без сторонніх присмаків.

Концентрат сироваткового протеїну, як правило, містить деяку кількість жирів, холестерину і вуглеводів (лактози) - 20% маси продукту і вище.

В роботі також використовуються ферментні препарати такі як трипсин, хімотрипсин і панкреатин. Вони здатні розщеплювати білки сироватки молока.

Препарати трипсин і хімотрипсин використовували фірми «Biozym» (Німеччина), препарат панкреатин – виробництва української фірми ПрАТ «Технолог».

					18-154 19 ДР 002 ПЗ		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Берекета В.П.</i>			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Юкало В.Г.</i>					
<i>Реценз.</i>					ТНТУ, МЛМ-61		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>							
Матеріал і методи досліджень							

2.2. Визначення концентрації білків спектрофотометричним методом

Для визначення концентрації білків в біохімії використовують ряд методів: метод К'ельдаля, спектрофотометрію в ультрафіолетовій області, колориметрію.

Зручним і швидким способом визначення концентрації білків у розчинах є спектрофотометрія, який ми і використовували. З амінокислот, які входять до складу білків, дві (триптофан, тирозин) і в меншій мірі фенілаланін поглинають в ультрафіолетовій області спектру. Оптична густина розчинів білків, що містять вказані амінокислоти, при 280 нм прямо пропорційна їх концентрації в розчині. Цей метод дає добрі результати з гетерогенними білками, а також з препаратами індивідуальних білків, для яких відомі молярні коефіцієнти оптичної густини. Коефіцієнт оптичної густини даного білку залежить від вмісту в ньому триптофану, тирозину і фенілаланіну. Якщо коефіцієнт білка невідомий, тоді можна скористатися номограмою Адамса. На номограмі на шкалах відкладені значення оптичної густини розчинів при 280 і 260 нм, а також концентрація білка в мг/мл. Визначивши оптичну густина досліджуваного розчину білка при 280 і 260 нм, можна по номограмах визначити його концентрацію. При використанні номограми Адамса також враховується забруднення розчину білків нуклеїновими кислотами, які мають максимум при 260 нм.

Визначення оптичної густини в далекій ультрафіолетовій області спектру використовують як більш чутливий метод, який менше залежить від амінокислотного складу білків. Найкращі результати отримують при 205 нм (поглинання пептидних груп). Коефіцієнти екстинкції для більшості білків при цій довжині хвилі вкладаються в інтервал 28,5-33. В даній роботі використовується одна із методик, що базуються на поглинанні білків при 205 нм.

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Спектрофотометричний метод визначення концентрації білків

Матеріали, реактиви і обладнання

Розчини білків з невідомою концентрацією, штативи з пробірками, піпетки, спектрофотометр СФ-46.

Хід роботи

Однією з найбільш раціональних методик спектрофотометричного визначення білків є методика Р. Скоупса. Вона враховує вміст тирозину і триптофану при визначенні коефіцієнту екстинкції розчинів білків при 205 нм.

Для визначення концентрації невідомого білку вимірюють оптичну густину при 205 і 280 нм. Розраховують концентрацію білку, використовуючи формулу:

$$E_{205}^{1\text{мг/мл}} = 27,0 + 120 \frac{E_{280}}{E_{205}}$$

Тоді

$$C_{\text{білка}} = \frac{E_{205}^x}{E_{205}^{1\text{мг/мл}}}$$

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.3. Визначення протеолітичної активності спектрофотометричним методом

Спектрофотометричний метод розроблений В.Ф Селеменовим. Це спрощений варіант модифікованих методів, які незручні через багатостадійність і багатотривалість кожного елементу. Крім того, виключається застосування реактиву Фоліна, оскільки утворені в результаті гідролізу білка амінокислоти (тирозин і ін.) поглинають світло в УФ-області спектру.

Метод заснований на вимірюванні світлопоглинання в УФ-області спектру продуктами ферментативного гідролізу білка, що не осаджуються трихлороцтовою кислотою.

За одиницю протеолітичної активності в даному методі приймають таку кількість ферменту, яка за одну хвилину при температурі 30°C перетворює 1г казеїнату натрію в не осаджувані трихлороцтовою кислотою продукти гідролізу.

Реактиви. 1. Субстрат – 1 %-вий розчин казеїнату натрію. 2. Універсальний буферний розчин концентрацією 0,1 моль/дм³ з рН 1,8. 3. 0,3М розчин трихлороцтової кислоти. 4. Розчин соляної кислоти концентрацією 0,2 моль/дм³ . 5. Ферментний розчин.

Проведення аналізу. В пробірку місткістю 20 см³ вносять 2 см³ 1%-вого розчину казеїнату натрію, поміщають в ультратермостат з температурою 30°C на 10 хв. Після цього в пробірку наливають 2 см³ ферментативного розчину, даний вміст перемішують і інкубують при 30°C і 10 хвилин. Рівно через 10 хвилин додають 4 см³ 0,3 М розчину трихлороцтової кислоти, суміш перемішують і витримують в ультратермостаті 20 хвилин для осаду непрогідролізованого білка і інактивації ферменту. Вміст пробірки фільтрують через паперовий складчастий фільтр. Фільтрат використовують для виміру оптичної щільності на спектрофотометрі при довжині світлової хвилі 276 нм в кюветі товщиною поглинаючого шару 10 мм в порівнянні з контрольним розчином.

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для приготування контрольного розчину до 2 см³ того ж ферментативного розчину, котрий використовували в випробовуваній пробі, додають з ціллю інактивації ферменту 4 см³ трихлороцтової кислоти. Після термостатування впродовж 10 хвилин до інактивованого ферменту додають 2 см³ субстрату, витримують 20 хвилин в ультратермостаті при температурі 30°C і фільтрують утворений осад через паперовий складчастий фільтр.

Обробка результатів. Для розрахунку протеолітичної активності складають графік залежності оптичної щільності досліджуваних розчинів від концентрації ферментного препарату. Для цього готують розчини з різноманітним вмістом ферменту – від 0,4 до 2,0 мг в 1 см³. Після проведення реакції гідролізу казеїнату натрію ферментом вказаної концентрації і послідуячого визначення оптичної щільності будують графік вказаної залежності, відкладаючи по осі абсцис концентрацію ферменту, по осі ординат – оптичну щільність. Визначають тангенс кута нахилу середньої квадратичної прямої що проходить через початок координат,

$$b = \frac{\sum_{t=1}^n C_i A}{\sum_{t=1}^n C_i^2}$$

де C_i – концентрація протеази в i -тому визначенні, $b = 0,59$.

Протеолітичну активність розраховують за формулою:

$$ПА = \frac{b * 1000 * A}{a * 10}$$

де 1000 – коефіцієнт переведення з міліграмів в грами; 10 – тривалість гідролізу, хв; A – оптична густина; a – кількість ферментного препарату, взятого для аналізу, мг.

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.4. Гель-фільтрація

Гель-фільтрація — це вид розподільної хроматографії, де розділення макромолекул проходить відповідно з розмірами і формою. Гель-фільтрація суміші молекул проводиться в колонках, заповнених частинками інертного пористого матеріалу. Згідно моделі Флодіна, при пропусканні розчину молекул, розмір яких перевищує розмір пор, вони будуть рухатися в просторі між частинками не затримуючись матеріалом колонки. Молекули, розміри яких менші за розміри пор, зворотно дифундують в частинки, причому ймовірність цього процесу підвищується із зменшенням їх розміру, тобто рух молекул в колонці сповільнюється.

Якщо матеріал частинок в колонці не адсорбує молекули, ймовірність їх проникнення в пори є головним фактором, що визначає швидкість руху через колонку. Таким чином, молекули виходять з колонки в порядку зменшення їх розмірів або молекулярної маси, якщо їх форма подібна.

В ряді випадків стеричний ефект не може пояснити поведінку біомолекул при гель-фільтрації. При низькій іонній силі малі молекули з великим зарядом можуть не входити в пори частинок колонки. Це пояснюється їх електростатичним відштовхуванням, що обмежує число молекул в кожній порі. При низькій іонній силі також посилюється адсорбція.

В цілому процес гель-фільтрації полягає в розподілі біомолекул між стаціонарною фазою (інертні пористі частинки) і рухомою фазою (розчинник або елюент) колонки.

Розділення біомолекул з допомогою гель-фільтрації зводиться до відбору витікаючого з колонки елюента невеликими, рівними по кількості фракціями в окремі пробірки. Після цього кожна фракція аналізується на вміст речовин, що були присутні у вихідній суміші. Сучасні прилади для гель-фільтрації дають можливість проводити розділення суміші речовин з автоматичною реєстрацією профілів їх елюції і відбором фракцій. При цьому забезпечується постійність умов проходження гель-фільтрації.

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

В якості пористого матеріалу для заповнення колонки використовують гранульовані гелі. Структурну основу гелю складає хімічно інертна полімерна матриця з лінійних макромолекул, які скріплені поперечними зшивками. Весь вільний простір в гелях заповнений рідиною. Для гель-фільтрації найчастіше використовують гелі на основі декстрану (сефадекс, молселект), акриламід (біогель, акрилекс) і агарози (сефароза, біогель). Гелі кожного виду розділяють за розміром пор і величиною гранул.

Розглянемо властивості гелю на прикладі сефадексу. Сефадекси виготовляються винятково шведською фірмою Pharmacia Fine Chemicals на основі декстрану. Декстран - це полісахарид, побудований із залишків глюкози, який одержують при вирощуванні мікроорганізмів *Leuconostoc mesenteroides* на сахарозі.

В залежності від умов вирощування мікроорганізмів одержують вісім типів сефадексу з різним розміром пор від найбільш дрібнопористого G-10 до крупнопористого G-200. Номер в марці сефадексу характеризує його пористість і означає кількість води в мл, яку зв'язує 10 г сухого гелю. За розмірами сферичні гранули сухого сефадексу поділяють на дві категорії: звичайні (інтервал діаметрів 40-120 мкм) і дрібнозернисті або «Superfine» (10-40 мкм). Два найпоширеніші типи сефадексів (G-25 і G-50), крім категорії «Superfine» мають ще три діапазони розмірів: «Fine» (20-80 мкм), «Medium» (50-150 мкм), «Coarse»(100-300 мкм). Сефадекси категорій «Fine» і «Superfine» використовуються для аналітичних цілей, а «Coarse» і «Medium» - для препаративних робіт. Деякі властивості і області фракціонування біополімерів за їх молекулярною масою для сефадексів всіх типів і категорій наведені в таблиці 2.1.

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 2.1

Деякі властивості і області фракціонування біополімерів за їх молекулярною масою для сефадексів всіх типів і категорій

Тип категорія сефадексу	Величина гранул сухого гелю, мкм	Повний об'єм гелю, мл/г	Інтервал фракціонування по молекулярній масі, мг	
			пептиди глобулярні білки	полісахариди (декстрини)
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			
G-50 Coarse	100-300	9-11	1500-30000	500-10000
Medium	50-150			
Fine	20-80			
Superfine	10-40			
G-75	40-120	12-15	3000-80000	1000-50000
Superfine	10-40		3000-70000	
G-100	40-120	15-20	4000-150000	1000-100000
Superfine	10-40		4000-100000	
G-150	40-120	20-30	5000-300000	1000-150000
Superfine	10-40	18-22	5000-150000	
G-200	40-120	30-40	5000-600000	1000-200000
Superfine	10-40	20-25	5000-250000	

Сефадекси стійкі до дії температури, розведених кислот і лугів, не розчиняються в органічних розчинниках. Їх водозв'язуючі властивості не залежать від присутності солей, поверхнево активних речовин, карбаміду.

					Матеріал і методи досліджень	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Процес гелі-фільтрації характеризується рядом параметрів, які дозволяють ідентифікувати біомолекули і кількісно описати умови розділення. Загальний об'єм колонки (V_t), заповненої гелем, складається із об'єму розчинника в гранулах гелю (V_i), об'єму розчинника між гранулами (V_0) і об'єму самої матриці гелю.

Загальний об'єм V_t визначається як геометричний об'єм колонки:

$$V = \frac{\pi * D^2 * h}{4}$$

Об'єм розчинника між гранулами (V_0) можна встановити лише в ході гелі-фільтрації.

Результати гелі-фільтрації наводять у вигляді графіка залежності концентрації молекул від об'єму елюенту, що пройшов через колонку. Для характеристики поведінки біомолекул в процесі гелі-фільтрації експериментально визначають об'єм виходу (V_e) речовин з моменту їх нанесення на колонку, а також V_0 і V_t . В даному випадку об'єм виходу крохмалю співпадає з V_0 , оскільки великі молекули крохмалю не проникають в пори сефадексу G-25. Хроматографічні властивості глюкози описуються значенням виходу V_{er} . Для даної колонки об'єми V_{ek} і V_{er} величини постійні, а значення V_e залежить від загального об'єму колонки V_t і від способу підготовки гелю, тому для характеристики гелі-фільтрації молекул використовують коефіцієнт розподілу K_d :

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i}$$

де V_e - об'єм розчинника, який необхідний для елюювання досліджуваної речовини.

Коефіцієнт розподілу показує, яка частина об'єму розчинника в гранулах доступна для молекул даного розміру, що проходять через колонку.

Практично досить важко визначити V_i (для цього використовують іони радіоактивного ізотопу натрію), тому замість V_i використовують значення $V_t - V_0$. Тоді:

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

K_{av} називають коефіцієнтом доступності, який легко визначити експериментально і подібно до K_d не залежить від об'єму колонки і способу приготування гелю. Відношення $\frac{K_{av}}{K_d}$ є постійною величиною для конкретного гелю. Очевидно, що значення K_d знаходиться в межах $0 \leq K_d \leq 1$, в той час, коли навіть для найменших молекул значення K_{av} менше, оскільки $V_t - V_0 > V_i$. Якщо на практиці $K_{av} \geq 1$, то це вказує на наявність адсорбції молекул в нерухомій фазі.

Коефіцієнт доступності K_{av} для глобулярних білків і ряду полісахаридів лінійно зв'язаний з логарифмом молекулярної маси:

$$\lg M = a - bK_{av}$$

Це дозволяє використати гель-фільтрацію для визначення молекулярної маси біополімерів. Параметри a і b встановлюють експериментально, пропускаючи через колонку молекули з відомою масою. В результаті отримують графіки селективності. Знаючи K_{av} невідомої біомолекули за графіком можна визначити її молекулярну масу з точністю $\pm 10\%$.

Приведена вище залежність справджується для глобулярних білків і полісахаридів, які не адсорбуються матрицею гелю.

Гель-фільтрація широко застосовується в лабораторній практиці, що пояснюється рядом переваг даного методу при роботі з біологічними об'єктами:

1. Параметри гель-фільтрації біомолекул мало залежать від температури, рН, іонної сили, складу буферних розчинів.
2. Майже повна відсутність адсорбції дозволяє забезпечити нативну структуру біополімерів в процесі розділення, зберегти активність ферментів.

Гель-фільтрація дозволяє швидко і ефективно проводити розділення і очищення білків, ферментів, нуклеїнових кислот, вірусів, клітин, змінювати буферне середовище, провести діаліз розчинів макромолекул.

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.5. Електрофорез

Електрофорез є одним із найпоширеніших методів аналізу багатокомпонентних систем біологічних макромолекул, виділення та ідентифікації окремих компонентів.

Метод дозволяє розділити макромолекули, що відрізняються за електричним зарядом, молекулярною масою, просторовою конфігурацією.

Під явищем електрофорезу розуміють рух заряджених частинок в розчині під дією електричного поля. Більшість біологічних полімерів містять іоногенні групи, тому вони здатні рухатися в електричному полі. Заряд молекули білка визначається як сума електричних зарядів бокових груп амінокислот: основних (лізин, аргінін, гістидин) і кислих (аспарагінова і глютамінова кислот), які знаходяться на поверхні білка. Бокові групи, що заховані всередині білкової глобули, свого вкладу в сумарний заряд білка не дають, оскільки не контактують з водою і тому не іонізовані.

Якщо молекулу біополімеру помістити в буферний розчин із значенням рН, що відрізняється від ізоелектричної точки, і пропустити через такий розчин постійний струм, то вона буде рухатися до аноду або до катоду у відповідності зі знаком свого заряду. При цьому на молекулу буде діяти електрична сила:

$$F = \frac{E * q}{d}$$

де E - різниця потенціалів на електродах;

d - відстань між електродами;

q - заряд молекули.

Оскільки молекула рухається в розчині, то на неї також діє сила тертя, яка залежить від розмірів, форми молекули, в'язкості середовища і описується рівнянням Стокса:

$$F_m = 6 * \pi * r * \eta * v$$

де r - радіус сферичної молекули;

η - в'язкість середовища;

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

v — швидкість руху молекули.

В процесі електрофорезу електрична сила протидіє силі тертя, тому:

$$\frac{E * q}{d} = 6 * \pi * r * \eta * v$$

З рівняння одержуємо:

$$v = \frac{E * q}{6 * d * \pi * r * \eta}$$

Таким чином, швидкість молекули (v) пропорційна її заряду, напруженості електричного поля (E/d) і обернено пропорційна розміру. Заряд і розмір є строго індивідуальними характеристиками, тому шлях, який пройде та чи інша молекула при електрофорезі за певний інтервал часу, буде однозначно характеризувати даний біополімер. Наведені вище формули адекватно описують процес електрофорезу в рідкому діелектричному середовищі. Але реальне середовище, в якому відбувається електрофорез, є електролітом і містить ряд іонів, котрі взаємодіють з біополімерами, утворюючи іонну сферу, що екранує їх від електричного поля. Іонна оболонка частково порушується полем, а також взаємодіє з середовищем при переміщенні макромолекул. На сьогоднішній день ці явища теорією електрофорезу детально не описані.

На практиці використовують два типи електрофорезу: фронтальний (з вільною рухомою границею) і зональний (на підтримуючому середовищі). Ми використовували зональний електрофорез на поліакриламідному гелі.

