

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:

**Виділення  $\beta$ -казеїну з казеїнового**

**комплексу молока**

Виконав: студент 6 курсу, групи МЛм-61

спеціальності (напряму підготовки) \_\_\_\_\_

**181 “Харчові технології”**

(шифр і назва спеціальності (напряму підготовки))

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Даньків С. О.**

(прізвище та ініціали)

Керівник

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Юкало В. Г.**

(прізвище та ініціали)

Нормоконтроль

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Покотило О. С.**

(прізвище та ініціали)

Рецензент

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Зварич Н. М.**

(прізвище та ініціали)

м. Тернопіль – 2019

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

**проф. Покотило О.С.**

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019р.

## **ЗАВДАННЯ НА ДИПЛОМНИЙ ПРОЕКТ (РОБОТУ) СТУДЕНТУ**

**Даньків Софія Олегівна**

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема проекту (роботи) **Виділення  $\beta$ -казеїну з казеїнового  
комплексу молока**

Керівник проекту (роботи) **Юкало Володимир Глібович, д.б.н., професор**

(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) **грудень 2019 року**

3. Вихідні дані до проекту (роботи) **Періодична та спеціальна література, а також  
нормативна документація з питань дослідження. Стандартні та уніфіковані  
методики та методи досліджень**

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

**Здійснити пошук щодо загальної характеристики білків молока у науковій  
літературі.**

**Здійснити пошук щодо будови та властивостей  $\beta$ -казеїну у науковій літературі  
та патентах.**

**Дослідити біологічно активні пептиди з  $\beta$ -казеїну.**

**Дослідити різні способи виділення  $\beta$ -казеїну.**

**графіки, схеми, таблиці**

## 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., доцент		
Безпека в надзвичайних ситуаціях	Клепчик В.М., ст. викладач		
Екологія	Зварич Н.М., к.т.н., доцент		
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	14.05.19 р. – 31.05.19 р.	
2.	Складання схеми досліджень	03.06.19 р. – 10.06.19 р.	
3.	Опрацювання методики досліджень	11.06.19 р. – 27.06.19 р.	
4.	Виконання експериментальних досліджень (Частина I)	03.09.19 р. – 28.09.19 р.	
5.	Завершення експериментальних досліджень (Частина II)	01.10.19 р. – 15.10.19 р.	
6.	Збір інформації до виконання розділу «Екологія» та «Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях»	16.10.19 р. – 04.11.19 р.	
7.	Закінчення написання розділів	05.11.19 р. – 30.11.19 р.	
8.	Подання магістерської роботи до захисту	07.12.19 р.	

Студент

(підпис)

**Даньків С. О.**

(прізвище та ініціали)

Керівник проекту (роботи)

(підпис)

**Юкало В. Г.**

(прізвище та ініціали)

## Зміст

Вступ.....	7
Мета і завдання роботи.....	8
1. Огляд літератури.....	9
1.1. Загальна характеристика білків молока.....	9
1.1.1. Біологічна цінність молока.....	9
1.1.2. Білковий склад молока. Біологічні функції білків молока....	10
1.2. Будова і властивості $\beta$ -казеїну.....	17
1.3. Біологічно активні пептиди з $\beta$ -казеїну.....	23
1.4. Способи виділення $\beta$ -казеїну.....	34
2. Матеріал і методи досліджень.....	44
2.1. Визначення білків на спектрофотометрі (280 нм).....	44
2.2. Визначення концентрації білка по Лоурі.....	44
2.3. Диск-електрофорез.....	45
2.4. Електрофорез в однорідному ПАГ.....	46
2.5. ІОХ на ДЕАЕ-целюлозі.....	46
3. Власні дослідження.....	47
3.1. Результати власних досліджень та їх обговорення.....	47
3.1.1. Виділення загального казеїну.....	47
3.1.2. Отримання очищеного $\beta$ -казеїну.....	53
3.2. Розрахунок економічної ефективності проведених досліджень....	65
4. Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях.....	69
4.1. Охорона праці.....	69
4.1.1. Заходи безпеки при експлуатації електроустановок в цеху, що проектується.....	69
4.1.2. Гігієнічні вимоги до санітарно – побутових приміщень та пристроїв цеху, що проектується.....	72

<b>ДР 18-153.00.00.000 ПЗ</b>				
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розроб.</i>		Даньків С.О.		
<i>Перевірив</i>		Юкало В.Г.		
<i>Консульт.</i>				
<i>Рецензент</i>		Зварич Н. М.		
<i>Зав. каф.</i>		Покотило О.С.		
<b>Зміст</b>				
		<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
			5	99
ТНТУ, ФМТ, грМЛм-61				

4.2. Безпека в надзвичайних ситуаціях.....	75
4.2.1. Захист продуктів харчування та харчової промисловості в умовах радіоактивного забруднення.....	75
5. Екологія.....	81
5.1. Забруднення по виробництву казеїну.....	81
5.2. Методи по знешкодженню казеїну.....	83
Висновки і пропозиції виробництву.....	85
Список використаної літератури.....	86

Додатки

Апробація результатів магістерської роботи

					<i>Зміст</i>	Арк.
						6
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## Реферат

Даньків С.О. Виділення  $\beta$ -казеїну з казеїнового комплексу молока.

Дослідження на здобуття освітньо-кваліфікаційного рівня магістра за спеціальністю 181 «Харчові технології» - Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя. – Тернопіль, 2019.

В магістерській роботі розглянута будова і властивості казеїнового комплексу молока, способи виділення та використання  $\beta$ -казеїну. Також показано, різні методи виділення і очистки  $\beta$ -казеїну.

Отримано основний препарат  $\beta$ -казеїн диференційним осадженням в присутності сечовини. Охарактеризовано його ступінь гомогенності. Проведено очистку  $\beta$ -казеїну шляхом іонообмінної хроматографії на колонці. Охарактеризовано ступінь очистки препарату  $\beta$ -казеїну після першої і другої іонообмінної хроматографії. Розраховано вихід очищеного  $\beta$ -казеїну на різних стадіях диференційного осадження після першої і другої іонообмінної хроматографії (першої -28,4; другої – 18,2 % ).

**Ключові слова:** молоко, казеїн,  $\beta$ -казеїн, іонообмінна хроматографія.

## Abstract

Dankiw S.O.  $\beta$ -casein extraction from milk casein complex.

Research on education and qualification level of Master in the specialty 181 «Food technology» Ternopil National Technical University named Ivan Pulyuy. – Ternopil, 2019.

Master's thesis deals with structure and properties of casein complex of milk, methods of isolation and use of  $\beta$ -casein. Also shown are different methods of isolation and purification of  $\beta$ -casein.

The main drug  $\beta$ -casein was obtained by differential deposition in the presence of urea. It is define by its degree of homogeneity. Purification of  $\beta$ -casein by ion exchange column chromatography was performed. The degree of purification of the preparation of  $\beta$ -casein after the first and second ion exchange chromatography.

					<b>ДР 18-153.00.00.000 ПЗ</b>			
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>Реферат</b>	<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Розроб.</i>	Даньків С.О.						3	99
<i>Перевірив</i>	Юкало В.Г.							
<i>Консульт.</i>								
<i>Рецензент</i>	Зварич Н. М.							
<i>Зав каф.</i>	Покотило О.С.					ТНТУ, ФМТ, грМЛм-61		

The yield of purified  $\beta$ -casein at different stages of differential deposition after the first and second ion exchange chromatography is calculated (first -28,4; second - 18,2%).

**Keywords:** milk, casein,  $\beta$ -casein, ion exchange chromatography.

					<i>Реферат</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		4

## Вступ

Казеїн представлений основними фракціями -  $\alpha_{s1}$ -  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - і  $\kappa$ -казеїном, їх компонентами і генетичними варіантами, які відрізняються заміною одного або двох амінокислотних залишків. Кожен з них, як виявилось є попередниками біологічно активних пептидів. Було виявлено біологічно активні пептиди, які можуть утворюватись під час розщеплення різних фракцій протеїнів козеїнового комплексу. Такі пептиди впливають на функцію різних фізіологічних систем організму. Зокрема, було ідентифіковано агоністи та антагоністи опіатних рецепторів, інгібітори ангіотензинперетворювального ензиму, антитромботичні пептиди, імуномодуляторні пептиди, біоактивні фосфопептиди, пептиди, які пригнічують розвиток патогенних мікроорганізмів. У 1991р. було встановлено можливість утворення таких біоактивних пептидів з протеїнів казеїнового комплексу молока під дією ензимів протеолітичних систем лактококів і протеаз, що їх використовують у виробництві ферментованих молочних продуктів. Дослідження біоактивних пептидів з казеїнів активно проводять і в наш час. Постійно поповнюється база даних щодо біологічно активних пептидів, які утворюються в процесі перетравлювання казеїнів, відкрито нові види біологічної активності (антиканцерогенна дія, стимуляція синтезу ДНК, антивірусна дія і т. д.)

Особливо багато біологічно активних пептидів є у  $\beta$ -казеїні. Їх використання в продуктах харчування, як добавки могло би позитивно впливати на організм людини. Виділення цих пептидів із загального казеїну неможливе. Оскільки для них властива фракційна специфічність, тому ефективніше використовувати на першій стадії виділення очищених казеїнових фракцій. Проте на сьогоднішній день в світі немає доступних, дешевих і ефективних способів виробництва очищеного  $\beta$ -казеїну. Вивчення шляхів отримання очищеного  $\beta$ -казеїну присвячена моя робота.

					<i>ДР 18-153.00.00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Вступ</i>	<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Розроб.</i>	Даньків С.О.						7	99
<i>Перевіряв</i>	Юкало В.Г.							
<i>Консульт</i>								
<i>Рецензент</i>	Зварич Н. М.							
<i>Зав. каф.</i>	Покотило О.С.					<i>ТНТУ, ФМТ, грМЛм-61</i>		



## Мета і завдання роботи

Мета роботи – виділення гомогенного попередника біологічно активних пептидів з казеїнового комплексу молока –  $\beta$ -казеїну.

Для досягнення мети, яка була поставлена запропоновані наступні завдання:

- 1) провести виділення казеїнового комплексу з коров'ячого молока;
- 2) провести диференційне фракціонування протеїнів казеїнового комплексу;
- 3) очистити  $\beta$ -казеїн з допомогою іонообмінної хроматографії (ІОХ) на ДЕАЕ-целюлозі;
- 4) визначити гомогенність препарату виділеного  $\beta$ -казеїну.

					<i>ДР 18-153.00.00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Мета і завдання роботи</i>	<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Даньків С.О.</i>						8	99
<i>Перевірив</i>	<i>Юкало В.Г.</i>							
<i>Консульт.</i>								
<i>Рецензент</i>	<i>Зварич Н. М.</i>							
<i>Зав каф.</i>	<i>Покотило О.С.</i>					<i>ТНТУ, ФМТ, грМЛм-61</i>		

# 1. Огляд літератури

## 1.1. Загальна характеристика білків молока

### 1.1.1. Біологічна цінність молока

Хімічний склад молока тварин є дуже складний. У молоці містяться білки, вуглеводи, ліпіди, стероїди, вітаміни, ферменти, солі, гази, вода.

Таблиця 1

Хімічний склад коров'ячого молока,% [1]

Назви речовин	Вміст
Вода	88
Ліпіди	3,5
Вуглеводи	4,9
Солі	0,8
Білки	3,2

Склад і властивості молока залежать в основному від породи і віку корови, лактаційного періоду, годівлі та умов утримання. Вода - середовище, в якій розчинені або розподілені всі інші компоненти молока, що утворюють стійку колоїдну систему, що дозволяє піддавати молоко різним технологічним процесам. Ліпіди молока представлені молочним жиром і жироподібними речовинами - фосфоліпідами і стероїдами[2]. Вуглеводи в молоці представлені молочним цукром – лактозою, яка добре засвоюється організмом, надає молоку солодкуватий смак[3]. Мінеральні речовини у молоці становлять 0,8 %[4]. Мінеральні речовини знаходяться у вигляді солей, кислот, йонів, біо-комплексів, входять до складу металоензимів тощо[5]. Вміст білків в молоці корів в середньому становить 3,7%. 78-85% білків представлені казеїном, інша частина сироваткові білки.

					<i>ДР 18-153.00.00.001 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Огляд літератури</i>	<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Даньків С.О.</i>						9	99
<i>Перевіряв</i>	<i>Юкало В.Г.</i>							
<i>Консульт.</i>								
<i>Рецензент</i>	<i>Зварич Н. М.</i>							
<i>Зав. каф.</i>	<i>Покотило О.С.</i>					<i>ТНТУ, ФМТ, грМЛм-61</i>		

### 1.1.2. Білковий склад молока. Біологічні функції білків молока.

Білки молока різноманітні за будовою, фізико-хімічними властивостями та фізіологічними функціями. На цей час у світі визнана класифікація і номенклатура білків молока, яка розроблена Комітетом з номенклатури, класифікації і методології білків молока Американської асоціації молочної промисловості (ADSA).

Усі білки молока ділять на три групи – казеїн, сироваткові білки і білки оболонки жирових кульок[6]. Відносний вміст казеїнової фракції складає біля 79,5%, сироваткових білків біля – 19,3%, білків оболонки жирових кульок – 1,2%. Кожна з цих груп теж неоднорідна. Казеїн представлений основними фракціями -  $\alpha_{s1}$ -  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - і  $\kappa$ -казеїном, їх компонентами і генетичними варіантами, які відрізняються заміною одного або двох амінокислотних залишків. Також у молоці є продукти протеолізу  $\beta$ -казеїну нативним ферментом плазміном –  $\gamma$ -казеїни ( $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ ) і протеозо-пептони.

Білки оболонки жирових кульок найменш вивчені, точної класифікації ще не мають. В таблиці 2 наведена номенклатура, вміст і деякі властивості основних білків молока.

Таблиця 2

Номенклатура, вміст і властивості основних білків молока

Білок (запропонована аббревіатура)	Вміст у знежиреному молоці (г/л)	Генетичні варіанти	Молекуля- рна маса, кДа	Ізоіонна точка	Ізоелект- рична точка
$\alpha_{s1}$ -казеїн ( $\alpha_{s1}$ - CN)	12-15	B	23,615	4,92-5,05	4,44-4,76
		C	23,542	5,00-5,35	...
$\alpha_{s2}$ -казеїн ( $\alpha_{s2}$ - CN)	3-4	A	25,226	...	...
$\beta$ -казеїн ( $\beta$ - CN)	9-11	A <sub>1</sub>	24,023	5,41	...
		A <sub>2</sub>	23,983	5,30	4,83-5,07
		B	24,092	5,53	-

										Арк.
										10
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Огляд літератури					

κ-казеїн (κ-CN)	2-4	A	19,037	5,77(5,35)	5,45-5,77
		B	19,006	6,07(5,37)	5,3-5,8
β-лактоглобулін (β-ЛГ)	2-4	A	18,363	5,35	5,13
		B	18,277	5,41	5,13
α-лактальбумін (α-ЛА)	0,6-1,7	B	14,178	-	4,2-4,5
Сироватковий альбумін (СА)	0,4	A	66,399	5,13	4,7-4,9
Імуноглобулін Г1 (ІгГ1)	0,3-0,6	...	161,000	-	5,5-6,8
Імуноглобулін Г2 (ІгГ2)	0,05	...	150,000	-	7,5-8,3
Імуноглобулін А <sub>7</sub> (ІгА)	0,01	...	385,000-417,000	...	...
Імуноглобулін М (ІгМ)	0,09	...	1,000,000	...	...
Секретний компонент (СК)	0,02-0,1	...	63,750	7,48	...
Лактоферин (ЛФ)	0,02-0,1	...	76,110	8,95	8,81

Сироваткові білки – це група азотистих сполук молока, які залишаються у плазмі після осадження казеїну при рН 4,6...4,7. Вміст їх складає 0,5...0,8%. Біля 20% цих не казеїнових азотистих сполук не є білками, а представляють собою пептиди (до них відносять протеозо-пептони – продукти протеолізу β-казеїну) та небілкові азотисті сполуки (амінокислоти, сечовина, креатин, креа-

					Огляд літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

тинін, аміак, оротова, сечова, гіпурова кислоти).

Білки сироватки представляють собою групу різних глобулярних білків, які відрізняються структурою і властивостями. Головними представниками сироваткових білків слід вважати  $\beta$ -лактоглобулін (52% сироваткових білків) та  $\alpha$ -лактальбуміну (23% сироваткових білків). Останню частку сироваткових білків складають альбумін сироватки крові, імуноглобуліни, лактоферин та інші мінорні білки. Всі фракції виконують в організмі людини важливі біологічні функції.

Імуноглобуліни виконують захисну функцію, є носіями пасивного імунітету, виконуючи роль антитіл, здатних до аглютинації чужих клітин. Лактоферин і деякі ферменти (лізоцим, лактопероксидаза, ксантиоксидаза) мають антимікробну дію. Лактоферин,  $\beta$ -лактоглобулін виконують транспортну функцію.  $\beta$ -лактоглобулін транспортує у кишечник новонародженого – вітамін А. Лактоферин регулює також надходження заліза в організм новонародженого. Залежно від ступеня насичення залізом він може попереджувати від надлишку заліза або навпаки посилювати його адсорбцію і всмоктування через слизову оболонку кишечника. Крім того, лактоферин виконує захисну функцію – бактеріостатично діє на кишкову мікрофлору, а також посилює бактерицидну дію лізоциму.  $\alpha$ -лактальбумін виконує регуляторну функцію, бере участь у синтезі лактози. Один із компонентів протеозо-пептонів є інгібітором ліпопротеїдліпази, а  $\beta$ -лактоглобулін – інгібітор плазміну.

Сироваткові білки на відміну від казеїнової фракції не містять фосфорної кислоти, а головні компоненти у своєму складі не мають вуглеводів. Відрізняються вони високим вмістом цистеїну, низьким – проліну, рівномірним розподілом вздовж поліпептидного ланцюга полярних і неполярних амінокислот. Мають компакту глобулярну конформацію зі значним ступенем спіралізації ланцюга. Вони не асоціюють один з одним, не осаджуються в ізоелектричній точці, не гідролізуються плазміном і хімозином. Порівняно з казеїном сироваткові білки менш чутливі до іонів кальцію, але чутливі до температури. Нагрівання молока і сироватки викликає денатурацію (розгортання поліпептидних ланцюгів) сироваткових білків, потім відбувається

					Огляд літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

їх агрегація з утворенням димерів і полімерів. Низьку термостійкість сироваткових білків пов'язують з високим вмістом цистеїну і упорядкованою вторинною структурою.

Амінокислотний склад сироваткових білків найбільш близький до амінокислотного складу м'язової тканини людини, а за змістом незамінних амінокислот і амінокислот з розгалуженим ланцюгом (валіну, лейцину і ізолейцину) перевершують всі інші білки тваринного і рослинного походження.

В табл. 3 наведені дані щодо амінокислотного складу сироваткових білків.

Таблиця 3

Амінокислотний склад основних представників сироваткових білків

Амінокислота (скорочене позначення)	β-Лактоглобулін		α-Лактальбумін	
	Число	число	% вмісту	% вмісту
Аспарагінова (Асп)	10	9	7,32	6,17
Аспарагін (Асн)	5	12	9,76	3,09
Глутамінова (Глу)	16	8	6,50	9,88
Глутамін (Глн)	9	5	4,06	5,56
Гліцин (Глі)	4	6	4,88	2,47
Аланін (Ала)	15	3	2,44	9,26
Валін (Вал)	9	6	4,88	5,55
Лейцин (Лей)	22	13	10,57	13,58
Ізолейцин (Іле)	10	8	6,50	6,17
Серин (Сер)	7	7	5,69	4,32
Треонін (Тре)	8	7	5,69	4,94
Цистеїн (Цис)	5	8	6,50	3,09
Метіонін (Мет)	4	1	0,81	2,47
Лізин (Ліз)	15	12	9,76	9,26
Гістидин (Гіс)	2	3	2,45	1,23
Аргінін (Арг)	3	1	0,81	1,85
Тирозин (Тир)	4	4	3,25	2,47
Фенілаланін (Фен)	4	4	3,25	2,47

Пролін (Про)	8	2	1,63	4,94
Триптофан (Три)	2	4	3,25	1,23
Усього	162	123	100	100

Основні представники сироваткових білків характеризуються високим вмістом цистеїну, а також моноамінодикарбонових амінокислот і їх амідів, вміст проліну і серину нижчий порівняно з казеїновими фракціями.

Сироваткові білки стимулюють імунну систему, підвищують рівень інсуліноподібного чинника зростання, знижують вміст холестерину сильніше, ніж казеїн і соєвий білок. Крім того, сироваткові білки мають низький глікемічний показник, що дозволяє оптимізувати виділення інсуліну, регулюючи рівень глюкози в крові і тим самим запобігаючи виникненню діабету другого типу[7].

В даний час для виділення сироваткових білків застосовують мембранні методи. Так, використання ультрафільтрації дозволяє отримати з молочної сироватки унікальні їх концентрати (КСБ - УФ) в нативній формі з різним вмістом білка (від 35 до 80%). Виділені концентрати сироваткових білків добре розчиняються у воді в широкому діапазоні рН. Це дозволяє використовувати їх у виробництві кисломолочних напоїв різної кислотності[8].

Білки молока виконують різноманітні функції. Для більшості білків вони визначені на цей час. Казеїн молока є основним харчовим білком. Він виконує пластичні функції. Під дією ферментів шлунково-кишкового тракту казеїн максимально розщеплюється у нативному стані, в той час як інші глобулярні білки набувають такої здатності тільки після денатурації. Казеїн згортається у шлунку новонародженого з утворенням згустків високого ступеня дисперсності. Крім того, він є джерелом кальцію, фосфору і магнію, а також цілого ряду фізіологічно активних пептидів (зокрема глікомакропептиду), які регулюють процес травлення.

					Огляд літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

$\alpha_{s1}$ -Казеїн – це суміш двох білків – головного і мінорного компонентів, які мають однакову первинну структуру, але різний вміст фосфатних груп: головний компонент -8, мінорний – 9.  $\alpha_{s1}$ -Казеїн має 5 генетичних варіантів (А, В, С, D, Е), які відрізняються вмістом окремих амінокислот, а також їх розташування у поліпептидному ланцюзі. Головний компонент складається із 199 амінокислотних залишків, його можна виділити із  $\alpha_s$ -казеїнового комплексу осадженням 0,4 М розчином кальцій хлориду.

$\alpha_{s1}$ -Казеїн відрізняється від  $\beta$ - і  $\kappa$ -фракцій підвищеним вмістом лізину, триптофану, аспарагінової та глутамінової кислот, зниженим – проліну, треоніну, валіну. Аналіз первинної структури  $\alpha_{s1}$ -казеїну свідчить, що залишки фосфорної кислоти і неполярні амінокислоти розташовані нерівномірно вздовж поліпептидного ланцюга.  $\alpha_{s1}$ -Казеїн – це гідрофобний білок. Він чутливий до іонів кальцію, здатний до самоасоціації (агрегації), рухомою силою якої є гідрофобні взаємодії і водородні зв'язки, має найбільший заряд при рН 6,6.

До  $\alpha_{s2}$ -казеїну відносяться компоненти  $\alpha_s$ -казеїнів, які відрізняються тільки змістом залишків фосфорної кислоти ( $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s3}$ ,  $\alpha_{s4}$ ,  $\alpha_{s6}$ ). Наприклад,  $\alpha_{s2}$ -CN А-13Р,  $\alpha_{s3}$ -казеїн – 12 фосфосеринових залишків ( $\alpha_{s2}$ -казеїн CN А-12Р),  $\alpha_{s4}$ -11 ( $\alpha_{s2}$  – CN А-11Р),  $\alpha_{s6}$ -казеїн – 10 ( $\alpha_{s2}$ - CN А-10Р).

Молекула  $\alpha_{s2}$ -казеїну складається із 207 амінокислотних залишків і на відміну від  $\alpha_{s1}$ -казеїну містить 2 залишки цистеїну, 11 фосфатних груп. Гідрофобність цієї фракції нижча, ніж інших, він дуже чутливий до іонів калію, але не чутливий до хімозину. Величина заряду менша порівняно  $\alpha_{s1}$ -казеїном. Рухомою силою агрегації є електростатичні взаємодії.

$\beta$ -Казеїн має сім генетичних варіантів - А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub>, А<sub>3</sub>, В, С, D, Е. Ця фракція казеїну містить 209 амінокислотних залишків і 5 фосфатних груп. Генетичні варіанти відрізняються заміною деяких амінокислот у ланцюзі і кількістю залишків фосфорної кислоти (фракції С та D містять на одну фосфатну групу менше). Як і фракції  $\alpha_{s1}$ -казеїну  $\beta$ -казеїн не містить цистеїну і має значну кількість неполярних амінокислот, є найбільш гідрофобною фракцією казеїну, здатний до самоасоціації, головним чином, за рахунок гідрофобних взаємодій,

					Огляд літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15



осаджується іонами кальцію при температурі 37°C, але переходить у розчинний стан при низьких температурах (нижче 5°C), має низьку чутливість до хімозину. Вторинна структура  $\beta$ -казеїну мало упорядкована, що пояснюють високим вмістом у цій фракції проліну [5].

