

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

Факультет інженерії машин, споруд та технологій
(повна назва факультету)

Кафедра харчової біотехнології і хімії
(повна назва кафедри)

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня

магістр

(назва освітнього ступеня)

на тему: **Гіпоалергенне молоко на основі концентрату нативного казеїну**

Виконав(ла): студент(ка) VI курсу, групи МЛМ-61
спеціальності 181 «Харчові технології»

(шифр і назва спеціальності)

(підпис) **Борис Л.І.**
(прізвище та ініціали)

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

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

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

Рецензент _____
(підпис) **Шинкарик М.М.**
(прізвище та ініціали)

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

Факультет Інженерії машин, споруд та технологій
(повна назва факультету)

Кафедра Харчової біотехнології і хімії
(повна назва кафедри)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Покотило О.С.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« »

20__ р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ**

на здобуття освітнього ступеня магістр
(назва освітнього ступеня)

за спеціальністю 181 «Харчові технології»
(шифр і назва спеціальності)

студенту Борис Любові Ігорівні
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Гіпоалергенне молоко на основі концентрату нативного казеїну

Керівник роботи Юкало Володимир Глібович, д.б.н., професор
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

Затверджені наказом ректора від « 29 » 09 2020 року № 4/7-688

2. Термін подання студентом завершеної роботи грудень 2020 р.

3. Вихідні дані до роботи Спеціальна, періодична література та нормативна документація з питань досліджень. Методики та методи досліджень стандартні та уніфіковані.

4. Зміст роботи (перелік питань, які потрібно розробити)

Провести літературний та патентний пошук щодо будови та властивостей казеїнових міцел та їх моделей.

Провести літературний та патентний огляд виділення білків у системі «вода – протеїни молока– полісахарид».

Дослідити біоактивні пептиди протеїнів сироватки молока.

Провести власні дослідження та оформити їх результати.

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

Таблиці, графіки, схеми.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Охорона праці			
Безпека в надзвичайних ситуаціях			
Нормоконтроль			

7. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Аналітичний огляд та патентний пошук інформації відповідно до теми магістерської роботи		
2.	Складання схеми досліджень		
3.	Опрацювання методики досліджень		
4.	Виконання експериментальних досліджень (Частина I)		
5.	Завершення експериментальних досліджень (Частина II)		
6.	Збір інформації до виконання розділу «Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях»		
7.	Закінчення написання розділів		
8.	Подання магістерської роботи до захисту		

Студент _____

(підпис)

Борис Л.І.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____

(підпис)

Юкало В.Г.

(прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

	Анотація	5
	Вступ	6
1.	Огляд літератури	9
1.1	Казеїнові міцели. Будова і властивості	9
1.2	Виділення білків у системі «вода – протеїни молока – полісахарид»	17
1.3	Біоактивні пептиди протеїнів сироватки молока	19
2.	Матеріали і методи досліджень	29
2.1	Етапи проведення дослідження	29
2.2	Характеристика сировини та матеріалів, що використовувалися в дослідженнях	29
2.3	Методи дослідження	30
2.4	Методи статистичної обробки експериментальних даних	33
3.	Результати власних досліджень та їх обговорення	34
3.1	Обґрунтування рецептури та приготування дослідних зразків	37
3.2	Фізико-хімічні показники гіпоалергенного молока на основі КНК із наповнювачами кава та ванілін	43
3.3	Розробка технології виробництва гіпоалергенного молока з кавою та ваніліном	47
3.4	Розробка апаратурно-технологічної схеми виробництва запропонованих продуктів	51
4.	Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях	53
4.1	Інструкції з охорони праці на підприємстві	53
4.2	Методи боротьби з монотонністю праці на підприємстві	58
4.3	Застосування спеціальних способів оброблення молочних продуктів з метою зниження вмісту радіонуклідів	61
	Висновки	66
	Список використаної літератури	67
	Додатки	74

АНОТАЦІЯ

Борис Л.І. Гіпоалергенне молоко на основі концентрату нативного казеїну.
– Рукопис.

Дослідження на здобуття кваліфікації магістра зі спеціальності 181 «Харчові технології». – Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Тернопіль, 2020.

Магістерська робота присвячена розробці гіпоалергенного молока на основі концентрату нативного казеїну. Розроблено та обґрунтовано рецептурний склад, технологію виготовлення продукту, визначено його фізико–хімічні показники та встановлено оптимальний вміст наповнювачів для покращення органолептичних показників.

Ключові слова: знежирене молоко, концентрат нативного казеїну, сироваткові білки, полісахарид, гіпоалергенний продукт.

ANNOTATION

Borys L.I. Hypo allergic milk based on the native casein concentrate. – The manuscript.

Research for obtaining an educational degree «Master» in specialty 181 «Food Technologies». – Ternopil Ivan Puluj National Technical University, 2020.

The master's work is devoted to the development of hypoallergenic milk based on native casein concentrate. The recipe composition, technology of product production are developed and substantiated, its physical and chemical indicators are determined and the optimal content of fillers for improvement of organoleptic indicators is established.

Key words: skim milk, native casein concentrate, whey proteins, polysaccharide, hypoallergenic product.

ВСТУП

Актуальність досліджень. Сьогодні у світі спостерігається стійка проблема дефіциту білка в харчуванні. Тому для повноцінного забезпечення організму білком, важливо включати у раціон молоко та молочні продукти, які відносяться до незамінних продуктів харчування. Серед великого асортименту молочних продуктів важливими є молочно-білкові концентрати, адже вони представляють собою джерело унікальної білкової системи та володіють високою харчовою цінністю.

Білки знежиреного молока мають особливу цінність тому, що вони у нативному та денатурованому вигляді швидко і повністю засвоюються (ступінь засвоєння складає 96...98%). Тому досить актуальним є розроблення нових технологій молочних продуктів на основі білкових концентратів.

Постановка проблеми. Концентрат нативного казеїну отримують зі знежиреного молока з використанням полісахариду пектину: казеїнова фракція молочних білків осаджується, а сироваткові білки залишаються у сироватці. Концентрат нативного казеїну володіє високими функціональними властивостями та добре змішується із будь-якими харчовими компонентами і іншою харчовою сировиною.

При розробці технології нових продуктів на основі концентрату нативного казеїну для додаткового підвищення біологічної цінності пропонується використання низькоалергенного гідралізату сироваткових білків [73]. Його використання дозволяє отримати продукт із зниженими алергенними властивостями та водночас відтворити природній склад молока. Встановлено, що при додаванні ГСБ, отриманий продукт має виражений альбумінний присмак. Тому для покращення органолептичних характеристик використано такі наповнювачі, як кава та ванілін.

Мета дослідження. Метою даної роботи є розробка технологій гіпоалергенного молока на основі концентрату нативного казеїну.

Для поставленої мети необхідно вирішити наступні завдання:

1. Виділити і концентрувати білки молока в системі «знежирене молоко-полісахарид».
2. Провести поділ системи на фази.
3. Розробити технологію виготовлення гіпоалергенного молока на основі концентрату нативного казеїну.
4. Визначити фізико-хімічні та органолептичні показники готового продукту.

Об'єкт досліджень: технологія гіпоалергенного молока на основі концентрату нативного казеїну з наповнювачами кава та ванілін; зміна органолептичних та фізико-хімічних показників.

Предмет дослідження: знежирене молоко, концентрат нативного казеїну, органолептичні та фізико-хімічні показники готового продукту.

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено склад рецептурних компонентів та розраховано їх масову частку у продукті. Проведено порівняльний аналіз органолептичних показників запропонованих збірців, залежно від вмісту наповнювача та обрано найбільш оптимальний варіант.

Практичне значення одержаних результатів. Для виготовлення запропонованого гіпоалергенного молока на основі концентрату нативного казеїну не потрібно встановлювати додаткове спеціальне обладнання, тому розроблену технологію можна рекомендувати до впровадження у промислове виробництво. Виходячи з результатів експериментальних досліджень, пропонується виробництво гіпоалергенного молока на основі концентрату нативного казеїну з наповнювачами кава та ванілін, оптимальний вміст яких в готовому продукті становить відповідно 0,2% та 0,02%.

Особистий внесок. Полягає у вивченні та детальному аналізі сучасних наукових та патентних джерел; розроблені рецептури, технологічної та апаратно-технологічної схеми виробництва гіпоалергенного молока на основі концентрату нативного казеїну з наповнювачами кава та ванілін; дослідженні фізико-хімічних та органолептичних показників якості.

Апробація результатів. Участь у XIII Міжнародній науково-технічній конференції «Техніка і технологія харчових виробництв» 23-24 квітня 2020 р, Могильовський державний університет продовольства.

Публікації. За матеріалами роботи опубліковано одні тези доповіді:

Yukalo V.G., Datsyshyn K.Ye., Borys L.I. Technology of milk with reduced allergenic properties// Abstracts of the XIII International scientific and technical conference «Engineering and Technology of food production», Mogilev (Republic of Belarus), 23-24 april 2020. – Mogilev: Mogilev State University of Food Technologies, 2020. – 328-329 p.

Методи дослідження: визначення основних органолептичних та фізико-хімічних показників за допомогою традиційних методів; методи статистичної обробки експериментальних даних.

Структура і обсяг роботи. Робота складається із вступу, основної частини, висновків та пропозицій виробництву, переліку посилань та додатків. Основний зміст роботи викладено на 77 сторінках і містить 9 таблиць та 9 рисунків. Список використаної літератури містить 74 найменування.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Казеїнові міцели. Будова і властивості

У молоці містяться сотні видів білків, більшість яких присутні у незначних кількостях. Коров'яче молоко містить у середньому 3,2% білків, кількість яких коливається у межах 2,9 – 3,5%. Білки різноманітні за будовою, фізико-хімічними властивостями, біологічними функціями та мають різний склад.

Використовуючи сучасні способи поділу та виділення білків, дослідникам вдалось встановити, що до складу молока входять три групи білків (рис. 1).

- I група – казеїн, що містить 4 фракції (α_{s_1} – казеїн, α_{s_2} – казеїн, β – казеїн, κ – казеїн) і їх фрагменти. Кожна з цих фракцій гетерогенна за своїм складом і містить від 2 до 8 генетичних варіацій, які відрізняються лише кількома амінокислотами.

- II група – сироваткові білки: β –лактоглобулін, α –лактальбумін, імуноглобуліни і альбуміни сироватки крові. Крім того, в неї входять лактоферин, лізоцим і деякі інші так звані мінорні білки.

- III група – білки оболонок жирових кульок, що становлять всього близько 1% всіх білків молока [1].

Білки молока мають різноманітні біологічні функції, а казеїн є власне харчовим білком, який виконує в організмі структурну функцію. Крім того, він транспортує в складі своїх часток кальцій, фосфор і магній.

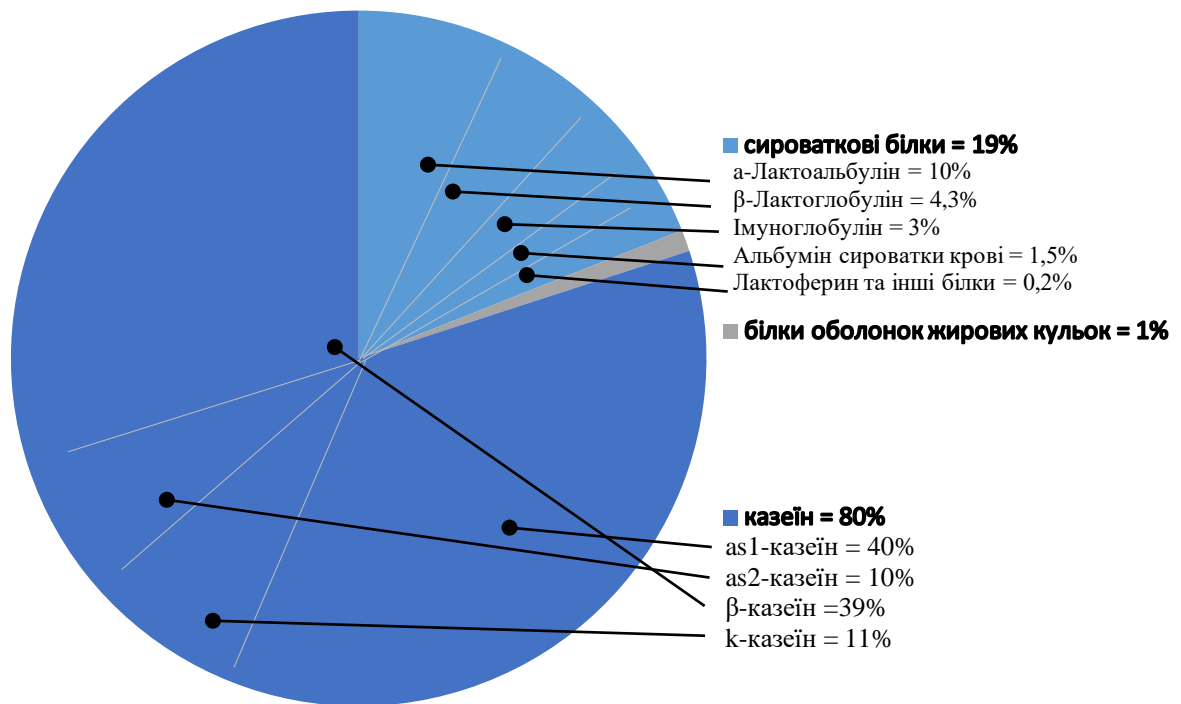


Рисунок 1.1 – Класифікація білків молока

Головним білком молока є казеїн, вміст якого коливається у межах від 2,2 до 2,8 %. Елементарний склад казеїну (у %) наступний:

- вуглець – 53,1;
- водень – 7,1;
- кисень – 22,8;
- азот – 15,4;
- сірка – 0,8;
- фосфор – 0,8.