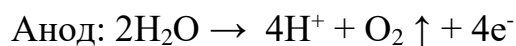
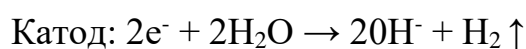
Прилад складається із робочої камери або трубки для підтримуючого матеріалу, двох електродів, електродних камер, заповнених буферним розчином. Через буферні розчини і робочу камеру замикається електричний ланцюг між електродами.

Для проведення електрофорезу суміш макромолекул наносять у вигляді зони на поверхню підтримуючого матеріалу. При підключенні електродів до джерела постійного електричного струму в робочій камері формується електричне поле. Його напруженість вимірюється різницею потенціалів на кінцях робочої камери, віднесеної до її довжини (В/см). Під дією поля

					Матеріал і методи досліджень	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

молекули відповідно до свого сумарного заряду починають рухатися з певною швидкістю. Швидкість руху також залежить від їх розмірів та форми. Поступово суміш розділяється на зони ідентичних молекул, що мігрують з однаковою швидкістю. Після закінчення електрофорезу зони в підтримуючому матеріалі фіксують і проявляють барвниками. В результаті одержують фіксовані електрофореграми, які піддаються якісному і кількісному аналізу.

При проведенні електрофорезу на електродах відбувається процес електролізу:



В результаті може змінитися значення рН буферних розчинів в камерах. В зв'язку з цим необхідно, щоб буфер мав достатню буферну ємкість.

Походження струму в розчині і підтримуючому матеріалі зумовлене переносом іонів буферу і проби. Швидкість руху молекул прямо пропорційна силі струму, а шлях, пройдений цими молекулами, пропорційний часу пропускання струму. Тому для кращого відтворювання результатів використовують джерела живлення, стабілізовані по струму.

В якості електродів частіше використовують платинові або вугільні. Платинові електроди кращі, тому що не забруднюють буферний розчин. В цілях економії платини для катодного електроду можна застосовувати нержавіючу сталь або мідь.

Зональний електрофорез поділяють на декілька видів в залежності від природи підтримуючого матеріалу: електрофорез на папері, блоках гранульованого матеріалу, в гелях.

Ефективнішим є зональний електрофорез в агарових, агарозних, крохмальних і поліакриламідних гелях. Електрофорез в гелях має ряд переваг порівняно з електрофорезом на папері. Головна з них та, що розміри пор гелю можуть бути близькими до розмірів біологічних макромолекул. Це вводить

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

додатковий фактор, що впливає на рухливість. Крім того, рівень адсорбції макромолекул в гелях порівняно низький.

Оскільки крохмальні і агарові гелі виготовляються на основі природних продуктів, їх властивості не є постійними. Це ускладнює ідентифікацію і кількісний аналіз електрофореграм. Тому поширенішим носієм в лабораторній практиці електрофорезу є синтетичний поліакриламідний гель. Поліакриламід — найефективніший носій для електрофорезу білків і невеликих молекул нуклеїнових кислот. Суттєва перевага поліакриламиду полягає в тому, що при його використанні можна: контролювати розмір пор, змінюючи концентрацію гелю; змінювати електричні заряди макромолекул, використовуючи буфери з різними рН; їх конфігурацію шляхом введення денатуруючих агентів.

Електрофорез в поліакриламідному гелі проводять або в колонках з гелем, або на пластинках гелю. В останні роки частіше використовують пластинки гелю, які дозволяють одночасно проводити розділення великої кількості проб в однакових умовах.

Електрофорез білків на пластинках поліакриламідного гелю

В даній роботі використовується система для електрофорезу на пластинках поліакриламідного гелю, розроблена в нашій лабораторії. Система дозволяє розділити білки згідно з сучасною міжнародною класифікацією.

Матеріали, реактиви, обладнання:

Білки казеїнового комплексу, акриламід, N,N'-метиленбісакриламід, персульфат амонію, N,N,N',N'-тетраметилендіамін, тріс/оксиметил/амінометан, етилендіамін-тетраацетат натрію, карбамід, веронал, етиловий спирт, оцтова кислота, амідочорний 10 Б, бромфеноловий синій, сахароза, дистильована вода, прилад для електрофорезу, джерело постійного струму, фільтрувальний папір, аналітичні ваги, штатив з пробірками, мірний циліндр на 50 мл, кристалізатор, ножиці, мірний капіляр.

Приготування гелю: для одержання поліакриламідного гелю (ПААГ) використовують акриламід і N,N'-метиленбісакриламід (зшиваючий агент).

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Ініціатором полімеризації служить персульфат амонію $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, а каталізатором - N,N,N',N'-тетраметилендіамін (ТЕМЕД).

В ході реакцій відбувається вінільна полімеризація, яка приводить до формування гелю з хаотично згорнутою структурою.

Поліакриламідний гель характеризується процентним вмістом мономерів - T і кількістю зшиваючого агенту - C:

$$T = \frac{a + b}{m} * 100\%$$

$$C = \frac{b}{a + b} * 100\%$$

де a - кількість акриламиду, г;

b - кількість мономеру, що утворює зшивки, г;

m - об'єм буферу, в якому проводиться полімеризація, мл.

Співвідношення між зшиваючим агентом і акриламідом впливає на механічні властивості гелю і визначається за формулою Річардса:

$$C = 6,5 - 0,3 * T$$

Поліакриламідний гель при електрофорезі служить не тільки підтримуючим матеріалом, але і сам приймає активну участь в процесі розділення макромолекул завдяки ефекту молекулярного сита. Показано, що чим більша концентрація акриламиду, тим менший розмір пор в гелі:

$$\bar{r} = \frac{k * d}{\sqrt{c}}$$

де r - середній розмір пор в гелі, Å;

d - діаметр молекули, Å;

c - об'ємна концентрація полімеру;

k - фактор, що залежить від геометрії гелю.

Для електрофорезу білків сироватки використовують ПААГ з концентрацією акриламиду 35 мг/мл, що забезпечує високу швидкість і ефективність розділення білків. Буферний розчин для приготування гелю (рН 7,9) містить 0,025 М тріс/оксиметил/амінометан, 0,027 М веронал, 0,003 М

					Матеріал і методи досліджень	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

етилендіамінтетраацетат натрію (ЕДТА $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) і 4,5 М карбамід. Буферний розчин забезпечує високий негативний заряд на всіх молекулах білків і відсутність агрегації білків за рахунок дії карбаміду та ЕДТА. Таким чином, для одержання гелю готують вихідні розчини:

- | | |
|---------------------|---------|
| 1. Акриламід | —14 г |
| Метиленбісакриламід | -0,75 г |

Вода до 0,1 л

- | | |
|----------|-----------|
| 2. Тріс | -6,05 г |
| ЕДТА | -2,016 г |
| Веронал | -11,135 г |
| Карбамід | -540 г |

Вода до 1 л

- | | |
|----------------------|-----------|
| 3. Персульфат амонію | -0,03 г |
| ТЕМЕД | - 0,05 мл |

Вода до 0,01 л

Розчини 1 і 2 можуть зберігатися при 4°C протягом одного місяця. Розчин 3 готується безпосередньо перед дослідом. Кількість персульфату амонію підбирають таким чином, щоб забезпечити полімеризацію акриламіду і утворення гелю протягом 30-40 хв. Гель одержують, змішуючи один об'єм розчину 1, два об'єми розчину 2 і один об'єм розчину 3.

Полімеризацію гелю проводять в робочій камері (100x90x3 мм), яка склеюється попередньо з чотирьох скляних деталей.

Нижній отвір камери заклеюють плівкою. Для формування стартових комірок в камеру із залитим гелем вставляється формер. Після полімеризації формер обережно, щоб не зруйнувати гель, витягають з камери.

Проба готується шляхом розчинення концентрату білків сироватки в розведеному в два рази буфері (вихідний розчин 2). Для збільшення густини

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

зразку додають кристали сахарози і в якості сигнального барвника - бром феноловий синій.

Сигнальний барвник має більшу електрофоретичну рухливість, ніж молекули проби, і дозволяє спостерігати за ходом електрофорезу.

Зразок готують за декілька годин до електрофорезу і перед нанесенням на гель фільтрують.

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

Робочу камеру з гелем встановлюють в нижню буферну камеру. В буферні камери і верхню частину робочої камери заливають електродний буфер (розведений в два рази вихідний розчин 2 без карбаміду).

Пробу вносять в стартові комірки в кількості 0,015 мл за допомогою мірного капіляру під буфер. Проба повинна рівномірно осісти на дно комірки. Від цього в значній мірі залежить якість розділення. Після нанесення проби з'єднують буферні розчини в робочій і верхній електродній камерах смужкою фільтрувального паперу і підключають електроди до джерела живлення. Електрофорез проводять при постійній силі струму - 50 mA. Коли сигнальний барвник досягне нижньої лінії гелю, відключають струм і дістають пластинку гелю для фіксації і забарвлення.

Після закінчення електрофорезу камеру розклеюють при нагріванні, обережно дістають пластинку гелю, розміщують її в кристалізаторі, заливають 1% розчином барвника (амідочорний 10 Б) в 7% розчині оцтової кислоти і витримують 30-40 хвилин. В результаті білки фіксуються в гелі і забарвлюються. Барвник, який не зв'язався з білками, відмивають 7% розчином оцтової кислоти в 20 % етанолі, періодично змінюючи розчин, поки фон не стане повністю прозорим.

На одержаній фіксованій електрофореграмі ідентифікують фракції білків по віддалі, яку вони проходять в гелі під час електрофорезу. Результати оформлюють у вигляді схеми електрофореграми.

Для кількісного аналізу електрофореграми піддають денситометрії [84].

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Результати досліджень продуктів гідролізу концентрату сироваткових білків протеазами тваринного походження

3.1.1. Порівняння динаміки гідролізу концентрату сироваткових білків за дії різних протеолітичних препаратів

Перед здійсненням гідролізу концентрату сироваткових білків протеазами тваринного походження було здійснено опис КСБ на фракційний склад та молекулярно-масовий розподіл білків і пептидів у ньому. Для цього був використаний 1 %-ий водний розчин КСБ та проведена гель-фільтрація на сефадексі G-50. Отримані результати представлені на рис. 3.1. Залежно від об'єму елюції, хроматограму поділено на три сектори (I, II, III). Фракції кожного сектору хроматограми об'єднували і визначали кількість протеїнів і пептидів спектрофотометричним методом. Було проведено три гель-фільтрації, результати яких представлені в табл. 3.1. Результати електрофоретичного аналізу фракційного складу протеїнів КСБ представлені на денситограмі (рис. 3.2). На ній представлений типовий поділ білкових фракцій сироватки молока: β -лактоглобулін (β -LG), α -лактоальбумін (α -LA), альбумін сироватки крові (BSA), імуноглобуліни (IG) і окремі високомолекулярні компоненти протеозо-пептонної фракції (PPF).

Таблиця 3.1

Сектор	I	II	III
Молекулярна маса протеїнів і пептидів (M), Да	>30000	1500 < M < 30000	M < 1500
Вміст даних протеїнів і пептидів у КСБ від загальної кількості, %	31	67	2

					18-154 19 ДР 003 ПЗ		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Берекета В.П.</i>			<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Южало В.Г.</i>					
<i>Реценз.</i>					<i>Власні дослідження</i>		
<i>Н. Контр.</i>					ТНТУ, МЛМ-61		
<i>Затверд.</i>							

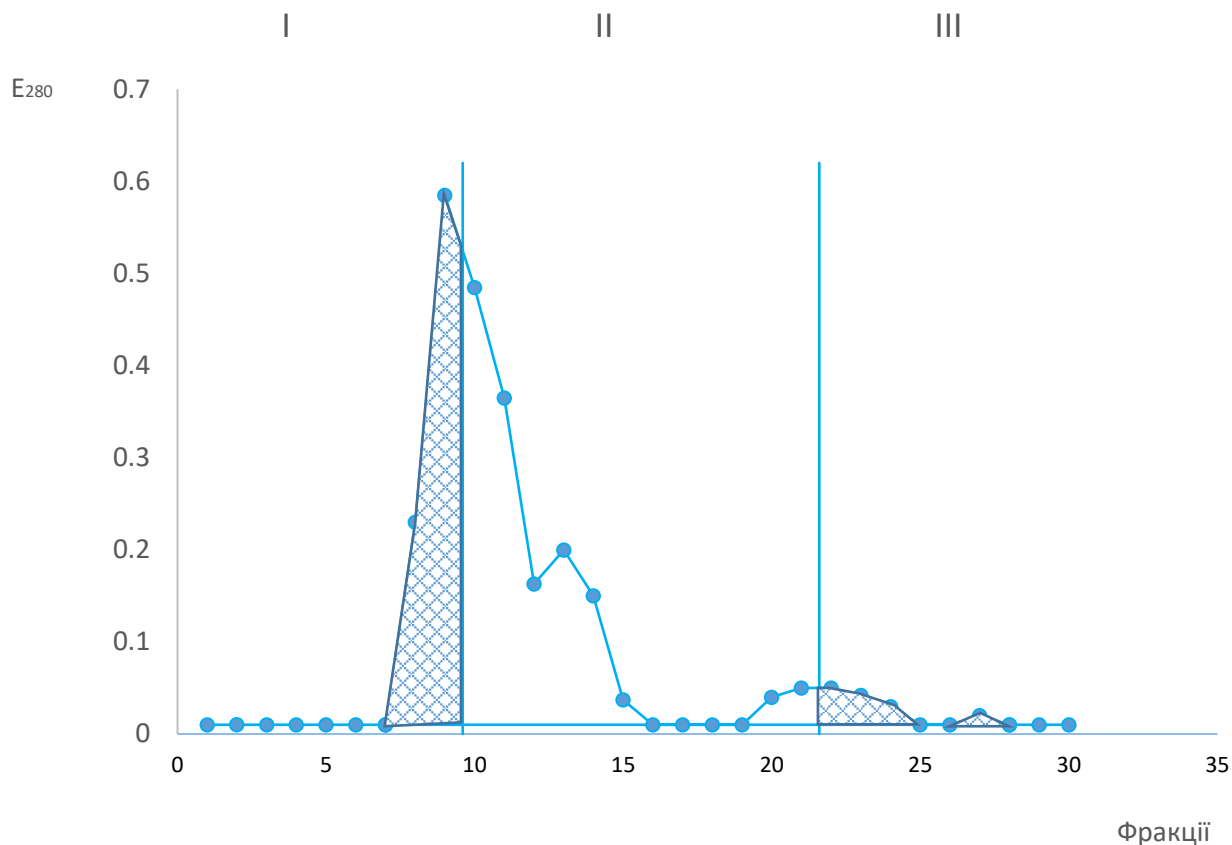


Рис. 3.1. Хроматограма концентрату сироваткових білків, отримана гелі-фільтрацією на колонці з сефадексом G-50

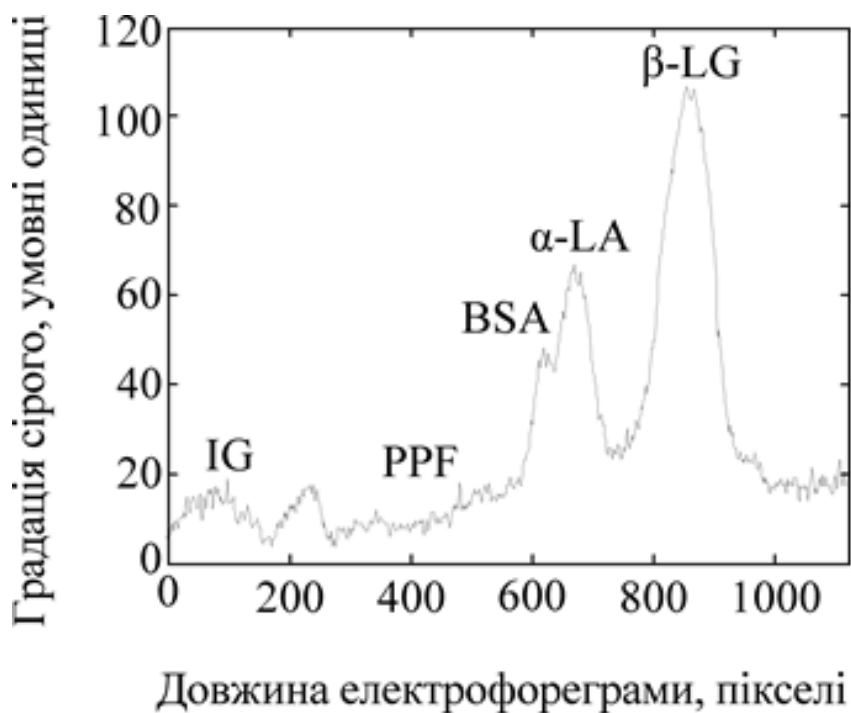


Рис. 3.2. Денситограма електрофореграми концентрату сироваткових білків

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Гідроліз 15 %-ого розчину КСБ виконували при співвідношенні фермент тваринного походження : розчин КСБ - 1:20. Ці співвідношення застосовуються при отриманні гідролізатів сироваткових білків [88, 92]. Перед гідролізом для ферментних препаратів було визначене значення критерію *b*, яке є пропорційним до протеолітичної активності препарату, за методом Селеменєва [94]. Найбільшою протеолітичною активністю, серед використаних в досліді препаратів, володіє хімотрипсин. Значення його критерію *b* становить 5,67. Співвідношення цього препарату до субстрату задали як 1:20. Концентрацію інших ензимних препаратів збільшували залежно до значення критерію *b*. Він становив для панкреатину - 2,67 і для трипсину - 2,02.