На цей час визначено, що  $\beta$ -казеїни після секреції можуть гідролізуватись під дією плазміну молока, внаслідок чого утворюються фрагменти  $\beta$ -CN, які раніш називали  $\gamma$ -казеїнами (молекулярною масою від 12000 до 20000) і компонентами протеозо-пептонів (молекулярною масою від 4000 до 14000). Гідроліз відбувається між 28 і 29, 105 і 106, 107 і 108 амінокислотними залишками. Комітет ADSA рекомендує називати  $\gamma$ -казеїни і компоненти 5 і 8 протеозо-пептонів  $\beta$ -казеїнами, вказуючи у дужках амінокислотну послідовність відповідного фрагменту. Наприклад,  $\gamma_1$ -казеїн слід називати  $\beta$ -CN (фрагмент 29...209),  $\gamma_2$ -казеїн -  $\beta$ -CN (фрагмент 106...209),  $\gamma_3$ -казеїн -  $\beta$ -CN (фрагмент 108...209); компонент 5 протеозо-пептонів -  $\beta$ -CN (фрагмент 1...105), компонент 8 "швидкий" -  $\beta$ -CN (фрагмент 1-28) і т.і.

У свіжому нормальному молоці  $\gamma$ -казеїнів складає до 3% від загального вмісту білків. Під час тривалого зберігання молока  $\beta$ -казеїн виходить із складу казеїнових міцел, після чого відбувається його протеоліз з утворенням фрагментів, які значно погіршують технологічні властивості молока. Накопичення  $\gamma$ -фрагментів до 10% відбувається також в кінці лактаційного періоду, при захворюванні корів на мастит, а також при порушенні режимів годування (дефіцит у кормах білків). Вміст протеозо-пептонів може складати 2...10% від загального вмісту білків.

Група  $\kappa$ -казеїну складається із одного головного компонента, який не містить вуглеводів, і шести мінорних, які відносять до глікопротеїдів. У плазмі молока і казеїнових міцел  $\kappa$ -казеїн знаходиться у формі мономерів або полімерів. Вважають, що ланцюги полімерів поєднані дисульфідними зв'язками.

Поліпептидний ланцюг головного компонента  $\kappa$ -казеїну ( $\kappa$ -CN В-1Р) містить 169 амінокислотних залишків, в тому числі 2 залишки цистеїну, значну

					Огляд літератури	Арк.
						16
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

кількість треоніну, аланіну, але мало метіоніну і гліцину та одну фосфатну групу. Два генетичні варіанти А та В відрізняються відповідно заміною ізoleyцину на треонін у положенні 136 та аланіну на аспарагін у положенні 148.

Міnorні глікопротеїдні компоненти к-казеїну містять від одного до трьох вуглеводних ланцюгів у вигляді три- та тетрасахаридів, які складаються із N-ацетилгалактозаміну, галактози та N-ацетиднейрамінової або сіалової кислот. Олігосахариди приєднуються до к-казеїну O-глікозидним зв'язком. Місцями їх приєднання є залишки треоніну в положенні 131, 133, 135 або 136. Деякими дослідниками у складі к-казеїну визначені крім перерахованих вуглеводів глюкоза і маноза, а к-казеїн молозива містить удвічі більше порівняно з к-казеїном молока вуглеводів, які представлені тетра-, пента- та гексасахаридами, що мають додатковий моносахариди – N-ацетилглюкозамін.

к-Казеїн на відміну від  $\alpha_{s1}$ - та  $\beta$ -казеїнів не осаджується іонами кальцію і у міцелах казеїну виконує по відношенню до них захисну функцію. У поліпептидному ланцюзі к-казеїну гідрофільні і гідрофобні ділянки більше обмежені: ділянка 1...105 має гідрофобний характер, а 106...109 – гідрофільний.

к-Казеїн майже не гідролізується плазміном, а під дією хімозину розщеплюється на дві частини – гідрофобний пара-к-казеїн (амінокислотні залишки з 1 по 105) та гідрофільний глікомакропептид (амінокислотні залишки з 106 по 169). Глікомакропептиди мають молекулярну масу 6000...8000, містять багато серину, треоніну та глютамінової кислоти, характеризуються високим від'ємним зарядом і фізіологічною активністю[7].

## 1.2. Будова і властивості $\beta$ -казеїну

Сімейство  $\beta$ - CN, яке становить до 45% казеїну молока великої рогатої худоби, є досить складним через дії плазміну нативного протеази молока [9]. Розщеплення плазміну призводить до утворення  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  - CN, які фактично є фрагментами  $\beta$ - CN, що складаються з залишків 29-209, 106-209 і 108-209. Крім того, поліпептиди, раніше названі протеозними пептонними компонентами 5, 8-

					Огляд літератури	Арк.
						17
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



Попередній звіт [10] описали 7 генетичних варіантів. З моменту цього перегляду, 3 нові варіанти були ідентифіковані послідовністю:  $\beta$ - CN F, раніше називається  $\beta$ - CN Ікс [19];  $\beta$ - CN G [20]; і  $\beta$ - CN X [21].

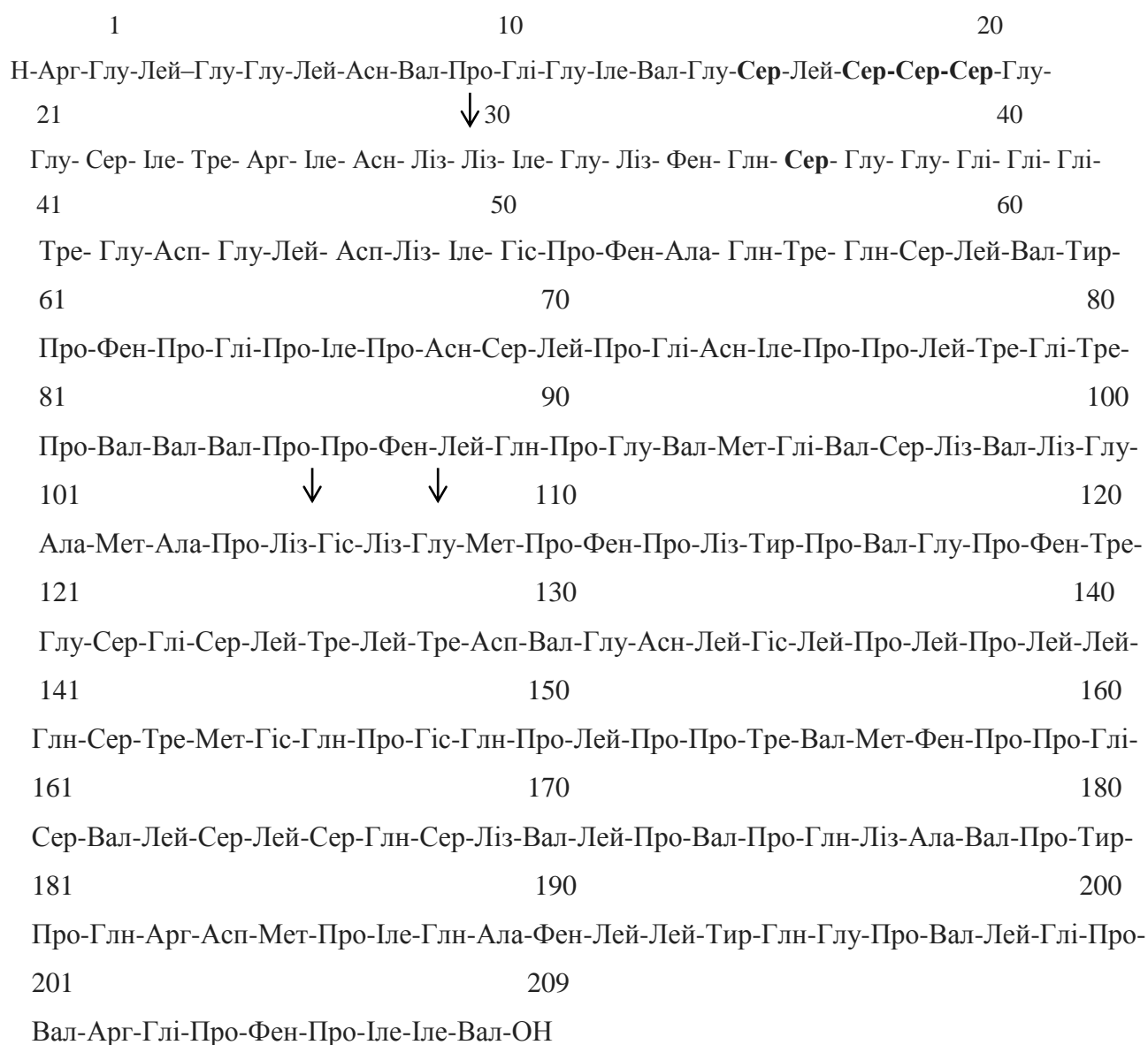


Рис. 1 - Первинна структура  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>-5P [11; 22]. Амінокислотні залишки, що відповідають мутаційним відмінностям в генетичних варіантах, A<sup>1</sup>, A<sup>3</sup>, B, C, D, E, F, G, H і I. Стрілки вказують на точки атаки плазміну, відповідального за фрагменти  $\beta$ - CN ( $\gamma$ - CN і протеозні пептони), присутні в молоці.





близько один до одного залишки аспарагіну, серину, треоніну та лейцину можуть заважати утворенню спіралі, залишки проліну викликають залом і також порушують  $\alpha$ -спіралі.

Третинна структура описує пакування поліпептидного ланцюга в певному об'ємі, в тому числі і простетичної групи. Структура складається із елементів вторинної структури, стабілізованих різними типами взаємодій, у яких гідروفобні відіграють головну роль.

В стабілізації третинної структури беруть участь: ковалентні зв'язки (між двома залишками цистеїну – дисульфідні містки), іонні зв'язки (між протилежно зарядженими боковими групами амінокислотних залишків), водневі зв'язки, гідрофільно-гідروفобні взаємодії. У водному розчині молекула білка прагне згорнутись так, щоб неполярні бокові групи амінокислот були ізольовані від води, а на поверхні опиняються гідрофільні бокові групи і визначають розчинність білків. Таке розташування є загальною рисою усіх глобулярних білків.

Четвертинна структура – це спосіб пакування у просторі окремих поліпептидних ланцюгів, які мають однакову або різну первинну, вторинну і третинну структури, та формування єдиного у структурному і функціональному відношенні макромолекулярного утворення. Кожний окремий поліпептидний ланцюг, який називають протомером, мономером або субоддиницею, частіше всього не володіє біологічною активністю. Цю здатність білок набуває при певному способі просторового об'єднання протомерів, що входять до його складу. Білки, які побудовані із кількох поліпептидних ланцюгів (по суті із кількох білків меншого розміру), називають олігомерами. Вони можуть розпадатись на складові при порівняно несуттєвих змінах середовища, наприклад зміні рН, додаванні гідروفобних речовин, охолодженні, а також під дією денатуруючих реагентів. В стабілізації четвертинної структури беруть участь ті самі взаємодії, що і у стабілізації третинної структури. Четвертинна структура є такою ж специфічною та унікальною характеристикою білка, як і інші рівні структури.

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
						22
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Що стосується структури казеїну, то на цей час розшифрована первинна структура усіх фракцій казеїну, отримані дані про вторинну і деякі дані про третинну та четвертинну структури. Вивчення вторинної структури показало, що  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - і  $\kappa$ -казеїни мають мало упорядковану  $\alpha$ -спіральну структуру, що пов'язують з високим вмістом проліну і інших амінокислот, які заважають її утворенню.

В табл. 4 наведена характеристика вторинної структури основних фракцій казеїну.

Таблиця 4

Вміст типів вторинної структури у фракціях казеїну

Типи вторинної структури	$\alpha_{s1}$ – казеїн	$\alpha_{s2}$ - казеїн	$\beta$ - казеїн	$\kappa$ -казеїн
а-спіралі	0...2	0	9...10	23
паралельної $\beta$ - структури	0...7	0...6	13...25	31
антипаралельної $\beta$ -структури	0	0	0	24
неупорядкованої структури	90...98	100	66...77	22

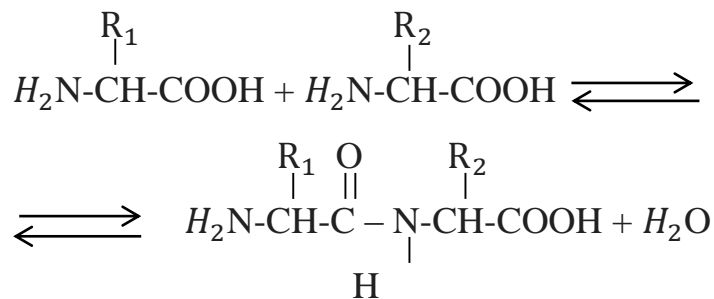
Дані таблиці свідчать, що  $\alpha_{s1}$ - та  $\alpha_{s2}$ - казеїни мають найбільш неупорядковану вторинну структуру. Вторинна структура ( як а-спіралі, так і  $\beta$ -структури) фракцій  $\beta$ -CN і особливо  $\kappa$ -CN більш упорядкована.

Отримані деякі дані про третинну і четвертинну структуру фракцій і запропоновані моделі структури міцели казеїну. Основна частина казеїну (біля 95%) міститься у вигляді казеїнових міцел і тільки 5% - у вигляді мономерів, полімерів, окремих фракцій і субміцел, які мають розмір менше 20...40 нм. Цю форму називають розчинним казеїном, вона не виділяється з білковою фракцією при ультрацентрифугуванні знежиреного молока. Кількість її залежить від температури і тривалості зберігання молока [7] .

### 1.3. Біологічно активні пептиди з $\beta$ – казеїну.

Амінокислоти здатні до конденсації при взаємодії карбоксильної групи однієї амінокислоти та аміногрупи – іншої:





Утворена сполука називається пептидом, а зв'язок – пептидним. При сполученні двох амінокислот утворюється дипептид, трьох – трипептид, а багатьох – поліпептид. Пептидний зв'язок міцний, він піддається гідролізу тільки при тривалому кип'ятінні в кислому або лужному середовищі. В пептиді виділяють N-кінець, на якому знаходиться вільна аміногрупа, та C-кінець, на якому міститься незаміщена карбоксильна група. Називаючи пептид, назвам всіх амінокислот, крім C-кінцевої, дають суфікс –ил або –іл, а назву останньої не змінюють, наприклад, гліцил-аланін, серил-тирозил-аргінін.

Пептидний зв'язок має специфічну просторову форму. Неподілена пара електронів азоту взаємодіє з  $\pi$ -електронами карбонільної групи, утворюючи делокалізовану систему електронів, розподілену між атомами O, C і N. Тому зв'язок C-O слабший, ніж подвійний, а зв'язок C-N міцніший, ніж одинарний. Навколо зв'язку C-N неможливе вільне обертання груп, оскільки він не одинарний. В одній площині знаходяться атоми C, N, O, H і  $\alpha$ -вуглецеві атоми. Причому атоми O і N знаходяться в транс-положенні. Вільно обертатися можуть лише радикали навколо  $\alpha$ -вуглецевих атомів. Така будова пептидного зв'язку обмежує можливості просторових конформацій пептидів.

Наявність пептидного зв'язку визначають біуретовою реакцією, характерною для амідів, зокрема, для біурету: Першим біуретову реакцію пептидів вивчав О. Я. Данилевський. Суть її полягає у взаємодії пептидної групи з йонами міді (II) в лужному середовищі з утворенням розчинного комплексу фіолетового кольору. Ця реакція дуже чутлива і використовується як для якісного, так і для кількісного визначення пептидів.

Відомо багато пептидів, які виконують важливі біологічні функції. Наприклад, глутатіон ( $\gamma$ -глутаміл-цистеїніл-гліцин,  $\gamma$ -глу-цис-глі, GSH). Цей

					Огляд літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		24

пептид, на відміну від білків, містить  $\gamma$ -амінокислотний залишок. Він викликає величезний інтерес біологів і медиків, оскільки є найбільш поширеною низькомолекулярною речовиною в клітині, виконує біля ста функцій в життєдіяльності майже всіх істот. Він бере участь в захисті клітин від токсичних хімічних речовин, продуктів радіоактивного розпаду, впливає на активність багатьох ферментів і стан субклітинних структур. Переважно його дія пов'язана із взаємоперетворенням двох форм – окисненої і відновленої:



Останні десятиліття інтенсивно вивчаються нейроолігопептиди (НОП) – невеликі пептиди (5-9 амінокислотних залишків), які виробляються в головному мозку і регулюють психічну діяльність (викликають страх, роздратування, біль, виділяються під час сну). Наприклад, метенкефалін (тир-глі-глі-фен-мет) виникає в нервовій тканині і послаблює больові відчуття, зв'язується з тими ж рецепторами, що і антибіотик морфін, і діє більш ефективно[28].

Молоко і протеїнові молочні продукти мають високу біологічну цінність. Це передусім пов'язано з високим ступенем збалансованості амінокислотного складу молочних протеїнів порівняно з так званим ідеальним харчовим протеїном, амінокислотний склад якого відповідає потребам організму людини. До того ж протеїни молока добре перетравлюються протеолітичними ензимами шлунково-кишкового тракту. Причому, головні протеїни молока – казеїни здатні однаково добре розщеплюватися протеолітичними ензимами в нативному і денатурованому стані [29,30, 31].

Ще наприкінці 70-х років минулого століття було встановлено, що окремі фрагменти первинної структури протеїнів казеїнового комплексу молока, які вивільняються у вигляді пептидів у процесі травлення, можуть мати фізіологічну активність в організмі тварин у період молочного живлення [31]. Такий висновок було зроблено в результаті дослідження властивостей глікомакропептиду, що утворюється на початкових стадіях дії травних протеїназ (хімозину і пепсину) на казеїнові міцели [32]. Виявилось, що гліко-

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
						25
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

глікомакропептид (ГМП) є сильним інгібітором шлункової секреції та моторики [33].

Уперше біологічно активні пептиди з протеїнів казеїнового комплексу, дія яких не була безпосередньо пов'язана з процесами травлення, було виділено в 1979 р. у Мюнхені групою Віктора Брантла (Інститут Макса Планка) [34]. Шляхом екстрагування в суміші хлороформ-метанол і використання різних видів рідинної хроматографії та гель-фільтрації йому вдалося виділити з ензиматичного гідролізату загального казеїну декілька пептидних препаратів, що були стійкими до дії протеази і виявляли опіїдну активність. Згодом ці пептиди дістали назву казоморфінів [35-37].

У 80-90-ті роки минулого століття було проведено низку досліджень ензиматичних гідролізатів казеїнів, отриманих *in vitro*, гастроінтестинальних гідролізатів, одержаних *in vivo*, а також синтетичних пептидів, які відповідали первинній структурі казеїнів. У результаті було виявлено біологічно активні пептиди, які можуть утворюватись під час розщеплення різних фракцій протеїнів казеїнового комплексу [38-41]. Такі пептиди впливають на функцію різних фізіологічних систем організму. Зокрема, було ідентифіковано агоністи та антагоністи опіатних рецепторів, інгібітори ангіотензинперетворювального ензиму, антитромботичні пептиди, імуномодуляторні пептиди, біоактивні фосфопептиди, пептиди, які пригнічують розвиток патогенних мікроорганізмів. У 1991р. було встановлено можливість утворення таких біоактивних пептидів з протеїнів казеїнового комплексу молока під дією ензимів протеолітичних систем лактококів і протеаз, що їх використовують у виробництві ферментованих молочних продуктів [42]. Дослідження біоактивних пептидів з казеїнів активно проводять і в наш час. Постійно поповнюється база даних щодо біологічно активних пептидів, які утворюються в процесі перетравлювання казеїнів, відкрито нові види біологічної активності (антиканцерогенна дія, стимуляція синтезу ДНК, антивірусна дія і т. д.) [43-46].

Казоморфіни. Казоморфіни – перші біологічно активні пептиди, які було виділені з ензиматичних гідролізатів казеїну [34, 35]. Віктор Брантл зі

					Огляд літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		26

співробітниками встановили, що фрагментові  $\beta$ -казеїну  $\beta$ -CN (f 60-70) притаманна опіодна морфіноподібна активність; він отримав назву  $\beta$ -казоморфін. Пізніше було встановлено, що  $\beta$ -казоморфіни та їхні синтетичні аналоги є агоністами  $\mu$ - і  $\kappa$ -опіатних рецепторів і за внутрішньо шлункового введення щурам спричиняють аналгезію [36]. Крім того, ці пептиди, подібно до морфію, викликають сонливість, пригнічення дихання, гіпотензію, брадикардію [47]. Анальгетична дія  $\beta$ -казоморфіну досягає піку через 10 хв після введення пептиду і зникає повністю через 30 хв унаслідок відщеплення N-термінального залишку тирозину. Амідний аналог  $\beta$ -казоморфіну -  $\beta$ -казоморфін-4-амід (морфіцептин) виявляє сильнішу дію на центральну нервову систему, ніж морфін [48].  $\beta$ -Казоморфіни виявлено в аналогічних ділянках первинної структури  $\beta$ -казеїнів людини і вівці [49, 50]. Вважають, що материнське молоко, яке містить  $\beta$ -казоморфіни, забезпечує нормалізацію сну в немовлят і заспокоює їх [51]. У результаті протеолізу пепсином було виявлено також опіодні пептиди з  $\alpha_{s1}$ -казеїну. Вони отримали назву екзорфінів [52, 53]. Ліганди опіодних рецепторів казеїнового походження належать до екзогенних атипичних опіодних пептидів. Вони відрізняються за структурою від типових ендогенних лігандів (динорфіни, енкефаліни, ендорфіни), хоча мають спільні риси в будові. Спільною структурною особливістю ендогенних і екзогенних опіодних пептидів є наявність тирозинового залишку в N-термінальному положенні молекули (крім екзорфінів) і додаткового ароматичного залишку (Фен або Тир) у третьому або четвертому положенні, що важливо для формування сайту зв'язування з опіатними рецепторами [49]. Негативний заряд, локалізований навколо фенольної гідроксильної групи тирозину, є необхідним для вияву опіодної активності. Відсутність тирозинового залишку призводить до втрати біологічної активності опіодів [48]. Окрім того, дуже важливим для активності опіодних пептидів є також залишок проліну, який впливає на просторову орієнтацію тирозину і фенілаланіну в пептидному ланцюзі [54]. Казоморфіни можуть також впливати на різні ланки обміну речовин (ліпідний обмін, секреція гормонів, інтестинальний транспорт амінокислот) [55-58].

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
						27
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Казоморфіни розглядають як екзогенні ліганди опіоїдних рецепторів [59]. Проте було показано, що в окремих випадках вони можуть діяти як ендogenous регулятори. Казоморфіни можуть звільнятися молочною залозою у жінок під час вагітності, переноситися через кров та зв'язуватися з опіатними рецепторами і, таким чином, брати участь в ендокринній регуляції вагітності, стимулюючи вивільнення пролактину [60, 61]. Характеристику ідентифікованих опіоїдних пептидів казеїнового походження наведено в табл. 5.

Таблиця 5

Опіоїдні пептиди казеїнового походження [59]

Назва пептиду	Фрагмент казеїну	Амінокислотна послідовність	Вид активності	Специфічність до рецепторів ( $\mu$ , $\delta$ , $\kappa$ )
$\beta_{\kappa}$ -Казоморфін (1-7)	$\beta_{\kappa}$ -казеїн A <sub>2</sub> (60-66)	YPFPGPI	агоніст	$\mu > \delta >> \kappa$
Морфіцептин	$\beta_{\kappa}$ -казеїн A <sub>2</sub> (60-63)	YFPF – NH <sub>2</sub>	агоніст	$\mu >> \delta >> \kappa$
Неоказоморфін	$\beta_{\kappa}$ -казеїн (114-119)	YPVEPF	агоніст	$\mu$
$\beta_{\kappa}$ -Казоморфін (1-8)	$\beta_{\kappa}$ -казеїн (60-67)	YPFPGPIP	агоніст	$\mu >> \delta, \kappa$
$\beta_{\text{л}}$ -Казоморфін (1-5)	$\beta_{\text{л}}$ -казеїн (51-55)	YPFVE	агоніст	$\mu / \delta >> \kappa$
$\beta_{\text{л}}$ -Казорфін	$\beta_{\text{л}}$ -казеїн (41-44)	YPSF – NH <sub>2</sub>	агоніст	$\mu$
Валмуцептин	$\beta_{\text{л}}$ -казеїн (51-54)	YPFV – NH <sub>2</sub>	агоніст	$\mu > \delta$
N.N. $\beta_{\kappa}$ -фрагмент казеїну	$\beta_{\text{л}}$ -казеїн (59-63)	YGFLP	агоніст	$\mu$

Примітка: л-казеїни людини;  $\kappa$ -казеїни коров'ячого молока.