Казеїни є фосфопротеїдами, які містять у своєму складі фосфор, зв'язаний з амінокислотою серином. Їх відкрито Браконнотом (1830 р.), виділено як основну фракцію молочних білків Хеммерстеном (1883 р.), їх неоднорідність та розділення на три основні фракції (α -, β - та κ -казеїни) встановлено Меландеру (1939 р.) [2].

Казеїн містить кілька фракцій, що відрізняються амінокислотним складом, відношенням до іонів кальцію і сичужного ферменту. Казеїн у нативному вигляді на 95 % знаходиться у вигляді казеїнових міцел (від лат. Micella – крихітка), чи

асоціацій субодиноць (казеїнових субміцел), які являють собою комплекси мономерних молекул казеїну. Вони складаються із сотень і тисяч окремих молекул казеїнових білків і мають розмір від 50 до 500 нм. Так як міцели мають колоїдні розміри, вони можуть розсіювати світло, а біле забарвлення молока в значній мірі викликана розсіюванням світла на міцелах казеїну.

Міцелам казеїну притаманні такі властивості:

- їх основу утворює лінійний пептидний ланцюг із молярною масою (19 000 – 24 000 г/моль);
- всі казеїни містять фосфатні залишки, етерифіковані з гідроксильною групою серину;
- внаслідок наявності фосфосерильних груп казеїни характеризуються високою здатністю зв'язувати кальцій та магній;
- за понижених значень активної кислотності молока, їх поверхня має від'ємний заряд;
- казеїни здатні до асоціації [2].

Співвідношення маси фракцій казеїну α_{s1} , α_{s2} , β , κ в міцелах приблизно коливається 3,0:0,8:3,0:1,0 та є відносно сталим тоді, як вміст солей піддається сильним коливанням. Діаметр міцел казеїну становить від 2×10^{-10} до 3×10^{-11} м. У залежності від розмірів казеїнових міцел їх утворює від 1×10^2 до 3×10^5 казеїнових молекул. Казеїнові міцели знаходячись у гідратованому стані, складаються з великої кількості води: 1 грам білка має об'єм $4,4 \text{ см}^3$ та вміщує 3,7 г рідини.

Заряджені групи молекул казеїну за активної кислотності молока 6,6 – 6,8 заряджають поверхні міцел від'ємним зарядом. Тоді створюються умови для утворення зовнішньої гідратної оболонки міцели, що надає їй колоїдну стабільність. Фізико-хімічні показники міцел казеїну наведені у табл. 1.

Таблиця 1.1 – Основні фізико-хімічні показники міцел казеїну [2,4,5]

Найменування показника	Одиниці вимірювання	Значення показника
Діаметр	нм	130-160 (діапазон 50-500)
Площа поверхні	см ²	8×10^{-10}
Об'єм	см ³	$2,1 \times 10^{-15}$
Густина (у гідратованому виді)	г/см ³	1,0632
Маса	г	$2,2 \times 10^{-15}$
Вміст води	%	63
Вміст гідратної води	г/г білка	3,7
Об'єм на одиницю маси	см ³ /г білка	4,4
Молярна маса (в гідратованому виді)	г/моль	$1,3 \times 10^9$
Молярна маса (в дегідратованому виді)	г/моль	5×10^8
Поверхневий заряд	мВ	-15...-20
Кількість пептидних ланцюгів	од.	5×10^3
Кількість міцел на кожний см ³ молока	од.	$10^{14} \dots 10^{16}$
Поверхня міцел на кожний см ³ молока	од.	5×10^4
Довжина вільного пробігу між міцелами	нм	240

Серед науковців часто виникає дискусія, яка модель у казеїнових міцел. На даний момент жоден тип не є повністю доведений. За останні 50 років висунуто різні моделі структури міцел казеїну, такі як:

- субміцелярна (відносяться моделі, в яких субодиниці ідентичні або мають різний склад);

- модель покритого ядра (представлена як окремий випадок моделей внутрішньої структури або субміцел);

- модель внутрішньої структури (описує специфічні взаємодії між казеїнами, представляє міцелу як сітку білків) [3,6].

В основі більшості розглянутих моделей стоїть субміцелярний принцип побудови міцели [7-11].

Схематично субміцелярна модель міцели казеїну представлена на рис. 2.

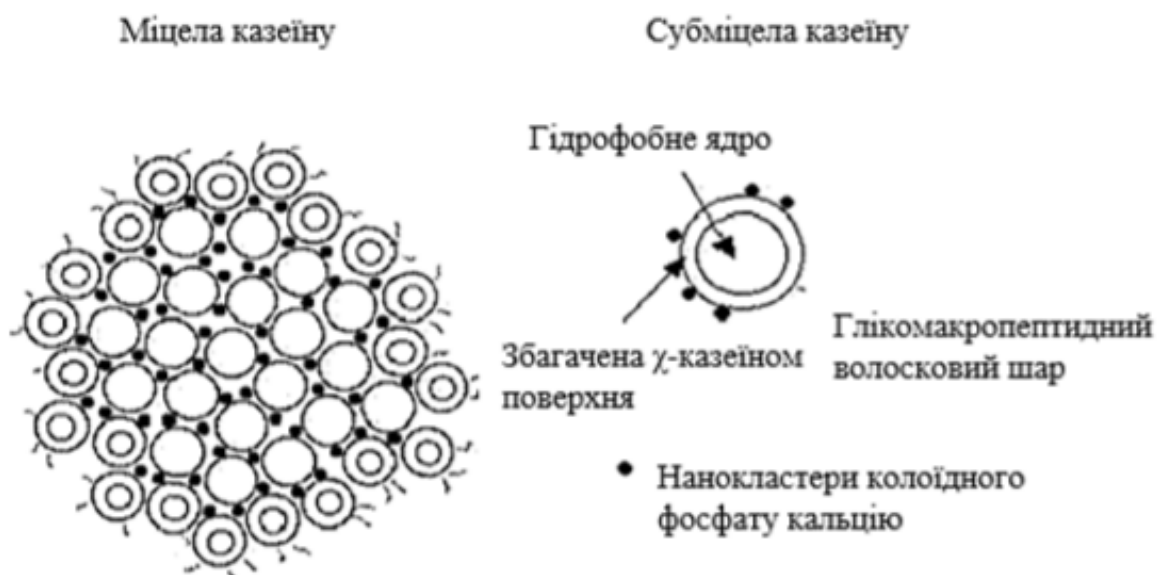


Рисунок 1.2 – Узагальнена субміцелярна модель міцели казеїну [3]

Науковці вважають, що казеїнові міцели утворюються з щільно упакованих субміцел, тип побудови яких «ядро-оболонка». Припускається, що субміцели мають гідрофобне ядро та гідрофільну поверхню, головними взаємодіями яких є взаємодії між протеїнами або через кальційфосфатні містки (нанокластери колоїдного фосфату кальцію). Зовнішня поверхня міцел є дифузійною, оскільки протеїнові ланцюги, які представляють собою гідрофільні ділянки поліпептидних ланцюгів кказеїну, що містять глікомакропептиди і, можливо, гідрофільні N-кінцеві ділянки β -казеїну, поширюються на 5 – 10 нм в довкілля та створюють «волосковий шар», що є перешкодою тісному зближенню міцел (субміцелярна модель, запропонована у 1990 році). Існування субміцел підтверджується хімічними і фізичними дослідженнями казеїнових міцел, дисоціацією міцел на більш дрібні частинки – субміцели, які формуються з

казеїнату натрію з їх подальшим зростанням при додаванні кальцію. Разом з тим встановлено, що при формуванні субміцели гідрофобні ділянки фракцій казеїну зосереджуються в її центрі, а на поверхні знаходяться гідрофільні ділянки κ -казеїну та фосфатні групи α_1 -, α_2 - і β -казеїну. Інші автори [12] допускають можливість агрегації субміцел як за допомогою колоїдного фосфату кальцію, так і за рахунок гідрофобних взаємодій.

Міцели казеїну мають неабиякий вплив на властивості молока. Вони в значній мірі визначають фізичну стабільність молочних продуктів при нагріванні і зберіганні, грають ключову роль при приготуванні сиру і визначають реологічні властивості ферментованих і концентрованих молочних продуктів. Міцели казеїну є досить щільними агрегації з невеликими включеннями фосфату кальцію, який пов'язує міцели разом, надаючи міцелам відкриту пористу структуру. Видалення фосфату кальцію (КФК - колоїдний фосфат кальцію), наприклад шляхом закислення або додавання ЕДТА або цитратів, веде до розпаду міцел. Розпад також відбувається, коли рН починає перевищувати 9. Внутрішня структура міцел казеїну обговорюється вже протягом тривалого часу і все ще до кінця не зрозуміла. Пропонуються три основні моделі:

- нанокластерних модель;
- модель подвійного зв'язування;
- модель субміцели.

Проте деякі характеристики є доведеними. Встановлено, що α_s і β – казеїни в основному сконцентровані в середині міцели, а κ – казеїни здебільшого розташовані на поверхні. Навколо міцели існує «ворсинчастий шар», що складається в основному з С – закінчень κ – казеїну, які виступають на 5-10 нм за поверхню міцели. Цей ланцюг κ – казеїну є гідрофільним та негативно зарядженим, що і відіграє основну роль у просторовій стабільності міцел. Колоїдну стабільність міцел можна змінити, якщо видалити ворсинчастий шар, наприклад додавши етанол або через ферментативний гідроліз під дією сичужного ферменту. Тоді міцели або агрегують, або випадають в осад.

Уже в 1996 році Holt [13] запропоновано модель внутрішньої структури міцели казеїну (рис. 3). Основна суть даної моделі полягає в тому, що казеїн має структуру, що дозволяє йому, подібно до білкових ферментів, виконувати певні біологічні функції, тобто не є випадково (хаотично) впорядкованим протеїновим комплексом.

Згідно даної моделі казеїн виступає як інгібітор росту кальцій-фосфатних комплексів. Тому можна дійти висновку, що казеїн має ідеальну структуру для швидкого ізолювання кальцій-фосфатних нанокластерних частинок у видільних везикулах молочних залоз ссавців [14].