Гідроліз протеазами проводили при значенні водневого показника рН 7,9 і температурі 37 °С. Під час досліду через встановлені проміжки часу відбирали проби продуктів гідролізу для спектрофотометричного аналізу, які розчинні в 5 % трихлороцтовій кислоті (ТХО). Також були відібрані проби для електрофоретичного і хроматографічного аналізу. Результати утворення розчинних у ТХО продуктів гідролізу КСБ представлені на рис. 3.3. Як бачимо з графіків, гідроліз найбільш інтенсивно проходить в перші 60 хв і в більшості випадків закінчується до 120 хв. За даними досліджень бачимо, що панкреатин має найвищий ступінь гідролізу.

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

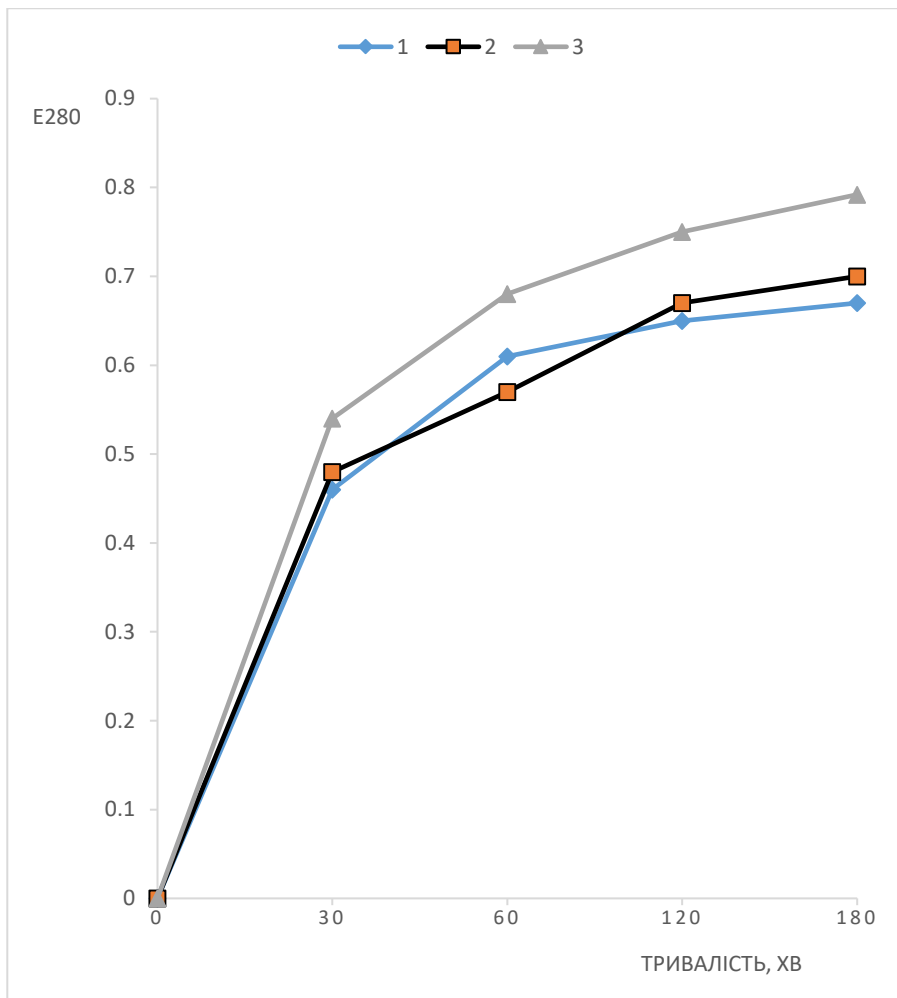
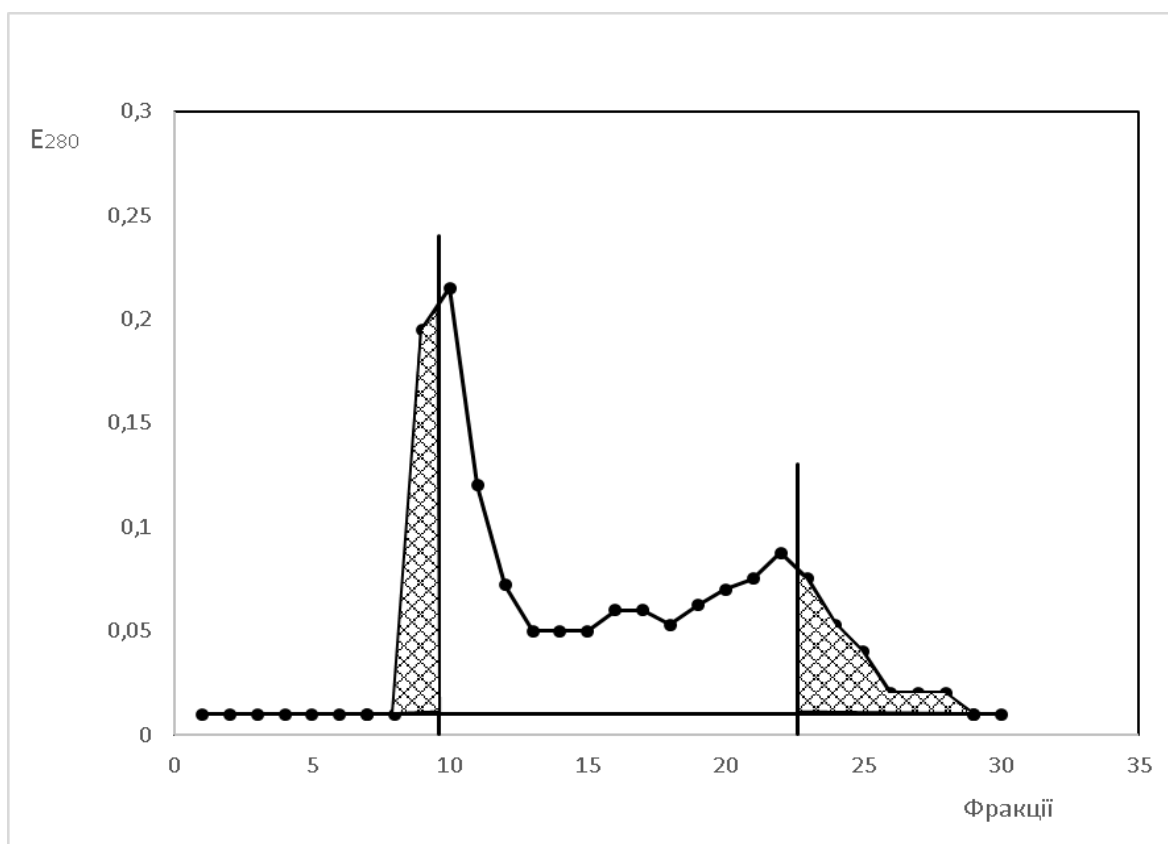


Рис. 3.3. Гідроліз КСБ протеолітичними препаратами: 1 — хімотрипсином; 2 — трипсином; 3 — панкреатином.

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

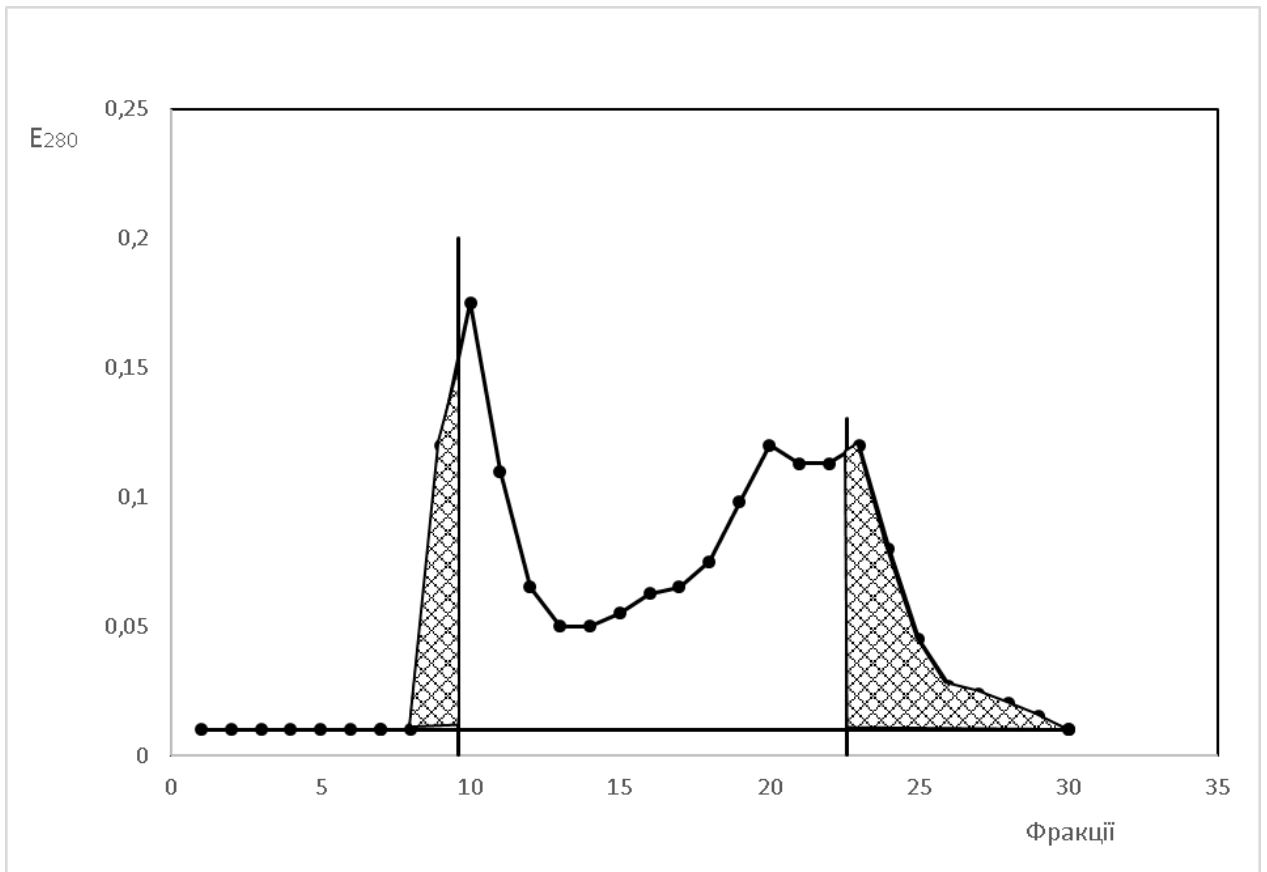
3.1.2. Гель-фільтрація продуктів протеолізу концентрату сироваткових білків на сефадексі G-50

Для визначення молекулярно-масового розподілу отриманих поліпептидів і пептидів під час гідролізу нами була виконана гель-фільтрація реакційної суміші на сефадексі G-50. Перед гель-фільтрацією в суміші, відібраний на 60-ій і 120-ій хвилині протеолізу, осаджували нерозщеплені білки трихлороцтовою кислотою. Результати гель-фільтрації продуктів протеолізу представлені на рис. 3.4. Як і при гель-фільтрації КСБ (рис. 3.1), так і тут, кожна хроматограма поділена на три сектори. За результатами трьох гель-фільтрацій в об'єднаних фракціях визначали середній вміст продуктів протеолізу в кожному секторі хроматограми (табл. 3.2). Також в табл. 3.2 показана кількість продуктів протеолізу (у відсотках), що розчинні у трихлороцтовій кислоті від загальної кількості протеїнів і пептидів у КСБ.