Ще одне важливе питання, пов'язане з дією цих пептидів, стосується їхньої стійкості і здатності зв'язуватися відповідними опіатними рецепторами. Так, було показано, що  $\beta$ -казоморфін стійкий до дії трипсину, хімотрипсину і карбоксипептидаз А і Б [62, 63]. Проте він може розщеплюватися карбоксипептидазою V з утворенням фрагменту Тир-Про-Фен, який ще зберігає активність. Повна втрата активності  $\beta$ -казоморфіну настає за дії пептидилдипептидази IV. Цей ензим виявлено в багатьох тканинах тварин і людини. Незважаючи на чутливість до травних пептидаз кишечника,  $\beta$ -казоморфіни, очевидно, можуть проникати в коров'яче русло і досягати своїх рецепторів у нервовій системі у вигляді своїх попередників – проказо морфінів, стійких до дії пептидаз. Проказоморфіни утворюються з казеїнів у результаті дії шлункових і панкреатичних протеїназ. Після досягнення рецептора захисна амінокислотна послідовність проказо морфінів відщеплюється під час обмеженого протеолізу з утворенням активного пептиду [38].

Казокініни – пептиди з антигіпертензивною активністю. Серед біологічно активних пептидів казеїнового походження важливе місце посідають пептиди, здатні гальмувати дію ангіотензинперитворювального ензиму (АПЕ). Цей ензим є компонентом ренін-ангіотензинальдостеронової системи організму і відіграє важливу роль у регулюванні коров'ячого тиску та водно-електролітичного гомеостазу [64]. З казеїнів інгібітори АПЕ вперше виділили в 1982 р. Маруяма і співавт. З трипси нового гідролізату загального казеїну коров'ячого молока [65]. Пізніше було виділено низку пептидів, інгібіторів АПЕ, з продуктів ензиматичного гідролізу різних фракцій протеїнів казеїнового комплексу. У багатьох випадках ці пептиди одержували хімічним синтезом. Ганс Мейзель [66] у 1933 р. запропонував казеїнові пептиди з АПЕ-інгібіторною дією називати казокінінами у зв'язку з подібністю їх дії до брадикініну. У табл. 6 наведено стислу характеристику відомих казокінінів.

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
						29
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>		

## Антигіпертензивні пептиди казеїнового походження [67]

Протеїн-попередник	Фрагмент	Первинна структура	IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> (μ · моль/л)	Ензим-ний гідроліз	Пептид-ний синтез
β-Казеїн	f (57-64)	SLVLPVPE	39	+	-
	f (60-66)	YPFPGPIP	500	-	+
	f (74-76)	IPP	5	+	-
	f (84-86)	VPP	9	+	-
	f (108-113)	EMPFPK	423 <sup>2</sup>	+	-
	f (169-174)	KVLPVP	5	-	+
	f (169-175)	KVLPVPQ	1000	+	-
	f (177-179)	AVP	340	-	+
	f (177-181)	AVPYP	80	-	+
	f (177-183)	AVPYPQR	15	+	-
	f (179-181)	PYP	220	-	+
	f (181-183)	PQR	>400	+	-
	f (193-198)	YQQPVL	280	+	-
	f (193-202)	YQQPVLGPVR	300	-	+

Гальмування активності АПЕ казокінінами *in vitro* дало змогу встановити структурно-функціональний зв'язок між будовою пептидних інгібіторів та їх спорідненістю до АПЕ [66]. На особливу увагу заслуговують фізіологічні ефекти, продемонстровані казокінінами *in vivo*. Передусім було показано антигіпертензивну дію казокінінів за їх внутрішньовенного введення спонтанно-гіпертензивним (SHR) щурам [68, 69]. Пероральне введення SHR-щурам трипсинового гідролізату загального казеїну спричиняло антигіпертензивний ефект [70]. Виявлено антигіпертензивну дію препарату у добровольців, які споживали трипсиновий гідролізат загального казеїну по 10 г двічі на добу протягом чотирьох тижнів [71].

					Огляд літератури	Арк.
						30
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

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

Фізіологічні ефекти казокінінів, уведених перорально, дають підстави вважати, що такі пептиди здатні в активній формі абсорбуватися в кишечнику. Це підтверджується даними про те, що ди- і трипептиди легше всмоктуються в кишечнику, ніж амінокислоти чи більші олігопептиди [68, 69]. Пептиди, які містять пролін, є стійкішими до деградації травними ензимами, а пептиди, які мають Про-Пропослідовність у С-термінальній ділянці молекули, резистентні до деградації пролінспецифічними пептидазами — пролідазами [72, 73]. У зв'язку із цим казокініни можуть бути стійкими до дії травних ензимів, здатні проникати в організм і виявляти антигіпертензивний ефект. Часткове розщеплення пептидів може призводити до підвищення АПЕ-інгібіторної дії [74].

У лабораторії кафедри харчової біотехнології і хімії Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя було проведено комплекс досліджень, на основі яких доведено утворення біологічно активних пептидів, зокрема казокінінів, під час протеолізу  $\alpha_{s1}$ - і  $\beta$ -казеїнів ензимами молочнокислих бактерій та молокозсідальних препаратів [75-77]. Роботу було проведено в умовах модельної системи, яка відображала реальні протеолітичні процеси у виробництві ферментованих молочних продуктів [78-80]. Результати свідчать про можливість утворення біоактивних пептидів казеїнового походження у ферментованих молочних продуктах.

Імуномодуляторні властивості продуктів протеолізу казеїнів. Імуномодуляторні властивості окремих пептидів казеїнового походження становлять значний теоретичний і практичний інтерес. Такі пептиди було виділено з різних фракцій казеїну (табл. 7). Залежно від концентрації  $\beta$ -казо-

					Огляд літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		31



морфін-7(фрагмент 60-66 β-казеїну) і β-казокінін-10 (фрагмент 193-202 β-казеїну) можуть справляти протилежні модуляторні ефекти на проліферацію периферичних лімфоцитів крові людини. Зокрема, обидва пептиди за низьких концентрацій виявляють гальмівний вплив на мітогенстимульовану проліферацію культури Т-лімфоцитів *in vitro*, проте у високих концентраціях, навпаки, посилюють проліферацію клітин цієї культури [81]. Для β-казокінінів – пептидів, які гальмують активність ангіотензинперетворювального ензиму, характеристикою є здатність стимулювати фагоцитоз, який здійснюють перитонеальні макрофаги мишей, і запобігати розвиткові інфекції, спричиненої *Klebsiella pneumoniae*, після внутрішньовенного введення їх мишам у дозах не менше 0,5 мг/кг [49, 82]. Окрім того, β-казеїнові пептиди як інгібітори АПЕ впливають на регулювання активності імунної системи, запобігаючи розщепленню брадикініну [68].

Таблиця 7

Імуномодуляторна дія казеїнових пептидів [83]

	Пептид і його амінокислотна послідовність, яка відповідає фрагменту протеїну-попередника	Спосіб протеолізу протеїну-попередника	Імунний ефект
β-казеїн	Суміш пептидів	Панкреатин Трипсин Пепсин/хімолтрипсин Пепсин/трипсин	↓ проліферації лімфоцитів ↓ проліферації лімфоцитів Немає ефекту <i>in vitro</i> з мітогенстимульованими лімфоцитами ↓ проліферації лімфоцитів
	YQQPVLGPFIV (193-209) PGIPN (63-68) LLY (191-193)	Пепсин/хімозин	↓ проліферації лімфоцитів ↑ продукції антитіл, ↑ фагоцитозу ↑ продукції антитіл, ↑ фагоцитозу, ↑ антигензалежної проліферації лімфоцитів

	$\beta$ -Казоморфін / YPFPG- PIPNSL (60-70)  $\beta$ -Казоморфін / YPFPGPI (60-66)  $\beta$ -Казокінін / YQQPVL- GPVR (193-202)  APYRQA (177-183)	Трипсин	↓ проліферації лімфоцитів ↑ резистентність мишей до інфекції <i>K. pneumoniae</i>  ↓ проліферації лімфоцитів за низьких концентрацій  ↑ проліферації лімфоцитів за високих концентрацій  Інгібітор АПФ
--	--	---------	---

Вплив казеїнових фосфопептидів на засвоєння мінеральних речовин. Посттрансляційне фосфорилування казеїнів відбувається в молочній залозі під час біосинтезу молока. Специфічність казеїнази, яка каталізує утворення фосфосеринових залишків, пов'язана з ділянками казеїнів, багатих на залишки серину і глутамінової кислоти, які утворюють так звані триплетні зони – СерР-СерР-СерР-Глу-Глу. Такі або подібні послідовності містяться з  $\alpha_{s1}$ -казеїні (66-70),  $\alpha_{s2}$ -казеїні (8-12, 56-60, 129-133) і  $\beta$ -казеїні (15-19) [84, 85]. Найважливішими властивостями казеїнових фосфопептидів (КФП) є здатність їх зв'язувати кальцій і переводити його в розчинну форму. КФП *in vitro* запобігають осадженню шенів кальцію за присутності фосфатів у лужному середовищі [86-88]. Однак дефосфорильовані пептиди втрачали здатність зв'язувати кальцій, цинк і залізо [89].

Різні методи було використано для кількісної характеристики взаємодії іонів кальцію з КФП [90]. Було встановлено, що константа зв'язування кальцію може набувати значень від  $10^{-2}$ - $10^{-3}$   $M^{-1}$  до  $0,32$   $mM^{-1}$  для не фракціонованої суміші КФП [88]. N-термінальному фосфопептиду  $\beta$ -CN (f 1-25) притаманна здатність зв'язувати 4 молі іонів заліза на 1 моль пептиду [84]. Що стосується кальцію, то до 40 молів іонів кальцію може зв'язувати 1 моль КФП [91]. Більш наочно це виглядає у вагових співвідношеннях. Показано, що від 7,4 до 24,0 мг  $Ca^{2+}$  може утворити розчинну сіль із 1 мг суміші КФП, отриманої в результаті протеолізу казеїну різними протеїназами [89]. Розчини фосфату кальцію

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

концентрацією до 1 М залишаються стабільними за присутності фосфопептидів, виділених з  $\beta$ -казеїну –  $\beta$ -CN (f 1-25) 4P і  $\beta$ -CN (f 1-42) 5P [86]. Крім того, присутність КФП у розчині гальмує утворення кристалів гідроксіапатиту [84].

Висока доступність кальцію, який надходить у травний тракт з казеїнами у складі молочних продуктів, пояснюється здатністю КФП доставляти іони кальцію у розчинному вигляді до активних і пасивних транспортувальних систем кальцію у кишечнику. Підтвердженням цього слугують результати досліджень *in vivo*, які свідчать про можливість утворення КФП у травному тракті, а також їхню стійкість до протеолітичного розщеплення і дефосфорилування [92]. У дослідах на тваринах встановлено підвищення рівня засвоєння кальцію за присутності КФП, отриманих різними способами [93-96]. Для дослідження властивостей і біологічної дії використовують КФП, одержані ензиматичним гідролізом загального казеїну або його фракцій [89, 97-99]. Ідентифіковані КФП подано в табл. 8.

Таблиця 8

#### Казеїнові фосфопептиди

Первинна структура пептиду	Фрагмент	Біологічна активність
FQ $\Sigma$ EEQQTEDELQDK	$\beta$ -CN(f 33-48) 1P	Зв'язування мінералів
RELEELNVPGEIVE $\Sigma$ L $\Sigma$ $\Sigma$ EE SITRINK	$\beta$ -CN(f 1-25/28) 1P	Зв'язування мінералів, імуномодуляторна

#### 1.4. Способи виділення $\beta$ -казеїну

Багато пептидів, які вивільняються *in vitro* або *in vivo* з тваринних або рослинних білків, є біоактивними і мають регуляторні функції у людини поза нормальним та адекватним харчуванням. Різним впливом на здоров'я приписуються харчові пептиди, включаючи антимікробні властивості, пониження артеріального тиску (інгібітор АПФ), знижувальну здатність холестерину, антитромботичну та антиоксидантну активність, підвищення абсорбції мінералів та / або біодоступності, цито- або імуномодулюючу дію та опіодні дії. Численні продукти вже знаходяться на ринку або розробляються

					Огляд літератури	Арк.
						34
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

харчовими компаніями, які використовують потенціал харчових біоактивних пептидів і які пояснюють науково обґрунтовані претензії на здоров'я до споживання цих функціональних продуктів [44].

Велика кількість біоактивних пептидів відбувається природним чином у традиційних продуктах харчування, які було спожито задовго до того, як термін «біоактивні» був встановлений. Багато з цих пептидів звільняються від шифрованого господаря білки шляхом ферментації молока, в тому числі і дозрівання сиру [100]. Багато пептидів утворюються за рахунок ферментативних реакцій у кишечнику після прийому всередину продуктів, що містять білки-попередники (наприклад, після вживання склянки молока) [101, 102]. Біоактивні пептиди є основними складовими багатьох продуктів або інгредієнтів, що продаються як "функціональні продукти" або «Nutraceuticals».

У цих продуктах біологічно активні пептиди або додаються, або збагачуються модифікацією звичайного виробничого процесу (наприклад, за допомогою процесу зміни параметру або використовується закваска). Деякі з цих продуктів, однак, є традиційними продуктами харчування, які зараз пропонуються з різних маркетингових стратегій.

Біоактивні пептиди також включаються до непродовольчих матриць забезпечуючи певні оздоровчі ефекти. Наприклад, CPPs додаються в поєднанні з аморфним розчин кальцію фосфату для полоскання рота, зубна паста (Prospec MI Paste™, GC Tooth Mousse™) або жувальна гумка (Recaldent™, Trident™) [103].

Біоактивні пептиди, отримані з їжі, також мають величезну кількість потенціалу в якості інгредієнтів фармацевтичних препаратів; наприклад, були виготовлені капсули для зниження артеріального тиску, які містять Katsuoibushi Oligopeptide LKPNM (в однобуквенному коді амінокислот) із обробленого термолізином сушеного боніто (риби з сімейства тунців), який перетворюється в його активну форму (ЛКП) травлення ферменти (Вазотензин 120™ від Metagenics, США; PeptACET™ Peptides 90 від Natural Factors, США).

Дослідження продовжують виявляти нові біоактивні пептиди та розкрити їх можливі функції та користь для здоров'я. Систематичний синтез пептидів та

					Огляд літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		35

пептидоміметиків має важливу роль у пошуку нових біоактивних речовин структур та для з'ясування структурної інформації про активні конформації [104]. Крім того, дослідження структуроактивності, засновані на силіко-аналізі з використанням хіміометричних методів (наприклад, штучних нейронних мереж), є ефективними та корисними для ідентифікації біоактивних послідовностей [105]. Застосування обчислювальної хімії призведе до створення структурних та послідовних баз даних, які будуть дозволяти шукати біоактивні фрагменти в білковому ланцюгу [106].

Численні продукти вже є на ринку або розробляються харчовими компаніями, використовуючи потенціал харчових біоактивних пептидів. Важливе завдання для виробництва функціональних продуктів, що містять біоактивні речовини пептиди - це підвищення їх біодоступності для молочних продуктів або для створення нових продуктів харчування шляхом додавання / фортифікація ізольованих або збагачених фракцій біоактивних речовин пептидів. Виробництво біоактивних пептидів протягом харчової обробки, наприклад, шляхом використання специфічних бактеріальних ферментів або генетично трансформованих мікроорганізмів представляють інтерес для майбутніх досліджень. Більше того, генетично модифіковані білки будуть розроблені для перенесення декількох копій біоактивних послідовностей [107]. Майбутні дослідження повинні з'ясувати можливе залучення цитомодуляції пептидів в розвитку пухлини.

Законодавство про харчові продукти завжди відстає від інновацій та розробок, іноді на багато років. Це особливо правда у випадку функціональної їжі в ЄС, де відповідне законодавство досі перебуває в "моменті утворення". Зараз законодавство ЄС ще не визнає функціональні продукти харчування як окрему категорію продуктів харчування. На відміну від цього, Японія була першою країною яка прийняла правову систему стосовно дозволеної претензії на здоров'я щодо функціональних харчових продуктів через запровадження FOSHU (Food for Specific Health Health) система ліцензування в 1991 році. Японські компанії можуть подати заявку на затвердження FOSHU Міністерством охорони здоров'я та добробуту Японії. З кінця 2005 р. 537

					Огляд літератури	Арк.
						36
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

продуктів FOSHU зорієнтована роздрібна вартість 6,3 млрд. дол. США вже є було схвалено носити етикетку FOSHU.

Існує згода з приводу того, що вимоги охорони здоров'я повинні бути доведені в клінічних дослідженнях. Однак харчові компоненти чинять хронічний, а не гострий вплив на здоров'я. Таким чином, слід розробити методи скринінгу для вимірювання довгострокових ефектів для встановлення впливів харчових компонентів, які, як стверджується, сприяють добре на здоров'я.

Молочні білки здійснюють широкий спектр харчової, функціональної та біологічної діяльності. Багато білків молока мають специфічні біологічні властивості, які роблять ці компоненти потенційними компонентами продуктів, що сприяють здоров'ю. Все більша увага приділяється фізіологічно активним пептидам, отриманим з молочних білків. Ці пептиди є неактивними в послідовності вихідної молекули білка і можуть бути вивільнені (1) шлунково-кишковим розщепленням молока, (2) ферментацією молока з протеолітичними заквасочними культурами або (3) гідролізом протеолітичними ферментами. Показано, що пептиди, отримані з молочного білка, *in vivo* здійснюють різні дії, що впливають, наприклад, на травну, серцево-судинну, імунну та нервову системи. Дослідженнями було виявлено велику кількість пептидних послідовностей із специфічною біоактивністю в основних молочних білках, а також були визначені умови їх вивільнення. Нещодавно були розроблені та запущені технології промислового масштабу, придатні для комерційного виробництва біоактивних пептидів молока. Ці технології ґрунтуються на нових методах розділення мембран та хроматографічних методах іонообміну, що використовуються в галузі молочних інгредієнтів, що розвиваються. Різноманітні природні форми біоактивні пептиди були виявлені в кисломолочних продуктах, таких як йогурт, кисле молоко та сир. Корисність для здоров'я, що приписується пептидам у цих традиційних продуктах, поки що не встановлена. З іншого боку, є вже кілька комерційних молочних продуктів, доповнених біоактивними пептидами, що одержують молочний білок, користь для здоров'я яких була зафіксована в клінічних дослідженнях на людях.

					Огляд літератури	Арк.
						37
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Передбачається, що ця тенденція буде розширюватися, оскільки буде отримано більше знань про багатофункціональні властивості та фізіологічні функції пептидів молока.

Фракціонування та збагачення біоактивних пептидів. Комерційне виробництво біоактивних пептидів білків з молока були обмежені відсутністю відповідних великомасштабних технологій. Дотепер методи мембранного поділу забезпечили найкращі технології, доступні для збагачення пептидів з певною молекулярною масою в ланцюгу [108]. Ультрафільтрацію регулярно застосовують для збагачення біоактивних пептидів від гідролізатів білка. Ферментативний гідроліз може здійснюватися за допомогою звичайного періодичного гідролізу або безперервного гідролізу за допомогою ультрафільтраційних мембран. Традиційний метод пакетної обробки має ряд недоліків, таких як відносно висока вартість ферментів та їх неефективність порівняно з безперервним процесом.

Використання реакторів ферментативної мембрани для безперервної дії було введено виробництво специфічних пептидних послідовностей протягом 1990-х років. Вона вже широко застосовується для повного перетворення харчових білків різного походження в гідролізати з поліпшеними харчовими та / або функціональними властивостями [109, 110]. Безперервний видобуток біоактивних пептидів в мембранних реакторах переважно застосовується до білків молока. [111] застосовували цю методику для відновлення антитромботиків пептидів, отриманих з гідролізованого казеїномакропептиду (СМР). [112] комбінований ферментативний гідроліз та ультрафільтрація з метою отримання емульгуючих пептидів з  $\beta$ -лактоглобуліну ( $\beta$ -lg). [113] продемонстрували, що алакторфін можна успішно генерувати який не переривається з гідролізом козячої сироватки в реакторі ультрафільтрації. З іншої точки зору, вони зауважили серйозні проблемні неполадки з пептидно-мембранної взаємодії, особливо при ультрафільтрації гідролізатів казеїну. [114] запропонував багатокомпонентний ферментий реактор, що працює під дією електричного поля для безперервного гідролізу білків молока. Ця методика

					<i>Огляд літератури</i>	Арк.
						38
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

дозволена для постійного збирання деяких біологічно активних пептидів, таких як фосфопептиди та попередники казоморфінів з триптичного гідролізату  $\beta$ -казеїну.

Поетапна ультрафільтрація з використанням зрізу мембрани з низькою молекулярною масою виявилася корисною для відокремлення малих пептидів з високомолекулярних залишків та залишків ферментів. [115] використано двоетапний процес ультрафільтрації і змогли виробляти суміш поліпептидів і фракцій, багаті дрібними пептидами з молекулярною масою нижче 2000 Да. [116] застосовуються селективні мембрани ультрафільтрації (30 та 1 кДа) для збагачення опіодних пептидів ( $\alpha$ - і  $\beta$ -лакторфіна) з гідролізованого пепсином  $\alpha$ -лактальбуміну ( $\alpha$ -1a) та від пепсин- і трипсин-гідролізований  $\beta$ -lg відповідно. Та сама методика успішно застосовується для збагачення АПФ-інгібіторних пептидів очищеними  $\alpha$ - 1a та  $\beta$ -lg [117].

Є кілька іонообмінних хроматографічних методів були розроблені для збагачення CPPs з казеїнових гідролізатів, але виробничі витрати цієї техніки були заборонними для масштабних операцій. [118] розвинений технологічний масштабний метод виділення високої чистоти CPPs, використовуючи кислотні осадження, діафільтрацію та хроматографію без змін. Останнім часом іонообмінна мембранна хроматографія стала перспективною технікою збагачення пептидних фракцій від гідролізата білка. [119] описано метод, де був зосереджений інтерес білка всередині хроматографічного середовища та гідролізується *in situ* відповідним ферментом. Отримані активні пептиди утримувались на іонному обміннику, а інші пептиди промивались. Наприкінці, фракція, що містить активні пептиди елюювали з середньою хроматографією. За допомогою цього методу вдалося виділити і збагатити катіони антибактеріальні пептиди з лактоферину та  $\alpha_{s2}$ -казеїн, а також негативно заряджені фосфопептиди від  $\beta$ -казеїну. Переваги цього процесу полягають у тому, що виділення білка-попередника є непотрібний фермент, використаний у цьому процесі, може бути відновлений. Ця техніка забезпечує нові можливості збагачення пептидів з низькою молекулярною масою і може бути легко роз-

					Огляд літератури	Арк.
						39
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		



ширена до врожайного грама або навіть в кілограмовій кількості [120].

Був розроблений новий метод отримання чистого  $\beta$ -CN. Казеїнат кальцію (3%) відновлювали, відновлювали з утворенням гелю, охолоджували (4 °C), щоб дозволити дисоціацію  $\beta$ -CN від гелю казеїнату, і центрифугували. Супернатант нагрівали до 30 °C, осаджуючи з розчину чистий  $\beta$ -CN. Великі кількості  $\beta$ -CN відновлювали шляхом збільшення цієї процедури, але ці  $\beta$ -CN препарати були менш чистими, ніж  $\beta$ -CN, який готували у меншому масштабі. Хроматографія (FPLC<sup>®</sup>) і сечовина-PAGE показали, що  $\beta$ -CN є основним компонентом осаду. Хімозин, який використовується для утворення казеїнового гелю, не гідролізував  $\beta$ -CN в умовах цих експериментів. Концентрація кальцію, час охолодження та концентрація казеїнату впливали на відновлення  $\beta$ -CN. Максимальне відновлення  $\beta$ -CN у використаних експериментальних умовах відбулося при 10 мМ кальцію, 48 год охолодження та 3% концентрації казеїнату.

Чистота виділення  $\beta$ -CN на лабораторній шкалі. Стандартний  $\beta$ -CN порівнювали з виділеним  $\beta$ -CN ідентифікували виділений білок як  $\beta$ -CN та визначили його чистоту. Гель-електрофорез (рис. 2) показав, що у стандартних  $\beta$ -CN була одна основна смуга  $\beta$ -казеїну та незначна смуга  $\beta$ II. Гель-електрофорез ізольованого  $\beta$ -CN показав лише одну смугу, яка безпосередньо відповідала стандартній смузі  $\beta$ -CN.

Гідроліз  $\beta$ -CN хімозином продукував пептиди ( $\beta$ I і  $\beta$ II), які мали підвищену рухливість (рис. 2).