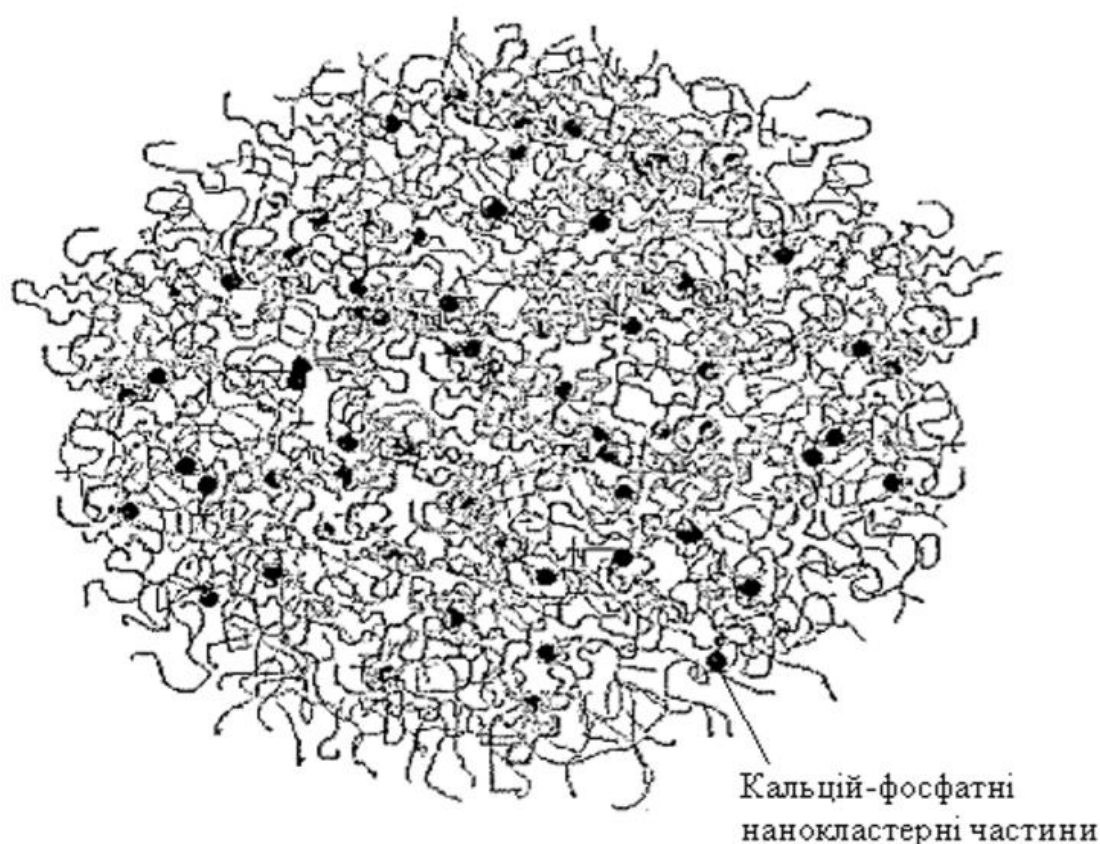


Рисунок 1.3 – Внутрішня структура моделі міцели казеїну [15]

Припускають, що казеїн та колоїдний фосфат кальцію відносно рівномірно розподілені в казеїнових міцелах. Казеїни, в основному, зв'язані разом у міцели електростатичною та гідрофобною взаємодією [16,17]. Крім того, взаємодія відбувається за рахунок кальцієвих містків, водневих зв'язків та сил Ван-Дер-Ваальса [17].

Внутрішню структуру міцел казеїну за допомогою методів сучасної електронної мікроскопії уточнено у роботах [18-20]. Аналіз одержаних зображень дозволив встановити, що деякі протеїни знаходяться в міцелі у вигляді невеликих агрегатів, але неможливо зробити однозначного висновку про те, чи є вони субміцелами або тільки випадковими кластерами, які сформовано під час синтезу міцел. Приклад мікроелектронного зображення міцели казеїну наведено на рис. 4.

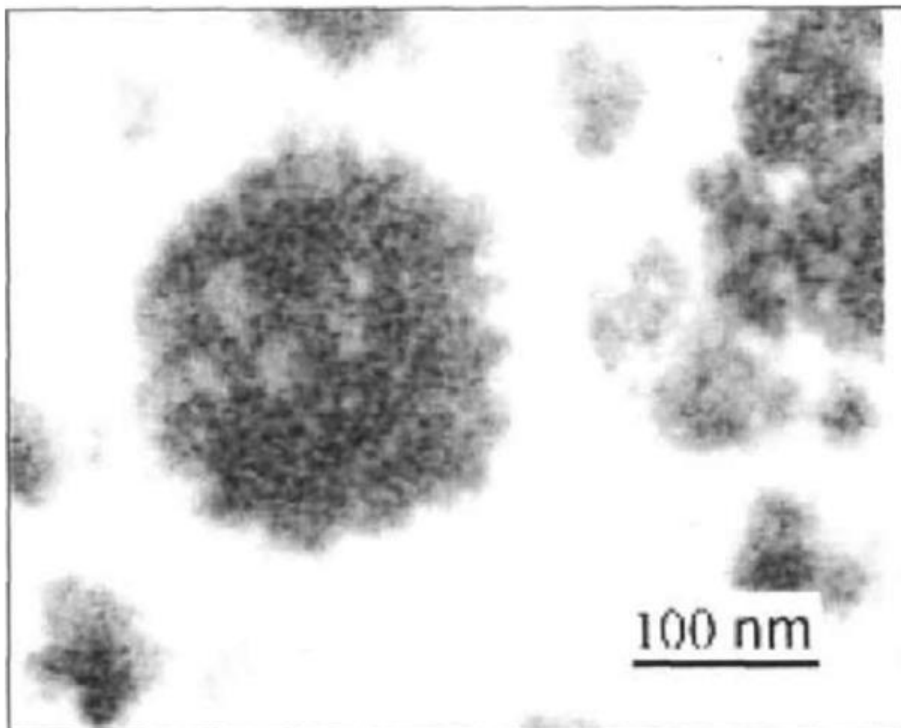


Рисунок 1.4 – Мікроелектрона фотографія міцели казеїну молока [3]

Автором [12] досліджено вторинну та третинну структури казеїнів різними методами. Завдяки цьому встановлено наявність в них лише незначної кількості ділянок впорядкованої структури (ділянок).

Кількість α -спіральных ділянок за одними даними становить близько 1 – 2 %, за іншими – 6 % і більше, що обумовлено високим вмістом проліну (8 – 17 %) і його хаотичним розташуванням уздовж поліпептидних ланцюгів. Завдяки даним дослідженням зроблено висновок, що молекули казеїнів мають маловпорядковану структуру.

Існує значна кількість наукових публікацій, в яких висвітлено структуру, властивості казеїну та типи моделей казеїнових міцел, проте важливим є дослідити вплив технологічних чинників на функціонально-технологічні властивості казеїну та визначити його потенціал з огляду на розробку та впровадження нових технологій.

1.2 Виділення білків у системі «вода-протеїни молока-полісахарид»

Структура будови міцел нативного казеїну досліджується науковцями уже протягом багатьох років, проте всі деталі ще досі не встановлені. Існує декілька варіантів будови казеїнових міцел [25], проте все ж відсутнє чітке пояснення багатofракційності казеїнів [23].

На даний момент виявлено, що казеїни є попередниками біологічно активних пептидів, які виникають в процесі травлення у ШКТ ссавців [22]. Можливо, цей процес має своє відображення у будові надмолекулярних структур казеїну. Саме тому до сих пір є важливим завдання виділення міцел казеїну зі збереженням початкової будови для їх дослідження та виявлення біологічних функцій.

На сьогодні існує декілька методів для виділення міцел казеїну, які так чи інакше змінюють їх будову і склад. Зокрема, гель-фільтрація із застосуванням гранульованих гелів або фракціонування у колонці спричинює зміни у співвідношенні білкових фракцій. Також втрачаються деякі компоненти казеїнових міцел. При ультрацентрифугуванні може зникнути фракція малих міцел [24]. У процесі ультрафільтрації велика частка протеїнів денатурує. Важливим є виділення міцел казеїну в умовах термодинамічної несумісності білків і полісахаридів у водних розчинах [26].

При розшаруванні системи «вода-полісахарид-протеїн» виділяються казеїнові міцели, які за розмірами і формою ідентичні з міцелами молока. Але, білкова міцелярна фаза системи містить також протеїни молочної сироватки [21]. Встановлено, що можна виділити нативні казеїнові міцели без домішок

протеїнів молочної сироватки. Для цього використовується казеїн, який виділяється із свіжого знежиреного молока шляхом дворазового переосадження в ізоелектричній точці. Далі відбувається дезактивація природних протеаз молока. Білки молочної сироватки виділяються після випадку казеїну в осад і переводяться у буферний розчин шляхом гел'фільтрації на сефадексі G-25.

В умовах термодинамічної несумісності міцели казеїну в системі «вода-протеїн-полісахарид» виділяють застосовуючи оптимальні співвідношення компонентів системи [21]. Концентрацію протеїнів у препаратах казеїнів, а також у хроматографічних фракціях визначають способом Лоурі або за допомогою спектрофотометра, користуючись коефіцієнтами поглинання.

Диск-електрофорез протеїнів проводять в трубочках поліакриламідного гелю. Білки казеїнового комплексу аналізують електрофорезом у анодній системі однорідного ПААГ. Гель-фільтрацію міцел казеїну проводять на сефарозі в хроматографічній колонці.

Після розділення системи, яка містила білки молока і, в якості полісахариду пектин, отримують концентровану білкову фазу казеїну. Для аналізу розподілу міцел казеїну, а також протеїнів казеїнового комплексу та сироватки молока вибирають сефарозу 2В, яка дає можливість фракціонувати білки в діапазоні молекулярних мас від 7×10^4 до 4×10^7 Да.

Простий розподіл міцелярного природного казеїну: великі міцели прирівнюються з об'ємом, який дорівнює вільному об'єму колонки. Далі із колонки виділяються малі міцели і субміцели. Загалом виділяються міцели, які є подібними до міцел знежиреного молока.

До фракції білкової фази системи «вода-протеїни молока-полісахарид», яка являється низькомолекулярною, входять всі основні протеїни сироватки молока:

- β -лактоглобулін (β -lg);
- α -лактоальбумін (α -la);
- альбумін сироватки (BSA);
- сліди імуноглобулінів (Ig) і протеозопептонної фракції.

Окрім того, присутні білкові фракції, які за електрофоретичною рухливістю можуть бути β -казеїном.

Для чистого відділення від протеїнів сироватки знову проводять виділення протеїнової фази у системі «вода – протеїни молока – полісахарид».

Отримується хроматограма, на якій спостерігається характерний розподіл міцел і надмолекулярних структур казеїнів та набагато нижчий пік низькомолекулярної фракції. Для ідентифікації протеїнів обох хроматографічних піків їх діалізують проти буферу для взірців анодної електрофоретичної системи в однорідному поліакриламідному гелі, що застосовується для аналізу фракційного складу казеїнів. Перший хроматографічний пік містить білки комплексу казеїну у звичних йому співвідношеннях, а низькомолекулярну фракцію (II пік) представляє β -казеїн. Слід відзначити, що β -казеїн інколи вилучається зі складу міцел казеїну у розчинах [27]. Інші білки на електрофореграмі не виявляють.

Шляхом повторного розшарування системи «вода – протеїни молока – полісахарид» отримується міцелярна казеїнова фаза. Хроматографічний аналіз на сефарозі підтверджує розподіл міцел, надмолекулярних структур і протеїнів казеїну у виділеній фазі. Аналіз показує ідентичність білкового складу виділеної міцелярної фази і загального казеїну.

1.3 Біоактивні пептиди протеїнів сироватки молока

Молочні білкові продукти вважаються дуже цінними завдяки біологічній дії не тільки самих протеїнів, а також їх продуктів – біоактивних пептидів, які розщеплюються травними протеазами.

На сьогодні відкрито і досліджено безліч пептидів, які позитивно впливають на функції таких систем організму, як серцево-судинна, нервова та травна [28]. Також встановлено, що пептиди проявляють антимікробну та антиоксидантну дії, відіграють важливу роль у розвитку імунної системи. У

більшості біоактивних пептидів уже встановлено механізм їх утворення та дії [29,30].

Зовсім нещодавно з'ясовано, що білки сироватки молока є повноцінним джерелом амінокислот і характеризуються амінокислотним скором (SKOR), який дуже схожий до скору «ідеального» харчового білка. До протеїнів сироватки молока відносять протеїни, що залишаються у розчині після осадження казеїнів молока за температури 20 °С і рН 4,6 .

Основними функціями цих протеїнів є [31]:

- забезпечення амінокислотного живлення ссавців на початкових етапах розвитку;

- синтез лактози в секреторних клітинах молочної залози,
- транспорт ретинолу,
- зв'язування жирних кислот та антиоксидантна дія (β -LG);
- транспорт кальцію,
- імуномодуляторна та антиканцерогенна дія (α -LA);
- імунний захист (імуноглобуліни А, М, G);
- транспортна функція (SA);
- зв'язування заліза,
- антимікробна та антиоксидантна (LF) функції.

Важливим шляхом переробки сироватки молока є протеоліз, за допомогою якого виготовляють гіпоалергенні продукти, дитячі молочні суміші та продукти для харчування спортсменів [32]. При виробництві цих продуктів використовують різні ензимні протеолітичні препарати тваринного, рослинного і мікробіологічного походження [33], а сам протеоліз проводять в умовах, які будуть оптимальними для кожного з цих препаратів. Умови і специфічність протеолітичної дії на протеїни сироватки при цьому можуть суттєво відрізнятися. У процесі протеолізу протеїнів сироватки молока в шлунково-кишковому тракті утворюється велика кількість різних біоактивних пептидів (БАП).

При дослідженні біологічної дії продуктів протеолізу білків сироватки молока було відкрито ряд пептидів, які можуть впливати на фізіологічні функції організму. За сучасною класифікацією [31] до протеїнів сироватки молока належать β -лактоглобуліни (β -LG), α -лактоальбуміни (α -LA), альбуміни сироватки (BSA), імуноглобуліни (Ig), лактоферин (LF), мінорні фракції протеїнів та протеозопептонна фракція (PPF).