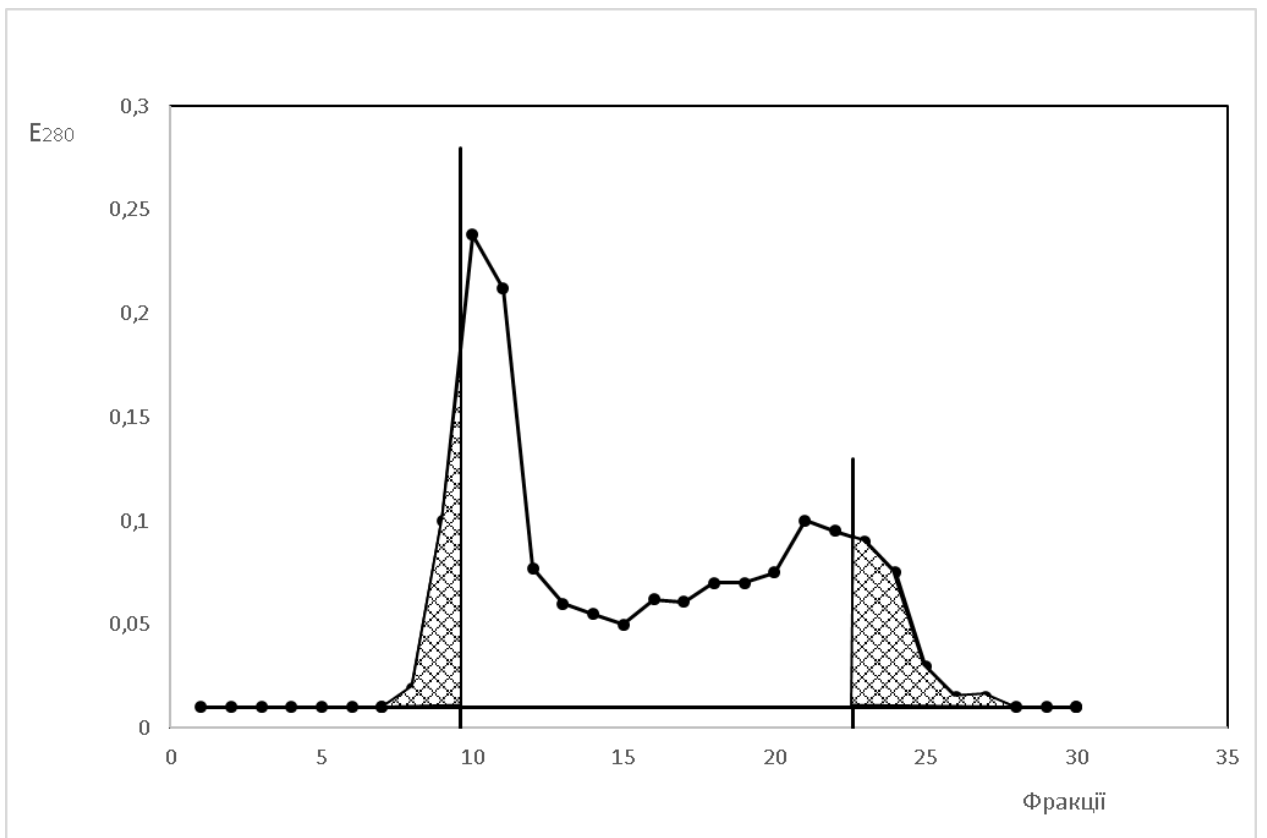


a

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

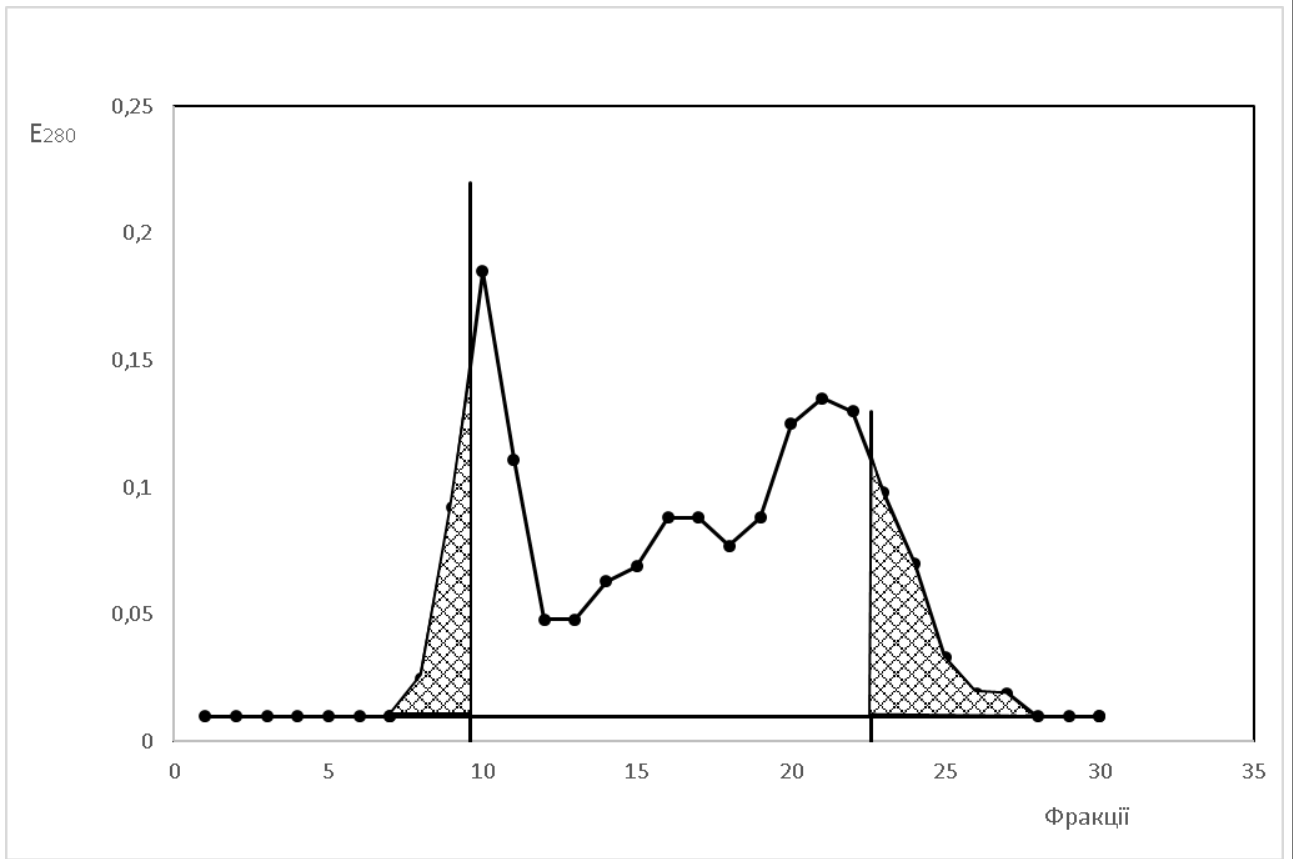


б

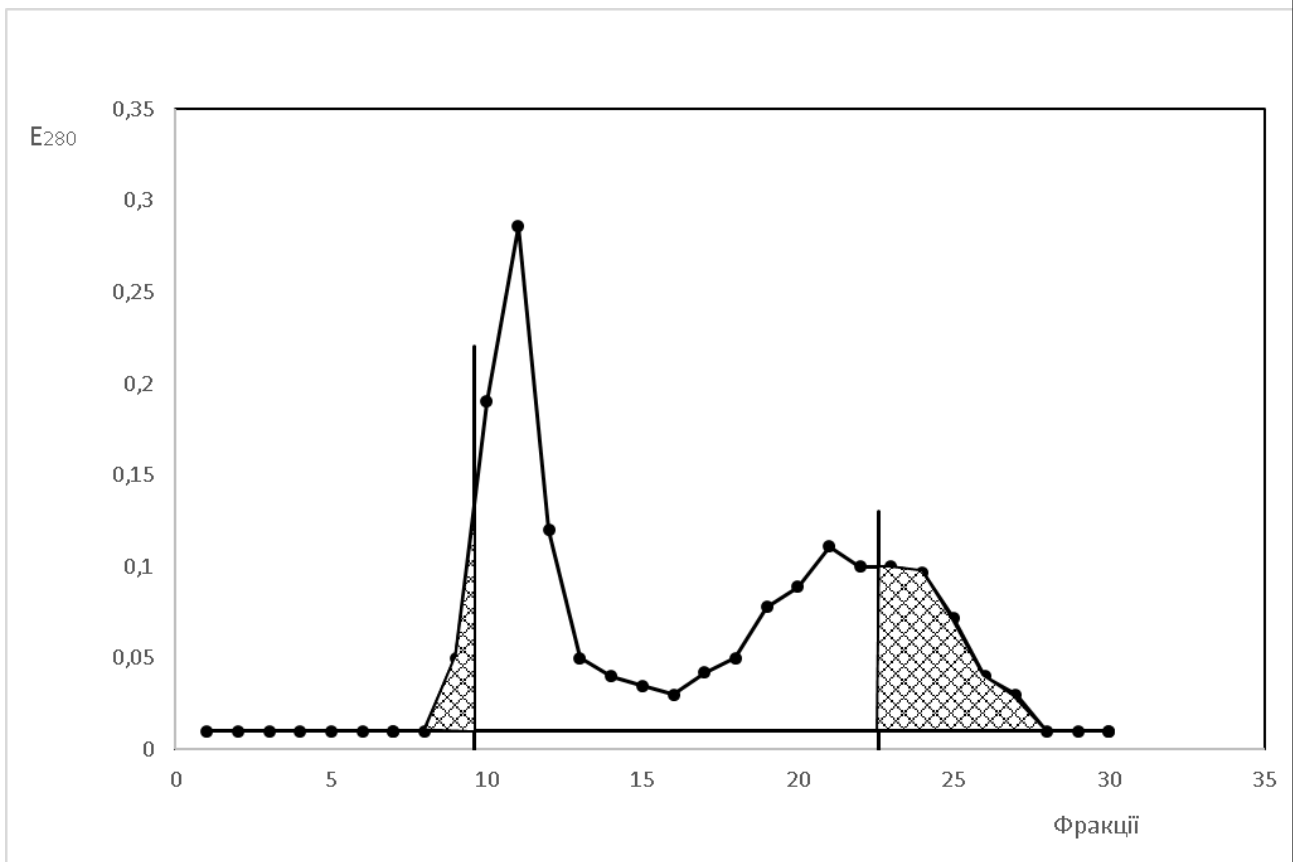


в

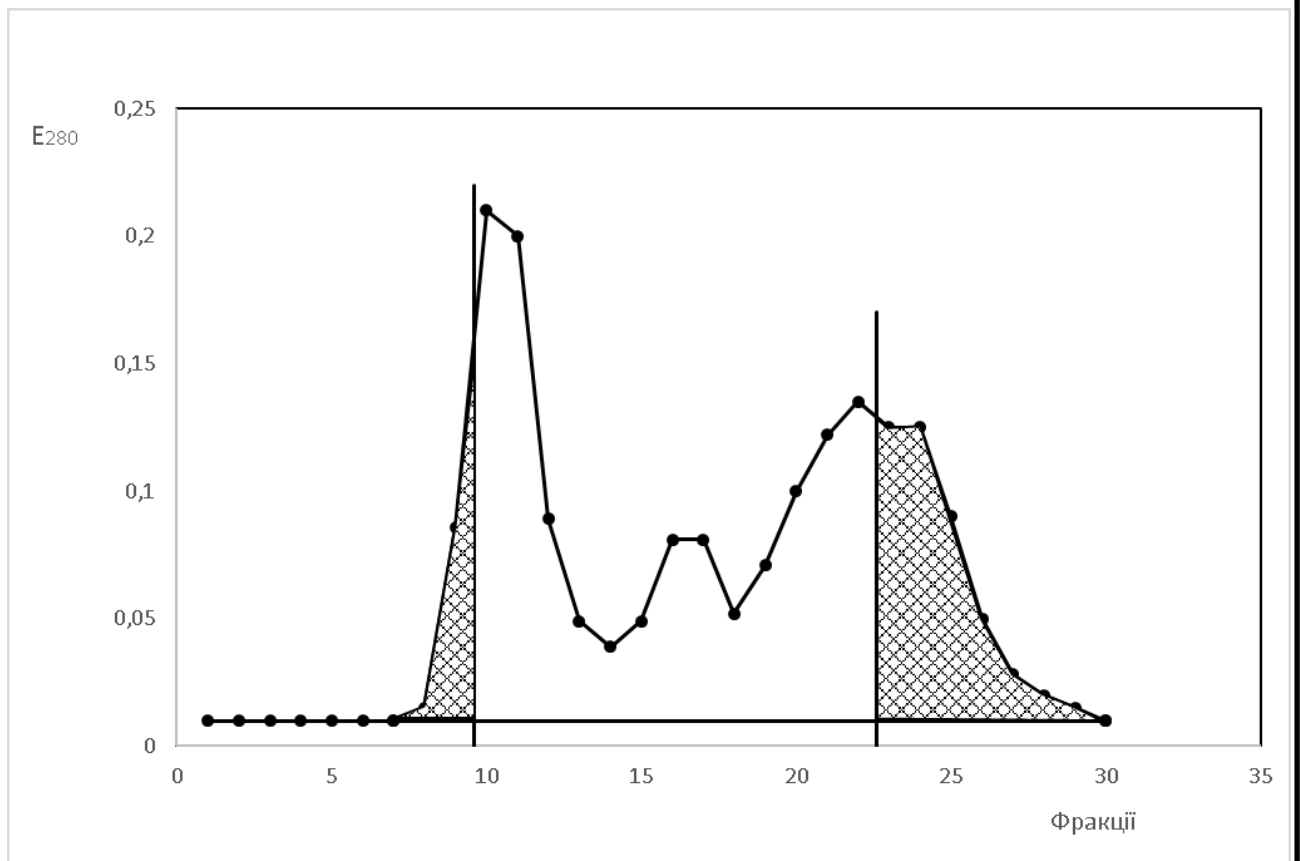
					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



2



д



e

Рис. 3.4. Хроматограми продуктів гідролізу КСБ, що отримані на 60-й і 120-й хвилинах протеолізу за дії ензимних препаратів: а - трипсину (60 хв); б – трипсину (120 хв); в - хімотрипсину (60 хв); г -хімотрипсину (120 хв); д - панкреатину (60 хв); е - панкреатину (120 хв)

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 3.2

Молекулярно-масовий розподіл продуктів гідролізу КСБ протеолітичними препаратами за результатами гель-фільтрації на сефадексі G-50 ($M \pm m$, $n=3$)

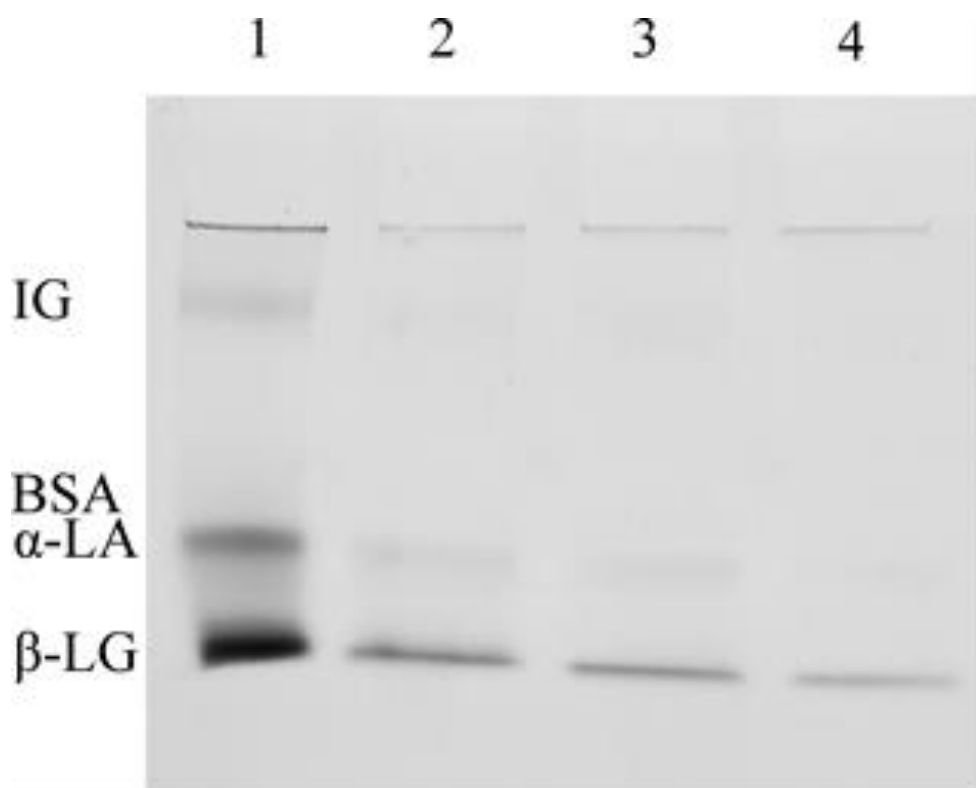
Протеолітичний препарат	Продукти протеолізу з $M \geq 30000$ Да		Продукти протеолізу з $1500 < M < 30000$ Да		Продукти протеолізу з $M \leq 1500$ Да		Загальна кількість продуктів протеолізу*	
	мг	%	мг	%	мг	%	Мг	%
Тривалість протеолізу 60 хвилин								
Трипсин	15,9±1,5	13	92±4,7	73,5	17±1,4	13,5	125±7,6	59
Хімотрипсин	10,8±1,0	8	108±6,2	78	19±3,1	14	138±10,3	64
Панкреатин	3,9±1,2	3	109±7,5	77	29,1 ±3,8	20	142±12,5	65
Тривалість протеолізу 120 хвилин								
Трипсин	13,1±1,1	9	99,4±9,7	72	26,5±1,3	19	139±12,1	67
Хімотрипсин	12,2±0,9	9	109±6,5	78	17,9±4,0	13	139±11,4	67
Панкреатин	4,9 ±1,0	3	107±11,0	71	39,1±3,7	26	151±15,7	70

Примітка. *Відсоток від кількості протеїнів зразку, взятого для гель-фільтрації

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

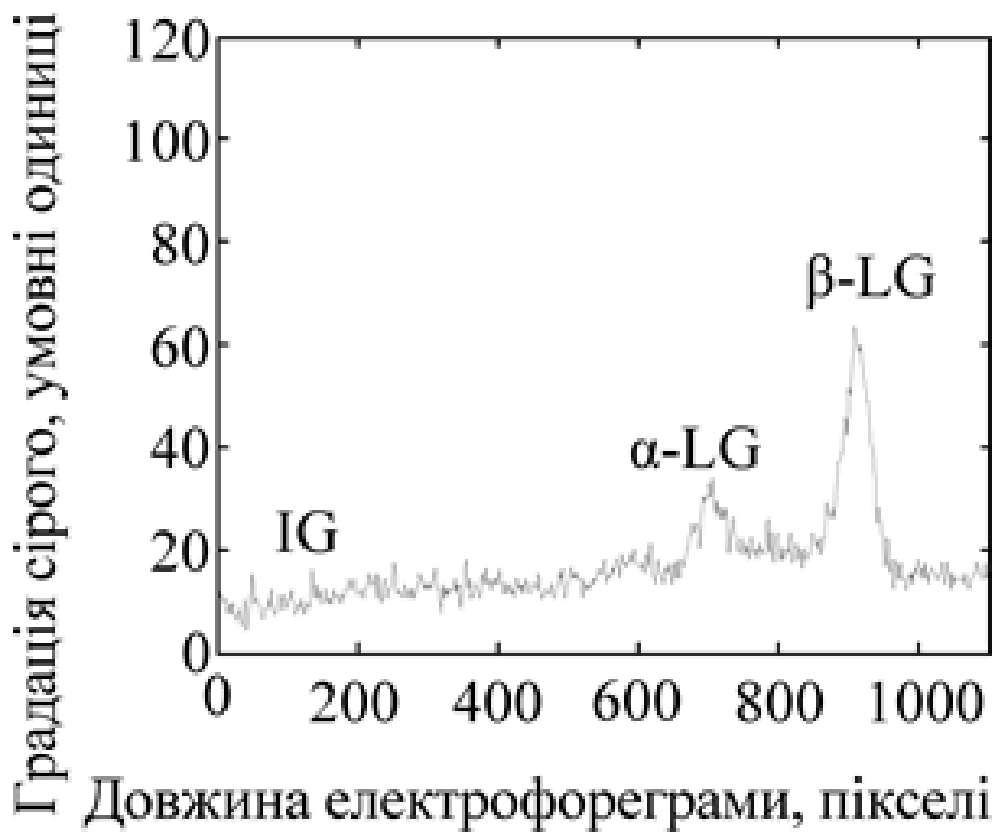
3.1.3. Електрофорез в поліакриламідному гелі протеїнових фракцій концентрату сироваткових білків

Для визначення походження продуктів гідролізу потрібно визначити фракційний склад протеїнів КСБ, які не розщепилися в процесі гідролізу різними протеолітичними препаратами, тому, що білкові фракції сироватки молока вирізняються різною стійкістю до дії протеолітичних ферментів. Для визначення фракційного складу проводили електрофорез відібраних проб, які брали на встановлених етапах гідролізу (0 хв, 60 хв, 120 хв і 180 хв). Для аналізу застосовувався експрес-метод [95]. Також у кожному випадку був здійснений денситометричний аналіз електрофореграми проби, відібраної на 120-й хвилині гідролізу. Результати денситометричного і електрофоретичного аналізів представлені на рис. 3.5. Як бачимо з електрофореграм, за 180 хв гідролізу, у жодному з зразків не відбувається повного розщеплення білкових фракцій. Денситометричні дослідження показують на відмінності у ступені розщеплення білкових фракцій різними протеолітичними препаратами.