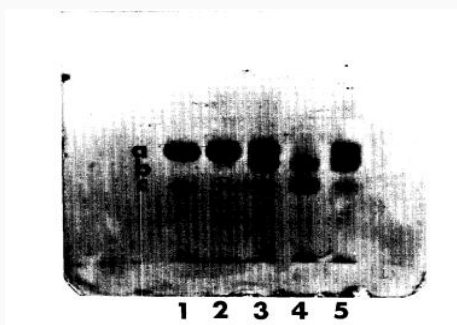


Рисунок 2. Сечовина-PAGE стандартного  $\beta$ -CN (смуга 1), виділена  $\beta$ -CN (смуга 2) та  $\beta$ -CN-гідроліз хімозином (смуги 3 до 5). ( $\beta$ -казеїн гідролізували при

									Арк.
									40
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат					

pH 2,2 (смуга 4), pH 5,5 (смуга 5) та pH 7 (смуга 3) при 37 °C протягом 12 год. Концентрація хімозину у всіх пробах складала 0,0238 RU / мл. Гідроліз в цих умовах виробляли різну кількість  $\beta$ I та  $\beta$ II. a =  $\beta$ -CN, b =  $\beta$ I і c =  $\beta$ II.

Результати FPLC<sup>®</sup> для стандартного  $\beta$ -CN (рис. 3a) показали один головний пік за 20 хв, який відповідав до  $\beta$ -CN. А, плече до і після основного піку на стандарті  $\beta$ -CN вказано, що  $\beta$ -CN містить невелику кількість іншого білка або пептиду. Цей пептид міг бути  $\beta$ II, який був єдиним іншим пептидом, виявленим за допомогою гелі-електрофорезу. Виділений  $\beta$ -CN елюювали за 20 хв (рис. 3b) у вигляді одного головного піку. Спостерігалось невелике плече перед головним піком. Плече спостерігається після основного піку для стандарту  $\beta$ -CN (рис. 3a) не спостерігалось для ізольованого  $\beta$ -CN, що вказує на відсутність  $\beta$ II. Гелі-електрофорез також не виявив наявності будь-якого  $\beta$ I або  $\beta$ II в ізольованому  $\beta$ -CN (рис.2). Проводили аналіз амінокислоти виділеного  $\beta$ -CN і розрахований амінокислотний склад порівнювали з прогнозованим складом (табл. 9). Порівняння були виготовлені з використанням  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>-5P (1) [121].

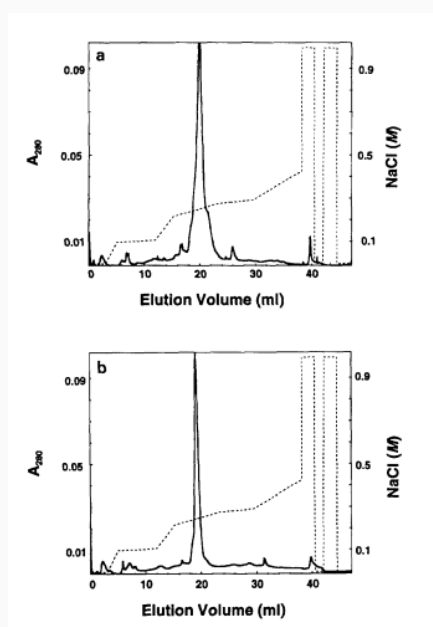


Рисунок 3. FPLC<sup>®</sup> хроматограми стандартних  $\beta$ -CN (a) та виділено  $\beta$ -CN (b). Абсорбція при 280 нм (-) і градієнт солі (- -) показано.

Аналіз амінокислот виділених  $\beta$ -CN і  $\beta$ -CN A<sup>25P</sup>

Amino acid	Predicted	Calculated
Aspartic acid	9.00	9.17
Threonine	9.00	8.23
Serine	16.00	11.93
Glutamic acid	39.00	38.61
Proline	35.00	34.04
Glycine	5.00	5.21
Alanine	5.00	6.12
Half-cystine	0.00	0.13
Valine	19.00	18.23
Methionine	6.00	6.02
Isoleucine	10.00	8.98
Leucine	22.00	22.56
Tyrosine	4.00	4.20
Phenylalanine	9.00	9.07
Histidine	5.00	5.56
Lysine	11.00	10.84
Arginine	4.00	4.06

Фракціонування казеїну. Починаючи з 1940-х років, можна було фракціонувати цілий казеїн компонентних білків в лабораторному масштабі, використовуючи відмінності в розчинності окремих казеїнів у розчинах сечовини при  $\sim$  рН 4,6, або у  $\text{CaCl}_2$  або за різними формами хроматографії. Однак ці методи не підходять для промислового виробництва окремих казеїнів, для яких вважається існують потенційні можливості, оскільки:

- Казеїн має дуже високу поверхневу активність і може застосовуватися як емульгатор високої якості або піноутворювач.

- Людське молоко містить в основному  $\beta$ - і  $\kappa$ -казеїни, але дуже мало або взагалі немає  $\alpha$ -казеїнів; отже,  $\beta$ -казеїн повинен бути привабливим інгредієнтом для виготовлення дитячої суміші з великої рогатої худоби.

- $\kappa$ -Казеїн, який відповідає за стабільність міцел казеїну, може бути як корисна добавка для певних молочних продуктів.

- Повідомлялося, що фортифікація молока з  $\beta$ -казеїном покращує його властивості сироваріння.

					Огляд літератури	Арк.
						42
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

- Всі білки молока містять послідовності, які мають біологічну активність при вивільненні протеолізом; отримання біологічно активних пептидів вимагає очищених білкових субстратів.

Існує ряд методів широкомасштабної підготовки  $\beta$ -казеїну які були описані, залишаючи фракцію, збагачену  $\alpha_s$ - і  $\kappa$ -казеїни. Ці методи засновані на дисоціації  $\beta$ -казеїну на низькому рівні температури, завдяки високій гідрофобності. Деякі з цих методів використовують UF або MF для відокремлення мономерного  $\beta$ -казеїну від більш агрегованих  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - та  $\kappa$ -казеїну в молоці або казеїнаті натрію [122], інші використовували дисоціацію  $\beta$ -казеїну з сичужного Са-казеїнату [123] або від сичужного молока (рис. 4). Останній метод здатний давати дуже високий вихід  $\beta$ -казеїну, з  $\gamma$ -казеїну як головної забруднюючої речовини, і можуть бути легко включені в промисловий процес для виробництва розпушувального казеїну [124].

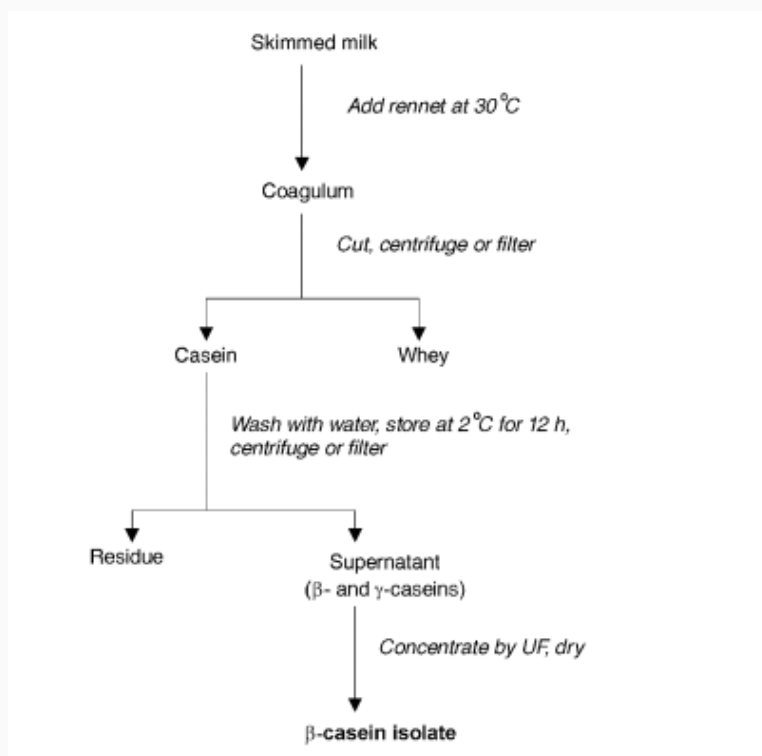


Рисунок 4. Порядок виділення  $\beta$ -казеїну з сичужного казеїнового сиру(Р. F. Fox, Shakeel-Ur-Rehman and T. Considine, unpublished).

## 2. Матеріал і методи досліджень

### 2.1. Визначення білків на спектрофотометрі (280 нм)

Концентрацію фракцій казеїну визначали за поглинанням при довжині хвилі 280 нм на спектрометрі СФ-46. При цьому використовували встановлені раніше коефіцієнти поглинання ( $D_{1\text{cv}}^{1\%}$ ): 10,0 – для  $\alpha_{s1}$ -казеїну; 4,6 – для  $\beta$ -казеїну; 9,6 – для  $\kappa$ -казеїну; 10,1 – для  $\alpha_{s2}$ -казеїну і 8,2 – для загального казеїну.

### 2.2. Визначення концентрації білків по Лоурі

Метод Лоурі є одним з найпоширеніших і найчутливіших методів визначення концентрації білка. Він ґрунтується на вимірюванні інтенсивності забарвлення розчину залежно від концентрації білка. Забарвлення розчину виникає внаслідок проходження двох біохімічних реакцій: біуретової та реакції реактиву фоліна. Метод Лоурі є високочутливим і дозволяє визначити кількість білка, яка виражена десятками мікрограмів.

Для визначення концентрації використовували:

- стандартний розчин білка (БСА, 2 мг/мл);
- реактив Фоліна-Чекальтеу (1 н розчин);
- реактив 1 - 10% розчин  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 0,5 М  $\text{NaOH}$ ;
- реактив 2 – 0,5%  $\text{CuSO}_4$ ;
- фотометр КФК-3.

До 0,6 мл досліджуваних розчинів додавали 3 мл робочого розчину (робочий розчин готували в день визначення наступним чином: змішували один об'єм реактиву 2 з десятьма об'ємами реактиву 1 і 40 об'ємами дистильованої води), перемішували і залишили при кімнатній температурі на 10 хв. Після цього додавали 0,3 мл розчину Фоліна-Чекальтеу, перемішували і через 30 хвилин колориметрували при довжині хвилі 750 нм на фотометрі КФК-3. В якості розчину для порівняння (контролю) використовували 0,6 мл дистильованої води або відповідного буферного розчину, до якого всі реагенти додавали у

					<b>ДР 18-153.00.00.002 ПЗ</b>			
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	Даньків С.О.				<i>Матеріал і методи досліджень</i>	<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Перевірюв</i>	Юкало В.Г.						44	99
<i>Консульт.</i>						<i>ТНТУ, ФМТ, грМЛМ-61</i>		
<i>Рецензент</i>	Зварич Н. М.							
<i>Зав каф.</i>	Покотило О.С.							

такій же послідовності, як і до досліджуваного розчину. Вміст білка в досліджуваному зразку визначали за калібрувальним графіком.

### 2.3. Диск-електрофорез

Проводили в нативних умовах анодної диск-ПААГ системи для кислих і нейтральних білків. Різні варіанти цієї системи описані в [125, 126]. Для виготовлення концентруючого і розділяючого гелів використовувались наступні розчини і співвідношення (об'ємні). Незначні зміни у порівнянні з методикою Б. Девіса [127] внесені до складу концентруючого гелю.

1.Складові частини розділяючого гелю (рН 8,9):

1 н НСІ – 24 мл	Акриламід (АА) – 15 г	Персульфат амонію
Тріс – 18,3 г	Метиленбісакриламід	(ПСА) - 0,065 г
ТЕМЕД – 0,115 мл	(МБА) – 0,4 г	
<hr/>	<hr/>	<hr/>
до 50 мл Н <sub>2</sub> О	до 50 мл Н <sub>2</sub> О	до 50 мл Н <sub>2</sub> О
1 частина	2 частина	5 частина

2.Складові частини концентруючого гелю (рН 6,9):

1 н НСІ – 24 мл	АА – 5 г	Сахароза – 20 г	ПСА – 0,03 г
Тріс – 2,99г	МБА – 1,25 г		
ТЕМЕД – 0,23 мл			
<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
до 50 мл Н <sub>2</sub> О	до 50 мл Н <sub>2</sub> О	до 50 мл Н <sub>2</sub> О	до 20 мл Н <sub>2</sub> О
1 частина	2 частина	4 частина	1 частина

Електродний буфер (рН 8,3) включав:

Тріс – 6 г
Гліцин – 28,9 г
<hr/>
до 100 мл Н <sub>2</sub> О

Електрофоретичне розділення зразків проводили в трубочках приладу фірми „Reanal” (Угорщина).

#### 2.4. Електрофорез в однорідному ПАГ

Аналіз фракційного складу і гомогенність препаратів  $\alpha_s$ -казеїнів на різних стадіях виділення проводили за допомогою електрофорезу на вертикальних пластинках поліакриламідного гелю в апараті Стадієра. При цьому використовували лужну буферну систему гелю (рН-7,9), що включала 0,025 М тріс, 0,027 м діетилбарбітурат, 0,003 М ЕДТА і 4,5 М сечовини. В пробірку вносили по 10 мкл розчину казеїнів. Після електрофорезу пластинки фіксували в 7% розчині оцтової кислоти і забарвлювали в 1% розчині амідочорного 10Б.

#### 2.5. ІОХ на ДЕАЕ-целюлозі

Фракціонування казеїнів у об'ємі проводили на ДЕАЕ-целюлозі (ДЕАЕ-52). Для порівняння казеїни фракціонували методом іонообмінної хроматографії на колонках Reanal (2×30 см). Умови іонообмінної хроматографії на колонці ДЕАЕ-целюлозою подібні до умов описаних в роботі [79].

					<i>Матеріал і методи досліджень</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		46

### 3. Власні дослідження

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

##### 3.1.1. Виділення загального казеїну

Препарат, який складається з основних і мінорних груп  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN і  $\kappa$ -CN, а також включає фрагменти  $\beta$ -CN –  $\beta$ -CN-1P(f 29-209),  $\beta$ -CN-1P(f 106-209) і  $\beta$ -CN-1P(f 108-209) називають казеїновим комплексом молока. У чистому вигляді казеїн – це білий аморфний порошок без запаху і смаку, практично нерозчинний у воді, розчинний у слабких розчинах лугів, кислот і солей і лужноземельних металів. Вміст казеїну у молоці корів коливається від 2,2 до 2,7%. Під час процедури виділення загального казеїну із молока його очищають від ліпідів, білків сироватки молока, низькомолекулярних органічних і неорганічних сполук. В результаті досліджень необхідно було домогтися високого ступеню очистки загального казеїну без використання екстремальних значень рН, іонної сили, температури та дезагрегуючих компонентів, які можуть викликати глибокі зміни у будові білків казеїнової групи. Потрібно було прорахувати період інактивації природних протеаз, які наявні в загальному казеїні і важко відокремлюється від нього [128].

Багато методів виділення загального казеїну зустрічається в наукових працях. Ці процеси можуть містити осадження казеїну хімозином, коагуляцію і осадження казеїну при високих температурах, а також за допомогою іонів кальцію [129]. Описані способи приводять до чималих безповоротних змін будови і просторової форми, а в першому випадку – амінокислотної послідовності казеїнів.

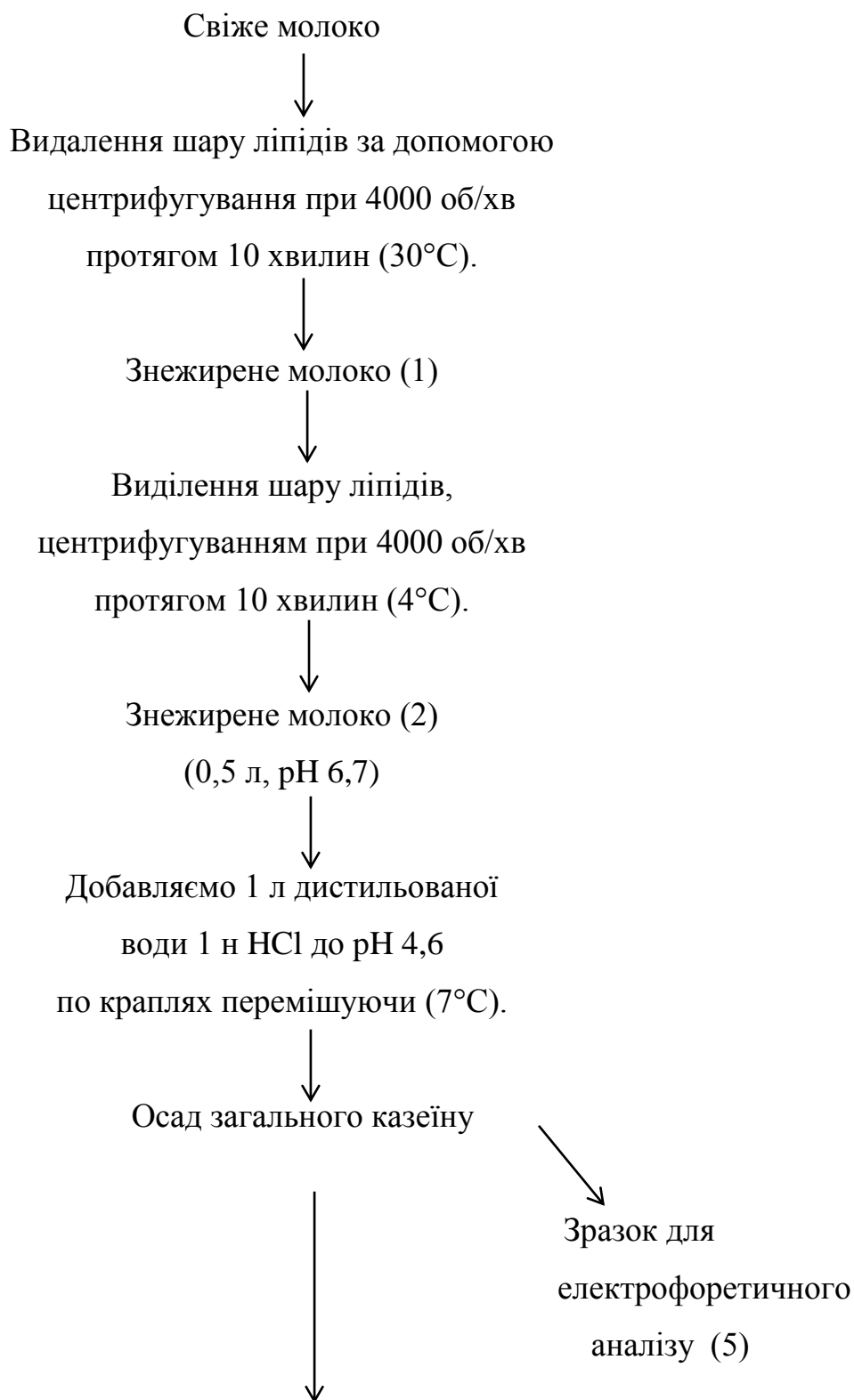
Першою стадією було знежирене молоко – процес відділення ліпідів. Ця процедура включає дві стадії і відбувається при двох різних температурах [130]. Цей процес дозволяє, без втрати білків більш повно відділити ліпіди молока. Соляна кислота була вибрана серед багатьох кислот, які використо-

					<b>ДР 18-153.00.00.003 ПЗ</b>			
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>Власні дослідження</b>	<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Розроб.</i>	Даньків С.О.							
<i>Певіріив</i>	Юкало В.Г.						47	99
<i>Консульт.</i>	.					<b>ТНТУ, ФМТ, грМЛм-61</b>		
<i>Рецензент</i>	Зварич Н. М.							
<i>Зав каф.</i>	Покотило О.С.							



увались для осадження казеїну, так як ця кислота сприяє нормальному травленні казеїну в шлунку. За допомогою NaOH розчиняли осад загального казеїну, спостерігаючи за значенням рН, яке не мало бути вищим 7,5, так як при значенні рН більшому 7,5 може відбуватися дефосфорилування казеїнів [131].

На схемі показано основні стадії виділення загального казеїну:



					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		48

Робимо промивання дистильованою

водою (1 л).

Диспергуємо у 0,5 л

дистильованої води.

Перемішуючи ( $\text{pH} \leq 7,5$ )

додаємо 1 н NaOH.



Розчин загального казеїну (1)



Добавляємо 1 л

дистильованої води і по

краплях 1 н HCl до  $\text{pH}$  4,6

при перемішуванні.



Осад загального казеїну (2)



Робимо промивання

дистильованою водою (0,5 л).

Диспергуємо в 0,5 л

дистильованої води.

При перемішуванні ( $\text{pH} \leq 7,5$ )

добавляємо 1 н NaOH.



Розчин загального казеїну (2)



Оцтову кислоту добавляємо

до  $\text{pH}$  4,0.



					Власні дослідження	Арк.
						49
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Осад загального казеїну (3)



Зразок для  
електрофоретичного  
аналізу

Коли знежирене молоко розводили дистильованою водою, це проводили для дестабілізації казеїнових міцел і більш повнішого видалення солей, лактози, пептидів, амінокислот [130]. Коли пройшло одне (рис. 5) і друге переосадження (рис. 6) загального казеїну, то отриманий осад аналізували в двох системах електрофорезу. У науковій літературі описано триразове переосадження казеїну в ізоелектричній точці [132, 133]. Це насправді так, після першого переосадження загального казеїну він містить залишки білків сироватки молока (рис. 5). Після двох переосаджень на електрофореграмі присутні лише білки казеїнового комплексу (рис. 6). Отриманий препарат інкубували в розчині оцтової кислоти при рН 4,0 протягом 5 годин при 4°C, для інактивації природних протеаз [134]. Закінчивши інкубацію осад загального казеїну промивали залишком дистильованої води, розчиняли його додавши NaOH і отриманий розчин казеїну висушували ліофільно. Загальний казеїн, який одержали, зберігали при низькій температурі в холодильнику. Через три місяці, при аналізі загального казеїну, не виявлено збільшення кількості розчинних пептидів після осадження білків ТХУ [135].

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
						50
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

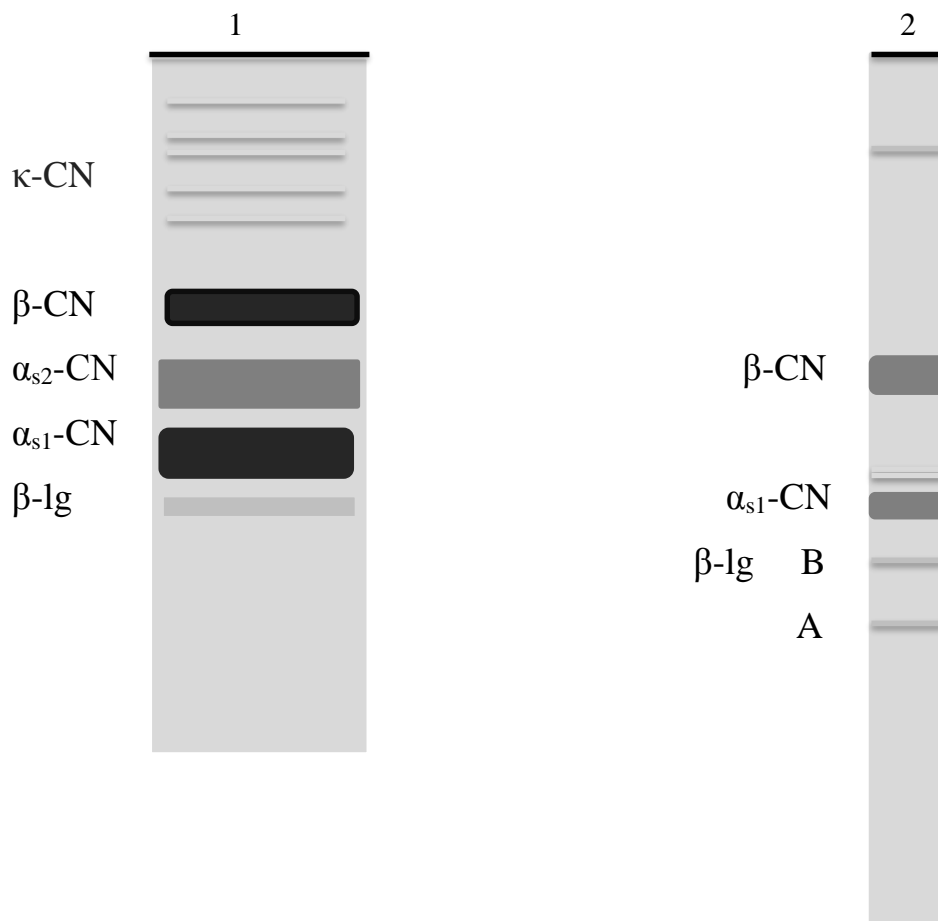


Рис. 5. Електрофореграми осаду казеїнового комплексу.