За видами біологічної дії серед біоактивних пептидів протеїнів сироватки молока знайдено інгібітори ангіотензинперетворювального ензиму (АПЕ), пептиди з опіюдною та бактерицидною дією, імуномодуляторні та гіпохолестеролемічні, а також пептиди, що впливають на моторику кишечника. Встановлено, що β -лактоглобулін є попередником усіх перелічених видів біоактивних пептидів окрім імуномодуляторних. Серед біоактивних пептидів, утворених з α -лактоальбуміну, відсутні пептиди з гіпохолестеролемічною дією та пептиди, що впливають на моторику кишечника, і лише два види біологічної активності притаманні пептидам з лактоферину (бактерицидні й імуномодуляторні).

Лактокініни

Найбільшою групою біологічно активних пептидів, які утворюються з білків сироватки молока, вважаються пептиди, що володіють інгібіторною дією по відношенню до ангіотензин-перетворюючого ферменту (АПФ). Такі пептиди, виявлені серед продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока, дістали назву лактокінінів [34]. АПФ трансформує декапептид ангіотензин I в октапептид ангіотензин II, його надмірна продукція спричинює артеріальну гіпертензію та ряд ССЗ.

Залежність між структурою та активністю пептидних інгібіторів АПЕ досліджували на багатьох інгібіторних пептидах з різних харчових протеїнів [35, 36]. У результаті було з'ясовано деякі загальні закономірності взаємодії їх з АПЕ [37]. Найчастіше іАПЕ — це невеликі пептиди, що містять від 2 до 12 амінокислотних залишків. Взаємодія пептидних інгібіторів з АПЕ залежить від

трьох С-кінцевих амінокислотних залишків у складі пептиду. Наявність залишків проліну або інших гідрофобних амінокислот посилює їхню інгібіторну дію. Важливими є і позитивно заряджені групи лізину і аргініну, розміщені в С-кінцевій ділянці іАПЕ. Конфігурація N-кінцевих залишків у іАПЕ мало впливає на інгібіторну дію пептидів [38]. Отримані результати, Gobbetti et al. [39] стверджують, що для того, щоб повністю гальмувати АПЕ необхідна суміш інгібіторних пептидів різної конфігурації для взаємодії з каталітичними центрами АПЕ. Тоді гальмування відбувається за змішаним типом. Для отримання інгібіторів АПЕ проводилися дослідження з протеолізу протеїнів молочної сироватки з використанням ензимів ШКТ. Під час протеолізу відтворювали умови травлення в організмі (температура, рН, тривалість процесу, концентрація) [40-42].

Бактерицидні, фунгіцидні та антивірусні пептиди

Не менш важливою групою біологічно активних пептидів білків молочної сироватки являються бактерицидні пептиди. Вони отримані із гідролізатів LF, саме тому можуть бути корисними у якості клінічних добавок завдяки їхній імуномодуляторній та антиканцерогенній дії. Антибактеріальний механізм лактоферицинів пов'язаний зі зміною мембранної проникності. Також, ймовірно, що вони модулюють кишкову мікрофлору, коли утворюються під час молочного травлення. Бактерицидні пептиди допомагають у захисті від мікробних спалахів, особливо у КТ немовлят і тому підтримують неімунну оборону кишечника. Ось чому ці пептиди доцільно застосувати як у сфері харчової безпеки, так і в якості фармацевтичних засобів.

На сьогоднішній день відкрито безліч біоактивних пептидів із протеїнів сироватки молока, проте на другому місці знаходяться саме антимікробні пептиди. Джерелом їх походження є передусім лактоферин, а також α -лактоальбумін і β -лактоглобулін [43–46].

У 1892 р. німецький науковець П. Ерліх вказав на наявність у молоці захисних речовин. Проте пізніше встановили, що до них належать протеїни:

імуноглобуліни, лізоцим і лактоферин [43]. Продукти ензиматичного розщеплення лактоферину виявляють більшу бактерицидну дію, ніж нативний лактоферин, а в інтактних α -лактоальбуміну і β -лактоглобуліну вона взагалі відсутня.

Фрагмент лактоферину (f 14- 41/42), який отримав назву лактоферицин є одним з найважливіших антимікробних пептидів[44]. Він утворюється за дії пепсину на лактоферин у кислому середовищі [45]. Цей пептид є стійким при дії високих температур і виявляє антимікробну дію в широкому діапазоні значень рН середовища [47]. Показано, що за відносно низьких концентрацій лактоферицин пригнічує розвиток багатьох видів бактерій, дріжджів, грибів. Лактоферицин володіє також антивірусною дією (на віруси гепатиту С, герпесу, аденовіруси) [48].

Важливим також є те, що і деякі штами молочнокислих бактерій, зокрема видів *Lc. lactis* та *Lb. casei*, є стійкими до дії лактоферицину [49]. Залежно від виду мікроорганізму автори пропонують різні механізми бактерицидної і фунгіцидної дії лактоферицину:

- зв'язування з поверхнею бактеріальної клітини (*B. subtilis*, *E. coli*);
- руйнування клітинної мембрани бактерій;
- взаємодія з фосфоліпідами бактеріальних мембран;
- зміна ультраструктури мікроскопічних грибів (*Aspergillus spp.*);
- формування додаткових іонних каналів у мембранах;
- вивільнення ліпополісахаридів із клітинної стінки грамнегативних бактерій [48].

Вивчаючи залежності активності фрагментів лактоферицину встановлено, що бактерицидні, фунгіцидні й антивірусні властивості пов'язані зі співвідношенням залишків триптофану та аргініну [50].

У складі домену N1 лактоферину було виявлено такий антимікробний пептид як лактоферампін(f 265-284), якому притаманний широкий спектр бактерицидної і фунгіцидної дії [51, 52]. Його антимікробна дія підвищується при відщепленні трьох N-кінцевих амінокислотних залишків. У продуктах

протеолізу лактоферину, крім лактоферицину і лактоферампіну, знайдено багато інших пептидів, які проявляють свою активність проти багатьох вірусів і патогенних мікроорганізмів. Їхні послідовності розташовані в N-кінцевому фрагменті лактоферину (f1–48).

Два бактерицидні пептиди (LDT1, LDT2) було ідентифіковано за дії на α -лактоальбумін трипсину і один — хімотрипсину (LDC) [53]. Усі ці пептиди є аніонними (pI — 4,5-6,1), тобто пригнічують розвиток грампозитивних бактерій. Найактивнішим є пептид LDT2, а найслабшим — LDT1. Пептиди LDT2 і LDC складаються з двох фрагментів, з'єднаних між собою дисульфідними зв'язками. При роз'єднанні цих фрагментів, LDT2 і LDC не виявляють бактерицидної дії. Слід також зазначити, що бактерицидні пептиди було одержано із залишків α -лактоальбуміну, які не є гомологічними до лізоциму [54].

Лакторфіни — пептиди з опіювальною дією

Ще однією групою біологічно активних пептидів, отриманих із білків сироватки молока, є група опіювальних пептидів. Опіювальні пептиди – це пептиди, що мають фармакологічну подібність до опіуму або морфіну. Відомими опіювальними пептидами є α -лакторфін (α -лактоглобулін f 50-53), β -лакторфін (β -лактоглобулін f 102-105) та лактофероксин А (лактоферин f 318-323). Іншими опіювальними пептидами сироваткового походження є сезорфін (Tyr-gly-Phe-Asn-Ala), що був ізольований з фрагменту 399-404 альбуміну сироватки (SA), та альбутензин А – з фрагменту 208-216 альбуміну сироватки (SA).

Одними із нетипових опіювальних пептидів із протеїнів сироватки молока є екзорфіни, які отримали назву лакторфінів [55]. Із проенкефаліну та продинорфіну утворюються типові опіювальні пептиди. Вони характеризуються сталою N-термінальною послідовністю Tyr-Gly-GlyPhe. N-термінальний залишок відомих лакторфінів відрізняється від послідовності типових опіювальних пептидів (послідовність амінокислотних залишків (N-термінальний Tyr і Phe у третьому або четвертому положенні)).

При дослідженні продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока було відкрито три лакторфіни [56]:

- α -лакторфін з α -лактоглобуліну (f 50–53);
- β -лакторфін із β -лактоглобуліну (f 102–105);
- серофін з альбуміну сироватки (f 399–404).

Ці пептиди належать до агоністів опіоїдних рецепторів μ -типу, а їхня біологічна дія подібна до дії ендогенних лігандів. Відомо, що опіоїдні ліганди впливають на емоційний стан, виявляють антисекреторну дію, впливаючи на інтестинальний транспорт електролітів та діють як анальгетики, подовжують термін травлення завдяки гальмуванню перистальтики і рухливості кишечника [50]. Проте, щоб використовувати лакторфінів у функціональному харчуванні людини потрібно більш детально зайнятися їх вивченням.

Імуномодуляторні пептиди

Імуномодуляторні пептиди можуть підсилювати функціонування імунних клітин, що виявляється в активації і проліферації лімфоцитів, активності природних клітин кілерів, синтезі антитіл, регуляції утворення цитокінів. Вони також можуть підвищувати імунітет клітин слизової ШКТ і знижувати вияви алергічної реакції [55, 57].

Великий обсяг праці присвячений вивченню впливу протеїнів сироватки молока на проліферацію лімфоцитів. При дослідженні продуктів протеолізу протеїнів сироватки, використовувались переважно суміші пептидів, набагато рідше вивчали імуномодуляторну дію індивідуальних пептидів [47, 48, 55, 58–60]. Так, було показано, що мітогенна активність β -лактоглобуліну стосовно клітин селезінки миші зростає після тригодинного протеолізу пепсином, трипсином, хімотрипсином або панкреатином, що підтверджує значення пептидів у цьому процесі [61].

Kauser і Meisel [62] синтезували два пептиди — Tyr-Gly і Tyr-Gly-Gly, ідентичні фрагментам α -лактоальбуміну f18–19, f 50–51 і f 18–20. Ці пептиди

виявляли виражену стимулювальну дію на проліферацію периферійних лімфоцитів крові людини [62].

Пепсиновий гідролізат лактоферину здатен впливати на синтез антитіл. Зокрема, встановлено підвищення продукції імуноглобулінів (Ig M, Ig G і Ig A) у культурі клітин селезінки миші, а також утворення Ig A у клітинах псерових бляшок [63]. Стимулювальну дію на синтез антитіл клітинами селезінки підтверджено *in vivo* за згодовування мишам панкреатичного гідролізату концентрату протеїнів сироватки молока. Пепсинові гідролізати лактоферину також досліджували на здатність впливати на синтез антитіл у мишей, імунізованих токсином холери [63]. Показано, що порівняно з контрольною групою тварин рівень специфічних антитіл Ig A був значно вищим.

У переважній більшості автори не заперечують важливості імуномодуляторної дії продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока, проте для їх практичного застосування у складі функціональних продуктів необхідні подальші систематичні дослідження. На сьогодні не створено жодних функціональних продуктів або інгредієнтів на базі імуномодуляторних пептидів із протеїнів сироватки молока.

Інші види біологічної дії пептидів із протеїнів сироватки молока

Не всі пептиди, які виділені з продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока, виявляють конкретний вид біологічної активності, існують й такі, які проявляють два чи три види активності. До прикладу, альбутензин і β -лактотензин є одночасно інгібіторами АПЕ і стимуляторами скорочення гладеньких м'язів кишечника [64]. Багатофункціональні властивості притаманні β -лакторфіну, який справляє опіюїдну дію і є активним інгібітором АПЕ [65]. Лактоферицин окрім бактерицидної та імуномодуляторної дії впливає на розвиток клітин злоякісних пухлин [57]. Наведені приклади свідчать про те, що поняття «мультифункціональність» є характерним не тільки для багатьох протеїнів, але й для природних біоактивних пептидів.

У більшості випадків потрібні подальші дослідження структури біоактивних пептидів та механізму дії, а також підтвердження їхньої біологічної активності *in vivo*. Відповідно до принципу молекулярної економії, який був сформульований Ленінджером [66], протеїнам молока окрім основної функції (забезпечення амінокислотами) притаманні й інші, що пов'язані з виживанням новонароджених ссавців. Ці функції реалізуються як на рівні протеїнів, так і пептидів, які утворюються під час процесів травлення в шлунково-кишковому тракті. Це стосується лише природних харчових протеїнів, до яких належать протеїни молока, зокрема сироватки.

З урахуванням даних, які відомі на сьогоднішній день, можна стверджувати, що харчові протеїни, крім основних функцій, виконують ще додаткові, які мають певні переваги і відіграють позитивну роль на ранніх етапах розвитку організму. Підтвердженням цього може бути таке:

1. Наявність великої кількості біоактивних пептидів серед продуктів розщеплення протеїнів молока травними протеазами, що дає підстави вважати ці протеїни прогормонами [67].