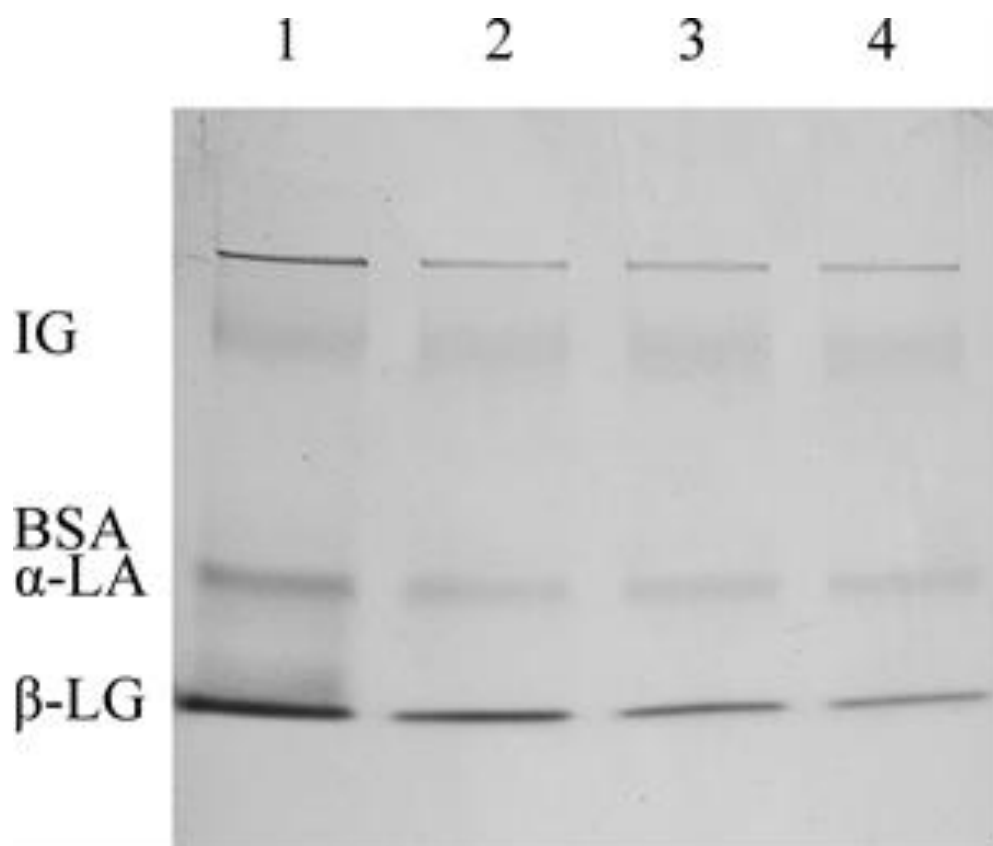


a

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

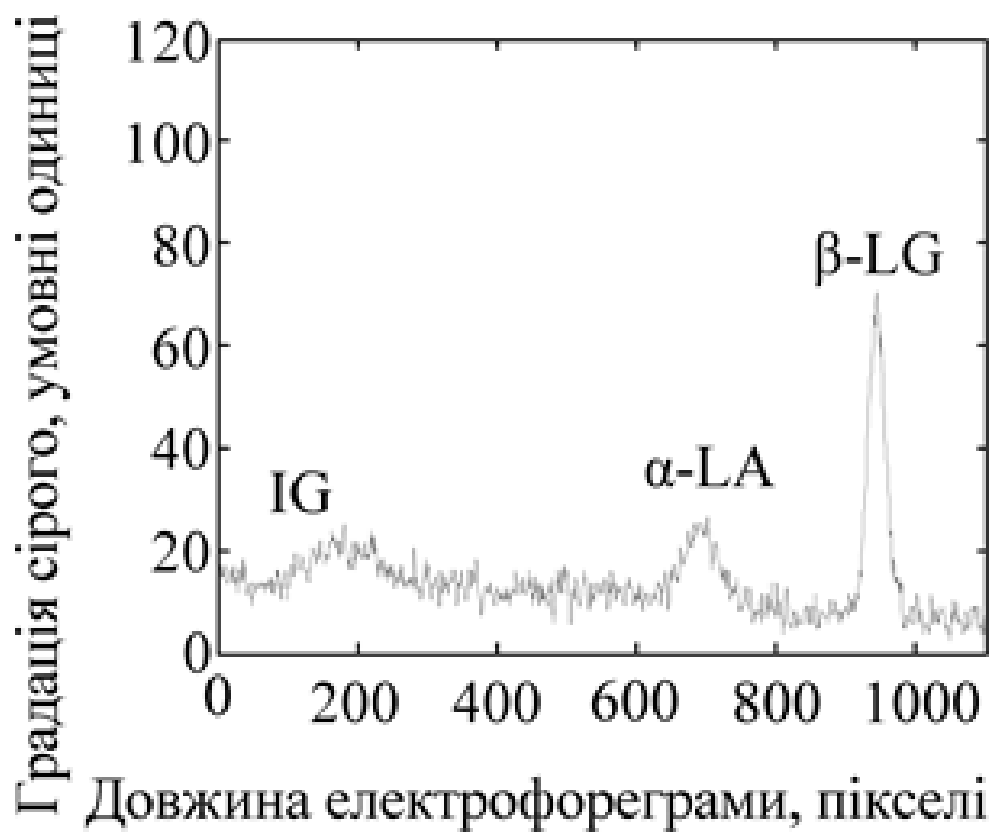


б

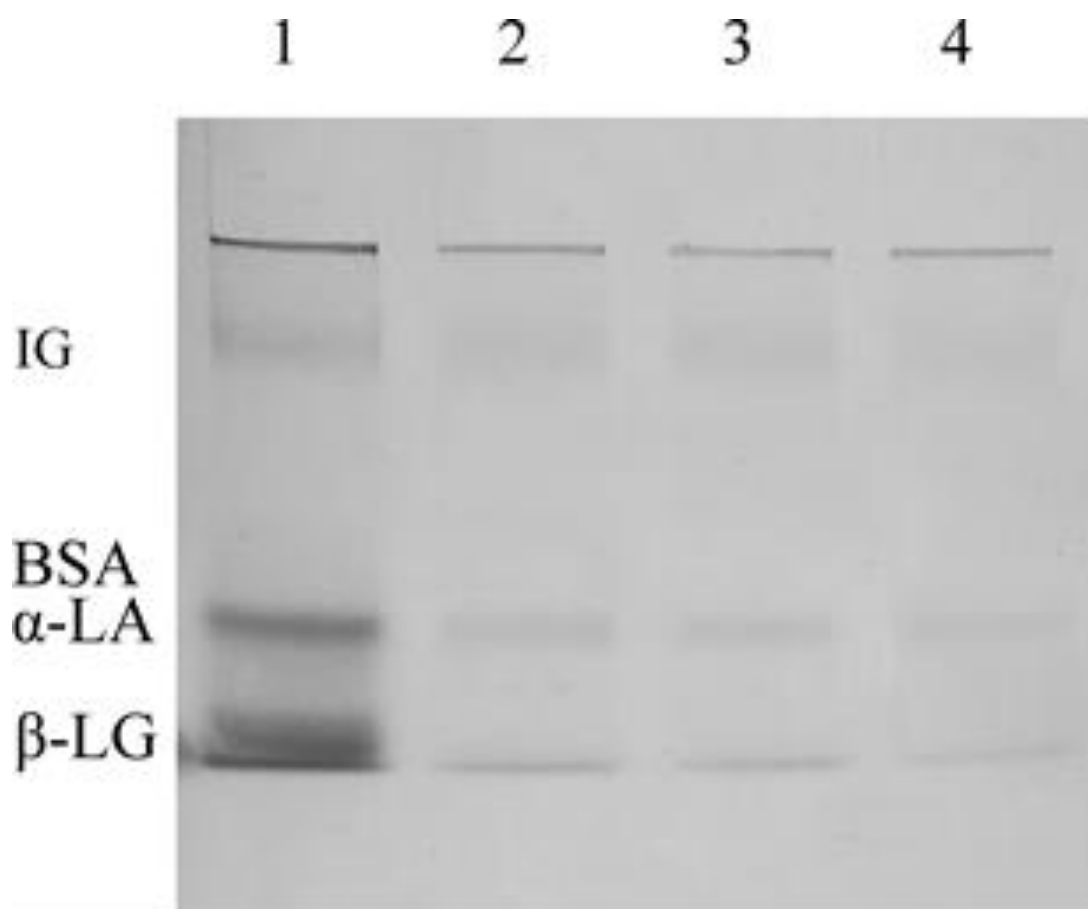


в

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

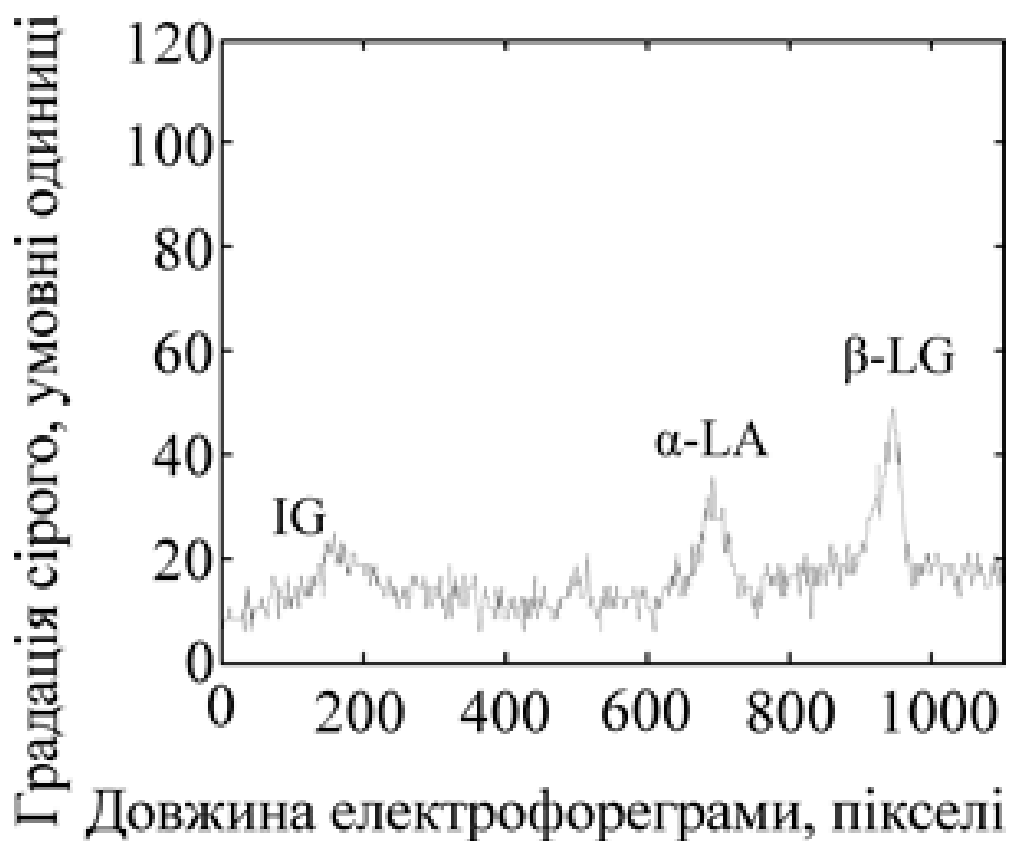


г



д

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



e

Рис. 3.5. Електрофореграми (1 - 0 хв; 2 - 60 хв; 3 - 120 хв; 4 - 180 хв) і денситограми (120 хв) продуктів протеолізу сироваткових протеїнів, отриманих на різних стадіях дії ензимних препаратів: а - трипсин (електрофореграма); б - трипсин (денситограма); в - хімотрипсин (електрофореграма); г — хімотрипсин (денситограма); д - панкреатин (електрофореграма); е - панкреатин (денситограма)

За площею відповідних піків на денситограмах розраховувалась залишкова кількість нерозщепленого β-лактоглобуліну і α-лактальбуміну після 120 хвилин гідролізу. Результати представлені на діаграмах (рис. 3.6). Близько 80 % β-лактоглобуліну і α-лактальбуміну розщепились за дії панкреатину. Близько 70 % білків цих фракцій розклали трипсин і хімотрипсин.

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

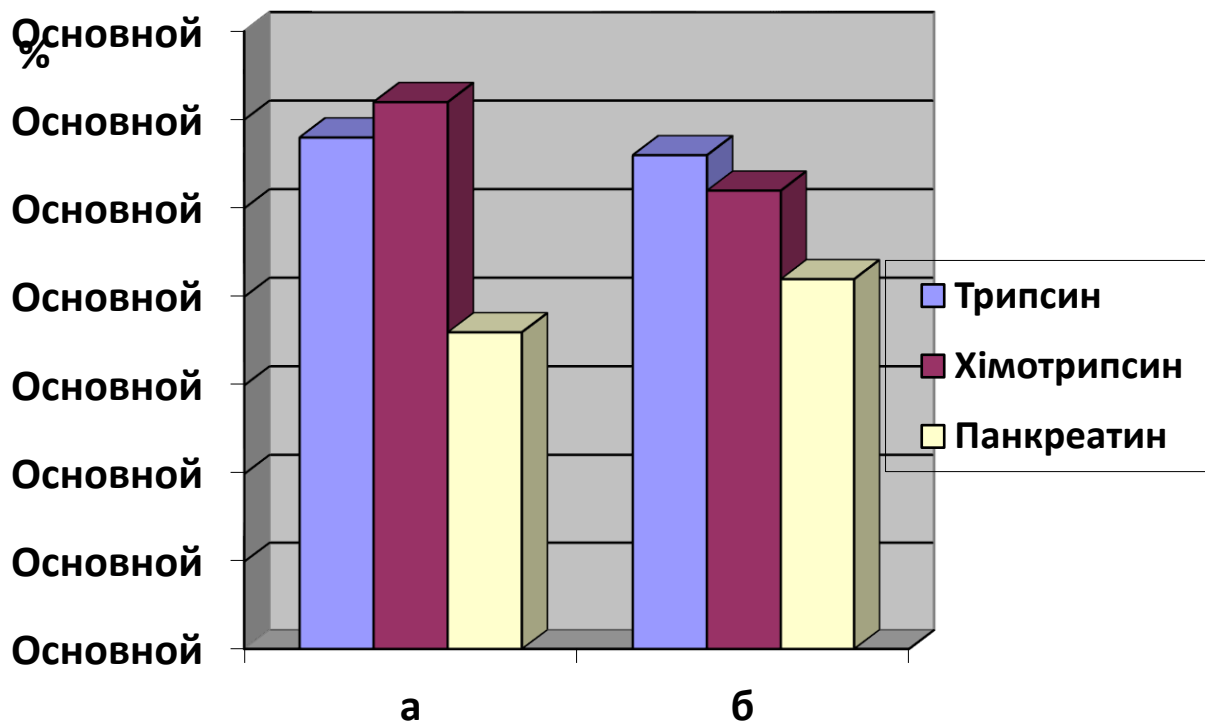


Рис. 3.6. Відсоток непрогідролізованих білкових фракцій КСБ за дії відповідних протеаз на: а — β-лактоглобулін; б — α-лактальбумін

3.2. Обговорення результатів протеолізу концентрату сироваткових білків

Порівняння препаратів на протеолітичну активність було здійснено на субстраті «Концентрат сироваткових білків». Цей субстрат включає усі основні білки сироватки молока, які є попередниками природних біологічно активних пептидів. Вміст цих білків за даними електрофоретичного аналізу (рис. 3.1 і 3.2) близький до їх вмісту у молочній сироватці [90].

При гідролізі білків сироватки молока застосовують протеолітичні препарати, які володіють високим ступенем протеолізу [88, 91, 93]. Важливим показником при одержанні гіпоалергенних продуктів на основі білків сироватки молока також є вміст низькомолекулярних пептидів [92]. Наші досліджувані три ферментні препарати тваринного походження є близькими за значенням ступеня протеолізу (рис. 3.3). Але при цьому, одержані продукти гідролізу за дії на них протеолітичних препаратів здатні відрізнитися за молекулярно-масовим розподілом, первинною структурою та походженням з різних білкових фракцій сироватки молока. Відомо, що молекулярна маса основної частини природних біологічно активних пептидів має межі від 200 до 1500 Да [85, 86]. Для дослідів та опису молекулярних мас продуктів гідролізу білків сироватки часто застосовують гель-фільтрацію на колонці з сефадексом G-25. При гель-фільтрації на такому сефадексі біологічно активні пептиди з молекулярною масою меншою за 1000 Да виходять з об'ємом, який рівний повному об'єму хроматографічної колонки. Інша частина біоактивних пептидів сироватки видаляється з об'ємом, що знаходиться між повним і вільним об'ємом. При застосуванні сефадексу G-100 [88] усі біоактивні пептиди та частина великих поліпептидів, що містять до 50 амінокислотних залишків, виходять з повним об'ємом колонки. Ми застосовували сефадекс G-50. При його використанні одержуються хроматографічні фракції, які містять практично усі природні біоактивні пептиди сироватки. Ці фракції елююються з об'ємом, який рівний повному об'єму колонки. На рис. 3.4 ці фракції

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

розміщені в третьому секторі хроматограм. У фракціях цього сектору найбільше продуктів гідролізу утворюється за дії панкреатину (табл. 3.2).

Електрофорез в поліакриламідному гелі (ПААГ) нечасто застосовують для дослідження коротких пептидів, тому, що вони погано фіксуються навіть у ПААГ з високою концентрацією. Але завдяки електрофорезу можна визначити білкові фракції, які не розкладаються в процесі гідролізу. Експрес-електрофорез в анодній системі однорідного поліакриламідного гелю дозволяє з високою точністю ідентифікувати головні білки сироватки молока, які є попередниками біологічно активних пептидів [95]. Завдяки використанню цієї електрофоретичної системи ми отримали наші денситограми (рис. 3.5) та кількісно оцінили розклад окремих білкових фракцій за дії протеолітичних препаратів (рис. 3.6). Найменше нерозщепленого β -лактоглобуліну була отримана за дії панкреатину. β -лактоглобулін є основним попередником біоактивних пептидів сироватки молока. Другим важливим попередником біоактивних пептидів є α -лактальбумін. Він швидко розкладається за дії хімотрипсину і панкреатину. Якщо порівняти ступінь гідролізу КСБ (табл. 3.2) і залишок нерозкладених фракцій (рис. 3.6), то бачимо певну невідповідність. Виходить, що певна частина високомолекулярних продуктів гідролізу осаджується 5 % трихлороцтовою кислотою, проте не відтворюється на ПААГ. Такі поліпептиди можуть відобразитися у ПААГ, проте не утворювати чітких смуг на електрофореграмах.

З літературних джерел відомо, що практично усі відомі природні біологічно активні пептиди сироватки молока можуть утворюватися за дії панкреатину, а також хімотрипсину і трипсину, які містяться в його складі [86]. Біоактивні пептиди білків сироватки молока мають певну первинну структуру, яка строго встановлює їх властивості та біологічну дію [87, 89].

Одержані результати вказують на розбіжності у молекулярно-масовому розподілі і фракційному походженні продуктів гідролізу білків сироватки, які отримані при дії різних ензимних препаратів з ідентичною загальною протеолітичною активністю. Для точнішого порівняння дії ензимних

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

препаратів потрібно здійснити дослід на рівні первинної структури білків та їх відповідності відомим біоактивним пептидам з білків сироватки. Для збереження властивостей природних біоактивних пептидів в отримуваних продуктах необхідно здійснювати протеолітичні процеси в умовах, які ідентичні процесам нормального травлення.

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

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ЕКОНОМІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИРОБНИЦТВА ГІДРОЛІЗАТІВ СИРОВАТКОВИХ БІЛКІВ

Під раціональним використанням білкової молочної сировини розуміють повне її використання для промислової переробки, розширення асортименту і збільшення об'єму продукції, підвищення за рахунок цього ефективності виробництва. Економічна ефективність раціонального використання білкової молочної сировини припускає випередження темпів зростання вартості товарної продукції і зниження витрат на природоохоронні заходи над темпами зростання повних витрат виробництва.