1 – електрофорез в анодній системі на пластинках поліакриламідного гелю;

2 – диск-електрофорез у трубочках поліакриламідного гелю.

Це вказує на інактивацію протеаз молока. Для кількісного опису електрофореграм були побудовані денситограми. Виділений таким чином казеїновий комплекс, як показано на схемі, було використано отримання окремих казеїнів.

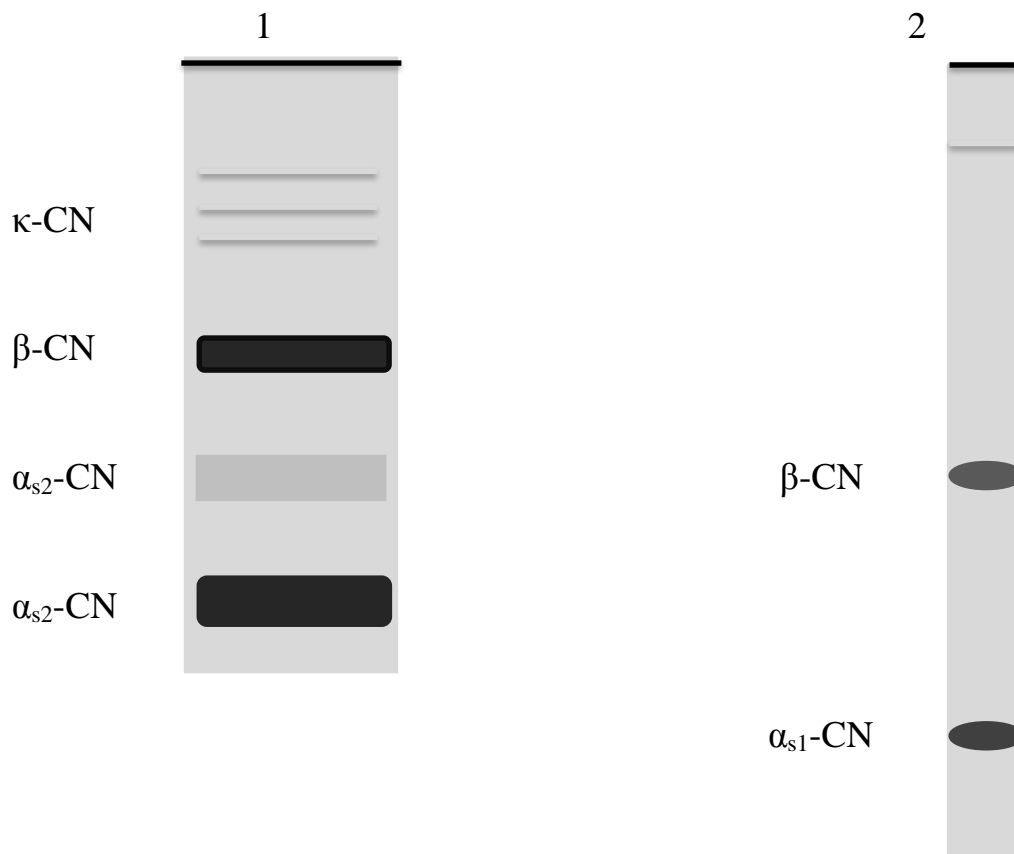


Рис. 6. Електрофореграми осаду казеїнового комплексу (3).

1 – анодна система однорідного ПАГ;

2 – трубочка ПАГ після диск-електрофорезу.

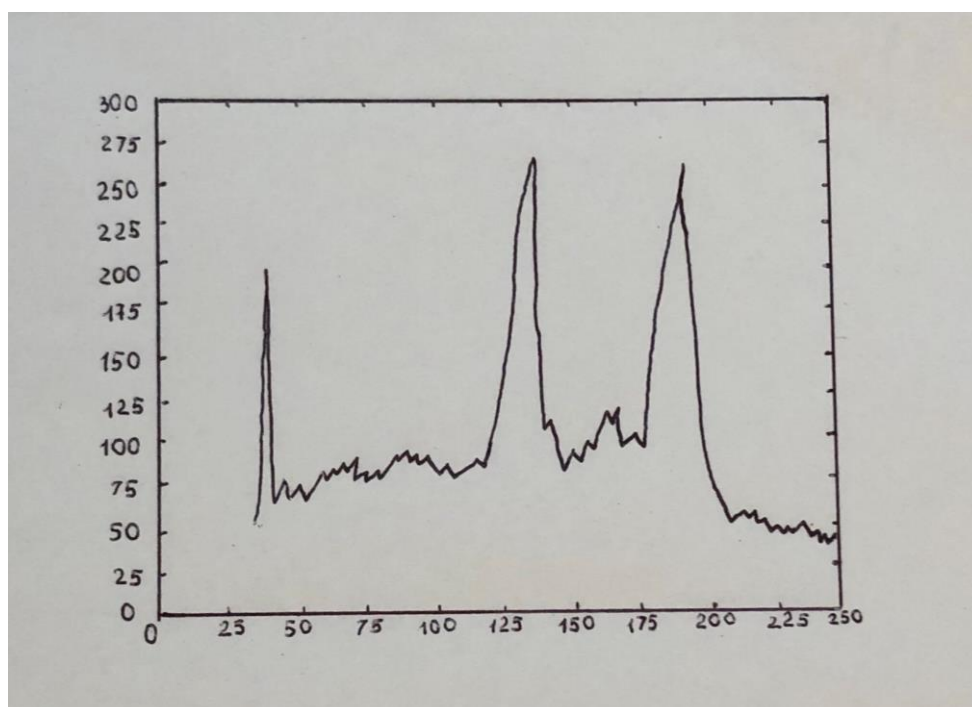


Рис. 7. Денситограма електрофореграми казеїнового комплексу отримані в анодній системі ПАГ [ рис. 6.(1)]

					Власні дослідження	Арк.
						52
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

### 3.1.2. Отримання очищеного $\beta$ -казеїну

Очистка від  $\alpha_{s1}$ - і  $\alpha_{s2}$ -казеїнів, а потім від  $\kappa$ -казеїну – є важливим завданням при виділенні  $\beta$ -казеїну.  $\beta$ -казеїн має певні своєрідності, які можна використати при виділенні його із складу загального коров'ячого молока і очистці до гомогенного стану [10, 136]. Ми не використовували способи виділення, можуть пошкодити будову і склад  $\beta$ -казеїну. Поміж усіх білків казеїнового комплексу цей казеїн є найбільш гідрофобним. Виражену спроможність  $\beta$ -казеїну до самоасоціації за участю гідрофобних взаємодій визначають своєрідність первинної структури. З підвищенням температури збільшується здатність до самоасоціації [131].  $\beta$ -казеїн може існувати в розчинах у вигляді мономерів при температурах близько до  $4^{\circ}\text{C}$ , на відміну від інших казеїнів. Він є розчинним у присутності 6,6 М сечовини, аналогічно до  $\alpha_{s1}$ -казеїну. Для  $\beta$ -казеїну притаманним є те, що його розчинність в 6,6 М сечовині не залежить від рН і іонної сили. Здатність залишатися у розчинному стані в наявності 3,3 М сечовини при рН 4,6, що відповідає ізоелектричній точці  $\alpha_{s1}$ -казеїну – є суттєвою властивістю  $\beta$ -казеїну, пов'язаною з його виділенням [137, 132]. Осадження  $\beta$ -казеїну проводилося при значенні рН 4,9, яке відповідає його ізоелектричній точці. Процедура формування осаду  $\beta$ -казеїном доцільно здійснювати при температурах, що перевищують  $20^{\circ}\text{C}$ . Перший період виділення  $\alpha_{s1}$ -казеїну можна водночас використати для отримання  $\beta$ -казеїну, через аналогічність розчинності  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ - і  $\kappa$ -казеїну у присутності сечовини. Не зважаючи на це  $\beta$ -CN залишається в розчині 3,3 М сечовини. Здебільшого  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - і  $\kappa$ -казеїн випадають в розчин.

На схемі показані всі періоди виділення  $\beta$ -казеїну:

#### Промитий осад загального казеїну

(Осад загального казеїну 3)



					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		53

У 0,5 л 6,6 М  
сечовини розводимо.  
Добавляємо 0,5 л  
дистильованої води,  
(за допомогою HCl) доводимо рН  
до 4,7.

↓  
Центрифугування (2000 об/хв,  
15 хвилин).

↓  
Розчин  $\beta$ -казеїну

↓  
За сприянням 1 н NaOH  
доводимо рН до 4,9.

↓  
Добавляємо 2 л  
дистильованої води.

Доводимо до  
температури 30°C  
і відстоюємо  
в термостаті.

↓  
**Осад  $\beta$ -казеїну (1)**

↓  
Декантування і найбільш  
можливе відокремлення  
осаду.

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		54

Центрифугування рідини над  
осадом впродовж  
30 хвилин (2000 об/хв).

↓  
**Осад  $\beta$ -казеїну (2)**

↘  
Взірець для  
електрофоретичного  
аналізу

↓  
В 0,2 л 3,3 М  
сечовини диспергуємо

осад.  
↓

За сприянням 1 н  
NaOH доводимо рН  
до 7,5 до утворення  
пластівців

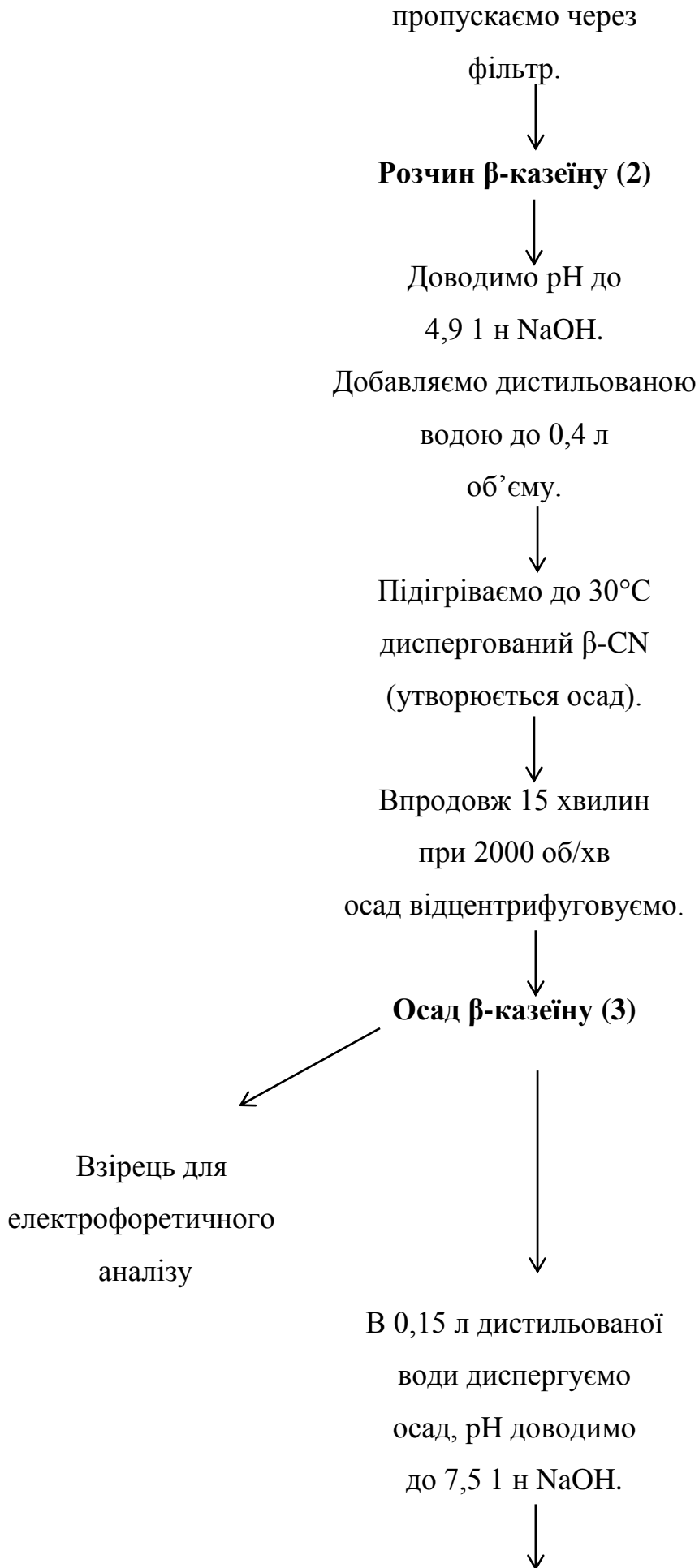
$\beta$ -казеїну.  
↓

Добавляємо 1 н  
HCl до рН 4,6 і  
доводимо до  
температури 37°C.

↓  
Маслянистий з дрібними  
зернинами осад  
відцентрифугуємо  
при 2000 об/хв  
впродовж 15 хвилин.  
Рідину над осадом

					Власні дослідження	Арк.
						55
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		





Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат

До розчину  $\beta$ -казеїну  
добавляємо 1 н HCl  
до рН 4,9.

Підігріваємо до  
температури 30°C.

↓  
Осад відцентрифугуємо  
впродовж 15 хвилин  
при 2000 об/хв.

↓  
**Осад  $\beta$ -казеїну (4)**

↓  
Розводимо в  
дистильованій воді і  
добавляємо 1 н  
NaOH при найменшому  
значенні рН.

↓  
**Розчин  $\beta$ -казеїну (3)**

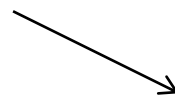
↘  
Визначення концентрації  
 $\beta$ -казеїну  
 $\beta$ -казеїну

↓  
Отриманий і очищений  
розчин  $\beta$ -казеїну  
ліофільно висушували



Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат

Очищений  
 $\beta$ -казеїн



Зразок для  
електрофоретичного  
аналізу

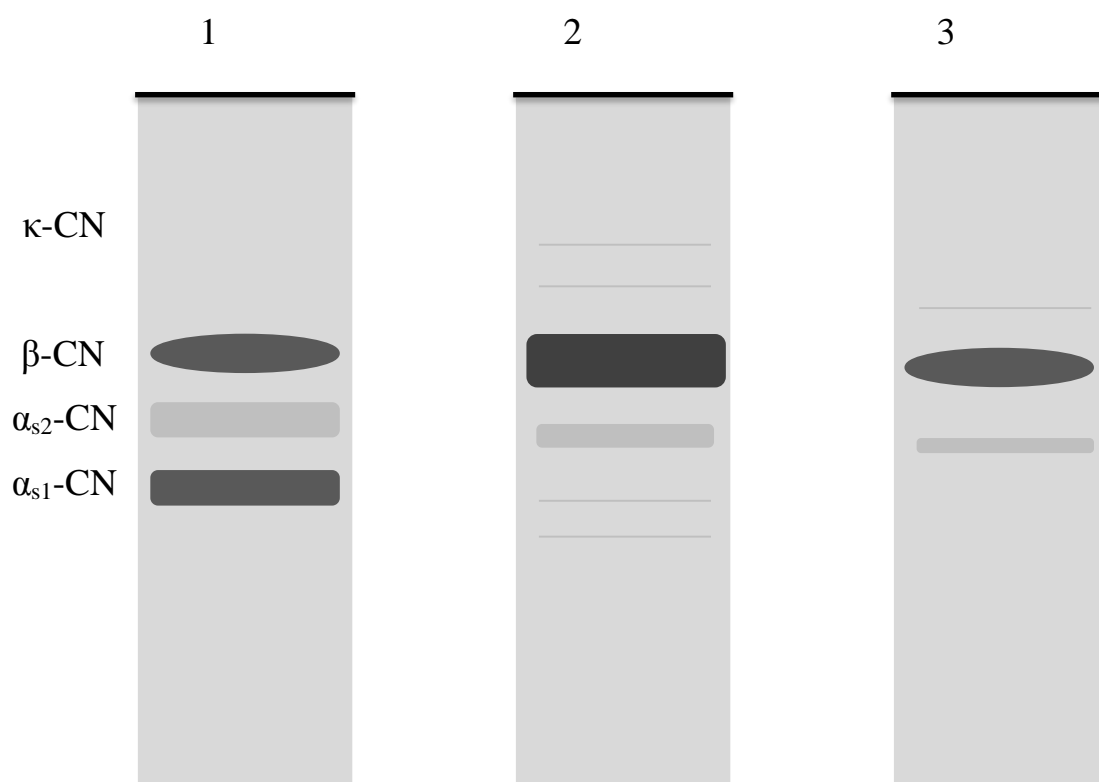


Рис. 8. Електрофореграми казеїнового комплексу (1), осаду  $\beta$ -казеїну 2 (2) і осаду  $\beta$ -казеїну 3 (3)

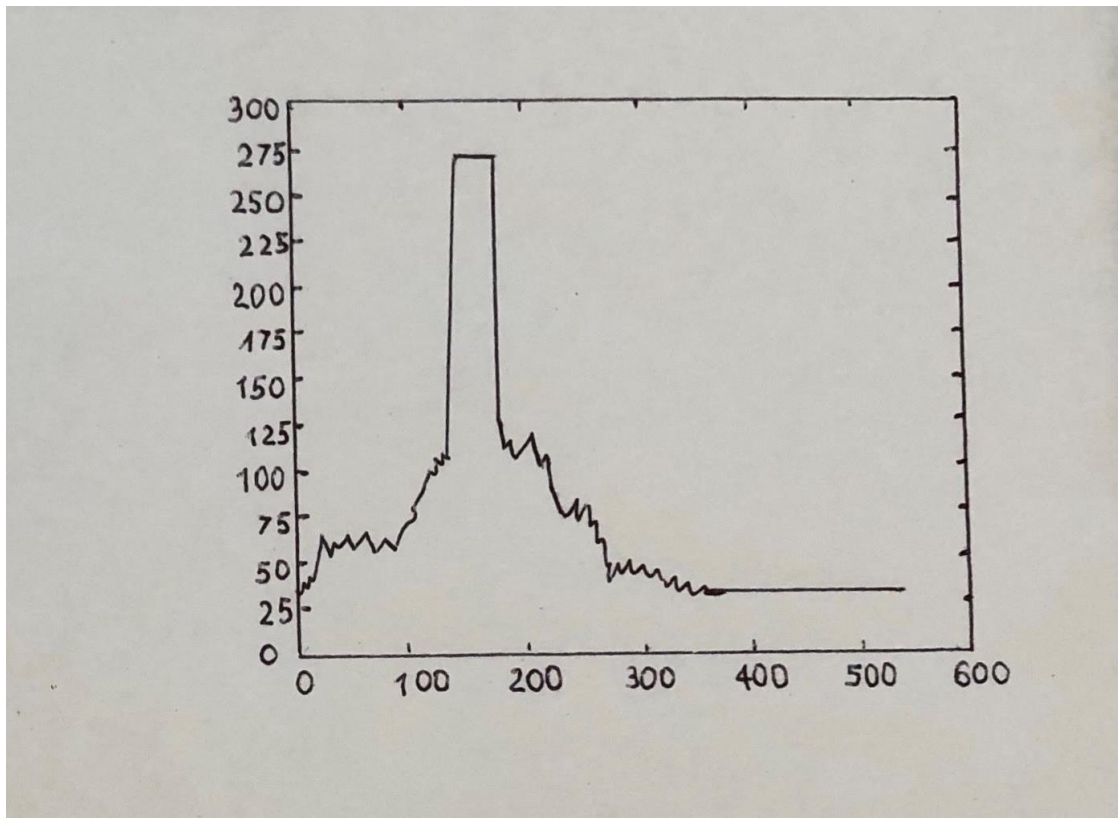


Рис. 9. Денситограма  $\beta$ -казеїну 2

Фракціонування  $\beta$ -казеїну з застосуванням іонів кальці, я вважаю не доцільне. Вразливість до іонів кальцію у  $\beta$ -казеїну виражається при  $20^{\circ}\text{C}$  і вище, аналогічно до  $\alpha_{s1}$ -казеїну – це по-перше. При температурах менше  $18^{\circ}\text{C}$   $\beta$ -казеїн стає стійкий навіть до великих концентрацій іонів кальцію аналогічно до  $\kappa$ -казеїну – це по-друге [128]. Такий взаємозв'язок розчинності  $\beta$ -казеїну в присутності іонів кальцію може ускладнювати процедуру виділення.

Зразки (як представлено на схемі) для дослідження білкового складу електрофорезом на пластинках ПАГ у лужній системі було вилучено на різних стадіях виділення  $\beta$ -казеїну. На електрофореграмі показані 2 і 3 результати аналізу осаду  $\beta$ -казеїну (рис. 8). Осад  $\beta$ -казеїну 2 вміщує домішки всіх казеїнових груп (найбільше  $\alpha_{s2}$ - і  $\kappa$ -казеїнів), що добре показано на електрофореграмі. Частка домішок помітно зменшується після останнього етапу очистки.

										Арк.
										59
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат						

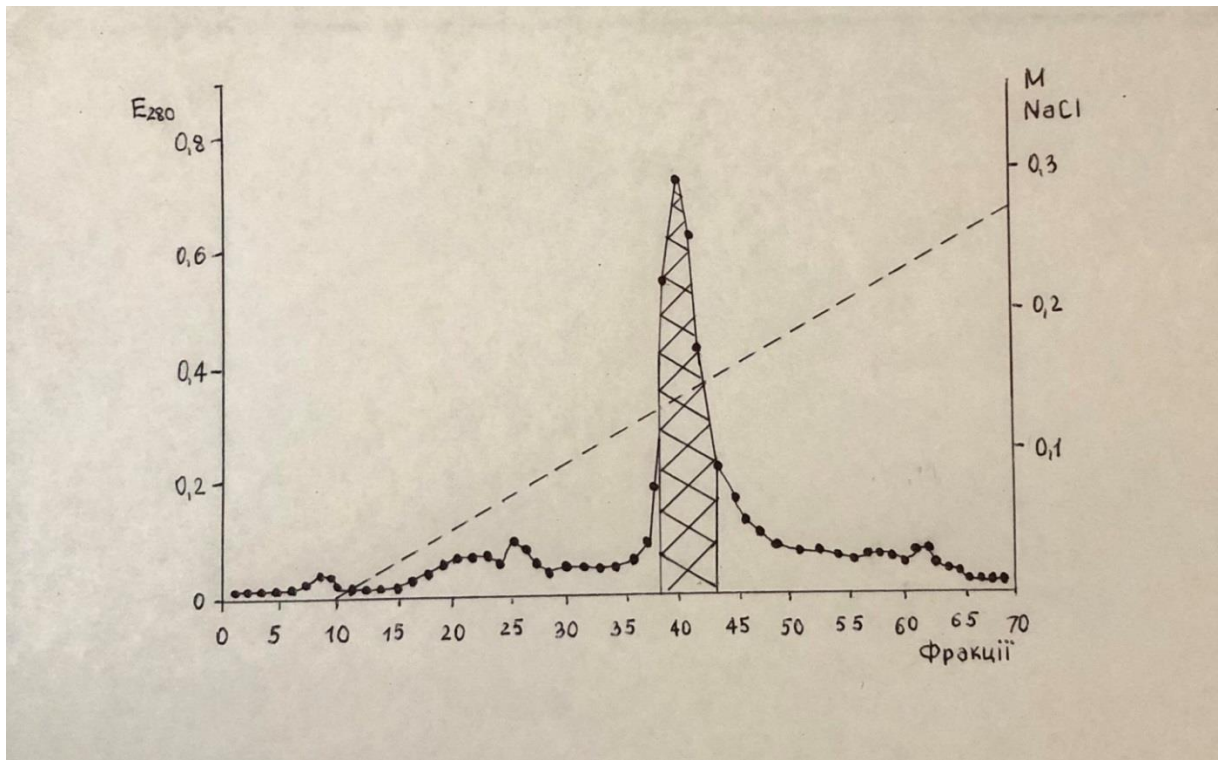


Рис. 10. Іонообмінна хроматографія  $\beta$ -казеїну в градієнті NaCl на діетил-аміноетил-целюлозі. Для аналізу і повторної хроматографії об'єднували заштриховані фракції

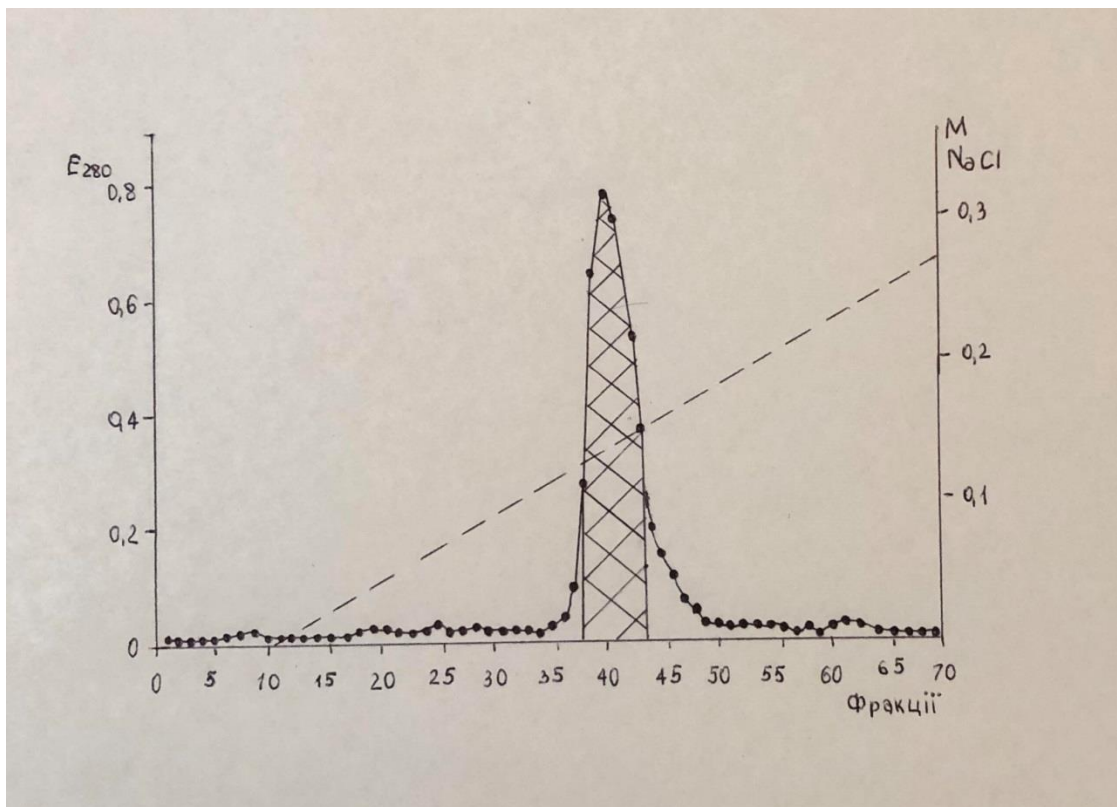


Рис. 11. Повторна іонообмінна хроматографія  $\beta$ -казеїну на діетил-аміноетил-целюлозі

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
						60
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Найкраще препарати  $\beta$ -казеїну зберігають у висушеному вигляді, при тому висушування проводили ліофілізацією. Електрофоретичне вивчення ліофілізованого препарату (рис. 12 (2)) вказує про присутність у ньому слідів  $\alpha_{s2}$ - і  $\kappa$ -казеїну.