2. Послідовності амінокислотних залишків, які відповідають біоактивним пептидам, займають значну частину первинної структури протеїнів молока (β -LG — 51%, α LA — 39%, казеїни — 70%). В інших протеїнах такі послідовності трапляються значно рідше, і біоактивні пептиди, очевидно, утворюються випадково [68].

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

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

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

Процес утворення біоактивних пептидів із протеїнів молока є дуже важливим у виробництві харчових продуктів, які містять протеїни молока або продукти їх протеолізу. Окрім традиційних ферментованих молочних продуктів, до них можна віднести різні суміші для дитячого харчування, продукти для спортсменів, гіпоалергенні продукти на основі гідролізатів молочних протеїнів. Під час створення перелічених вище продуктів дію біоактивних пептидів у більшості випадків не було враховано, проте вживання молочних ферментованих продуктів свідчить про їх позитивний вплив на здоров'я і тривалість життя людини. Такі традиційні ферментовані продукти Ганс Мейзель назвав функціональними продуктами природного походження [35].

На сьогодні створено ряд нових функціональних продуктів на основі протеїнів казеїнового комплексу [69-72]. Однак із протеїнів сироватки таких продуктів виробляють дуже мало [64]. Одним із найвідоміших продуктів із протеїнів сироватки є Bio Zate (США) з антигіпертензивною дією.

Для того, щоб ширше використовувати біоактивні пептиди із протеїнів сироватки молока необхідні подальші дослідження їхньої структури, механізмів біологічної дії *in vivo*, розроблення ефективних способів їх одержання шляхом модифікації технологій з використанням відповідних ензимів або мікроорганізмів заквасок, а також виявлення і обґрунтування біомаркерів, за якими можна оцінювати дію біоактивних пептидів на організм [55, 64].

Після проведення відповідних досліджень і обґрунтувань біоактивні пептиди з протеїнів сироватки молока можуть стати важливими компонентами у функціональних продуктах, а також відіграватимуть важливу роль у реалізації концепції персоналізації харчування людини. Створення функціональних продуктів на основі біоактивних пептидів із протеїнів сироватки молока дасть змогу більш раціонально використовувати цей побічний продукт.

Підсумовуючи вищесказане, можна зауважити, що білки сироватки молока є джерелом ряду біологічно активних пептидів, які мають значний вплив на біологічні функції організму, беруть участь у формуванні біологічної цінності молочних продуктів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Етапи проведення дослідження

Дослідження за темою магістерської роботи були проведені на кафедрі харчової біотехнології і хімії ТНТУ імені Івана Пулюя. Комплексна робота включала дослідження, які були розділені на 3 етапи:

1. Дослідження, що були проведені на першому етапі полягали у вивченні та систематизації інформації наукових публікацій, що стосуються будови казеїнових міцел, виділення білків у системі «вода-протеїни молока-полісахарид» та біоактивних пептидів білків сироватки молока. Також було сформульовано мету та завдання роботи.

2. На наступному етапі виконання магістерської роботи було проведено виділення концентрату нативного казеїну у системі «знежирене молоко-полісахарид», обґрунтовано рецептури для виготовлення дослідних зразків гіпоалергенного молока з наповнювачами кава та ванілін.

3. Третій етап включав в себе розробку технологічної та апаратурно-технологічної схем виробництва гіпоалергенного молока з наповнювачами і характеристику їх показників якості.

2.2 Характеристика сировини та матеріалів, що використовувались у дослідженнях

Для експериментів у якості сировини застосовували свіже знежирене молоко (ДСТУ 3262:2018) кислотністю 18–19°Т.

Осадження та отримання концентрату нативного казеїну (КНК) здійснювалось за допомогою пектину яблучного (ДСТУ 6088: 2009) згідно ТУ 49 1169-85.

Також при роботі використовували у якості наповнювачів каву та ванілін (ДСТУ 4394:2019 та ГОСТ 16599-71).

2.3 Методи дослідження

Характеристика показників якості гіпоалергенного молока з наповнювачами

Вивчення органолептичних показників

Органолептичні показники досліджують у такій послідовності: запах, смак, консистенція та колір. Ці показники повинні відповідати вимогам ДСТУ 2661-2010.

Запах: повинен бути чистим, характерним для наповнювача або ароматизатора, який використовується, без сторонніх запахів.

Смак: повинен бути чистим, без сторонніх присмаків, у міру солодкий, з присмаком відповідного наповнювача або ароматизатора.

Консистенція: однорідна, рівномірна по всьому об'єму.

Колір: білий або обумовлений кольором внесеного наповнювача.

У попередньо дезодоровану колбу з пришліфованою пробкою відбирають (60 ± 5) см³ знежиреного молока. Його пастеризують на водяній бані, температура води у якій становить $(85 \pm 2)^\circ\text{C}$. Колбу виймають з водяної бані, охолоджують до $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$. Після відкриття колби визначають запах молока. Далі невелику кількість молока наливають у склянку, споліскують ним ротову порожнину й оцінюють смак. Запах та смак оцінюють за 5-бальною шкалою згідно з табл. 2.1.

Колір визначають за допомогою скляного циліндру при хорошому освітленні. Консистенцію визначають повільно переливаючи молоко з однієї посудини в іншу.

Таблиця 2.1 – Оцінка запаху та смаку молока

Запах і смак	Оцінка молока	Бали
Чистий, приємний, злегка солодкуватий	Відмінно	5
Недостатньо виражений, порожній	Добре	4
Слабкий кормовий, окислений, слабкий хлівний, слабкий ліполізний, слабкий нечистий	Задовільно	3
Виражений кормовий, в тому числі цибулі, часнику, полину та інших трав, які надають молоку гіркого смаку, хлівний, солоний, окислений, ліполізний, затхлий	Погане	2
Гіркий, згірклий, пліснявий, гнильний, запах і смак нафтопродуктів, ліків, мийних, дезинфікувальних засобів та інших хімікатів	Деже погане	1

Визначення титрованої кислотності (ГОСТ 3624)

У конічну колбу, місткість якої 150...200 см³, піпеткою відмірюють 10 см³ молока, додають 20 см³ дистильованої води і спиртовий розчин фенолфталеїну (не більше 3-х крапель). Після цього суміш перемішують і титрують 0,1 моль/дм³ розчином натрій гідроксиду (NaOH) до появи слабо-рожевого забарвлення, яке відповідає контрольному еталону забарвлення і не зникає протягом 1 хв.

Кислотність молока у градусах Тернера дорівнює об'єму у см³ 0,1 моль/дм³ розчину натрій (калій) гідроксиду, витраченого на нейтралізацію 10 см³ молока, помноженому на 10.

Щоб приготувати контрольний еталон, термін зберігання якого не більше однієї доби, у колбу місткістю 150...200 см³ відміряють піпеткою 10 см³ молока, 20 см³ води і 1 см³ 2,5 %-го розчину кобальт сульфату.

Визначення масової частки жиру (ДСТУ ISO 1211; ДСТУ ISO 488)

Метод базується на виділенні жиру з молока під дією концентрованої сульфатної кислоти та ізоамілового спирту.

У молочний жиромір дозатором відміряють 10 см^3 сульфатної кислоти густиною $1810\text{...}1820 \text{ кг/м}^3$ та $10,77 \text{ см}^3$ підготовленої проби молока. Потім також за допомогою дозатора додають 1 см^3 ізоамілового спирту. Жиромір закривають спеціальною пробкою та інтенсивно перемішують до повного розчинення білкових речовин. Далі жиромір поміщають у водяну баню з температурою $(65 \pm 2)^\circ\text{C}$ та витримують 5 хв, після чого ставлять у патрони центрифуги вузькою частиною до центру. Важливо, щоб патрони були розміщені симетрично один до одного. Центрифугують 5 хв з частотою обертів $1100\text{...}1200$ об/хв, після чого рухом гумової пробки регулюють стовпчик жиру так, щоб він містився у градуйованій частині і знову вміщують пробками донизу у водяну баню з температурою $(65 \pm 2)^\circ\text{C}$ на 5 хв. Пізніше проводять відлік за шкалою жироміра: показ жироміра відповідає масовій частці жиру в молоці у %.

Визначення масової частки білка методом формольного титрування (ГОСТ 25179-90)

Метод ґрунтується на залежності між кількістю вільних карбоксильних груп білка молока і його масовою часткою у молоці.

У колбу місткістю 100 см^3 вносять 20 см^3 молока і $0,25 \text{ см}^3$ 2 %-го спиртового розчину фенолфталеїну. Вміст колби титрують розчином NaOH ($0,1$ моль/ дм^3) до появи рожевого забарвлення, яке відповідає забарвленню еталону та не зникає протягом однієї хвилини.

Далі в колбу вносять 4 см^3 нейтралізованого 40% формаліну (нейтралізований формалін отримують додаванням до 50 см^3 формаліну 3-4 крапель 2 % спиртового розчину фенолфталеїну, а пізніше по краплях додають спочатку 40%, а в кінці $0,1$ моль/ дм^3 розчин NaOH до появи слабо рожевого забарвлення) і знову титрують розчином гідроксиду натрію ($0,1$ моль/ дм^3) до

появи забарвлення, яке відповідає еталону. Кількість лугу, яка була витрачена на друге титрування (cm^3), множать на коефіцієнт 0,959 і таким чином отримують масову частку білка в молоці у %.

2.4 Методи статистичної обробки експериментальних даних

Експериментальні дані обробляли методами математичної статистики в редакторі Microsoft Excel 2013. Достовірність отриманих експериментальних даних визначають за допомогою критерію Стьюдента при довірчій ймовірності $p < 0,05$.

Графічна частина роботи здійснена з застосуванням тривимірної системи автоматизованого проектування «AutoCAD 2020».

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

До важливих високоцінних харчових білків належать і білки молока, які за своєю природою збалансовані по складу незамінних амінокислот. Саме тому їх широко використовують при створенні продуктів харчування. Концентрати молочних білків (казеїн, копреципітати, казеїнати, концентрати сироваткових білків) застосовують як збагачувачі білка в багатьох галузях промисловості, зокрема і молочній. Також можливе їх використання у вигляді добавок: емульгаторів і стабілізаторів.

Важливими також є концентрати сироваткових білків, які широко застосовують у вигляді альбумінного молока або білкової маси. З них також виготовляють гідролізати, які використовують при виробництві гіпоалергенних продуктів харчування.

Промисловими способами, які дозволяють виділити білки із знежиреного молока та отримати нативні білки є методи, засновані на їх коагуляції під дією різних чинників, а також на основі гель-ультрафільтрації та зворотного осмосу. Проте, застосовуючи вищеперераховані методи, може відбутися денатурація і зміна властивостей білків.

Виділити і концентрувати білки можна також за допомогою високопродуктивного методу безмембранного осмосу. Його суть полягає у концентруванні в системах „білок – полісахарид – вода”, при чому мембрана не використовується. Даний метод ґрунтується на важливій властивості сумішей полімерів – термодинамічній несумісності білків і полісахаридів у водному середовищі. При безмембранному осмосі використовують два розчини, які мають різницю хімічних потенціалів розчинника. У якості мембрани виступає поверхня, яка знаходиться між розчинами термодинамічно несумісних полімерів. При змішуванні розчину полісахариду із знежиреним молоком відбувається розділення системи. Білковий концентрат утворюється при

переході води в полісахаридну фазу, яка відповідно розводиться. Через деякий час після відстоювання спостерігається мінімальна границя розділення фаз.

Як результат, при розділенні осаджуються білки молока. Основні фракції білків сироватки присутні в надосадовій (сироватко-пектиновій фракції) рідині. В осаді міститься концентрат нативного казеїну, який володіє високими функціональними властивостями.

Отримані фракції концентрат нативного казеїну (КНК) і сироватко-пектинова фракція (СПФ) необмежено розчиняються у воді, добре змішуються з будь-якими компонентами молока і іншою харчовою сировиною, що дозволяє використовувати їх для виробництва рідких та пастоподібних та продуктів.

При розробці технології нових продуктів на основі КНК для додаткового підвищення біологічної цінності нами пропонується використання низькоалергенного гідролізату сироваткових білків [73]. Його використання дозволить отримати продукт із зниженими алергенними властивостями та водночас відтворити природній склад молока.

Для отримання концентрату нативного казеїну використовували 6,5 % розчин яблучного пектину. Для приготування системи „знежирене молоко – полісахарид” брали 900 г молока і 100 г розчину пектину, перемішували 10 хвилин. Для осадження КНК гомогенну суміш витримували при 4⁰С протягом 2,5 годин [74]. Необхідно відмітити, що протягом усього періоду фракціонування потрібно підтримувати постійну температуру суміші. Вигляд суміші у процесі розділення показано на рис. 3.1.

Свіжоотриманий розчин КНК володів яскраво-білим кольором, приємним смаком та запахом, рН 6,68. Для отримання гіпоалергенного молока нами було також використано панкреатиновий гідролізат сироваткових білків. При його попередній характеристиці було встановлено, що він має виражений альбумінний присмак, кисломолочний запах та білий з кремовим відтінком колір. Для того, щоб отримати готовий продукт з хорошими органолептичними характеристиками, ми використали такі наповнювачі, як кава та ванілін.