При оцінці ефективності виробництва продуктів з білкової молочної сировини необхідно враховувати результати використання цих продуктів, включаючи стадію кінцевого споживання, а також чинник поліпшення екологічної обстановки в зоні цього підприємства.

Вартість товарної продукції і повні витрати з розрахунку на 1т молочної сировини - важливі елементи в економічному механізмі оцінки підвищення ефективності виробництва.

Економічні розрахунки ефективності виробництва продуктів з білкової молочної сировини виконують на основі критерію і системи показників ефективності виробництва. Розрізняють загальну порівняльну і приватну ефективності виробництва.

Показником комплексного використання білкової молочної сировини є рівень використання білків в цілому.

Нині більше значення для підприємства має приватна економічна ефективність, що відображає використання окремих ресурсів виробництва і отримання певних результатів : річної економії, приросту прибутку, рентабельності, окупності капітальних вкладень та ін.

					18-154 19 ДР 004 ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Берекета В.П.</i>			<i>Обґрунтування економічної ефективності виробництва гідролізатів сироваткових білків</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Юкало В.Г.</i>						
<i>Реценз.</i>						ТНТУ, МЛМ-61		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>								

Важливий чинник при організації виробництва по виробленню продуктів з білкової молочної сировини - рентабельність виробництва і термін окупності зроблених витрат. Намічені технічні рішення будуть економічно ефективними, якщо термін окупності зроблених витрат менше або дорівнює нормативному. При розрахунку терміну окупності доцільно враховувати і потенційну економічну ефективність підприємства від зниження витрат на охорону довкілля за рахунок скорочення або повного припинення забруднення стічних вод компонентами білкової молочної сировини у зв'язку з їх переробкою.

Досліджені літературні дані показують, що виробництво продуктів з молочної сироватки досить рентабельне, терміни покриття витрат на капітальні вкладення рівні або значно нижчі нормативного показника (6 років). Це говорить про економічну доцільність організації цих виробництв. Крім того доцільно враховувати і екологічну оцінку.

Для переробки молочної сироватки економічно вигідні концентрація і спеціалізація виробництва. В цьому випадку можна використати спеціалізоване високопродуктивне устаткування, механізувати і автоматизувати допоміжні процеси. Спеціалізовані цехи (дільниці) дозволяють досягти високої культури виробництва і підвищення санітарно-гігієнічних умов.

При виборі асортименту продукції слід керуватися можливістю її реалізації на місцевому ринку (продукція з обмеженими термінами зберігання) або постачання її в інші регіони нашої країни або на експорт (продукція з тривалими термінами зберігання) [19].

У асортимент нашої продукції входять гідролізати білків сироватки молока. Нашу продукцію доцільно реалізувати як на місцевому ринку, по областях країни так і відправляти на експорт. Також економічно вигідно після повного видалення сироваткових білків для вироблення гідролігатів направляти сироватку на подальше перероблення. Сироватка може бути використана для отримання екологічно чистої високоякісної харчової лактози.

					Обґрунтування економічної ефективності виробництва гідролігатів сироваткових білків	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Гідроліз є кислотний, лужний та ферментативний. В даній роботі використовується ферментативний гідроліз за допомогою протеаз тваринного походження, так як він з-поміж усіх трьох є екологічно безпечним. Також великою перевагою ферментативного гідролізу білка є те, що цей процес проходить з великою швидкістю при відносно м'яких умовах, тому він практично не супроводжується пошкодженням амінокислот і зниженням біологічної цінності.

Основними продуктами ферментативного гідролізу практично завжди є пептиди, а фракція вільних амінокислот, як правило, відносно невелика, тому завдяки цьому гідролізати є гіпоалергенними, легкозасвоюваними та володіють лікувальними властивостями.

					Обґрунтування економічної ефективності виробництва гідролізатів сироваткових білків	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ

5.1. Відповідальність посадових осіб і працівників за порушення законодавства про охорону праці

В Законі України «Про охорону праці» говориться, що особи, які порушують закони та інші нормативно-правові акти про охорону праці, перешкоджають діяльності посадових осіб органів державного нагляду за охороною праці, а також представників профспілок, їх організацій та об'єднань притягаються до дисциплінарної, матеріальної, адміністративної та кримінальної відповідальності [96].

Дисциплінарна відповідальність передбачає накладання дисциплінарних стягнень, що передбачені чинним законодавством. До дисциплінарних стягнень відносяться догана, звільнення з роботи. Правом накладати дисциплінарні стягнення на працівників володіє орган, який приймає на роботу цього працівника. Накладатись дисциплінарне стягнення може також за ініціативою органів, що здійснюють громадський і державний контроль за охороною праці. За кожне дисциплінарне порушення може бути накладене лише одне стягнення. При виборі стягнення враховують ступінь тяжкості вчиненого проступку і завдану ним шкоду, обставини, за яких було вчинено проступок, попередню роботу працівника [97].

Якщо ж законодавство про працю порушує керівник тоді профспілковий орган, який підписав колективний договір, має право вимагати від власника чи уповноваженого ним органу розірвання трудового договору або ж звільнення керівника з посади.

Працівники служби охорони праці на підприємстві можуть вимагати від посадових осіб усунення від роботи працівників, які не пройшли медичного огляду, інструктажу, навчання, перевірки знань з охорони праці, які не мають

					18-154 19 ДР 005 ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Берекета В.П.</i>			<i>Охорона праці</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Окіпний І.Б.</i>						
<i>Реценз.</i>						ТНТУ, МЛМ-61		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>								

допуску до відповідних робіт або які порушують нормативні акти про охорону праці.

Дисциплінарне стягнення застосовується безпосередньо за виявленням провини, але не пізніше одного місяця від дня його виявлення. У цей період часу не враховують час звільнення працівника з роботи в зв'язку з тимчасовою непрацездатністю або перебуванням його у відпустці. Дисциплінарне стягнення не може накладатись більше ніж за шість місяців від дня здійснення порушення. Перед накладанням стягнення, роботодавець повинен вимагати від працівника, який провинився, письмового пояснення. Якщо ж працівник не подав пояснення в відведений термін, дисциплінарне стягнення накладається на основі матеріалів, які є у роботодавця [96].

Адміністративна відповідальність настає за будь-які посягання на загальні умови праці (порушення законів та нормативно-правових актів з охорони праці). Адміністративна відповідальність представляється накладанням штрафу на працівників та, зокрема, посадових осіб підприємств, організацій, установ, а також громадян – власників підприємств чи уповноважених ними осіб.

Адміністративна відповідальність настає за досягнення особою шістнадцятирічного віку.

Правом притягнення до адміністративної відповідальності працівників володіють органи державного нагляду за охороною праці. За порушення законодавства про охорону праці, невиконання розпоряджень посадових осіб органів державного нагляду за охороною праці максимальний розмір штрафу може досягати п'яти відсотків місячного фонду заробітної плати юридичної чи фізичної особи, яка використовує найману працю.

При несплаті штрафу нараховується пеня. Її розмір сягає двох відсотків за кожний день прострочення. В місячний строк у судовому порядку рішення про стягнення штрафу може бути оскаржено [98].

Загальними підставами накладення матеріальної відповідальності на працівника є наявність прямого дійсного збитку, провини працівника, його

					Охорона праці	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

протиправні дії. Є повна та обмежена матеріальна відповідальність. Якщо в діях працівника присутні ознаки карного злочину на нього може бути покладена повна матеріальна відповідальність, а при відсутності таких ознак – обмежена матеріальна відповідальність у межах середнього місячного заробітку [99].

Матеріальна відповідальність забезпечує відшкодування збитків, які завдані підприємствами працівникам (або членам їх сімей), які постраждали від нещасного випадку або профзахворювання [100].

Кримінальна відповідальність настає, якщо порушення вимог законодавчих та інших нормативно-правових актів про охорону праці службовою особою підприємства, установи, організації або громадянином – суб'єктом підприємницької діяльності, заподіяло шкоду здоров'ю потерпілого або спричинило загибель людей або інші тяжкі наслідки [ст. 271 Кримінального кодексу України].

Порушення вимог законодавства про охорону праці, яке спричинило шкоду для здоров'я потерпілого, карається штрафом до п'ятдесяти неоподатковуваних мінімумів доходів громадян або виправними роботами терміном до двох років, або обмеженням волі на той самий термін.

Порушення вимог законодавства про охорону праці, що призвело до загибелі людей або інших тяжких наслідків, карається виправними роботами на строк до двох років, або обмеженням волі на строк до п'яти років, або позбавленням волі на строк до семи років, з позбавленням права обіймати певні посади чи займатися певною діяльністю на строк до двох років або без такого [101].

					Охорона праці	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.2. Основні положення державного соціального страхування від нещасного випадку на виробництві та професійного захворювання

Одним із важливих питань у Кодексі законів про працю є питання про державне соціальне страхування працівників. У Ст. 5 Закону України «Про охорону праці», а також у розділі 17 Кодексу законів про працю говориться, що усі працівники підлягають обов'язковому соціальному страхуванню від нещасних випадків і профзахворювань. Здійснюється страхування на умовах, що визначаються законодавством і колективним договором.

Виплата грошей потерпілому працівникові за період його тимчасової непрацездатності або в порядку компенсації збитків, виплати одноразової допомоги здійснюється із Фонду соціального страхування.

Власник повертає відповідні суми коштів до Фонду соціального страхування тоді, коли нещасні випадки або профзахворювання сталися з його вини.

Кошти соціального страхування повинні витратитися тільки за своїм прямим призначенням. Усі працівники (можливо, і члени їхніх сімей) забезпечуються в порядку державного соціального страхування а саме:

3. допомогою за тимчасової непрацездатності, а жінки, крім того, допомогою при вагітності, під час пологів і при догляді за дитиною до 3-х років;
4. пенсіями за віком, при інвалідності, при втраті годувальника, а також пенсіями за вислугу років, що встановлені для деяких категорій працівників;
5. використання коштів на санаторно-курортне лікування працівників, обслуговування їх профілакторіями та будинками відпочинку, на лікувальне харчування та інші заходи.

У зв'язку з тимчасовою непрацездатністю допомога виплачується так:

6. при хворобі;
7. при каліцтві;

					Охорона праці	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

8. при тимчасовому переведенні на іншу роботу в зв'язку із захворюванням;
9. при догляді за хворим членом сім'ї;
10. при карантині;
11. при санаторно-курортному лікуванні та протезуванні виплачується допомога в розмірі повного місячного заробітку.

Допомога виплачується до відновлення працездатності або до встановлення інвалідності [102].

Згідно з Законом «Про загальнообов'язкове державне соціальне страхування під нещасного випадку на виробництві та професійного захворювання, які спричинили втрату працездатності» всі підприємства повинні реєструватися в регіональних Управліннях виконавчої дирекції Фонду соціального страхування і отримати страхове свідоцтво. Розмір страхових внесків залежить від класу професійного ризику підприємства. Клас професійного ризику та страховий тариф визначає Управління виконавчої дирекції Фонду на підставі Закону України «Про страхові тарифи на загальнообов'язкове державне соціальне страхування від нещасного випадку на виробництві та професійного захворювання, які спричинили втрату працездатності» та постанови КМ України від 13.09.2000 р. № 1423 «Про затвердження Порядку визначення страхових тарифів для підприємств, установ та організацій на загальнообов'язкове державне соціальне страхування від нещасного випадку на виробництві та професійного захворювання».

Підприємства, де сталися нещасні випадки, переходять у вищий клас ризику рішенням відповідного керівного органу страхового Фонду і тому платять більші страхові внески. Пільги по страховим внескам скасовуються, якщо підприємство штрафується за порушення правил охорони праці. Контроль за станом травматизму і за відрахуванням страхових внесків здійснюють страхові експерти Фонду. Великі страхові внески погіршують матеріальне становище підприємства і змушують власника дбати про стан

					Охорона праці	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

безпеки й удосконалювати виробництво, щоб мати пільги і низький клас ризику [103].

Державне соціальне страхування створює правове поле, фінансові й організаційні механізми для вирішення таких завдань: запобігання нещасним випадкам і професійним захворюванням, відновлення здоров'я та працездатності потерпілих на виробництві, відшкодування збитків внаслідок погіршення здоров'я в процесі праці.

Основними принципами соціального страхування від нещасного випадку Закон проголошує:

- обов'язковий порядок страхування всіх працівників, а також учнів та студентів навчальних закладів, коли вони набувають професійних навичок;
- сплату страхованих внесків тільки роботодавцями;
- своєчасна та повна компенсація збитків потерпілим;
- надання державних гарантій застрахованим у реалізації їх прав;
- диференціювання страхового тарифу з урахуванням умов і стану безпеки праці, виробничого травматизму та професійної захворюваності на кожному підприємстві;
- економічну зацікавленість суб'єктів страхування в поліпшенні умов і безпеки праці [104].

					Охорона праці	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 6. БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ

Підвищення стійкості роботи об'єктів харчової галузі у воєнний час.

За умов можливої дії надзвичайних ситуацій й воєнного часу підвищується роль економічного фактору в житті кожного регіону , кожної країни. Руйнування об'єктів харчової галузі і великі втрати серед населення , а також порушення широкого кооперування галузей харчової промисловості стають причиною різкого скорочення випуску сільськогосподарської продукції, продуктів харчування, що миттєво відзначиться на боєздатності збройних сил і життєдіяльності держави.

Для зменшення впливу цих факторів необхідно підвищувати стійкість роботи об'єктів харчової галузі.

Під стійкістю роботи економіки країни розуміють здатність забезпечити виробництво необхідною для підтримки життєдіяльності держави і успішного ведення дій по захисту її незалежності та недоторканості кордонів промисловою продукцією, а також роботу енергетики, транспорту, зв'язку, торгівлі, сільськогосподарського виробництва.

Стійкість роботи господарства країни складається із стійкості роботи його галузей і об'єктів.

Під стійкістю роботи галузі господарства розуміють здатність галузі за умов утрати частини підприємств та часткового порушення виробничих зв'язків випускати продукцію в потрібній кількості та асортименті , або функціонувати.

Під стійкістю роботи об'єктів харчової галузі розуміють їх здатність за умов дії надзвичайних ситуацій виробляти продукцію, конкурентно спроможну на ринку , а при одержанні слабких чи середніх руйнувань

					18-154 19 ДР 006 ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Берекета В.П.			Безпека в надзвичайних ситуаціях	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Клепчик В.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.								
						ТНТУ, МЛМ-61		

відновлювати своє виробництво в мінімальні терміни. На стійкість роботи об'єктів мають вплив наступні фактори:

- надійність захисту робітників та службовців від дії вражаючих факторів, що супроводжують надзвичайні ситуації;
- здатність інженерно - технічного комплексу об'єкта протистояти дії вражаючих факторів;
- захищеність об'єкта від дії вторинних вражаючих факторів;
- надійність системи постачання об'єкта всім необхідним для виробництва запланованої продукції;
- стійкість системи управління виробництвом та цивільним захистом;
- готовність об'єкта до ведення рятувальних та інших невідкладних робіт і робіт з відновлення порушеного виробництва.

Перелічені фактори визначають шляхи підвищення стійкості роботи об'єктів харчової галузі:

- забезпечення надійного захисту робітників і службовців від вражаючих факторів, що діють за надзвичайних ситуацій воєнного часу;
- захист виробничих приміщень, будівель та споруд від згаданих вражаючих факторів;
- підвищення надійності й оперативності керування виробництвом і цивільним захистом;
- забезпечення стійкості постачання об'єктів харчової галузі електричною енергією, газом, водою, парою, сировиною і т ін. для випуску запланованої продукції.

Вказані шляхи підвищення стійкості роботи об'єктів харчової галузі виробництва реалізують на практиці за допомогою затверджених норм, які є обов'язковими до виконання всіма об'єктами незалежно від форм власності й підпорядкування. Ці норми призначені:

- забезпечити захист і знизити втрати серед населення, а також рівень руйнувань;
- підвищити стійкість роботи об'єктів і галузей виробництва;

					Безпека в надзвичайних ситуаціях	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- забезпечити задовільні умови для успішної ліквідації наслідків надзвичайної ситуації, проведення рятувальних та інших невідкладних робіт в осередках ураження.

Вимоги норм реалізуються:

- під час планування та розбудови нових міст і нових кварталів у містах, жилих і промислових районах шляхом розміщення об'єктів харчової галузі з урахуванням вимог ЦЗ;
- розробки проектів зведення нових будівель , споруд промислових підприємств та об'єктів електро -, водо - і газопостачання, транспорту, зв'язку, складів, захисних споруд тощо;
- реконструкції міст, районів, важливих об'єктів, комунально - технічних систем, засобів зв'язку, транспорту, якщо раніше вони були збудовані без додержання цих вимог.

Контроль за виконанням вимог згаданих норм покладається на Управління та відділи надзвичайними ситуаціями.

Підвищення стійкості роботи об'єктів харчової галузі і промисловості вцілому в умовах надзвичайних ситуацій досягається завчасним проведенням комплексу інженерно - технічних, технологічних і організаційних заходів, направлених на максимальне зниження дії вражаючих чинників надзвичайних ситуацій і створення умов для ліквідації, або зменшення їх негативних наслідків.

Інженерно-технічні заходи включають комплекс робіт, направлених на підвищення стійкості виробничих будівель, споруд, технологічною устаткування, комунально-енергетичних систем.

Технологічні заходи забезпечують підвищення стійкості роботи об'єкту шляхом зміни технологічних процесів і режимів, які сприяють спрощенню виробництва продукції та виключають можливість виникнення, аварій і катастроф.

Організаційні заходи передбачають розробку і планування дій керівного складу, штабу, служб і формувань ЦЗ щодо захисту робочих і службовців,

					Безпека в надзвичайних ситуаціях	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

проведенню рятувальних і невідкладних робіт, відновленню виробництва, а також випуску продукції на устаткуванні, що збереглося.