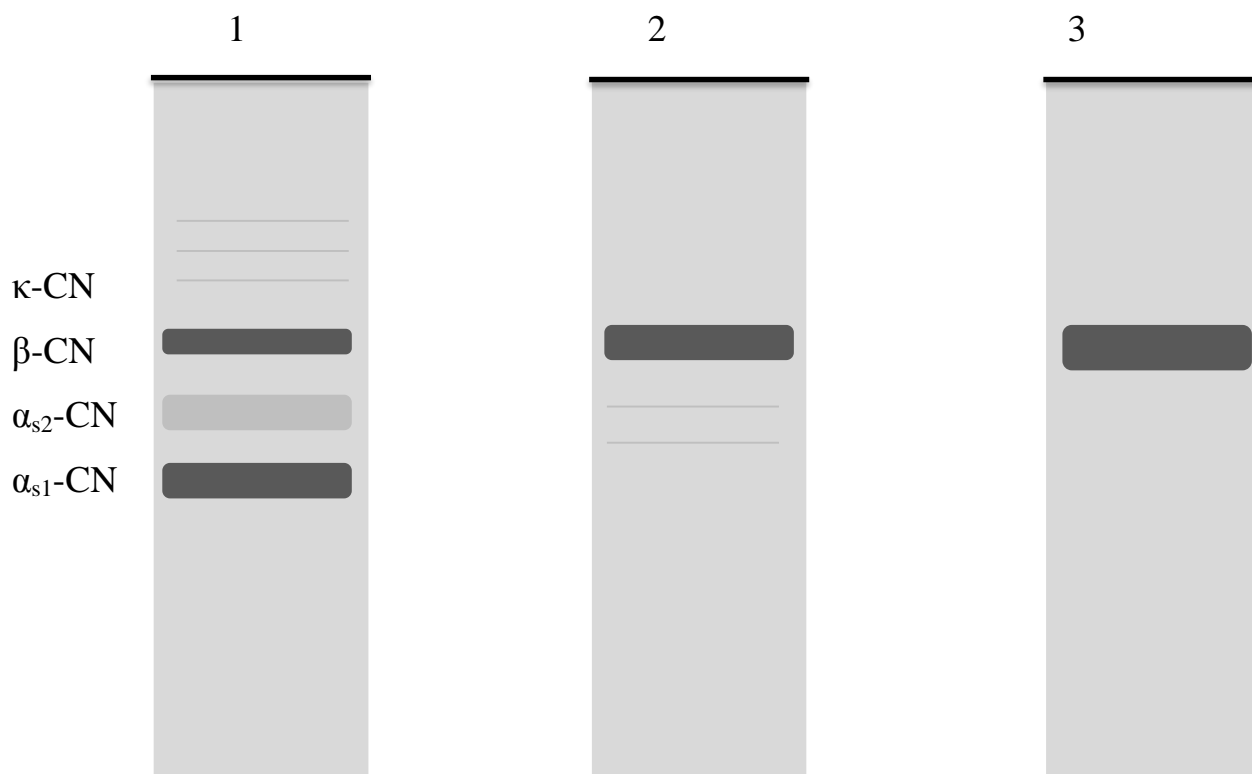


Рис. 12. Електрофореграми казеїнового комплексу (1), препарату  $\beta$ -казеїну після ліофілізації (2) і  $\beta$ -казеїну після очистки на колонці з ДЕАЕ-целюлозою (3)

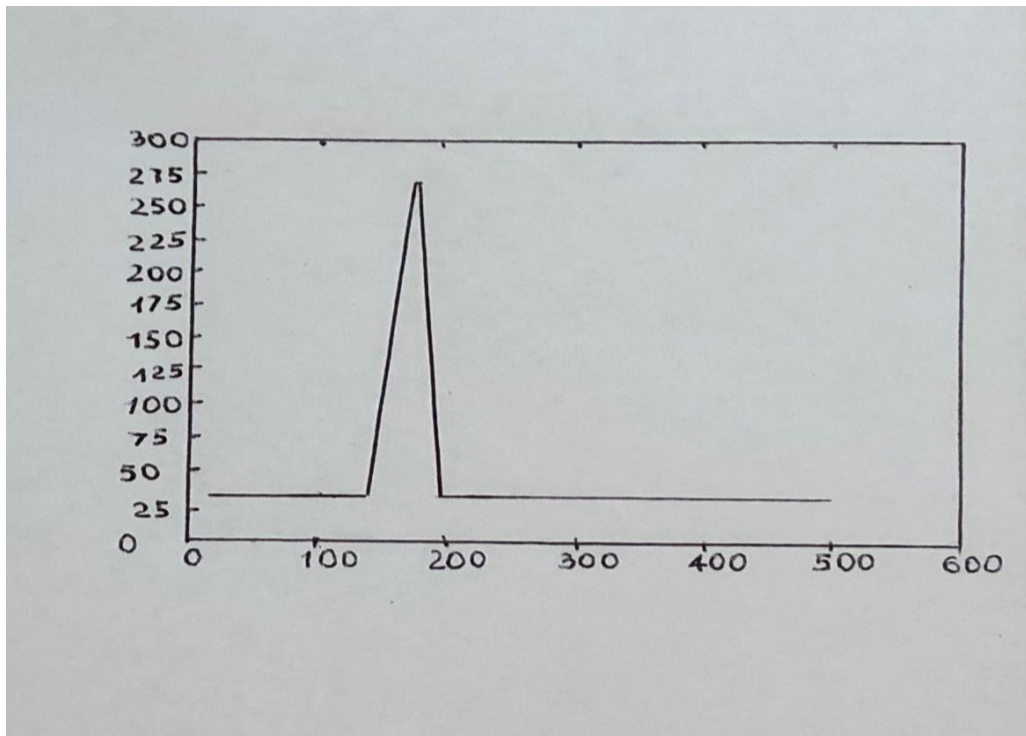


Рис. 13. Денситограма  $\beta$ -казеїну після очистки на колонці з ДЕАЕ-целюлозою

Наступну очистку  $\beta$ -казеїну потрібно виконувати беручи до уваги відмінність в зарядах між  $\beta$ -казеїном і к- та  $\alpha_{s2}$ -казеїнами. Проведені експерименти довели, що при очищенні препарату  $\beta$ -казеїну,  $\alpha_{s1}$ -казеїну, найбільш результативною є іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі. Продукт ліофілизованого  $\beta$ -казеїну (300 мг) розводили в 15 мл хроматографічного буферу (0,01 М імідазол, 3,3 М сечовина, рН 7,0) і вносим в хроматографічну колонку з ДЕАЕ-целюлозою. У такому разі застосували таку ж насиченість, як і при очистці  $\alpha_{s1}$ -казеїну (0 – 0,27 М NaCl), оскільки в продукті  $\beta$ -казеїну знайдені залишки казеїнів, які вивільняються з іонообмінника при високих показниках іонної сили.

Наслідком першого фракціонування  $\beta$ -казеїну у колонці ДЕАЕ-целюлозою представлено на рис. 10. На хроматограмі показано маленьку частку всіх (дивлячись по об'єму виходу) групи білків казеїнового комплексу. Через те в результаті виділені з  $\beta$ -казеїну доцільна повторна хроматографічна очистка його на ДЕАЕ-целюлозі. Деякою мірою це обумовлено подібними зна-

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		62

ченням зарядів молекул  $\kappa$ -казеїнів і  $\beta$ -казеїнів при нейтральних і слаболужних показниках рН. Відмінність зарядів  $\alpha_{s1}$ - і  $\kappa$ -казеїнів значно більша і вони результативніше роз'єднуються під час хроматографії. Щоб одержати гомогенний продукт  $\beta$ -казеїну після однієї хроматографічної очистки не залучають до об'єданого взірця всі фракції  $\beta$ -казеїну (38-44), які можуть мати добавки  $\kappa$ - і  $\alpha_{s1}$ -казеїнів таким чином. Такий загальний взірець (пробірки 39-43) діалізували, сушили ліофільно і вивчали його гомогенність з використанням електрофорезу в анодній системі х ПАГ. Отримані електрофореграми показані на рис. 12 (3). На електрофореграмі явно видно лише смужку  $\beta$ -казеїну, що засвідчує про високий рівень гомогенності продукту. Ліофілізований взірець  $\beta$ -казеїну застосовували для ще однієї хроматографічної очистки. Вимоги хроматографії цілком відповідали умовам першої хроматографічної очистки. Групування відбувалося на цій ж колонці з ДЕАЕ-целюлозою і в цьому ж буфері. Фракціонували 300 мг ліофілізованого  $\beta$ -казеїну, одержаного після першої хроматографічної очистки. Наслідки повторного розділення показані на рис. 11. На хроматограмі показано, що велика частка білка, який виходить з колонки, є  $\beta$ -CN. Інші казеїни знаходяться у залишкових кількостях.

Електрофореграма діалізованого і ліофілізованого згрупованого взірця (пробірки 39 – 43) схожа до попередньої електрофореграми (рис. 12). З цього можна зробити висновок, що при правильному відборі фракцій для об'єданого взірця досить здійснити одну хроматографію.

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
						63
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>		



Відсоток виходу  $\beta$ -казеїну на різних стадіях виділення і очистки

Стадія виділення $\beta$ -казеїну	Концентрація, %	Об'єм фракції, мл	Кількість білка, г	Вихід, %
1.Розчин загального казеїну	1,09	1000	10,9	
2.Розчин $\beta$ -казеїну I	0,51	930	4,75	43,6
3.Розчин осаду $\beta$ -казеїну II	1,55	200	3,10	28,4
4.Розчин осаду $\beta$ -казеїну III	1,32	150	1,98	18,2
5.Розчин $\beta$ -казеїну III	0,97	149	1,45	13,3
6.Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ- целюлозі (нанесено на колонку 300 мг білка)		60	1,70*	56,7
7.Повторна іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ- целюлозі (нанесено на колонку 300 мг)		70	207*	69

\*Узагальнений зразок  $\beta$ -казеїну діалізували, ліофільно висушували і зважували (мг)

В даній таблиці 10 висвітлено вихід  $\beta$ -казеїну під час описаної процедури його виділення на стадіях диференційного осадження із казеїнового комплексу іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі. Порівняно невеличкий вихід  $\beta$ -казеїну після першої стадії очистки можна пояснити тим, що обчислення велося по співвідношенню до первинної кількості застосовуваного загального казеїну, де відсоток  $\beta$ -казеїну становить приблизно 35-38% [9]. Для очистки  $\beta$ -казеїну достатньо проведення одної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі. Беручи до уваги гомогенність виділеної групи  $\beta$ -казеїну (рис. 12) можна обмежитись однією хроматографією.

					Власні дослідження	Арк.
						64
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

### 3.2. Розрахунок економічної ефективності проведених досліджень

Ефективність виробництва як економічна категорія відображує дію об'єктивних економічних законів і проявляється в результативності виробництва. Вона є тією формою, в якій реалізується мета суспільного виробництва. Економічна ефективність показує кінцевий корисний ефект від застосування засобів виробництва і живої праці, а також сукупних їх вкладень. В ефективності виробництва відображується вплив комплексу взаємопов'язаних факторів, які формують її рівень і визначають тенденції розвитку. У зв'язку з цим, для оцінки економічної ефективності виробництва молока використовують відповідний критерій і систему взаємопов'язаних показників, які відбивають вимоги економічних законів і характеризують вплив різних факторів.

Проблема повного й раціонального використання молока існує в усьому світі незалежно від системи економічних взаємин і обсягів виробництва. Сутність її полягає в існуючій традиційній технології виробництва молочних продуктів.

Хімічний склад молока тварин є дуже складний. У молоці містяться білки, вуглеводи, ліпіди, стероїди, вітаміни, ферменти, солі, гази, вода.

Склад і властивості молока залежать в основному від породи і віку корови, лактаційного періоду, годівлі та умов утримання. Вода - середа, в якій розчинені або розподілені всі інші компоненти молока, що утворюють стійку колоїдну систему, що дозволяє піддавати молоко різним технологічним процесам. Ліпіди молока представлені молочним жиром і жироподібними речовинами - фосфоліпідами і стероїдами. Вуглеводи в молоці представлені молочним цукром – лактозою, яка добре засвоюється організмом, надає молоку солодкуватий смак. Мінеральні речовини у молоці становлять 0,8 %. Мінеральні речовини знаходяться у вигляді солей, кислот, йонів, біо-комплексів, входять до складу металоензимів тощо. Вміст білків в молоці корів в середньому становить 3,7%. 78-85% білків представлені казеїном, інша частина сироваткові білки. Найважливішою складовою частиною є білки.

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		65

Білки молока складаються з казеїну, альбуміну і глобуліну. Останній володіє антибіотичними і імунними властивостями, служить джерелом антитіл, які захищають наш організм від інфекції. З казеїном в процесі перетравлення утворюються речовини, що роблять вплив на мозковий кровообіг, тому молоко незамінне для людей, що страждає серцево-судинними захворюваннями.

При сепаруванні молока, виробництві вершкового масла одержують побічний продукт – знежирене молоко. Основними продуктами, які виробляють із знежиреного молока. Є казеїн та сухе знежирене молоко.

Казеїн випускають для різних цілей і він може бути:

1) кислотним – харчовий казеїн, отриманий із використанням у ролі коагулянта кислоти, бактеріальної закваски або сироватки, заквашеної закваскою молочнокислих бактерій;

2) сичуговим – харчовий казеїн, отриманий із використанням для коагуляції знежиреного молока химозину або інших ферментів.

У виробництві кислотного казеїну дозволяється використовувати в ролі коагулянту такі кислоти: молочну, соляну, сірчану, лимонну, оцтову й ортофосфору.

У зв'язку з тим, що на ринку переважає казеїн, що не відповідає вимогам НД за якісними показниками, існує гостра необхідність одержання якісного харчового казеїну. Якість казеїну залежить від правильного ведення технологічного процесу. Поліпшити якість харчового казеїну можливо практично на всіх стадіях його отримання.

Тому, пошук нових технологічних прийомів з метою інтенсифікації процесів виробництва харчового казеїну підвищеної якості одне з актуальних завдань молочної промисловості.

Казеїн молока є основним харчовим білком. Він виконує пластичні функції. Під дією ферментів шлунково-кишкового тракту казеїн максимально розщеплюється у нативному стані, в той час як інші глобулярні білки набувають такої здатності тільки після денатурації. Казеїн згортається у шлунку новонародженого з утворенням згустків високого ступеня дисперсності.

					Власні дослідження	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		66

ті. Крім того, він є джерелом кальцію, фосфору і магнію, а також цілого ряду фізіологічно активних пептидів (зокрема глікомакропептиду), які регулюють процес травлення.

Основна частина казеїну (біля 95%) міститься у вигляді казеїнових міцел і тільки 5% - у вигляді мономерів, полімерів, окремих фракцій і субміцел, які мають розмір менше 20...40 нм. Цю форму називають розчинним казеїном, вона не виділяється з білковою фракцією при ультрацентрифугуванні знежиреного молока. Кількість її залежить від температури і тривалості зберігання молока

Ще наприкінці 70-х років минулого століття було встановлено, що окремі фрагменти первинної структури протеїнів казеїнового комплексу молока, які вивільняються у вигляді пептидів у процесі травлення, можуть мати фізіологічну активність в організмі тварин у період молочного живлення.

Уперше біологічно активні пептиди з протеїнів казеїнового комплексу, дія яких не була безпосередньо пов'язана з процесами травлення, було виділено в 1979 р. у Мюнхені групою Віктора Брантла (Інститут Макса Планка). Шляхом екстрагування в суміші хлороформ-метанол і використання різних видів рідинної хроматографії та гель-фільтрації йому вдалося виділити з ензиматичного гідролізату загального казеїну декілька пептидних препаратів, що були стійкими до дії пронази і виявляли опіоїдну активність. Згодом ці пептиди дістали назву казоморфінів.

У 80-90-ті роки минулого століття було проведено низку досліджень ензиматичних гідролізатів казеїнів, отриманих *in vitro*, гастроінтестинальних гідролізатів, одержаних *in vivo*, а також синтетичних пептидів, які відповідали первинній структурі казеїнів. Дослідження біоактивних пептидів з казеїнів активно проводять і в наш час. Постійно поповнюється база даних щодо біологічно активних пептидів, які утворюються в процесі перетравлювання казеїнів, відкрито нові види біологічної активності (антиканцерогенна дія, стимуляція синтезу ДНК, антивірусна дія і т. д.).

					Власні дослідження	Арк.
						67
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Але виробництво їх ще не налагоджене. Для їх виробництва і широкого застосування необхідно отримати очищені попередники, зокрема  $\beta$ -казеїн. Чому і присвячена моя робота.

					<i>Власні дослідження</i>	Арк.
						68
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>		

## 4. Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях

### 4.1. Охорона праці

*4.1.1. Заходи безпеки при експлуатації електроустановок в цеху, що проектується*

Охорона праці - система збереження життя і здоров'я працівників у процесі трудової діяльності, що включає в себе правові, соціально - економічні, організаційно - технічні, санітарно - гігієнічні, лікувально профілактичні заходи та засоби.

На заводі повинна бути розроблена система проведення інструктажу з техніки безпеки, пожежної безпеки й електробезпечності.

Усі працівники, зайняті при виробництві молочної продукції, включаючи керівників і фахівців виробництв, зобов'язані проходити навчання, інструктажі, перевірку знань по охороні праці відповідно до Порядку навчання по охороні праці і перевірки знань вимог охорони праці працівників організацій.

Працівники повинні проходити обов'язкові попередні (при надходженні на роботу) і періодичні (протягом трудової діяльності) медичні огляди відповідно.

Умови праці на робочих місцях повинні відповідати вимогам діючих нормативних актів, затверджених у встановленому порядку.

На підприємстві створені сприятливі умови санітарно-побутового обслуговування. Зокрема кімната відпочинку, туалет. На підприємстві повинен бути призначений спецодяг. У кожного індивідуальна і підписана. Всі інструктажі на підприємстві проводяться відповідно, по спеціальних програмах.

На теперішній час на міжнародному рівні найефективнішим способом контролю якості і безпеки у виробництві харчових продуктів визнана система аналізу небезпечних факторів ("ризиків") за критичними контрольними точками — Hazard Analysis Critical Control Point (НАССР). Основні вимоги щодо застосування системи НАССР викладені в гармонізованому до міжна-

					<b>ДР 18-153.00.00.004 ПЗ</b>			
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Даньків С.О.			<b>Охорона праці</b>	<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Перевіряв</i>		Юкало В.Г.					69	99
<i>Консульт.</i>		Окіпний І.Б.				<b>ТНТУ, ФМТ, грМЛм-61</b>		
<i>Рецензент</i>		Зварич Н. М.						
<i>Зав каф.</i>		Покотило О.С.						

Родних вимог національному стандарті – ДСТУ ІСО 22000. Система НАССР займає провідне місце у світовому індустріальному виробництві харчових продуктів. Міжнародні організації International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF), Codex Alimentarius тощо рекомендують її як один із кращих методів гарантії безпеки харчової продукції. Були визначені базові елементи системи, гармонізовані з міжнародними стандартами ІСО серії 9000. На більшості зарубіжних підприємствах харчової промисловості систему НАССР застосовують в процесі поточного контролю автоматизованого виробництва харчової продукції.

Основні принципи, закладені в основу даної концепції, не є новими. Наприклад, відомі поняття "епідеміологічно уразливих технологічних етапів" виробництва продуктів, контроль "за ходом технологічного процесу" тощо. Традиційний метод контролю ґрунтується переважно на визначені рівня дотримання встановлених нормативів виробництва харчових продуктів і ґрунтується на результатах аналізу якості і безпечності кінцевих продуктів харчування. Проте традиційному методу властиві недоліки, серед яких можна відмітити деяку суб'єктивність оцінки санітарного стану виробництва, часто нівелювання різниці між важливими і малозначними вимогами і статичність результату обстеження: зауваження і пропозиції стосуються лише окремої частини даного процесу на даний момент часу. Лабораторний аналіз харчової продукції при цьому характеризує здебільше наслідок і не дає чіткого висвітлення його причини і шляхів усунення.

Система НАССР як основа запобіжних заходів для виробництва безпечних продуктів харчування

Проведена оцінка систем контролю за якістю та безпекою харчових продуктів привела до висновку про необхідність здійснення профілактичного підходу, в основі якого покладено принцип критичних контрольних точок під час аналізу небезпечних факторів. З метою уникнення недоліків, властивих традиційному методу, та підвищення дієвості і забезпечення єдності форми і змісту контролю за якістю і безпечністю харчових продуктів в різних країнах, Комісія Codex Alimentarius опублікувала документ "Система аналізу

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
						70
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>		

небезпечного фактору і контрольної критичної точки (НАССР) і керівництво до її застосування", який розцінюється як стандарт. НАССР являє собою динамічну систему контролю виробничого процесу, яка, завдяки проведенню аналізу небезпечних факторів, визначає етапи, на котрих можливо виникнення ризиків. Вона дозволяє позбавитися залежності від мікробіологічних аналізів, приділяючи головну увагу факторам, які безпосередньо впливають на епідемічну безпечність їжі. Її прийняття свідчить про зміщення акценту від перевірки готової продукції до попереджувального контролю критичних моментів у виробництві продукції. Концепція забезпечує системний підхід до ідентифікації небезпечних факторів і оцінки імовірності їх виникнення на усіх етапах виробництва, реалізації і споживання харчових продуктів та визначає засоби їх контролю і попередження випуску небезпечної продукції. Її можна застосувати в усіх галузях харчової промисловості, а також на підприємствах громадського харчування і торгівлі. НАССР – логічна науково - обґрунтована система, яка контролює безпеку харчових продуктів при їх виробництві.

НАССР базується на оцінці ризиків при виробництві продукції та встановленні критичних контрольних точок по контролю за небезпечними факторами.

Небезпечні фактори поділяються на біологічні, фізичні і хімічні.

Першими кроками в розробці НАССР плану є створення групи фахівців до якої повинні входити спеціалістів із складання НАССР плану, представник керівництва підприємства, технолог, лікар ветеринарної медицини, представники з виробництва (працівники). Основою НАССР плану є визначення ССР (Control Critical Points), а саме можливих небезпечних контамінантів, що можуть бути в сировині чи продуктах.

Критичною контрольною точкою (ККТ) може бути сировина, місцевість, технологічна операція, процес, рецептура продукту. Якщо в певній точці технологічної лінії є висока вірогідність виникнення потенційної небезпеки, то така точка вважається критичною.