а)



б)

Рисунок 3.1 – Вигляд системи «знежирене молоко – полісахарид» через 30 хв (а) та через 2,5 год (б) після початку відстоювання

3.1 Обґрунтування рецептури та приготування дослідних зразків

Початковим етапом дослідження було розроблення складу дослідних зразків та визначення складу основних компонентів. Рецептури гіпоалергенного молока на основі КНК наведено у таблиці 3.1. Кількість наповнювачів визначали експериментально.

Під час виробництва гіпоалергенного молока з кавою, каву вносили у вигляді кавової витяжки. Для визначення оптимальної кількості наповнювача, використовували три зразки із кількістю кавової витяжки 1,5%, 2,0% та 2,5%.

Таблиця 3.1 – Рецептури для виготовлення гіпоалергенного молока на основі концентрату нативного казеїну з наповнювачами кава та ванілін

Складники рецептури	Одиниці	Кількість					
		Гіпоалергенне молоко з кавою м.ч.ж. 2,5%			Гіпоалергенне молоко з ваніліном м.ч.ж. 2,5 %		
		Взірець 1	Взірець 2	Взірець 3	Взірець 1	Взірець 2	Взірець 3
Концентрат нативного казеїну	кг	204,1	204,1	204,1	204,1	204,1	204,1
Гідролізат сироваткових білків	кг	37	37	37	37	37	37
Вершки м.ч.ж. 35%	кг	71,4	71,4	71,4	71,4	71,4	71,4
Ванілін	кг	-	-	-	0,1	0,2	0,3
Цукор	кг	70	70	70	80,0	85,0	90,0
Кава (витяжка)	кг	15	20	25	-	-	-
Питна Вода	кг	602,5	597,5	592,5	607,4	602,3	597,2
Всього	кг	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Органолептичну оцінку проводили за загальноприйнятими методиками, з використанням так званого кількісного критерію сенсорного оцінювання молочних продуктів.

Таблиця 3.2 – Органолептична оцінка якості гіпоалергенного молока з кавою, залежно від концентрації внесеного наповнювача

Назва показника	Взірець		
	Гіпоалергенне молоко з кавою 1,5%	Гіпоалергенне молоко з кавою 2,0%	Гіпоалергенне молоко з кавою 2,5%
Зовнішній вигляд	Притаманний молоку	Притаманний молоку	Притаманний молоку
Колір	Білий, із незначним кремуватим відтінком	Легкий кремовий відтінок	Кремовий відтінок
Консистенція	Однорідна рідина без сторонніх домішок	Однорідна рідина без сторонніх домішок	Однорідна рідина без сторонніх домішок
Смак	Молочний із слабким присмаком кави та вираженим присмаком альбуміну	Молочний із достатньо вираженим присмаком кави	Злегка молочний із чітко вираженим присмаком кави
Запах	Добре виражений молочний, запах кави практично не відчувається	Добре виражений молочний, присутній легкий запах кави	Слабо виражений молочний, присутній добре відчувається запах кави

Із таблиці 3.2 за результатами органолептичного оцінювання можна зробити висновок, що найкращі показники спостерігаються у зразку №2, де вміст

кавової витяжки у гіпоалергенному молоці становить 2,0%. Тому цей зрієць можна вважати оптимальним.

Під час виробництва гіпоалергенного молока з ваніліном, для визначення оптимальної кількості наповнювача, використовували три зразки із кількістю ваніліну 0,01%, 0,02% та 0,03%.

За результатами оцінювання із таблиць 3.3, 3.4 і 3.5 видно, що найвищу оцінку отримав зрієць №2 (вміст ваніліну 0,02%), тобто даний зразок є найбільш оптимальним за органолептичними показниками.

Таблиця 3.3 – Результати органолептичної оцінки гіпоалергенного молока з ваніліном (зразок №1)

Показник якості	Зовнішній вигляд	Смак	Запах	Колір	Консистенція	Загальна оцінка	
Оцінка експертів	1-ий	задовільно	добре	задовільно	задовільно	добре	задовільно
	2-ий	добре	добре	задовільно	відмінно	добре	добре
	3-ій	задовільно	задовільно	добре	добре	задовільно	задовільно
	4-ий	задовільно	задовільно	добре	добре	відмінно	добре
	5-ий	добре	добре	добре	добре	добре	добре
	Сумарна оцінка	задовільно	добре	добре	добре	добре	добре

Таблиця 3.4 – Результати органолептичної оцінки гіпоалергенного молока з ваніліном (зразок №2)

Показник якості	Зовнішній вигляд	Смак	Запах	Колір	Консистенція	Загальна оцінка
Оцінка експертів	1-ий	добре	відмінно	відмінно	добре	добре
	2-ий	відмінно	добре	відмінно	добре	відмінно
	3-ій	відмінно	відмінно	відмінно	добре	відмінно
	4-ий	відмінно	відмінно	добре	відмінно	відмінно
	5-ий	відмінно	добре	відмінно	відмінно	добре
	Сумарна оцінка	відмінно	відмінно	відмінно	добре	відмінно

Таблиця 3.5 – Результати органолептичної оцінки гіпоалергенного молоказ ваніліном (зразок №3)

Показник якості	Зовнішній вигляд	Смак	Запах	Колір	Консистенція	Загальна оцінка	
Оцінка експертів	1-ий	добре	добре	добре	відмінно	добре	добре
	2-ий	добре	відмінно	добре	добре	добре	добре
	3-ій	відмінно	добре	задовільно	добре	добре	добре
	4-ий	добре	відмінно	добре	відмінно	відмінно	відмінно
	5-ий	відмінно	добре	добре	відмінно	добре	добре
	Сумарна оцінка	добре	добре	добре	відмінно	добре	добре

3.2. Фізико-хімічні показники гіпоалергенного молока на основі КНК із наповнювачами кава та ванілін

Властивості молока як єдиної фізико-хімічної системи обумовлюються властивостями компонентів, що містяться в ньому. Будь-які зміни у вмісті чи стані складових частин молока мають супроводжуватися змінами його фізико-хімічних властивостей.

Головними фізико-хімічними властивостями молока є кислотність, густина, яка є функцією його складу, тобто залежить від вмісту жиру, температура замерзання та електропровідність та ін. Усі ці показники і обумовлюють якість молока та молочних продуктів і впливають на технологічні процеси переробки молока.

Гіпоалергенне молоко кавове та ванільне, які виготовлені за рецептурами зразків №2, мають наступні фізико-хімічні властивості (таблиця 3.6).

Таблиця 3.6 – Фізико-хімічні показники кавового та ванільного молока

Показник	Значення	
	Гіпоалергенне молоко з кавою 2,0%	Гіпоалергенне молоко з ваніліном 0,02%
Масова частка жиру, %	2,5±0,06	2,5±0,06
Титрована кислотність, °Т	14,5±0,35	15±0,38
Активна кислотність, рН	6,61±0,14	6,6±0,14
Густина, кг/м ³	1049±2	1027±2
Фосфатаза	Відсутня	Відсутня

При порушенні умов зберігання молока в ньому розвиваються молочнокислі мікроорганізми, які зброджують лактозу, внаслідок чого акумулюється молочна кислота, яка зумовлює підвищення його кислотності, тому титрована кислотність є показником санітарної якості молока та критерієм його свіжості.

Визначення фосфатази широко використовується у молочній промисловості як підтвердження дотримання температурних та часових вимог пастеризації. Відсутність фосфатази підтверджує, що продукти при виготовленні були нагріті до необхідної температури пастеризації та в них відсутній вміст сирого молока.

При зберіганні готового продукту важливим є запобігання його псуванню. Велика увага приділяється саме температурі зберігання, адже при її оптимальному значенні можна збільшити термін зберігання гіпоалергенного молока та стабілізувати його якісні показники. Тому доцільним було дослідження зміни активної та титрованої кислотності гіпоалергенного молока з кавою та ваніліном. Температура зберігання готових продуктів становить $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ не довше 7-ми діб. Отримані результати подані у вигляді графіків на рисунках 3.2 та 3.3.

Із графіку можна зробити висновок, що внесення наповнювача у гіпоалергенне молоко практично не змінює активну кислотність. Титрована кислотність із зміною часу зростає.

Проаналізувавши графік 3.3 видно, що титрована кислотність ванільного молока із зміною часу поступово зростає, активна кислотність практично не змінюється.

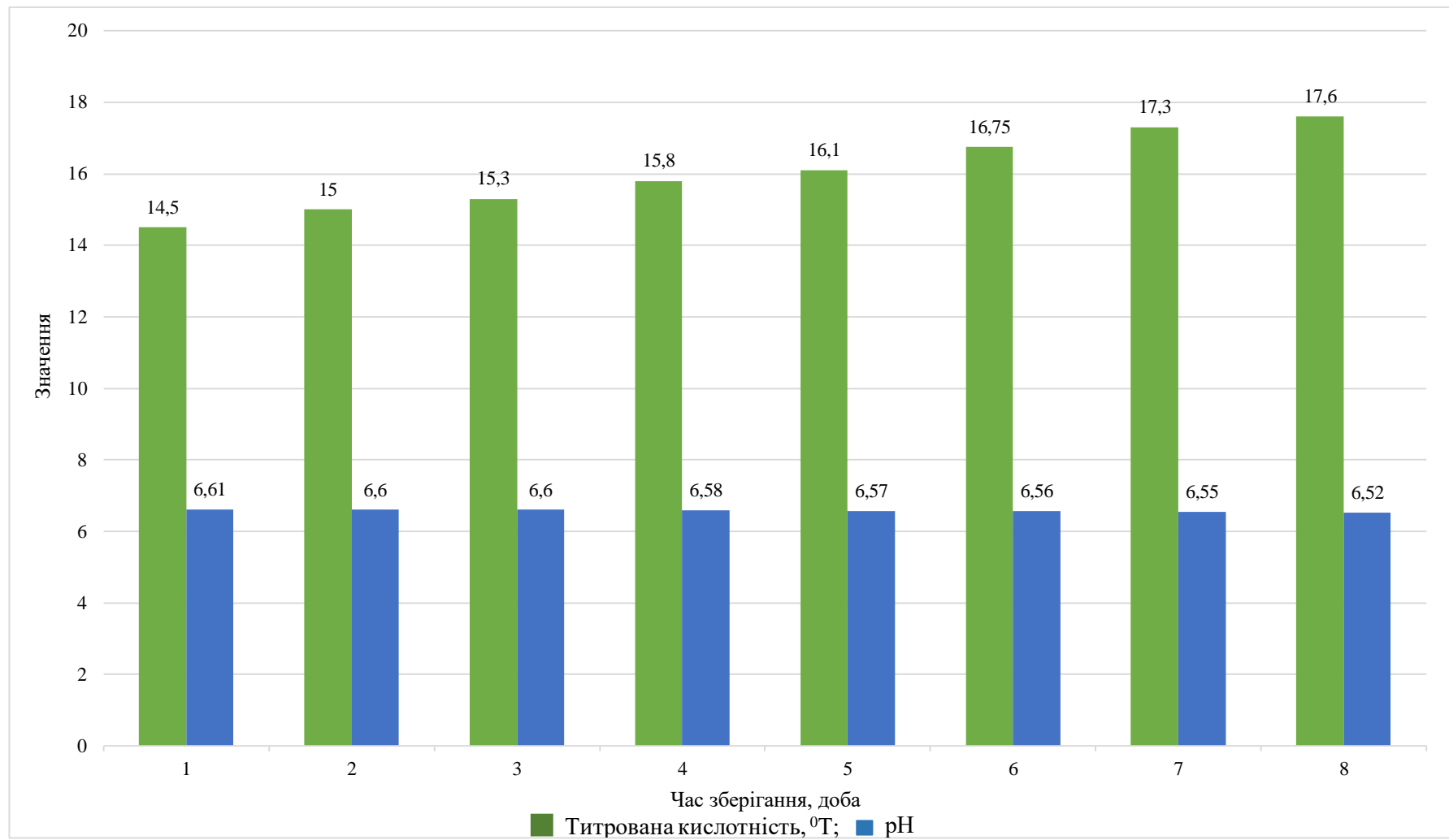


Рисунок 3.2 – Залежність титрованої та активної кислотності гіпоалергенного молока з кавою від часу зберігання готового продукту