Заходи щодо підвищення стійкості:

підвищення міцності опорних конструкцій і перекриттів будівель шляхом установки додаткових колон, ферм, або підкосів;

розміщення устаткування на нижніх поверхах будівель, в підвалах і підземних спорудах, надійне закріплення його на фундаменті, установка спеціальних захисних кожухів або ковпаків;

прокладка комунально-енергетичних і технологічних мереж під землею; створення резервних запасів палива, сировини, устаткування, контрольно - вимірювальної апаратури;

зміна відстані між промисловим і вибухонебезпечним об'єктами до безпечного рівня;

зменшення кількості вибухових речовин у сховищах.

У період загрози нападу противника проводять ті заходи з підвищення стійкості роботи об'єкта, які недоцільно здійснювати у мирний час. До таких заходів належать:

- проведення згідно з особовим розпорядженням евакуаційних засобів;
- приведення в готовність системи сповіщення, захисних споруд та пунктів керування;
- видача робітникам і службовцям засобів індивідуального захисту;
- будівництво швидко будованих захисних споруд;
- підготовка об'єкта до швидкої та безаварійної зупинки виробництва згідно з сигналом "Повітряна тривога";
- проведення заходів з підвищення стійкості інженерно-технічного комплексу (підсилення будівель та споруд, встановлення зонтів, навісів, захисних козирків над цінним обладнанням, запасами паливно-мастильних матеріалів, сильнодіючих отруйних речовин та вибухонебезпечної сировини, обваловка складів і т ін.);

					Безпека в надзвичайних ситуаціях	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- здійснення переведення об'єкта на режим роботи воєнного часу (двозмінна праця) та перехід на випуск запланованої на воєнний час продукції;
- введення до дії графіка цілодобового чергування керуючого складу;
- підсилення охорони об'єкта і встановлення суворого пропускного режиму;
- здійснення світломаскування об'єкта.

На період загрози нападу противника згідно зі спеціальним розпорядженням на всіх об'єктах у темний час доби здійснюють світломаскування за режимом "часткове затемнення", при ньому обмежується зовнішнє освітлення до допустимої норми, затемнюють світлові пройоми, вікна і т.ін.

За сигналом "Повітряна тривога" в темний час здійснюють світломаскування за режимом "повного затемнення". При цьому живлення електроенергією усіх об'єктів харчової галузі і жилих районів припиняється, за винятком тих об'єктів, на яких не можна зупинити виробничий процес, а також вузлів зв'язку, станцій переливання крові, операційних і т.ін.

Для організованого й своєчасного проведення заходів з підвищення стійкості роботи об'єктів харчової галузі завчасно складають плани-графіки заходів з підвищення стійкості. Питання підвищення стійкості відображають також у плані ЦЗ об'єкта. У плані-графіку наводять перелік заходів на шкалі часу вказують початок і закінчення виконання кожного заходу. Для начальника ЦЗ і штабу ЦЗ цей документ є керівним під час вирішення одного з найважливіших завдань - підвищення стійкості роботи об'єкта.

Під час раптового нападу, коли термін на організацію та виконання заходів ЦЗ гранично обмежений, здійснюють виконання тільки першочергових завдань, які направлені передусім на захист робітників, службовців та членів їх сімей, на безаварійну зупинку виробництва та прийняття екстрених заходів, що дозволяють, якоюсь мірою, зменшити ступінь ураження в надзвичайних ситуаціях. Під час виконання заходів цивільного захисту особливе значення має надійність і оперативність

					Безпека в надзвичайних ситуаціях	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

керування цивільним захистом об'єкта як одна з основних ланок успішного вирішення завдань з підвищення стійкості роботи об'єкта харчової галузі.

Отже, розробка й планування заходів, що є економічно обґрунтованими, щодо стійкості роботи об'єкта залежать від всебічного вивчення умов, які мають скластися під час надзвичайних ситуацій. Вивчення ступеня їх впливу на виробничу діяльність підприємства будь-якої форми власності дозволяє значно скоротити витрати на строки підвищення стійкості роботи в надзвичайних ситуаціях, а це, в свою чергу, підвищує життєздатність як об'єкта, так і всього господарства в цілому.

Усі фахівці об'єктів харчової галузі повинні володіти методикою оцінки стійкості об'єкта і на основі висновків визначати необхідні заходи з підвищення його стійкості [105].

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

РОЗДІЛ 7. ЕКОЛОГІЯ

В останні роки все більша увага приділяється екологічній чистоті продуктів харчування. Це повною мірою відноситься і до продуктів з вторинної молочної сировини, оскільки велика частина з них вживається безпосередньо в їжу, інша частина використовується у вигляді сировини (напівфабрикатів) для інших видів продуктів харчування. Не менш важлива екологічна чистота продуктів, призначених для кормових цілей, бо через організм тварин і вона повертається у вигляді продуктів харчування для людини.

На екологічну чистоту усіх продуктів з вторинної молочної сировини роблять вплив два основні чинники:

- екологічна чистота сировини, з якої вироблений продукт;
- техніка і технологія виробництва продукту.

Вторинна молочна сировина: пахта, знежирене молоко, молочна сироватка або суміш цих видів сировини - утворюється з молока. Екологічний стан молока обумовлений рядом чинників: екологічною чистотою кормів і води; умовами утримання корів і отримання молока на фермі; технологією первинної обробки молока і його доставки на молочний завод. Шкідливі речовини, що накопичуються рослинами з ґрунту, води і повітря, потрапляють в організм тварини, а через нього безпосередньо в молоко. При переробці такого молока частина речовин перейде в молочні продукти, а частина залишиться у вторинній молочної сировині.

Окрім цього на екологічну чистоту вторинної молочної сировини робить вплив технологія основних продуктів, при яких воно виходить: сепарація незбираного молока, виготовлення вершкового масла, кисломолочного сиру, сичужного сиру, казеїну. Важливо враховувати і екологічну чистоту

					18-154 19 ДР 007 ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Берекета В.П.</i>			Екологія	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Зварич Н.М.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>								
						ТНТУ, МЛМ-61		

використовуваних при цьому допоміжних матеріалів.

Іншим важливим чинником, що визначає чистоту молочних продуктів, являється технологія і устаткування, використовуване для їх виробництва. Важлива екологічна чистота матеріалів, з яких виготовлено технологічне устаткування, і чистота води, використовувана для його миття. При виборі устаткування слід віддати перевагу герметичним апаратам, які виключають контакт сировини з довкіллям [106].

Харчові продукти, потрапляючи в організм людини, можуть стати факторами ризику. Тому вони є особливими об'єктами виробництва, зберігання, транспортування та споживання і до їх виробництва та обігу ставлять особливі вимоги:

1) харчові продукти повинні бути нешкідливими для організму. Вони не повинні містити небезпечні і токсичні речовини в кількості, яка перевищує допустиму норму;

2) харчові продукти повинні бути збалансованими за харчовою і біологічною цінністю, тобто до їх складу повинні входити усі речовини, щоб забезпечити потребу організму в енергії, пластичних і регуляторних речовинах;

3) оскільки харчові продукти і сировина є сприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів в тому числі і патогенних, через швидке псування можливі харчові отруєння, то до сировини, обладнання, умов виробництва пред'являються жорсткі санітарно-гігієнічні вимоги. Ці вимоги викладені в нормативних та законодавчих актах, які в сукупності складають харчове законодавство;

4) харчова сировина і готова продукція є дуже складною за складом і властивостями, містить десятки і сотні різних речовин (білки, жири, вуглеводи, вітаміни та ін.), які можуть змінюватися під впливом природних і технологічних факторів, що впливає на харчову і біологічну цінність, на технологічні і споживчі властивості. Тому необхідно контролювати і запобігати таким небажаним змінам продукції;

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

5) харчові продукти повинні мати звичні для споживача органолептичні властивості: смак, запах, забарвлення, консистенцію, зовнішній вигляд. Тому завданням технології є збереження звичних для споживача характеристик продукції [107].

При прийманні молока спочатку проводять інспекцію тари – перевіряють її чистоту й цілісність пломб, правильність наповнення, наявність гумових кілець під кришками фляг і заглушок у цистернах. Якщо тара забруднилась у дорозі, її попередньо миють. Потім розкривають транспортну тару та визначають органолептичні показники – колір молока, рівномірність забарвлення, однорідність консистенції, яка може бути порушена відстоюванням жиру на поверхні, утворенням осаду на дні тари або наявністю пластівців.

Згідно з ДСТУ 3662 «Молоко коров'яче незбиране. Вимоги при закупівлі» молоко незбиране за зовнішнім виглядом і консистенцією повинно бути однорідною рідиною без осаду і згустків, мати колір від білого до світло-жовтого. Запах і смак повинен бути чистий, приємний, злегка солодкуватий.

Фізико-хімічні показники молока наведені в таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Фізико-хімічні показники молока

Назва показника	Норма для гатунку			
	Екстра	Вищий	Перший	Другий
Густина, не менше ніж, кг/м ³	1028	1027	1027	1027
Кислотність, °Т	16 - 17	16 - 18	16 – 19	≤ 20
Ступінь чистоти за еталоном, група	1	1	1	2
Температура, °С	До 6	До 8	До 10	До 10
Масова частка сухих речовин, %%	≥ 12,2	≥ 11,8	≥ 11,5	≥ 10,6

Базисний вміст жиру в молоці встановлений на рівні 3,4 %%, білка – 3,0 %% [108].

Відомо, що для людини, фізично не навантаженої, яка має надмірну масу тіла і емоційно перегружена, має значення не стільки енергетична цінність харчування, скільки забезпечення його високою біологічною цінністю.

З молочних продуктів вираженими дієтичними і лікувальними властивостями найбільшою мірою володіють продукти, що отримуються на основі знежиреного молока, пахти і молочної сироватки. Саме вони можуть бути в першу чергу віднесені до продуктів, що не мають атерогенних властивостей. Ці продукти харчування дають оздоровчо-профілактичну дію в попередженні ожиріння і серцево-судинної патології.

Одним з найбільш цінних компонентів молока є сироваткові білки, вміст яких досягає в сироватці 1%.

Сироваткові білки (альбумін і глобуліни) мають цінні корисні біологічними властивості, вони містять оптимальний набір життєво необхідних амінокислот і з точки зору фізіології харчування наближаються по амінокислотній шкалі до "ідеального" білку, тобто білку, в якому співвідношення амінокислот відповідає потребам організму.

Нині існує висока потреба в продуктах з лікувально-профілактичними властивостями. Це обумовлено неблагополучною екологічною ситуацією, недостатньо високим рівнем життя, зростанням інфекційних захворювань.

Незважаючи на усе різноманіття і привабливість сучасних барвників, ароматизаторів, наповнювачів, стабілізаторів і напоїв з їх використанням, споживачі віддають велику перевагу екологічно чистим продуктам на основі натуральних природних компонентів.

Такі продукти необхідно включати в постійний раціон харчування жителів екологічно забруднених районів, а також спецконтингенту і спортсменів [19].

Гідролізати білків сироватки є джерелом високоякісного білка і

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

володіють великою кількістю корисних ефектів як для покращення фізичних показників, так і для загального здоров'я організму. Гідролізат вважають повністю безпечним для алергіків, тому його використовують для виготовлення легкозасвоюваних сумішей для немовлят, організм яких не засвоює молока.

Екологічні аспекти технології виготовлення гідролізатів з білків сироватки молока включають питання захисту довкілля. Для попередження забруднення довкілля необхідно максимально унеможливити попадання сироваткових білків і інших компонентів сироватки в стічні води [106].

Дослідження показали, що тонна молочної сироватки, злита в стічні води, забруднює водойму так само, як 100 м³ господарчо-побутових стоків. Витрати, на очищення стічних вод, забруднених сироваткою, яку отримують на сироварному заводі при переробці 50 т молока в зміну, рівноцінні витратам на очищення стічних вод в місті з населенням 80 тис. чоловік.

Ці витрати і прибуток, що отримується від реалізації продуктів переробки молочної сироватки перебивають витрати, необхідні для організації збору і повної переробки цієї сироватки.

Заходи по збору і промисловій переробці молочної сироватки в різні харчові, кормові і технічні продукти економічно вигідні і окупуються за порівняно короткі терміни (1- 3 роки).

Усе це доводить необхідність і доцільність організації повного збору і переробки молочної сироватки, меляси, інших молочних продуктів як з економічної, так і з екологічної точок зору [19].

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

Висновки і пропозиції виробництву

1. При гідролізі 15 %-ого розчину КСБ (фермент тваринного походження : розчин КСБ - 1:20), при встановлених умовах (37 °С і рН 7,9) ензимними препаратами (хімотрипсин, трипсин і панкреатин) тривалістю 180 хв нами одержано близькі значення концентрації продуктів гідролізу, розчинних у 5 % трихлороцтовій кислоті. Більша частина продуктів гідролізу утворювалася за перші 60 хв. Гідроліз практично закінчувався до 120 хв.

2. За допомогою гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-50 ми визначили продукти і ступінь гідролізу КСБ на 60 і 120 хвилинах. Вони склалися відповідно: для хімотрипсину — $138 \pm 10,3$ мг (64%) і $139 \pm 11,4$ мг (67%); для трипсину — $125 \pm 7,6$ мг (59 %) і $139 \pm 12,1$ мг (67%); для панкреатину - $142 \pm 12,5$ мг (65%) і $151 \pm 15,7$ мг (70 %). Також поділом хроматограм на три сектори ми дослідили вміст продуктів гідролізу в кожному із секторів. Найбільше низькомолекулярних пептидів (25 %), з молекулярною масою менше 1500 Да, отримана при дії на КСБ панкреатину.

3. Електрофоретичні дослідження гідролізатів КСБ вказують на різний вплив протеолітичних препаратів на різні протеїнові фракції. Найвищий ступінь гідролізу фракцій β -лактоглобуліну і α -лактальбуміну показав панкреатин, він становив приблизно 80 %.

Пропозиції виробництву:

- при проведенні гель-фільтрації доцільно використовувати колонку з сефадексом G-50, оскільки при його використанні одержуються хроматографічні фракції, які містять практично усі природні біоактивні пептиди сироватки;
- гідроліз білків сироватки протеазами тваринного походження найкраще виконувати за умов ідентичних процесам нормального травлення, щоб зберегти властивості природних біоактивних пептидів в отримуваних

					18-154 19 ДР 000 ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Берекета В.П.			<i>Висновки і пропозиції виробництву</i>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Юкало В.Г.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.								
						ТНТУ, МЛМ-61		

продуктах;

- використання експрес-електрофорезу в анодній системі однорідного поліакриламідного гелю дозволяє з високою точністю ідентифікувати головні білки сироватки молока, які є попередниками біологічно активних пептидів.

					<i>Висновки і пропозиції виробництву</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Список використаної літератури

1. Боєчко Ф. Ф. Біологічна хімія: Навч. посібник. – 2-ге вид., перероб. і допов. – К. : Вища шк., 1995. – 536 с. : іл.
2. Біохімія: Підручник / М. Є. Кучеренко, Р. П. Виноградова, Ю. Д. Бабенюк та ін. – К. : Либідь, 1995. – 464 с.
3. Біохімія. Курс лекцій: Навч. посібник / О. Б. Столяр. – Тернопіль.: Вид-во Карп'юка. 2001. – с. 247: іл. 20
4. Практикум з технології молока та молочних продуктів: Навч. посіб. / О. В. Грек, Н. М. Ющенко, Т. Г. Осьмак та ін. – К.: НУХТ, 2015. – 431 с.
5. Оноприйко А. В., Храмцов А. Г., Оноприйко В. А. Технология молочных продуктов мини-производств: практическое руководство. Ростов-на-Дону: Март, 2004. – 411 с.
6. Скорченко Т. А. Технологія молочних консервів. – К.: НУХТ, 2007. – 232 с.
7. Технологія молочних продуктів: Підруч. / Г. Є. Поліщук, О. В. Грек, Т. А. Скорченко та ін. – К.: НУХТ, 2013. – 502 с.
8. Кочубей-Литвиненко О. В., Ющенко Н. М. Технологія отримання та первинного оброблення молока: Підруч. – К.: НУХТ, 2013. – 211 с.
9. Загальні технології харчових виробництв: Підруч. / В. А. Домарецький, П. Л. Шиян, М. М. Калакура, Л. Ф. Романенко, Л. М. Хомічак, О. О. Василенко, І. В. Мельник, Л. М. Мельник. – К.: Університет «Україна», 2010. – 814 с.
10. Скорченко Т. А., Грек О. В. Технологія дитячих молочних продуктів: Навч. посіб. – К.: НУХТ, 2012. – 330 с.
11. Технологічні розрахунки у молочній промисловості / Поліщук Г. Є., Грек О. В., Скорченко Т. А. та ін.: Навч. посіб. – К.: НУХТ, 2013.– 343 с.