Аналіз небезпечного фактору – процедура щодо виявлення потенційних

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>		71



небезпек або передумов їх появи в харчових продуктах. Після ідентифікації небезпечних факторів необхідно розробити систему заходів для їх контролю. Система НАССР дає можливість створити на харчовому підприємстві реальну можливість організації і підтримання ефективної та дійової системи оцінки ризику з метою запобігання випуску небезпечної продукції.

Розроблений Міжнародною організацією з стандартизації стандарт ISO 22000: 2005 "Система менеджменту безпеки харчових продуктів" дозволяє об'єднати принципи менеджменту якості з оцінкою та управлінням харчових ризиків. Вимоги стандарту стосуються всіх ланок виробництва харчових продуктів і гарантують відповідність міжнародним вимогам до безпечності. Впровадження стандарту ISO 22000:2005 на підприємствах вітчизняного виробника дозволить інтегрувати принципи НАССР з вимогами до системи менеджменту якості. Дієвість такої системи менеджменту є своєрідним гарантом виробництва якісних та безпечних продуктів харчування.

#### *4.1.2. Гігієнічні вимоги до санітарно – побутових приміщень та пристроїв цеху, що проектується*

Призначення молочних цехів — забезпечувати високу якість видоєного молока і загалом поліпшувати ведення галузі молочного скотарства. Функціями цехів є: первинна обробка молока для збереження його свіжим до здавання на завод або на реалізацію; правильне зберігання молока; запобігання його забрудненню, нагріванню або охолодженню під час транспортування; проведення систематичного обліку видоєного молока, а також вироблених на місцях молочних продуктів; вивчення хімічного складу молока від окремих корів для підвищення їх продуктивності та вдосконалення племінних якостей; забезпечення телят необхідною кількістю знежиреного молока; своєчасне придбання необхідного обладнання та інвентарю для ферми, реактивів і матеріалів для лабораторних аналізів; утримання в чистоті молочного посуду, апаратури й інвентарю, контроль їх санітарного стану; проведення своєчасного ремонту .

					Охорона праці	Арк.
						72
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Основи проектування молочних цехів. При проектуванні молочних цехів слід передбачати: кількість молока, яке підлягатиме обробці, з урахуванням зростання обсягу його виробництва найближчими роками, а також сезонності виробництва, кратності доїння корів, кількості молока для потреб господарства, розміру ферм, кількості корівників та їх розміщення на території ферми чи комплексу. Відповідно до технологічних процесів обробки молока підбирають обладнання, яке розміщують у певній послідовності; здійснюють розрахунок забезпечення цехів гарячою водою, паром і холодом. При проектуванні та будівництві молочних цехів треба дотримувати певних правил.

Так, не можна будувати їх поблизу гноєсховищ, водойм із стічною водою, силосних будівель, вигульних майданчиків для худоби і шосейних доріг. Цехи для приймання та зберігання молока бажано розміщувати з північного або східного боку. Якщо це неможливо зробити, південний бік обсаджують деревами або обладнують навіс над вікнами для захисту від сонячних променів. Молочний цех розміщений в прибудівлі або блоці, відокремлюють від корівника коридором або тамбуром. Двері мають бути рівними, без фільонок, щоб запобігти збиранню на їх поверхні пилу, бруду.

Стіни молочного цеху роблять рівними і непроникними. Нижню частину їх на висоті 1,5 – 1,8 м фарбують масляною фарбою або облицьовують кахлем. Стелю утеплюють, бо на неутепленій узимку утворюється вода, що руйнує перекриття, внаслідок чого погіршується санітарний стан цеху. Підлога має бути вологонепроникною, міцною, легко митися. Кращою є бетонна підлога, а для мийної кімнати — із метласької плитки. Для кращого стоку промивної води підлогу роблять з нахилом у бік каналізаційного трапу, який обладнують гідравлічним затвором. Діаметр каналізаційних труб має бути не менш як 100 мм.

Молочні цехи треба добре вентилювати. Відділення теплової обробки молока, мийну і компресорну обладнують примусовою вентиляцією. Температуру в приміщеннях підтримують на рівні 16 – 18 °С. Тому взимку їх треба опалювати. У молочному цеху мають бути ваги для приймання молока,

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
						73
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		



— початкова і кінцева температури молока, °С;  $i$  — ентальпія пари (640 – 648 кал);  $t$  — температура конденсату, який видаляється (89 – 95 °С);  $n$  — коефіцієнт корисної дії пастеризатора (0,85 – 0,90). Забезпечення молочних цехів холодом. Забезпечити високу якість молока неможливо без холоду. Для визначення джерел холоду та вибору холодильних машин відповідної холодопродуктивності потрібно знати загальну потребу в холоді для охолодження молока або молочних продуктів. З цією метою визначають, яка кількість молока від добового надою підлягає охолодженню за одне доїння, встановлюють температуру молока перед охолодженням і після нього.

## 4.2. Безпека в надзвичайних ситуаціях

### 4.2.1. *Захист продуктів харчування та харчової промисловості в умовах радіоактивного забруднення*

Вперше проблема забруднення харчування та харчової промисловості стала актуальною після катастрофи на Чорнобильській АЕС. Якість продуктів харчування напряму залежить від стану ґрунтів, організації і ведення сільськогосподарського виробництва.

Через роки після катастрофи основний внесок у радіоактивне забруднення сільськогосподарської продукції і, відповідно, в формування дози опромінення населення, забезпечував  $^{137}\text{Cs}$ . Таким чином, організація і ведення сільськогосподарського виробництва на радіоактивно забруднених угіддях України в пізню фазу Чорнобильської аварії обумовлює актуальність розрахунку допустимих рівнів забруднення ґрунтів  $^{137}\text{Cs}$ , які б забезпечували не перевищення у сільськогосподарській продукції та продуктах харчування гігієнічних нормативів вмісту цього радіонукліду.

Вивчення закономірностей та оцінка кількісних характеристик накопичення радіонуклідів рослинністю мають виключно практичне значення для організації сільськогосподарського виробництва та впровадження контрзаходів на території, що зазнала радіоактивного забруднення.

					Охорона праці	Арк.
						75
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

*Основні фактори, що впливають на надходження радіонуклідів в сільськогосподарську продукцію*

Надходження радіонуклідів у врожай сільськогосподарських культур буде суттєво відрізнятися як від типу ґрунту, на якому вони вирощуються, так і від біологічних особливостей різних видів культур і технологій їх вирощування, а також від часу, що минув від початку радіаційної аварії. Наукові дані про вплив типу ґрунту, виду рослин та технології їх вирощування на надходження  $^{137}\text{Cs}$  у сільськогосподарську продукцію дозволяють моделювати процеси його міграції по трофічному ланцюгу людини та прогнозувати забруднення продукції. Розробка радіоекологічно-обґрунтованих нормативів вмісту  $^{137}\text{Cs}$  в основних типах ґрунтів для виробництва в Україні сільськогосподарської продукції, яка б відповідала діючим гігієнічним нормативам ДР-2006 значно спростило б таке прогнозування у віддалений період чорнобильської аварії. Однак, на сьогоднішній день для розробки таких нормативів не вистачає кількісних параметрів переходу  $^{137}\text{Cs}$ , як у ланцюгу «ґрунт-урожай сільськогосподарських культур» для віддаленого періоду після Чорнобильської аварії, так і в ланцюгу «сільськогосподарська сировина-продукти харчування».

Узагальнення даних різних авторів свідчить, що основними факторами, які впливають на надходження радіонуклідів з ґрунту в рослини, є тип та агрохімічні властивості ґрунтів, біологічні особливості рослин та технології вирощування сільськогосподарських культур.

Перехід радіонуклідів з ґрунтового розчину в рослини можна розбити на дві стадії: сорбція з ґрунтового розчину на кореновому обмінному комплексі кліткової стінки і перенос через мембрану рослинної клітини.

Засвоєння радіонуклідів з ґрунту рослинами в процесі їх мінерального живлення залежить у першу чергу від біологічної доступності радіонукліду (наявності його в ґрунті у формах, що визначають інтенсивність первинного поглинання радіонукліду коренями не метаболічним шляхом), яка визначається фізико-хімічною природою нуклідів та агрохімічними властивостями ґрунтів, а

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>		76

також біологічними особливостями культур.

Проведення заходів з запобігання надходження та нагромадження радіонуклідів у сільськогосподарських рослинах і тканинах сільськогосподарських продуктивних тварин в певних умовах може виявитись малоефективним, в зв'язку з чим вміст їх в одержаній продукції може перевищувати допустимі рівні. Проте це не означає, що така продукція повинна бути знищена. За деяких технологічних переробок, які передбачають її розподіл на декілька компонентів, може виявитись, що переважна частина радіонуклідів зосереджується тільки у деяких з них. Нерідко таким компонентом стає не основний, а супутній продукт переробки.

Надзвичайно високий ступінь очищення продукції із дуже забруднених радіонуклідами рослин досягається при одержанні рослинних олій з насіння соняшнику, льону, конопель та інших видів рослин.

Концентрація радіонуклідів в продукції тваринництва також може бути суттєво знижена внаслідок її переробки чи обробки. При цьому досить відчутний ефект може бути досягнутий і при використанні звичайних прийомів. Кращим прикладом є дезактивація молока – основного дозоутворюючого компонента в раціоні людини, особливо дітей. Так, після сепарування цільного коров'ячого молока лише 8–16%  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{131}\text{I}$  та  $^{137}\text{Cs}$  залишається у вершках, а решта переходить до відвійок. Дво-триразове промивання вершків теплою водою та знежиреним молоком зменшує кількість в них  $^{90}\text{Sr}$  ще у 50–100 разів. При переробці вершків на вершкове масло значна частина радіонуклідів переходить до промивних вод. Кількість  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{131}\text{I}$  та  $^{137}\text{Cs}$  у маслі при цьому зменшується до 35, 75 та 50% відповідно їх концентрації у вершках. Перетоплення масла дозволяє видалити з нього практично повністю  $^{90}\text{Sr}$  та  $^{137}\text{Cs}$  і ще 10%  $^{131}\text{I}$ . Переробка молока на знежирений сир веде до зниження вмісту  $^{90}\text{Sr}$  та  $^{137}\text{Cs}$  на 90%, а  $^{131}\text{I}$  – на 70%. Отже, не виникає сумнівів, що з забрудненого радіонуклідами молока доцільно виробляти деякі продукти і в першу чергу вершки та вершкове масло.

Продукти переробки молока відрізняються, іноді досить суттєво, по кіль-

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
						77
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

кості радіонуклідів –  $^{90}\text{Sr}$  концентрується переважно у багатих на білки продуктах, а  $^{137}\text{Cs}$  в основному залишається у сироватці та сколотинах. Оскільки жири не утворюють комплексів із лужними та лужноземельними металами, невелика частка цих радіонуклідів переходить у вершки і зовсім мала – у масло. Із збільшенням жирності вершків та одночасним зменшенням вмісту у них білку зменшується вміст як  $^{90}\text{Sr}$ , так і  $^{137}\text{Cs}$  – першого у 2,7 і другого – у 2,3 рази. Це, однак, не відноситься до йоду, котрий йодує жири, утворюючи з ними міцні сполуки. Саме тому  $^{131}\text{I}$  може концентруватись у маслі, як і в інших жирах. Але, зважаючи на короткий період піврозпаду  $^{131}\text{I}$  (8 діб), витримування забрудненого масла в холодильнику протягом 40–50 діб дозволяє дочекатись практично повного його зникнення в межах допустимого часу зберігання продукту. Величина переходу рН із молока у вершки обчислюється за формулою:  $P_v = P_m K (100 - Ж_v) / (100 - Ж_m)$ , де  $P_v$  і  $P_m$  – вміст рН в одиниці маси вершків і молока;  $K$ - коефіцієнт (для цезію - 1,22, стронцію - 1,29, йоду - 0,9);  $Ж$ - жирність продукції, % (табл.11).

Таблиця 11

Перехід рН з молока в молочні продукти, % вміст у молоці

Вид продукту	$^{90}\text{Sr}$	$^{137}\text{Cs}$	$^{131}\text{I}$
Вершки, жирність % :			
10	36,5	36,5	37,8
20	15,4	15,8	16,8
35	6,6	6,8	8,0
60	1,6	1	3,1
Молочно-кисла закваска	8,1	10,9	21,6
Сичужний фермент	31,0	12,1	22,5
Жирний сир: кислий	8,2	12,2	27,0
Сичужно-кислий	68,8	3,2	53,5
Казеїн сичужний	84,6	1,8	1,8

Існують також засоби, за допомогою яких можна здійснювати очищення молока від радіонуклідів без суттєвої зміни його хімічного складу та властивостей. Застосування пірофосфатів, які зв'язують стронцій, дозволяє протягом доби вилучити з молока до 80%  $^{90}\text{Sr}$ . За допомогою іонообмінних смол можна швидко і досить ефективно очищати молоко і від інших радіонуклідів. Так, один об'єм відомого аніоніту Дауекс 2 дозволяє вилучити більш як 95%  $^{131}\text{I}$  та 50%  $^{90}\text{Sr}$  з 230 об'ємів молока. Створені також установки з очищення молока від  $^{137}\text{Cs}$  шляхом сорбції його на фероціні. Але найбільш ефективним є електродіалізний метод очищення молока, котрий дозволяє вивести з нього до 90%  $^{90}\text{Sr}$ . А при електродіалізі через аніонообмінні мембрани з нього вилучається до 99%  $^{137}\text{Cs}$  і до 70–90%  $^{131}\text{I}$ .

Для оцінки ступеню зниження радіоактивності продукції внаслідок застосування окремих прийомів існує коефіцієнт очищення продукції (КОП) від радіонуклідів, який визначається відношенням питомої радіоактивності одержаного внаслідок обробок чи переробок продукту до питомої радіоактивності сирого матеріалу. Фактично це різновид коефіцієнту переходу (КП).

На цьому можна завершити розгляд окремих прийомів щодо особливостей ведення сільськогосподарського виробництва на забруднених радіонуклідами територіях. Викладений матеріал свідчить, що стратегія виробництва продукції рослинництва і тваринництва з мінімальним вмістом радіоактивних речовин – це багатоешолонований комплекс радіозахисних заходів протягом всього харчового ланцюжка на шляху їх до людини. Ця стратегія передбачає найактивніше втручання спеціалістів сільського господарства у всі ланки цього ланцюжка: ґрунт–рослина, рослина (корми) – тварина, продукція рослинництва і тваринництва–людина з метою блокування переходу і накопичення радіонуклідів у кінцевому продукті. І чим на більш ранньому етапі цього переходу дане завдання буде вирішене, тим ефективнішим буде захист людини від дії іонізуючої радіації.

Значення допустимих рівнів встановлені, виходячи з того, що вміст рН у

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		79



продуктах харчування забезпечує не перевищення річної дози внутрішнього опромінювання 1мЗв. При цьому опромінення внаслідок надходження інших техногенних і природних рН не враховується. Допустимі рівні вмісту радіонуклідів  $^{137}\text{Cs}$  і  $^{90}\text{Sr}$  в харчових продуктах і питній воді наведені в табл.1.

Продукти харчування придатні до реалізації і вживання, якщо виконується співвідношення:  $+ \leq 1 \text{ Sr Sr Cs Cs ДР С ДР С}$ , де  $C_{\text{Cs}}$  і  $C_{\text{Sr}}$  — результати вимірювання питомої активності РН в даному харчовому продукті;  $\text{ДРС}_{\text{Cs}}$  і  $\text{ДРС}_{\text{Sr}}$  — нормативний вміст  $^{137}\text{Cs}$  і  $^{90}\text{Sr}$  в даному харчовому продукті.

У випадку не виконання умов співвідношення, реалізація продукту і його вживання заборонені.

					<i>Охорона праці</i>	Арк.
						80
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

## 5. Екологія

### 5.1. Забруднення по виробництву казеїну

Проблема повного і раціонального використання молока існує в усьому світі незалежно від системи економічних взаємин і обсягів виробництва. Ця проблема має помітну екологічну складову. Сутність її полягає в існуючій традиційній технології виробництва молочних продуктів.

При сепаруванні молока, виробництві вершкового масла одержують побічний продукт – знежирене молоко. При виробництві 1 т вершкового масла одержують 20т знежиреного молока. Основними продуктами, які виробляються із знежиреного молока, є казеїн та сухе знежирене молоко.

Кількість казеїну на споживчому ринку залишається досить високою. У Європі, не зважаючи на те, що виробництво казеїну сьогодні скорочується, накопичені великі запаси товару. Попит на казеїн низький завдяки високим цінам на товар і здебільшого низьку якість, яка не відповідає вимогам.

Найбільшими виробниками казеїну на сьогодні є: Нова Зеландія, Австралія, Аргентина, Франція, на частку яких припадає 90% світового виробництва й експорту.

У зв'язку з тим, що на ринку переважає казеїн, який не відповідає вимогам НД за якісними показниками, існує гостра необхідність одержання якісного харчового казеїну. Якість казеїну залежить від правильного ведення технологічного процесу.

Поліпшити якість харчового казеїну можливо практично на всіх стадіях його отримання (сепарування, коагуляція, відділення сироватки й промивання зерна, пресування, дроблення (гранулювання) й сушіння).

Одним з основних і важливих факторів, що впливають на якість казеїну є процес сушіння.

					<b>ДР 18-153.00.00.005 ПЗ</b>			
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>Екологія</b>	<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Розроб.</i>		Даньків С.О.						
<i>Перевіряв</i>		Юкало В.Г.					81	99
<i>Консульт.</i>		Зварич Н.М.				<b>ТНТУ, ФМТ, грМЛМ-61</b>		
<i>Рецензент</i>		Зварич Н. М.						
<i>Зав. каф.</i>		Покотило О.С.						



всім основним вимогам, які ставляться до сушильних установок.

Тому, пошук нових технологічних прийомів з метою інтенсифікації процесів виробництва харчового казеїну підвищеної якості, а також виключення забруднення стоків при виробництві казеїну – одне з актуальних завдань молочної промисловості.

Казеїн - важливий харчовий продукт. Використовується казеїн у деяких добавках до раціону, призначених для збагачення його білком. Такі добавки часто пропонуються при різних патологічних станах, наприклад, при важких опіках, лихоманці або затяжних захворюваннях. Казеїн знаходить різноманітне застосування в промисловості. Його використовують як водостійку речовину, що забезпечує адгезію клею на поверхнях, що склеюються, як єднальну речовину у виробництві клейових фарб і при проклеюванні паперу, а також як стабілізатори в різних емульсіях.

Харчовий казеїн використовується на молочних, м'ясних і кондитерських підприємствах як білковий наповнювач, що поліпшує якість готового продукту. У харчових цілях він звичайно переробляється в казеїнати натрію й калію

Випускають: 1. кислотний казеїн - харчовий казеїн, отриманий з використанням для коагуляції знежиреного молока кислоти, бактеріальної закваски або сироватки, сквашеної закваскою молочнокислих бактерій; 2. сичужний казеїн - харчовий казеїн, отриманий з використанням для коагуляції знежиреного молока молокозсідальних ферментів. У виробництві кислотного казеїну дозволяється використовувати в ролі коагулянту такі кислоти: молочну, соляну, сірчану, лимонну, оцтову й ортофосфорну.

## 5.2. Методи по знешкодженню казеїну

Кислотний метод одержання казеїну потребує суттєвих матеріальних затрат для знешкодження відходів технологічного процесу осадження казеїну і забезпечення його екологічності, але не гарантує без використання додаткових знезаражувальних процедур відсутність шкідливих бактерій у одержаному продукті. Цих недоліків позбавлений даний спосіб осадження казеїну при

					Екологія	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		83

використанні плазмового розряду. В цьому способі осадження казеїну дія екологічно агресивних коагулянтів замінюється дією продуктів обробки сировини (молока) плазмовим розрядом. Під дією холодної плазми електричного розряду утворюється хімічно активні частки, що поступають у сировину. Під дією не рівноважних іонів у речовині відбувається процес коагуляції речовини і паралельно проводиться її знезараження, що приводить до зменшення кількості бактерій. Через час, що перевищує час життя іонів, одержані продукти стають екологічно нейтральними і не потребують додаткової обробки для їх утилізації.

					<i>Екологія</i>	Арк.
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>		84

## Висновки і пропозиції виробництву

1. В результаті диференційного фракціонування казеїнового комплексу отримано препарат  $\beta$ -казеїну. Електрофоретичний аналіз показав в його складі мінорні домішки  $\alpha_{s2}$ -казеїнів, а також  $\kappa$ -казеїн.

2. В результаті іонообмінної хроматографії препарату  $\beta$ -казеїну отримано гомогенний  $\beta$ -казеїн без домішок інших казеїнових фракцій.

3. Отриманий гомогенний  $\beta$ -казеїн можна рекомендувати для виділення з нього біологічно-активних пептидів.

Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
					<i>ДР 18-153.00.00.000 ПЗ</i>			
Розроб.		Даньків С.О.			<i>Висновки і пропозиції виробництву</i>	Лит.	Лист	Листів
Перевіпив		Юкало В.Г.					85	99
Консульт.						<i>ТНТУ, ФМТ, грМЛМ-61</i>		
Рецензент		Зварич Н. М.						
Зав. каф.		Покотило О.С.						

## Список використаної літератури

1. Бурлака В.А., Борщенко В.В., Кривий М.М. Біологія продуктивності сільськогосподарських тварин: Курс лекцій. – Житомир: Вид-во ЖДУ ім. І.Франка, 2012. – 191 с.
2. Злодійка М. Ф., Фролов В. П., Серко С. А .. Ветеринарно-санітарна експертиза з основами технології стандартизації продуктів жівотноводства., 2007.
3. «ФАРМАЦЕВТ ПРАКТИК. Наука. Практика. Життя », №5–6, 2014 р.
4. Здоров'я та молоко [Електронний ресурс]// Каталог статей 04.03.2019 р. Режим доступу: <https://catalogueofarticles.com/uk/sport-ta-zdorovya/zdorovya-ta-moloko/> (дата звернення 06.10.2019). Назва з екрану.
5. Хімічний склад молока. Фізико-хімічні властивості молока [Електронний ресурс] // Студопедія 01.11.2014 р. Режим доступу: [https://studopedia.su/10\\_4750\\_himichniy-sklad-moloka.html](https://studopedia.su/10_4750_himichniy-sklad-moloka.html) (дата звернення 06.10.2019). Назва з екрану.
6. Дисертація на тему: „Розробка технології альбумінового сиру „Урда” із молока різних видів тварин [Електронний ресурс] / О. Я. Білик, 2016. Режим доступу: [https://www.onaft.edu.ua/download/dissertation/thesis/disser\\_Bilyk.pdf](https://www.onaft.edu.ua/download/dissertation/thesis/disser_Bilyk.pdf) (дата звернення 06.10.2019). Назва з екрану.
7. Чагаровський О. П. Хімія молочної сировини : навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / О. П. Чагаровський, Н. А. Ткаченко, Т. А. Лисогор. – Одеса : Сімекс-прінт, 2013. – 268 с.
8. Горбатова К. К. Фізико-хімічні та біохімічні основи виробництва молочних продуктів. - СПб .: ГИОРД, 2003.

					<i>ДР 18-153.00.00.000 ПЗ</i>											
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Список використаної літератури  <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;"><i>Лит.</i></td> <td style="text-align: center;"><i>Лист</i></td> <td style="text-align: center;"><i>Листів</i></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">   </td> <td style="text-align: center;">86</td> <td style="text-align: center;">99</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;"><i>ТНТУ, ФМТ, грМЛм-61</i></td> </tr> </table>			<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>		86	99	<i>ТНТУ, ФМТ, грМЛм-61</i>		
<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>														
	86	99														
<i>ТНТУ, ФМТ, грМЛм-61</i>																
<i>Розроб.</i>	<i>Даньків С.О.</i>															
<i>Перевірів</i>	<i>Юкало В.Г.</i>															
<i>Консульт.</i>																
<i>Рецензент</i>	<i>Зварич Н. М.</i>															
<i>Зав каф.</i>	<i>Покотило О.С.</i>															

9. H. M. Farrell, Jr., R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, L. K. Creamer, C. L. Hicks, C. M. Hollar, K. F. Ng-Kwai-Hang, and H. E. Swaisgood. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *J. Dairy Sci.* 87:1641–1674.
10. Eigel, W. N., J. E. Butler, C. A. Ernstrom, H. M. Farrell, Jr., V. R. Harwalkar, R. Jenness, and R. M. Whitney. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *J. Dairy Sci.* 67:1599–1631.
11. Ribadeau-Dumas, B., G. Brignon, F. Grosclaude, and J.-C. Mercier. 1972. Structure primaire de la casein  $\beta$  bovine. *Eur. J. Biochem.* 25:505–514.
12. Jimenez-Flores, R., Y. C. Kang, and T. Richardson. 1987. Cloning and sequence analysis of bovine  $\beta$ -casein cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 142:617–621.
13. Stewart, A. F., J. Bonsing, C. W. Beattie, F. Shah, I. M. Willis, and A. G. Mackinlay. 1987. Complete nucleotide sequences of bovine  $\alpha$ 2- and  $\beta$ -casein cDNAs: Comparisons with related sequences in other species. *Mol. Biol. Evol.* 4:231–241.
14. Bonsing, J., J. M. Ring, A. F. Stewart, and A. G. Mackinlay. 1988. Complete nucleotide sequence of the bovine  $\beta$ -casein gene. *Aust. J. Biol. Sci.* 41:527–537.
15. Yan, S. C. B., and F. Wold. 1984. Neoglycoproteins: In vitro introduction of glycosyl units at glutamines in  $\beta$ -casein using transglutaminase. *Biochemistry* 23:3759–3765.
16. Carles, C., J.-C. Huet, and B. Ribadeau-Dumas. 1988. A new strategy for primary structure determination of proteins: Application to  $\beta$ -casein. *FEBS Lett.* 229:265–272.
17. Groves, M. L. 1969. Some minor components of casein and other phosphoproteins in milk. A review. *J. Dairy Sci.* 52:1155–1165.
18. Gouldsworthy, A. M., J. Leaver, and J. M. Banks. 1996. Application of a mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 6:781–791.