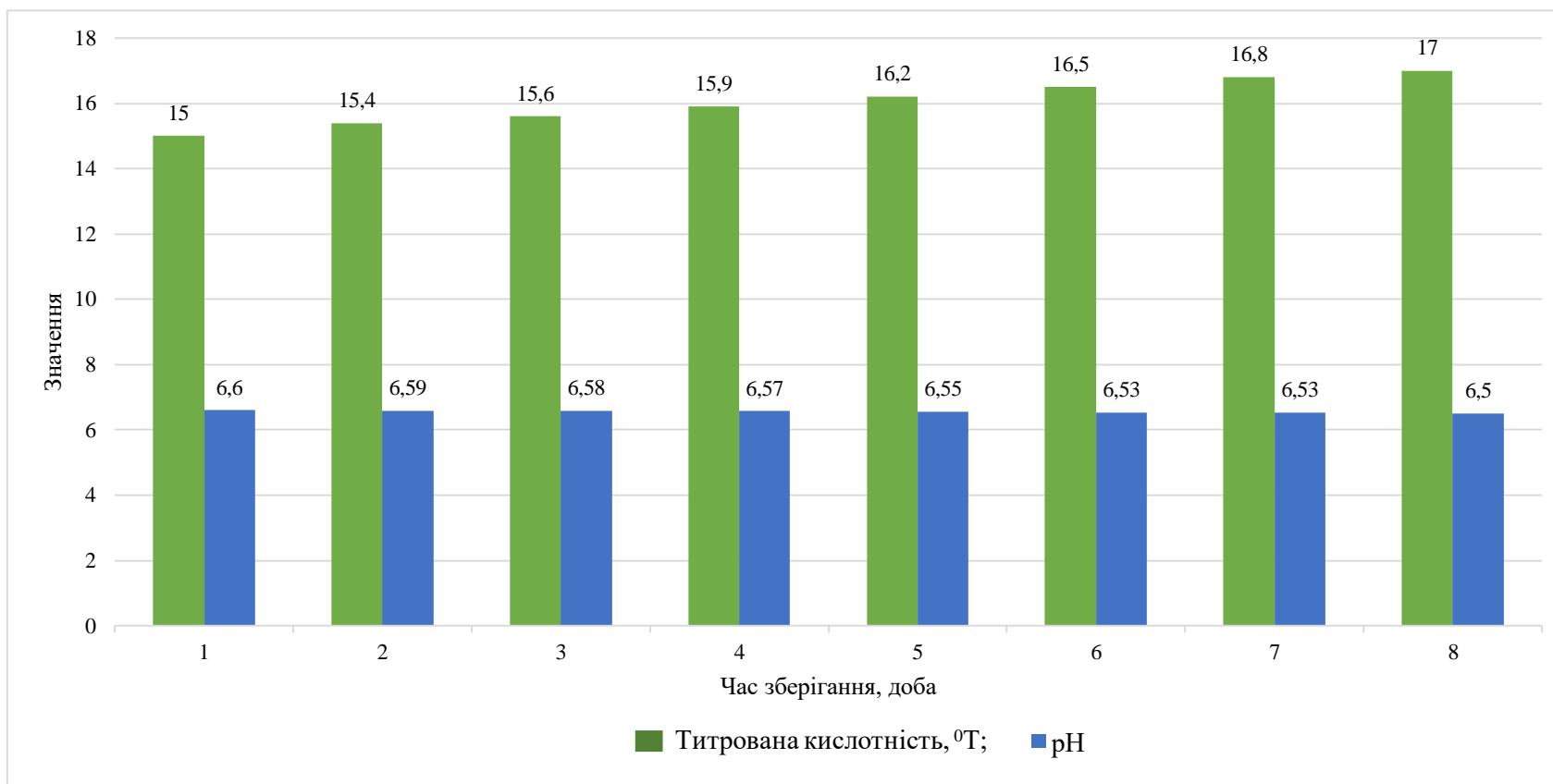


Рисунок 3.3 – Залежність титрованої та активної кислотності гіпоалергенного молока з ваніліном від часу зберігання готового продукту

3.3. Розробка технології виробництвагіпоалергенного молока з кавою та ваніліном

Технологічна схема виготовлення гіпоалергенного молока з кавою та ваніліном представлена на рис. 3.4.

Підготовка знежиреного молока. У молоці знежиреному, яке поступає на виробництво гіпоалергенного молока з кавою та ваніліном, відбирають проби для проведення органолептичних та фізико-хімічних досліджень. Оцінюють смак, запах і колір молока, визначають його механічне забруднення, бактеріологічне обсіменіння, густину, кислотність, масову частку жиру. Ці показники мають відповідати чинному ДСТУ 3262:2018.

Знежирене молоко охолоджують до 4-6°C. За таких умов гальмується життєдіяльність молочнокислої мікрофлори, а титрована кислотність майже не зростає. Не рекомендується зберігати молоко довше 4...10 годин після приймання, адже тривале зберігання сприяє розвитку психотропної мікрофлори, яка продукує протеолітичні та ліполітичні ферменти, збільшується вміст бактерій групи кишкової палички.

Після визначення показників, знежирене молоко пастеризують на пастеризаційно-охолоджувальній установці. Мета пастеризації – повне знищення патогенних мікроорганізмів, руйнування ферментів та максимальне зниження залишкової мікрофлори. Ефективність пастеризації забезпечується правильністю вибору температури нагрівання молока та тривалості витримки його при цій температурі. Тому пастеризація знежиреного молока проводиться при температурі $(74 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ із витримкою 20...25 с (рис. 3.5, поз. 3). Далі його охолоджують та подають у резервуар (рис. 3.5, поз. 8) для приготування системи «знежирене молоко – полісахарид».

Підготовка системи «знежирене молоко-полісахарид». Пектин – добре розчинна у воді речовина білого кольору. У даній роботі використовується розчин яблучного пектину концентрацією $6,5 \pm 0,3\%$, який готується попередньо за допомогою розчинення порошку у воді [74]. Для цього кількість пектину, яка

необхідна за рецептурою зважують (рис. 3.5, поз. 5), просіюють (рис. 3.5, поз. 6) та подають у місткість (рис. 3.5, поз. 7) разом із підігрітою питною водою. Після інтенсивного перемішування, розчин залишають на певний час у місткості для повного розчинення.

Далі приготування системи «знежирене молоко – полісахарид» відбувається за допомогою змішування у резервуарі (рис. 3.5, поз. 8) необхідної кількості знежиреного молока та розчину пектину. Отриману суміш перемішують та витримують 2,5 години до утворення осаду та надосадової рідини:

- осад – концентрат нативного казеїну (КНК);
- надосадкова рідина – сироватко-пектинова фракція (СПФ).

Поділ системи на фази. Важливим етапом є поділ системи на фази, який відбувається після завершення процесу відстоювання суміші. За допомогою насоса (рис. 3.5, поз. 9) осад, а саме концентрат білка подають на виробництво гіпоалергенного молока з кавою та ваніліном. Отримана фракція концентрат нативного казеїну (КНК) добре розчиняється у воді та змішується з будь-якими компонентами молока і іншою харчовою сировиною. Сироватково-пектинова фракція далі нами не використовується, тому відправляється на кінцеве зберігання у резервуар (рис. 3.5, поз. 10).

Виготовлення гіпоалергенного молока з кавою та ваніліном. Далі відбувається приготування гіпоалергенного молока з кавою та ваніліном. Для цього концентрат нативного казеїну поступає у резервуари (рис. 3.5, поз. 16 і 17), де змішується з питною водою та гідролізатом сироваткових білків. Розрахунок кількості гідролізату сироваткових білків проводиться із врахуванням масової частки білків сироватки у коров'ячому молоці [74].

Всі компоненти додаються у кількості, згідно з рецептурою (табл. 3.1). Каву, як наповнювач, вносять у молоко у вигляді кавової витяжки, яку готують попередньо у ємності (рис. 3.5, поз. 11) наступним чином: до однієї частини змеленої кави додають три частини води, суміш кип'ятять протягом 5 хв, витримують близько 30 хв, екстракт фільтрують та охолоджують. Нами

встановлено, що найоптимальнішим варіантом є приготування гіпоалергенного молока з кавовою витяжкою, концентрація якої становить 2,0%.

При виробництві гіпоалергенного молока ванілін вносять у вигляді порошку, який попередньо зважують на вагах (рис. 3.5, поз. 5) та просіюють. Вище доведено, що найкращими органолептичними показниками володіє молоко, де вміст ваніліну становить 0,02%.

Після змішування, продукт подається на пастеризацію у пластинчасту пастеризаційно-охолоджувальну установку (рис. 3.5, поз. 18), далі охолоджується та подається на фасування у фасувальний автомат (рис. 3.5, поз. 19).

Термін зберігання гіпоалергенного молока з кавою та ваніліном становить 7 діб при температурі $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