					18-154 19 ДР 000 ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Берекета В.П.</i>			<i>Список використаної літератури</i>			
<i>Перевір.</i>		<i>Юкало В.Г.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>								
						ТНТУ, МЛМ-61		

12. Догарева Н. Г. Технология молока и молочных продуктов: Курс лекций. – Оренбург, 1995. – 724 с.
13. Крусь Г. Н., Храмцов А. Г., Волокитина З. В., Карпычев С. В. Технология молока и молочных продуктов: Учеб. – М.: «КолосС», 2003. – 316 с.
14. Переработка и использование молочной сыворотки: Технологическая тетрадь / Храмцов А. Г., Павлов В. А., Нестеренко П. Г., Холодов Г. И., Евдокимов И. А., Лодыгин Д. Н.. – М.: Росагропромиздат, 1989. – 271 с.: ил.
15. Храмцов А. Г., Нестеренко П. Г. Безотходная технология в молочной промышленности / Под ред. А. Г. Храмцова. – М.: Агропромиздат, 1989. – 279 с.: ил.
16. Храмцов А. Г., Василисин С. В. Рациональное использование обезжиренного молока, пахты и молочной сыворотки: Научно-технические рекомендации. – Ставрополь, 2001. – 106 с.
17. Ножечкіна Г. М. Білки молока і їх роль в сировиробництві. *Молочное Дело*. 2007. № 7 (56). с. 40.
18. Грек О. В., Красуля О. О. Молокопереробка. Інновації: підруч. – К.: НУХТ, 2017. – 390 с.
19. А.Г. Храмцов, П.Г. Нестеренко. Технология продуктов из молочной сыворотки: Учебное пособие. – М.: ДеЛи принт, 2003. - 768 с.
20. Машкін М. І., Париш Н. М. Технологія молока і молочних продуктів: Навчальне видання. – К.: Вища освіта, 2006. – 351 с.: іл.
21. Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов: учеб. К. К. Горбатова, П. И. Гунькова; под общ. ред. К. К. Горбатовой. – 4-е изд., перераб. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2010. – 336 с.: ил.
22. *Сироватка молочна–біологічно цінний продукт* / О. А. Чернюшок, О. В. Кочубей–Литвиненко, В. П. Василів та ін. - Харчова наука і технологія, 2011., № 5, с. 40-42.

					Список використаної літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

23. Рибак О. М. Технологія молока і молочних продуктів. Технології молочних консервів та перероблення вторинної молочної сировини: Курс лекцій. – Т.: Вектор, 2017. – 156 с.
24. Білик О. Я. Розробка технології альбумінного сиру «Урда» із молока різних видів тварин: дис. на здобуття наук. ступ. канд. техн. наук: 05.18.04. Львів, 2016. 173 с.
25. Каліновська Т. В., Оболкіна В. І. Застосування комбінованих білків та гідроколлоїдів при створенні збивних цукеркових мас. *Восточно-Европейский журнал передовых технологий*. 2014. № 2/12 (68). с. 113 – 121.
26. Горбатова К.К. Химия и физика молока и молочных продуктов / К.К. Горбатова, П.И. Гунькова. – СПб. : ГИОРД, 2012. – 336 с.
27. Уханова І. М. Особливості використання ретентату з метою отримання високоякісного напою оздоровчого характеру / І. М. Уханова // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі. 2016. - Вип. 1. - с. 113 - 126. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Pt_2016_1_12
28. Крамаренко О. С. Біохімія молока і молочних продуктів : курс лекцій / О.С. Крамаренко. – Миколаїв: МНАУ, 2017. – 96 с.
29. Рудавська Г. Б., Тищенко Є. В. Молочні та яєчні товари. – К.: Книга, 2004. – 392с.
30. Вороніна Л.М. та ін. Біологічна хімія: [Підручник / Л. М. Вороніна, В. Ф. Десенко, Н. М. Мадієвська та ін.]; За ред. проф. Л. М. Вороніної. – Х.: Основа; Видавництво НФАУ, 2000. – 608с. – (Навчальна література для студентів фармацевтичних вищих закладів освіти).
31. Sasaki, M. Intestinal brush border membrane enzyme activities of rats fed chemically defined diets containing oligopeptides or amino acids as the nitrogen source / M. Sasaki, T. Vamba, S. J. Hosoda//Clin. Biochem. Nutr/ - 1989. – V.7, № 3. – P. 231 – 241.

					Список використаної літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

32. Kelleher, S. L. Glucomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys / S. L. Kelleher, D. Chatterton, K. Nielsen, B. Lonnerdal // Am. J. Clin. Nutr. – 2003. – V. 77, № 5. – P. 1261 – 1268.
33. Телишевская Л. Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение / Л. Я. Телишевская. Под. ред. Панина А. Н. – М.: «Аграрная наука». – 2000. – 295 с.
34. Капрелянц Е. И. Нетрадиционные ферментные продукты с пробиотическими свойствами / Е. И. Капрелянц, О. А. Нестеренко // Хранение и переработка сельхоз сырья. – 2001. - № 10 – с. 54 - 55.
35. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. – М.: Элевар, 2000. – 512 с.
36. Храмцов А. Г. Феномен молочной сыворотки / А. Г. Храмцов. – СПб.: Професия, 2011. – 804 с., табл., ил.
37. Біологічна хімія: підручник / Павлоцька Л. Ф., Дуденко Н. В., Левітін Є. Я. та ін. – Суми: Університетська книга, 2011. – 510 с.
38. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: Novel applications for milk proteins // Appl. Biotechnol. Food Sci. Policy. — 2003. — V. 1. — P. 133–144.
39. FitzGerald R. J., Meisel H. Lactokinins: Whey protein — derived ACE inhibitory peptides // Nahrung. — 1999. — V. 43, N 3. — S. 165–167.
40. Ганонг В. Ф. Фізіологія людини: Пер. з англ. — Львів: БаК, 2002. — 784 с.
41. Lopes-Fandino R., Otte J., van Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity // Int. Dairy J. — 2006. — V. 16, N 11. — P. 1277–1293.
42. Hall J. E., Gayton A. C., Brands M. W. Control of sodium excretion and arterial pressure by intrarenal mechanisms and the rennin-angiotensin system

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

- // Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. — New York: Raven Press Ltd., 1995. — P. 1451–1475.
43. Жарінов О. Й. Захист серця і судин — майбутнє покликання інгібіторів ангіотензинперетворюючого ферменту // Мед. світу. — 2000. — Т. 8, № 2. — С. 80–85.
44. Pripp A. H., Asaksson T., Stepaniak L., Sorhaug T. Quantitative structure–activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins // Europ. Food Res. Technol. — 2004. — V. 219, N 6. — P. 579–583.
45. Gobetti M., Stepaniak L. De Angelis M. et al. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. — 2002. — V. 42, N 3. — P. 223–239.
46. Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Pülola K. et al. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory properties of whey proteins digests: Concentration and characterization of active peptides // J. Dairy Res. — 2000. — V. 67, N 1. — P. 53–64.
47. Vermeirssen V., Van Camp J., Decroos K. et al. The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein // J. Dairy Sci. — 2003. — V. 86, N 2. — P. 429–438.
48. Abubakar A., Saito T., Kitazawa H. et al. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion // J. Dairy Sci. — 1998. — V. 81, N 12. — P. 3131–3138.
49. Ortiz-Chao P. J. A., Gomez-Ruiz R. A., Rastall D. et al. Production of novel ACE inhibitory peptides from β -lactoglobulin using Protease N Amano // Int. Dairy J. — 2009. — V. 19, N 2. — P. 69–76.
50. Nagpal R., Behare P., Rana R. et al. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update // Food Funct. — 2011. — V. 2, N 1. — P. 18–27.

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

51. Pellegrini A. Antimicrobial peptides from food proteins // *Curr. Phamaceut. Design.* — 2003. — V. 9, N 16. — P. 1225–1238.
52. Jones F. S., Simms H. S. The bacterial growth inhibitor (lactenin) of milk // *J. Experim. Med.* — 1930. — V. 51. — P. 327–339.
53. Bellamy W., Takase M., Yamauchi K. et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin // *Biochem. Biophys. Acta. Prot. Struct. Mol. Enzymol.* — 1992. — V. 1121, N 1–2. — P. 130–136.
54. Oo T. Z., Cole N., Garthwaite L., Mark D. et al. Evaluation of synergistic activity of bovine lactoferricin with antibiotics in corneal infection // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2010. — V. 65, N 6. — P. 1243–1251.
55. Szwajkowska M., Wolanciuk A., Barlowska J. et al. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system — a review // *Anim. Sci. Papers Rep.* — 2011. — V. 29, N 4. — P. 269–280.
56. Madureira A. R., Tavares T., Gomes A. M. P. et al. Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins // *J. Dairy Sci.* — 2010. — V. 93, N 2. — P. 437–455.
57. Korhonen H. Antibacterial and antiviral activities of whey proteins, the impotence of whey and whey components in food and nutrition // *Proc. 3 rd Int. Whey Conf.* — Munich, Germany. — 2001. — P. 303–321.
58. Haque E., Chand R., Kapila S. Biofunctional Propeties of Bioactive Peptides of Milk Origin // *Food Rev. Intern.* — 2009. — V. 25, N 1. — P. 28–43.
59. Van der Kraan M. I. A., Groenink K., Nazmi K. et al. Lactoferrampin: A novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin // *Peptides.* — 2004. — V. 25, N 2. — P. 177–183.
60. Van der Kraan M. I. A., Nazmi K., Teeken A. et al. Lactoferrampin an antimicrobial of bovine lactoferrin exhibits its candidacidal activity by a cluster of positively charged residues at the C-terminus in combination with a helix facilitating N-terminal part // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 386, N 1. — P. 137–142.

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

61. Gifford J. L., Hunter H. N., Vogel H. J. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2005. — V. 62, N 22. — P. 2588–2598.
62. Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N. et al. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule // *Biochem. Biophys. Acta. Gen. Subj.* — 1999. — V. 1426, N 3. — P. 439–448.
63. Pellegrini A., Dettling C., Thomas H., Hunziker P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin // *Ibid.* — 2001. — V. 1526, N 2. — P. 131–140.
64. Gauthier S. F., Pouliot Y., Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins // *Int. Dairy J.* — 2006. — V. 16, N 11. — P. 1315–1323.
65. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality // *Ibid.* — 2006. — V. 16, N 9. — P. 945–960.
66. Mahmud R., Matn M. A., Otani H. Mitogenic effect of bovine β -lactoglobulin and its proteolytic digests on mouse spleen resting cells // *Pakist. J. Biol. Sci.* — 2004. — V. 7, N 12. — P. 2047–2050.
67. 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, N 10. — P. 2330–2339.
68. Kayser H., Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins // *FEBS Lett.* — 1996. — V. 383, N 1–2. — P. 18–20.
69. Madureira A. R., Pereira C. I., Gomes A. M. P. Bovine whey proteins — Overview on the main biological properties // *Food Res. Int.* — 2007. — V. 40, N 10. — P. 1197–1211.
70. Gill H. S., Doull F., Ruterfurd K. J., Cross M. L. Immunoregulatory peptides in bovine milk // *Brit. J. Nutr.* — 2000. — V. 84, Suppl. 1. — S. 111–117.

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

71. Pihlanto-Leppala A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACEinhibitory peptides // *Trend. Food Sci. Tech - nol.* — 2001. — V. 11, N 9–10. — P. 347–356.
72. Sieber R., Butikofer U., Egger Ch. et al. ACEinhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties // *Dairy Sci. Technol.* — 2010. — V. 90, N 1. — P. 47–73.
73. Shimizu M. Food-derived peptides and intestinal functions // *Bio Fact.* — 2001. — V. 21. — P. 43–47.
74. Nagaoka S. Y., Futamura K., Miwa T. Identification of novel hypoholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2001. — V. 281, N 1. — P. 11–17.
75. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функций клетки. — М.: Мир, 1974. — С. 12.
76. Migliore-Samour D., Jolles P. Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn // *Experientia.* — 1988. — V. 44. — P. 188–193.
77. Korhonen H., Pihlanto A. A food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods // *Curr. Farmaceut. Design.* — 2003. — V. 9. — P. 1297–1308.
78. Глухарева Т. В. Биохимия : [учеб. пособие]. В 2 ч. Ч. 1. Основные питательные вещества человека / Т. В. Глухарева, И. С. Селезнева ; [науч. ред. Ю. Ю. Моржерин] ; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2016. – 140 с.
79. Хомченко Г. П. Посібник з хімії для вступників до вищих навчальних закладів: Підруч. – К.: Вид-во «Арій», 2008. – 480 с.
80. Тележенко Л.М., Дідух Г.В., Капчан В.І. Модифіковані сироваткові білкові концентрати як збагачувачі харчових продуктів. *Молодий вчений.* 2017. № 5 (45). с. 495 – 500.

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

81. Березовська Л. Протеоліз протеїнів сироватка молока. *Природничі та гуманітарні науки. Актуальні питання: Збірник тез Міжнародної науково-технічної конференції в 2-х т. Т.1 (26–27 квітня 2018 року).* – Тернопіль: ТНТУ, 2018. с. 154.
82. Сидоров Ю. І. Розроблення технології одержання біологічно активної суміші амінокислот з молочної сироватки / Ю. І. Сидоров, С. А. Познанська, В. П. Новіков // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». – 2008. – № 622 : Хімія, технологія речовин та їх застосування. – С. 88-95.
83. Польшалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. – М.:ДеЛи принт, 2003. – 375 с.
84. Методичні вказівки до лабораторних робіт з дисципліни «Біохімія» для студентів спеціальності 181 «Харчові технології» всіх форм навчання. – Тернопіль: ТНТУ, 2016. – 78 с.
85. Brandelli A., Daroit D. J., Corrêa A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities // Food Research International. 2015. Vol. 73. P. 149-161. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.016>.
86. Юкало А. В., Дацишин К. Є., Юкало В. Г. Біоактивні пептиди протеїнів сироватки молока корів (*Bos Taurus*) // Biotechnologia Acta. 2013. Т. 6 № 5. С. 49-61. doi: <https://doi.org/10.15407/biotech6.05.049>.
87. Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects / McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. (Eds.). Springer, 2016. 498 p.
88. Enzymatic hydrolysis of heat-induced aggregates of whey protein isolate/ O'Loughlin I. B., Murray B. A., Kelly P. M., FitzGerald R. J., Brodtkorb A. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012. Vol.60, Issue 19. P. 4895–4905. Doi: 10.1021/jf205213n.
89. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion / Abubakar A., Saito T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T. // Journal of Dairy Science. 1998. Vol. 81, Issue 12. P. 3131–3138. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75878-3.

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

90. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin / Silveira S. T., Martínez-Maqueda D., Recio I., Hernández-Ledesma B. // Food Chemistry. 2013. Vol. 141, Issue 2. P. 1072–1077. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.056>.
91. Yukalo V., Datsyshyn K., Storozh L. Obtaining of β -lactoglobulin by gel filtration of cow milk whey // EUREKA: Life Sciences. 2019. № 2. P. 33–39. doi: 10.21303/2504-5695.2019.00859.
92. Полыгалина Г. В., Чередниченко В. С., Римарева Л. В. Определение активности ферментов. Справочник. М.: Де Ли принт, 2003. 375 с.
93. Yukalo V., Datsyshyn K., Storozh L. Electrophoretic system for express analysis of whey protein fractions // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. 2019. Vol. 2, №11 (98). P. 37–44. doi: 10.15587/1729-4061.2019.160186.
94. Білкові гідролізати для дітей раннього віку / Шаркова Н. О., Жукотський Е. К., Авдєєва Л. Ю. Декуша Г.В. // Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій. 2013. Вип. 44., Т.2. С. 250–252.
95. Dairy Chemistry and Biochemistry / Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. Springer, 2015. 584 p. Doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>.
96. Зацарний В. В. Конспект лекцій з дисципліни «Основи охорони праці». – Київ : КПП, 2016. – 74 с.
97. Жидецький, В. Ц. Основи охорони праці: підручник / В. Ц. Жидецький, В. С. Джигирей, О. В. Мельников — Вид. 2-е, стереотипне. — Львів: Афіша, 2000. — 348 с.
98. Основи охорони праці: Підручник. 2-ге видання, доповнене та перероблене. / К. Н. Ткачук, М. О. Халімовський, В. В. Зацарний, Д. В. Зеркалов, Р. В. Сабарно, О. І. Полукаров, В. С. Коз'яков, Л. О. Мітюк. За ред. К. Н. Ткачука і М. О. Халімовського. — К.: Основа, 2006 — 448 с.

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

99. Я. О. Серіков. Основи охорони праці: Навчальний посібник для студентів вищих закладів освіти. – Харків, ХНАМГ, 2007. - 227с.
100. Винокурова Л. Е., Васильчук М. В., Гаман М. В. Основи охорони праці: Підручн. для проф.-техн. навч. закладів. — 2-ге вид., допов., перероб. — К. : Вікторія, 2001. - 192 с.
101. Абільтарова Е. Н. Основи охорони праці. Модуль 1: Правові та організаційні питання охорони праці, основи фізіології, гігієни праці та виробничої санітарії : навч.-метод. посібник / Е. Н. Абільтарова, М. С. Корець, С. М. Яшанов. – К. : НПУ ім. М. П. Драгоманова, 2010. – 409 с.
102. Основи охорони праці : підручник / М. С. Одарченко, А. М. Одарченко, В. І. Степанов, Я. М. Черненко. - Х.: Стиль-Издат, 2017. - 334 с.
103. Гандзюк М. П., Желібо Є. П., Халімовський М. О. Основи охорони праці: Підруч. для студ. вищих навч. закладів За ред. М. П. Гандзюка –К.: Каравела, 2004. - 408 с.
104. Грибан В. Г., Негодченко О. В. Охорона праці. Навч. посіб. 2ге вид.– К.: Центр учбової літератури, 2011. – 280 с.
105. Підвищення стійкості роботи об'єктів господарської діяльності (ОГД) за надзвичайних умов мирного й воєнного часу (Конспект лекцій для студентів очної і заочної форми навчання всіх напрямків) / Укл. Обухов С.О. - Харків: ХНАМГ, 2008 р. 27 с.
106. Технология продуктов из вторичного молочного сырья: Учебное пособие. А. Г. Храмцов [и др.]. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 424 с.: ил.
107. Теоретичні основи технології харчових виробництв [Електронний ресурс] //Тема: «Загальна характеристика харчових виробництв». Лекція №2. Режим доступу: <https://dl.tntu.edu.ua/content.php?cid=189657> (дата звернення 09.12.2019). Назва з екрану.
108. Технологія молока і молочних продуктів [Електронний ресурс] //Лабораторна робота №1. Вивчення показників якості молока

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

незбираного. Режим доступу: <https://dl.tntu.edu.ua/content.php?cid=244554>
(дата звернення 09.12.2019). Назва з екрану.

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Арк.

Список використаної літератури