					<i>Список використаної літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		87



19. Visser, S., C. J. Slangen, F. M. Lagerwerf, W. D. Vandongen, and J. Haverkamp. 1995. Identification of a new genetic variant of bovine  $\beta$ -casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis. *J. Chromat. A* 711:141–150.
20. Dong, C., and K. F. Ng-Kwai-Hang. 1998. Characterization of a nonelectrophoretic genetic variant of  $\beta$ -casein by peptide mapping and mass spectroscopic analysis. *Int. Dairy J.* 8:967–972.
21. Han, S.K., Y.C. Shin, and H.D. Byun. 2000. Biochemical, molecular and physiological characterization of a new  $\beta$ -casein variant detected in Korean cattle. *Anim. Genet.* 31:49–51.
22. Grosclaude, F., M.F. Mahe', and B. Ribadeau-Dumas. 1973. Structure primaire de la caseine  $\alpha$ 1-et de la caseine  $\beta$ -bovine. *Eur. J. Biochem.* 40:323–324.
23. Senocq, D., D. Molle', S. Pochet, J. Le'onil, D. Dupont, and D. Leveux. 2002. A new bovine  $\beta$ -casein genetic variant characterized by a Met93  $\rightarrow$  Leu93 substitution in the sequence A2. *Lait* 82:171–180.
24. Jann, O., G. Ceriotti, A. Caroli, and G. Erhardt. 2002. A new variant in exon VII of the bovine  $\beta$ -casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* 119:65–68.
25. Aoki, T., N. Yamada, and Y. Kako. 1990. Relation between colloidal calcium phosphate cross-linkage and release of  $\beta$ -casein from bovine casein micelles on cooling. *Agric. Biol. Chem.* 54:2287–2292.
26. Kumosinski, T. F., E. M. Brown, and H. M. Farrell, Jr. 1993b. Threedimensional molecular modeling of bovine caseins: an energy minimized  $\beta$ -casein structure. *J. Dairy Sci.* 76:931–945.
27. Choi, B.K., and R. Jimenez-Flores. 1996. Study of putative glycosylation sites in bovine  $\beta$ -casein introduced by PCR-based site-directed mutagenesis. *J. Agric. Food Chem.* 44:358–364.
28. Столяр О. Б. Біохімія. Курс лекцій: Навчальний посібник / О. Б. Столяр. – Тернопіль.: Карп'юка. 2001. – с. 247.

					<i>Список використаної літератури</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		88

29. Юкало А. В. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів / А. В. Юкало, Л. А. Сторож, В. Г. Юкало // *Biotechnologia Acta*. - 2012. - Т. 5, № 4. - С. 21-33.
30. Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов. — СПб: Гиорд, 2001. — 320 с.
31. Черников М. П. Протеолиз и биологическая ценность белков (казеины как собственно пищевые белки). — М.: Медицина, 1975. — 231 с.
32. Черников М. П., Никольская Г. В., Стан Е. Я. Гидролиз казеина и некоторых его компонентов протеиназами желудочно-кишечного тракта // *Биохимия*. — 1967. — Т. 32, № 6. — С. 1122–1127.
33. Стан Е. Я. Казеины молока и их физиологически активные пептиды // *Вопр. питания*. — 1987. — № 1. — С. 3–9.
34. Brantl V., Teschemacher H., Henschen A., Lottspeich F. Novel opioid peptides derived from casein ( $\beta$ -Casomorphins) 1. Isolation from bovine casein peptone // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* — 1979. — V. 360, N 9. — P. 1211–1216.
35. Brantl V., Teschemacher H. A material with opioid activity in bovine milk and milk products // *Naunyn — Schmiedebergs Archiv fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. — 1979. — V. 306. — P. 301–304.
36. Brantl V., Pfeiffer A., Herz A. Antinociceptive potencies of  $\beta$ -Casomorphin analogs as compared to their affinities towards  $\mu$  and  $\delta$  opiate receptor sites in brain and periphery // *Peptides*. — 1982. — V. 3. — P. 793–797.
37. Brantl V., Neubert K. Opioid peptides derived from food proteins // *Trends Pharmacol. Sci.* — 1986. — V. 7, N 1. — P. 6–7.
38. Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins // *Biopolymers*. — 1997. — V. 43, N 1. — P. 119–128.
39. Meisel H. Overview on milk proteinderived peptides // *Int. Dairy Journal*. — 1998. — V. 8. — P. 363–373.

					Список використаної літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		89

40. Meisel H., Bochemann W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and throphofunctional properties // *Antonie van Leeuwenhoek*. — 1999. — V. 76. — P 207–215.
41. Dziuba J., Minkiewicz P., Nalecz D., Iwaniak A. Database of biologically active peptide sequences // *Nahrung*. — 1999. — V. 43, N 3. — P. 190–195
42. Юкало В. Г., Шуляк Т. Л. Протеолиз казеинов ферментами молочнокислих бактерий // Тез. докл. Всесоюз. конф. «Химические превращения пищевых полимеров». — Калининград: ИНЭОС АН СССР. — 1991. — С. 22.
43. Silva S. V., Malcata F. X. Caseins as source of bioactive peptides // *Intern. Dairy J.* — 2005. — V. 15. — P. 1–15.
44. Hartmann R., Meisel H. Food derived peptides with biological activity: from research to food applications // *Curr. Opin. Biotech nol.* — 2007. — V. 18. — P. 163–169.
45. Haque E., Chand R., Kapila S. Biofunctional Properties of Bioactive Peptides of Milk Origin // *Food Rev. Intern.* — 2009. — V. 25, N 1. — P. 28–43.
46. Srinivas S., Prakash V. Bioactive Peptides from Bovine Milk  $\alpha$ -Casein: Isolation, Characterization and Multifunctional properties // *Intern. J. Pept. Res. Therap.* — 2010. — V. 16. — P. 7–15.
47. Ramabadran K., Bansinath M. Pharmacology of  $\beta$   $\beta$ casomorphins, opioid peptides derived from milk proteins // *Asia-Pacific J. Pharmacol.* — 1989. — V. 4. — P. 45.
48. Chang K. J., Killian A., Hazum E. Morphiceptine (NH<sub>4</sub>-Tyr-Pro-Phe-Pro-CONH<sub>2</sub>): a potent and specific agonist for morphine ( $\mu$ ) receptors // *Science*. — 1981. — V. 212, N 4490. — P. 75-77.
49. Schlimme E., Meisel H. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects // *Nahrung*. — 1995. — V. 39, N 1. — P. 1-20.
50. Yoshikawa M., Yoshimura T., Chiba H. Opioid peptides from milk proteins // *Agric. Biol. Chem.* — 1984. — V. 48, N 12. — P. 3185–3187.

					Список використаної літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		90

51. Fiat A. M., Jolles P. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. // Mol. Cell. Biochem. —1989. — V. 87. — P. 5–30.
52. Loukas S., Varoucha D., Zioudrou C. Opioid activities and structures of  $\alpha$ -casein —derived exorphins // Biochemistry. — 1983. — V. 22, N 19. — P. 4567–4573.
53. Zioudrou C., Streaty R. A., Klee W. A. Opioid peptides derived from food proteins (The Exorphins ) // J. Biol. Chem. — 1979. — V. 254, N 7. — P. 2446–2449.
54. Mierke D. F., Nobner G., Schiller P. W. Morphiceptin analogs containing 2-aminocyclopentane carboxylic acid as a peptidomimetic for proline // Intern. J. Pept. Prot. Res. — 1990. — V. 35, N 1. — P. 35–45.
55. Brandsch M., Brust P., Neubert K.  $\beta$ -Casomorphins — chemical signals of intestinal transport system /  $\beta$ -Casomorphins and related peptides: recent developments. — Weinheim: VCH, 1994. — P. 207-219.
56. Meisel H., FitzGerald R. J. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences // Brit. J. Nutr. — 2000. — V. 84, Suppl. 1. — S. 27-31.
57. Pfeuffer M., Barth C.A. Influence of casomorfin on plasma lipid levels and lipid secretion rates // Milchwissenschaft. — 1988. — V. 43, N 10. — P. 643–645.
58. Schusdziarra V., Schick R., Dela Fuente A. Effect of  $\beta$ -casomorphins and analogs on insuline release in dogs // Endocrinology. — 1983. — V. 112. — P. 1948–1951.
59. Teschemacher H. Opioid receptor ligands derived from food proteins // Curr. Pharmaceut. Design. — 2003. — V. 9, N 16. — P. 1331–1344.
60. Assargard U., Larsson C., Norby U. Human  $\beta$ -casomorphin\_5 containing peptides in human body fluids /  $\beta$ -Casomorphins and related peptides: recent developments. — Weinheim: VCH, 1994. — P. 247–254.

					Список використаної літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		91

61. Koch K., Wiedemann K., Drebes E. Human  $\beta$ -casomorfins-8 immunoreactive material in the plasma of women during pregnancy and after delivery // Reg. Pept. — 1998. — V. 20. — P. 107–117.
62. Teschemacher H., Koch G., Brantl V. Milk protein — derived opioid receptor ligands // Biopolymers. — 1997. — V. 43. — P. 99–117.
63. Teschemacher H., Umbach M., Hamel V. No evidence for the presence of beta — casomorphins in human plasma after ingestion of cows milk or milk products // J. Dairy Res. — 1986. — V. 53. — P. 135–138.
64. Ганонг В. Ф. Фізіологія людини: Пер. з англ. — Львів: БаК, 2002. — 784 с.
65. Maruyama S., Suzuki H. A peptide inhibitor of angiotensin-I-converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein // Agric. Biol. Chem. — 1982. — V. 46. — P. 1393–1394.
66. Meisel H. Casokinins as bioactive peptides in the primary structure of casein / Food Proteins — Structure Functionality. — New York: VCN Wehheim, 1993. — P. 67–75.
67. Fitzgerald R. J., Meisel H. Milk protein — derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme // Brit. J. Nutr. — 2000. — V. 84, Suppl. 1. — P. 33–37.
68. Maruyama S., Mitachi H., Awaja J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory of the C-terminal hexapeptide of casein // Agric. Biol. Chem. — 1987. — V. 51. — P. 2557–2561.
69. Yamamoto N., Akino A., Takano T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP 790 // J. Dairy Sci. — 1994. — V. 77. — P. 917–922.
70. Karaki H., Doi K., Sugano S. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats // Comp. Biochem. Physiol. — 1990. — V. 96. — P. 367–371.

					Список використаної літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		92

71. Sekiya S., Kobayashi Y., Kita E. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers // J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci. — 1992. — V. 45. — P. 513–517.
72. Adibi S. A. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption // J. Clin. Invest. — 1971. — V. 50. — P. 2266–2275.
73. Hara H., Funabiki R., Iwata M., Yamazuki K. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions // J. Nutr. — 1984. — V. 114. — P. 1122–1129.
74. Maeno M., Yamamoto N., Takano T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP 790 // J. Dairy Sci. — 1996. — V. 79, N 8. — P. 1316–1321.
75. Юкало В. Г. Вплив продуктів протеолізу  $\alpha$ S1-казеїну на активність ангіотензин-перетворюючого ферменту // Укр. біохім. журн. — 2001. — Т. 73, № 5. — С. 28–32.
76. Yukalo V. G. Casokinins: their generation and usage // Nutra Bayers Guide. — Milano. Italy: B5 Srl. — 2004. — P. 10–12.
77. Yukalo V. G., Luhovyy B. L. The obtaining of bioactive peptide material from proteolysis  $\alpha$ S-and  $\beta$ -casein // Abstracts of the 27th European Peptide Symposium: Journal of Peptide Science — 2002. — Suppl. to V. 8. — P. 185.
78. Yukalo V. G., Luhovyy B. L. Proteolysis of  $\alpha$ S1- and  $\beta$ -caseins by Lactococci // Ernahrungsforschung. — 2000. — V. 45, N 3. — P. 205–206.
79. Юкало В. Г., Луговий Б. Л. Утворення антигіпертензивних пептидів при модельному протеолізі  $\beta$ -казеїну // Фізіол. журн. — 2000. — № 3. — С. 78–83.
80. Юкало В. Г. Модельна протеолітична система для виділення біоактивних пептидів з протеїнів казеїнового комплексу // Мат. ІХ Укр. біохім. з'їзду. — К.: ІБ НАН України. — 2006. — С. 236.

					Список використаної літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		93

81. Kayser H., Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins // FEBS Lett. — 1996. — V. 383. — P. 18–20.
82. Jolles P., Fiat A. M., Migliore)Samour D. Et al. Peptides from milk proteins implicated in infant nutrition. — New York: Thieme medical publications, 1992. — P. 53–57.
83. Gill H. S., Dull F., Rutherford K. J., Cross M. L. Immunoregulatory peptides in bovine milk // Brit. J. Nutr. — 2000. — V. 84, Suppl. 1. — P. 111–117.
84. FitzGerald R. J. Potential uses of caseinophosphopeptides // Int. Dairy J. — 1998. — V. 8. — P. 451–457.
85. West D. W. Phosphopeptides and calcium absorption // Dairyng in a changing world. — Brussels, Belgium: Int. Dairy Feder., 1990. — P. 1208–1216.
86. Holt C., Timmins P. A., Errington N., Leaver J. A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by beta-casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron-scattering measurements // Eur. J. Biochem. — 1998. — V. 252. — P. 73–78.
87. Holt C., Wahlgren N. M., Drakenberg T. Ability of a  $\beta$ -CN phosphopeptide to modulate the precipitation of calcium phosphate by forming amorphous dicalcium phosphate nanoclusters // Biochem. J. — 1996. — V. 314. — P. 1035–1039.
88. Sato R., Shindo M., Gunshin H. et al. Characterization of phosphopeptide derived from bovine  $\beta$ -casein: an inhibitor to intraintestinal precipitation of calcium phosphate // Biochim. Biophys. Acta. — 1991. — V. 1077. — P. 413–415.
89. Mc Donagh D., FitzGerald R. J. Production of caseinophosphopeptides (CPPS) from sodium caseinate using a range of commercial protease preparations // Int. Dairy J. — 1998. — V. 8. — P. 39–45.
90. Perich J. W., Kelly D. P., Reynolds E. C. Efficient solution-phase synthesis of phosphopeptides related to casein and stratherin // Int. J. Pept. Prot. Research. — 1992. — V. 40. — P. 81–88.

					Список використаної літератури	Арк.
						94
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

91. Lee Y. S., Noguchi T., Naito H. Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet // *Brit. J. Nutr.* — 1980. — V. 43. — P. 457–467.
92. Chabance B., Marteau P., Rambaud J. C. et al. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt // *Biochimie.* — 1998. — V. 80, N 2. — P. 155–165.
93. Brommage R., Juillerat M., Jost R. Influence of casein phosphopeptides and lactulose on intestinal calcium absorption in adult female rats // *Lait.* — 1991. — V. 71. — P. 173–180.
94. Kitts D. D., Yuan Y. V. Casein phosphopeptide and calcium bioavailability // *Trends Food Sci. Technol.* — 1992. — V. 3. — P. 31–35.
95. Kopra N., Seholz)Ahrens K. E., Barth C. A. Effect of casein phosphopeptides on utilization of calcium in vitamin D-replete and vitamin D-deficient rats // *Milchwiss.* — 1992. — V. 47. — P. 488–493.
96. Pointellart A., Gueguen L. Absence d'effet de l'incorporation d'un phosphopeptide du lait sur l'utilisation du calcium et du phosphore chez le jeune porc // *Repr. Nutr. Develop.* — 1989. — V. 29. — P. 477–486.
97. Berrocal R., Chanton S., Juillerat M. et al. Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilisation of calcium // *J. Dairy Res.* — 1989. — V. 56. — P. 335–341.
98. Juilierat M. A., Beachler R., Berrocal R. et al. Tryptic phosphopeptides from whole casein. I. Preparation and analysis by FPLC // *J. Dairy Res.* — 1989. — V. 56. — P. 603–611.
99. Kasai T., Iwasaki R., Tanaka M., Kiriya S. Casein phosphopeptides (CPP) in faeces and contents in digestive tract of rats fed casein and CCP preparations // *Biosci. Biotech. Biochem.* — 1995. — V. 59. — P. 26–30.
100. Fitzgerald RJ, Murray BA: Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int J Dairy Technol* 2006, 59:118-125.

					<i>Список використаної літератури</i>	<i>Арк.</i>
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>		95



101. Meisel H, Bernard H, Fairweather-Tait S, FitzGerald RJ, Hartmann R, Lane CN, McDonagh D, Teucher D, Wal JM: Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. *Br J Nutr* 2003, 89:351-358.

102. Meisel H, Bernard H, Fairweather-Tait S, FitzGerald RJ, Hartmann R, Lane CN, McDonagh D, Teucher D, Wal JM: Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. *Br J Nutr* 2003, 89:351-358.

103. Shen P, Cai F, Nowicki A, Vincent J, Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res* 2001, 80:2066-2070.

104. Nakai S, Alizadeh-Pasdar N: Rational designing of bioactive peptides. In *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. Edited by Mine V, Shahidi F. Taylor & Francis; 2006:565-582.

105. Meisel H, Walsh DJ, Murray BA, FitzGerald RJ: ACE inhibitory peptides. In *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. Edited by Mine V, Shahidi F. Taylor and Francis; 2006:269-315.

106. Dziuba J, Iwaniak A: Database of protein and bioactive peptide sequences. In *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. Edited by Mine V, Shahidi F. Taylor & Francis; 2006:543-563.

107. Prak K, Maruyama Y, Maruyama N, Utsumi S: Design of genetically modified soybean proglycinin A1aB1b with multiple copies of bioactive peptide sequences. *Peptides* 2006, 27:1179-1186.

108. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003b). Bioactive peptides: Novel applications for milk proteins. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, 1, 133–144.

109. Martin-Orue, C., Henry, G., & Bouhallab, S. (1999). Tryptic hydrolysis of k-caseinomacropeptide: Control of the enzymatic reaction in a continuous membrane reactor. *Enzyme Microbiology and Technology*, 24, 173–180.

110. Perea, A., & Ugalde, U. (1996). Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. *Enzyme Microbiology and Technology*, 18, 29–34.

					<i>Список використаної літератури</i>	<i>Арк.</i>
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>		96

111. Bouhallab, S., & Touze', C. (1995). Continuous hydrolysis of caseinomacropeptide in a membrane reactor: Kinetic study and gram-scale production of antithrombotic peptides. *Lait*, 75, 251–258.

112. Gauthier, S. F., & Pouliot, M. (1996). Use of ultrafiltration for the preparation of enzymatic hydrolysates from milk proteins. *IDF Bulletin*, 311, 31–32.

113. Bordenave, S., Sannier, F., Ricart, G., & Piot, J. M. (1999). Continuous hydrolysis of goat whey in an ultrafiltration reactor: Generation of alpha-lactorphin. *Preparatory Biochemistry and Biotechnology*, 29, 189–202.

114. Righetti, P. G., Nembri, F., Bossi, A., & Mortarino, M. (1997). Continuous enzymatic hydrolysis of beta-casein and isoelectric collection of some of the biologically active peptides in an electric field. *Biotechnology Progress*, 13, 258–264.

115. Turgeon, S. L., & Gauthier, S. F. (1990). Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process: Production and characterization. *Journal of Food Science*, 55, 106–110.

116. Pihlanto-Leppäla", A., Koskinen, P., Paakkari, I., Tupasela, T., & Korhonen, H. (1996). Opioid whey protein peptides obtained by membrane filtration. *IDF Bulletin*, 311, 36–38.

117. Pihlanto-Leppäla", A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., & Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67, 53–64.

118. Ellega°rd, K. H., Gammelga°rd-Larsen, C., So°rensen, E. S., & Fedosov, S. (1999). Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive casein phosphopeptides. *International Dairy Journal*, 9, 639–652.

119. Recio, I., & Visser, S. (1999). Two ion-exchange methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin—in situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography*, 831, 191–201.

120. Recio, I., Floris, R., & Visser, S. (2000). Bioactive peptides from food proteins: A new isolation method. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*, 2, 9–11.

					Список використаної літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		97

121. Loren S. Ward and Eric D. Bastian (1996). A Method for isolating  $\beta$ -Casein. International Dairy Journal. 79:1332-1339.
122. Mulvihill, DM and FOX, PF 1994. Developments in the production of milk proteins. In New and Developing Sources of Food Proteins, Hudson, B.J.F, ed., Chapman and Hall, London, pp 1-30.
123. Ward, LS and Bastian, ED 1996. A new method for isolating  $\beta$ -casein. J. Dairy Sci. 79: 1332-1339.
124. Yada R. Y.(2004) Proteins in food processing. Woodhead Publishing. pp 37-39.
125. Юкало В.Г. Гель-фільтрація білків казеїнового комплексу // Медична хімія. – 2001. – Т.3, №2. – С. 35 – 38.
126. Walstra P.W., On the stability of casein micelles // J. Dairy Sci. – 1990. – Vol. 73, №8. – P. 1965 – 1979.
127. Thompson M.P., Kiddy C.A. Genetic polymorphism in caseins of cow`s milk. Isolation and properties of  $\alpha_{s1}$ -caseins A, B and C // J. Dairy Sci. – Vol. 47, №6. – P. 626 – 637.
128. Fox P.F., Mc Sweeny P.L.H. Dairy chemistry and biochemistry. – London: Tomson Science, 1998. – 478.
129. Горбатова К.К. Химия и физика белков молока – М.: Колос, 1993. – 192 с.
130. Янковський Д.С., Попова Т.В., Федін Ф.А., Головань Л.Н. Методи виділення і изучения степені очистки казеїнового комплексу,  $\alpha_s$ - і  $\beta$ - казеїна // Направлення раціонального використання вторичного сир`я в молочної промисловості. – Київ: Укр. НІІНТІ. – 1981. – С. 113 – 123.
131. Whitney R. Proteins of milk // Fundamentals of dairy chemistry. – Gaithersburg, Maryland: Aspen publishers, 1999. – P. 81 – 169.
132. Davies G.T., Law A.J.R. An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion-exchange chromatography // J. Dairy. Res. – 1977. – Vol. 44, №2. – P. 213 – 221.

					Список використаної літератури	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		98

133. Ribadeau-Dumas B., Grappin R. Milk protein analysis // Lait. – 1989. – Vol. 69, №5. – P. 357 – 416.

134. Vreeman H.J., Van Riel J.A.M. The large – scale isolation of  $\alpha_{s2}$ -casein from bovine casein // Neth. Milk Dairy J. – 1990. – Vol. 44, №1. – P. 43 – 48.

135. Юкало В.Г. Белки казеинового комплекса молока, как предшественники биологически активных пептидов // Материалы международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии». – Минск: ИМ НАН Беларуси – 2004. – С. 264 – 265.

136. Walstra P., Jenness R. Dairy chemistry and physics – New York: John Wiley and Sons, 1984.

137. Christensen T.M., Munksgaard L. Quantitative fractionation of casein by precipitation or ion exchange chromatography // Milchwissenschaft. – 1989. Vol. 44, №8. – P. 480 – 484.

					<i>Список використаної літератури</i>	Арк.
						99
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

## Апробація

Окремі результати роботи доповідались на II Міжнародній студентській науково-технічній конференції «Природничі та гуманітарні науки. Актуальні питання», Україна, Тернопіль, 25-26 квітня 2019 р., а також на VIII Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції», Україна, Київ, 5-6 листопада, 2019 р.

					<i>ДР 18-153.00.00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Апробація</i>	<i>Лит.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Даньків С.О.</i>						
<i>Перевіряв</i>		<i>Юкало В.Г.</i>						
<i>Консульт.</i>								
<i>Рецензент</i>		<i>Зварич Н. М.</i>				<i>ТНТУ, ФМТ, грМЛМ-61</i>		
<i>Зав каф.</i>		<i>Покотило О.С.</i>						