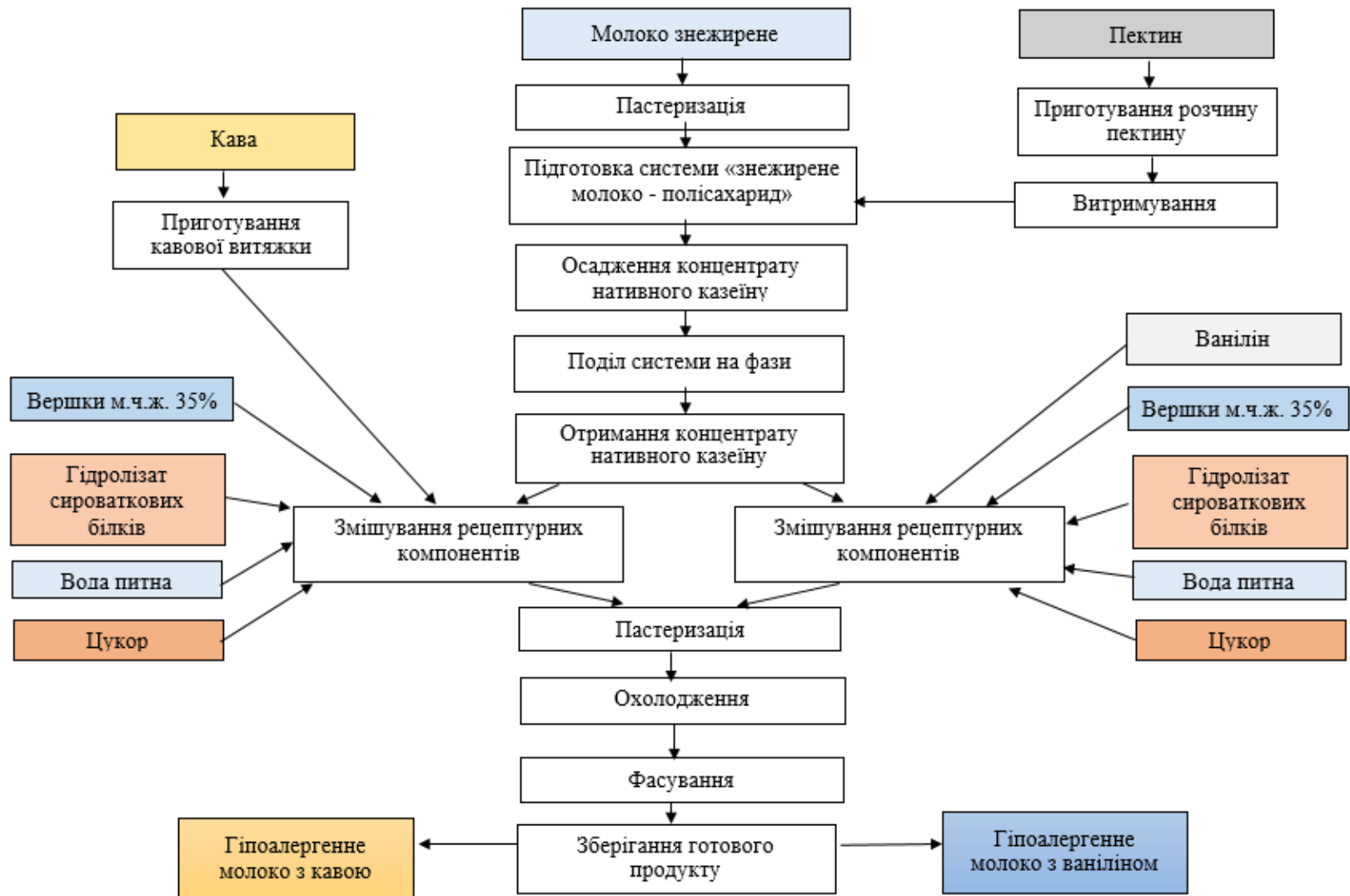


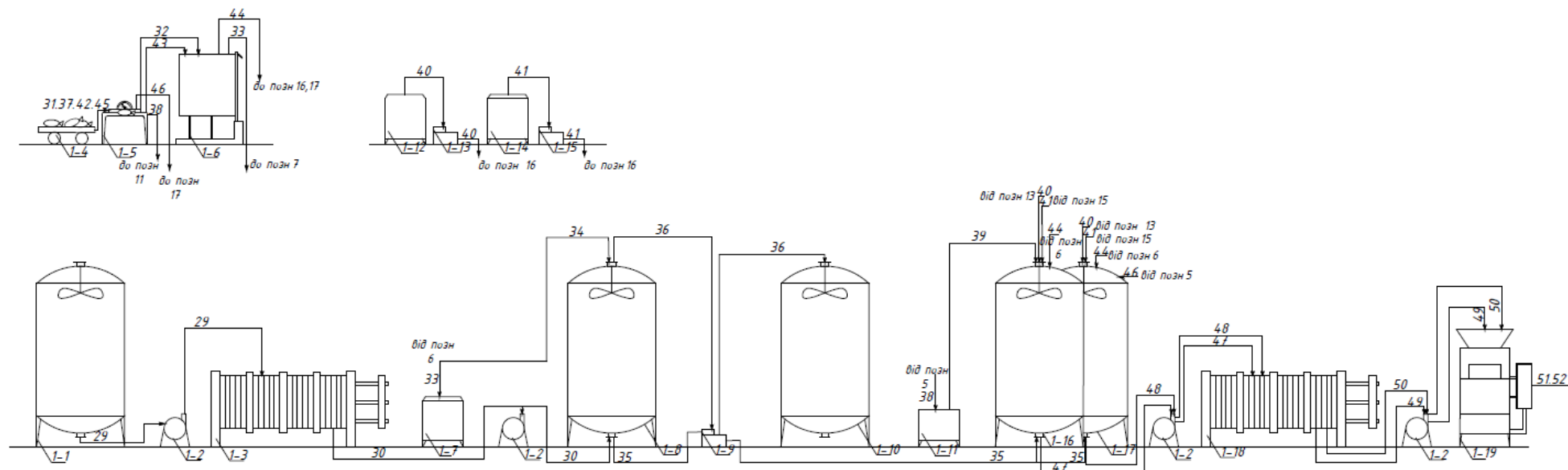
Рисунок 3.4 – Технологічна схема виготовлення гіпоалергенного молока з кавою та ваніліном

3.4 Розробка апаратурно-технологічної схеми виробництва запропонованих продуктів

Апаратурно-технологічна схема виготовлення гіпоалергенного молока з каваю та ваніліном подана на рис. 3.5.

Таблиця 3.7 – Специфікація технологічного обладнання до апаратурно-технологічної схеми виробництва гіпоалергенного молока з каваю та ваніліном

Назва	Позначення обладнання
Резервуар для знежиреного молока	1-1
Насос для перекачування знежиреного молока	1-2
ПОУ для знежиреного молока	1-3
Візок	1-4
Ваги	1-5
Просіювач	1-6
Термоізоляційна місткість для приготування розчину пектину	1-7
Резервуар для розділення суміші	1-8
Насос для перекачування КНК і СПФ	1-9
Резервуар для кінцевого зберігання СПФ	1-10
Місткість для приготування кавової витяжки	1-11
Місткість для зберігання ГСБ	1-12
Насос для перекачування ГСБ	1-13
Місткість для зберігання вершків	1-14
Насос для перекачування вершків	1-15
Резервуар для приготування кавового молока	1-16
Резервуар для приготування ванільного молока	1-17
ПОУ для готових продуктів	1-18
Фасувальний автомат	1-19



Технологічні потоки:

29 – молоко знежирене; 30 – молоко знежирене пастеризоване охолоджене; 31 – пектин; 32 – пектин зважений; 33 – пектин зважений просіяний;
 34 – розчин пектину; 35 – КНК; 36 – СПФ; 37 – кава; 38 – кава зважена; 39 – кавова витяжка; 40 – ГСБ; 41 – вершки м.ч.ж. 35%; 42 – цукор; 43 –
 цукор зважений; 44 – цукор просіяний; 45 – ванілін; 46 – ванілін зважений; 47 – молоко кавове; 48 – молоко ванільне; 49 – молоко кавове
 охолоджене до температури фасування; 50 – молоко ванільне охолоджене до температури фасування; 51 - гіпоалергенне молоко кавове фасоване;
 52 – гіпоалергенне молоко ванільне фасоване.

Рисунок 3.5 – Апаратурно-технологічна схема виготовлення гіпоалергенного молока з кавою та ваніліном

РОЗДІЛ 4

ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ

4.1 Інструкції з охорони праці на підприємстві

Більшість людей не менше третини свого життя проводять на роботі. Тому від того, як організоване їхнє робоче місце, наскільки продумані їхні дії, залежить якість виконання службових обов'язків, безпека та навіть настрої працівників.

Своєю головною метою керівники підприємств вважають отримання максимального прибутку в стислі терміни, тому до питань охорони праці ставляться, як правило, формально. Але ж забезпечення безпечних умов праці — це як обов'язок роботодавця, так і прямий шлях до підвищення ефективності роботи та захист від можливих економічних втрат. По-перше, кожний працівник цінний тим, що має власний досвід та знання, необхідні певному підприємству. По-друге, правильно організована робота зі створення безпечних умов праці підвищує дисциплінованість працівників, завдяки чому поліпшується працездатність, знижується ризик травмування, зменшується ймовірність виходу з ладу устаткування та виникнення інших нештатних ситуацій. Тобто в кінцевому підсумку ефективність роботи підвищується. По-третє, під поняттям «охорона праці» мається на увазі не лише забезпечення безпеки працівників під час виконання ними службових обов'язків.

Правильний підхід до організації охорони праці, застосування матеріальних і нематеріальних методів стимулювання працівників надають останнім відчуття захищеності, стабільності, сприяють зацікавленості в роботі, що знову ж таки позитивно впливає на її ефективність.

Отже, будь-яке підприємство, установа, організація повинні мати пакет документів, які визначають обсяги їхньої діяльності та регламентують питання охорони праці. Серед них одним з найголовніших є інструкція з охорони праці.

Інструкція з охорони праці – це акт з охорони праці підприємства, що містить обов’язкові для дотримання працівниками вимоги з охорони праці при виконанні ними робіт певного виду або за певною професією на всіх робочих місцях, у виробничих приміщеннях, на території підприємства, будівельних майданчиках або в інших місцях.

Вимоги до змісту й побудови інструкції з охорони праці визначаються Положенням про розробку інструкцій з охорони праці (НПАОП 0.00-4.15-98). У ньому, зокрема, зазначено, що:

«1.5. Інструкції, що діють на підприємстві, належать до нормативних актів про охорону праці, чинних у межах конкретного підприємства.<...> Вони затверджуються роботодавцем і є обов’язковими для дотримання працівниками відповідних професій або при виконанні відповідних робіт на цьому підприємстві.

1.6. Інструкції повинні відповідати чинному законодавству України, вимогам державних міжгалузевих і галузевих нормативних актів про охорону праці: правил, норм, стандартів, інших нормативних і організаційно-методичних документів про охорону праці, на основі яких вони розробляються».

Згідно з цим же Положенням інструкції повинні містити такі розділи:

- загальні положення;
- вимоги безпеки перед початком роботи;
- вимоги безпеки під час виконання роботи;
- вимоги безпеки після закінчення роботи;
- вимоги безпеки в аварійних ситуаціях.

За необхідності інструкції можна доповнити й іншими розділами. Слід зазначити, що Положення чітко роз’яснює, які саме питання мають висвітлюватися в цих розділах. Так, розділ «Загальні положення» повинен містити:

- відомості про сферу застосування інструкції;
- загальні відомості про об’єкт розробки;

- умови і порядок допуску працівників до самостійної роботи за професією або до виконання відповідного виду робіт;
- вимоги правил внутрішнього трудового розпорядку, що стосуються питань охорони праці для даного виду робіт або професії;
- характеристику основних небезпечних та шкідливих виробничих факторів для даної професії (виду робіт), особливості їх впливу на працівника;
- перелік видів спецодягу, спецвзуття та інших засобів індивідуального захисту, що належать до видачі працівникам даної професії (виду робіт);
- вимоги санітарних норм і правил особистої гігієни, яких повинен дотримуватись працівник під час виконання роботи.

Розділ «Вимоги безпеки перед початком роботи» має висвітлювати таке:

- порядок приймання змін у випадку безперервної роботи, у тому числі при порушенні режиму роботи виробничого обладнання або технологічного процесу;
- порядок підготовки робочого місця;
- порядок перевірки справності обладнання, інструменту, захисних пристроїв небезпечних зон машин і механізмів, пускових, запобіжних, гальмових і очисних пристроїв, систем блокування та сигналізації, вентиляції та освітлення, знаків безпеки, первинних засобів пожежогасіння, виявлення видимих пошкоджень захисного заземлення (занулення) тощо;
- порядок перевірки наявності та стану вихідних матеріалів (сировини, заготовок, напівфабрикатів);
- порядок повідомлення роботодавця про виявлені несправності обладнання, пристроїв, пристосувань, інструменту, засобів захисту тощо.

У розділі «Вимоги безпеки під час роботи» мають бути наведені:

- відомості щодо безпечної організації праці, застереження про можливі небезпечні, неправильні методи та прийоми праці, які заборонено застосовувати;
- правила безпечного поводження з вихідними матеріалами, з готовою продукцією, допоміжними матеріалами та відходами виробництва, що становлять небезпеку для працівників;
- правила безпечної експлуатації внутрішньоцехових транспортних і вантажопідіймальних засобів і механізмів, тари;
- вказівки щодо порядку утримання робочого місця в безпечному стані;
- можливі види небезпечних відхилень від нормального режиму роботи обладнання та технологічного регламенту і способи їх усунення;
- вимоги щодо використання засобів індивідуального та колективного захисту від шкідливих і небезпечних виробничих факторів;
- умови, за яких робота повинна бути припинена (технічні, метеорологічні, санітарно-гігієнічні тощо);
- вимоги щодо забезпечення пожежо- та вибухобезпеки;
- порядок повідомлення роботодавця про нещасні випадки чи раптові захворювання, факти порушення технологічного процесу, виявлені несправності устаткований, пристроїв, інструменту, засобів захисту та про інші небезпечні та шкідливі виробничі фактори, що загрожують життю і здоров'ю працівників.

Розділ «Вимоги безпеки після закінчення роботи» має охоплювати такі питання:

- порядок безпечного вимикання, зупинення, розбирання, очищення і змащення обладнання, пристроїв, машин, механізмів та апаратури, а при безперервному процесі — порядок передачі їх черговій зміні;
- порядок здавання робочого місця;
- порядок прибирання відходів виробництва;

- вимоги санітарних норм і правил особистої гігієни, яких повинен дотримуватись працівник після закінчення роботи;
- порядок повідомлення роботодавця про всі недоліки, що виявились у процесі роботи.

У розділі «Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях» має розкриватися таке:

- відомості про ознаки можливих аварійних ситуацій, характерні причини аварій (вибухів, пожеж тощо);
- інформація про засоби та дії, спрямовані на запобігання можливим аваріям;
- порядок дій, особисті обов'язки та правила поведінки працівника при виникненні аварії згідно з планом її ліквідації, у тому числі якщо вона сталася під час передачі/приймання зміни при безперервній роботі;
- порядок повідомлення роботодавця про аварії та ситуації, що можуть до них призвести;
- відомості про порядок застосування засобів протиаварійного захисту та сигналізації;
- порядок дій щодо надання першої медичної допомоги потерпілим під час аварії.

При розробці інструкції за основу, як правило, береться типова інструкція з охорони праці для певної посади або роботи. Інструкції зазвичай передбачають все, що тільки може виникнути під час виконання такої роботи (навіть суто теоретично).

Текст інструкції з охорони праці має бути конкретним, стислим та зрозумілим, аби уникнути можливості різного тлумачення, не має містити не властивих для нормативних актів слів, словосполучень і зворотів, характерних для розмовної мови, довільних скорочень слів, іноземних слів, але допускається застосування загальноприйнятих скорочень та абревіатур. Потрібно уникати викладення вимог у формі заборони. Не потрібно застосовувати слова «категорично», «особливо», «обов'язково», «суворо» тощо, оскільки всі вимоги

інструкції є однаково обов'язковими. Інструкція з охорони праці може ілюструватись малюнками, схемами, кресленнями.

4.2 Методи боротьби з монотонністю праці на виробництві

У сучасних умовах виробництва та використання людського ресурсу, домінуючою тенденцією є праця, пов'язана з одноманітним, постійно повторюваним виконанням трудових завдань та обов'язків.

У психологічній літературі поняттям «монотонність» характеризують особливий психічний стан, який виникає у людини як реакція на одноманітну і бідну на враження діяльність. У соціально-економічній літературі монотонність пов'язується з надмірним розчленуванням трудового процесу на прості елементи (операції).

Основні ознаки монотонних робіт такі:

- малоелементний склад, тобто структурна одноманітність і простота трудових дій;
- незначна тривалість виконання однотипних трудових операцій і дій;
- висока повторюваність трудових операцій і дій за одиницю часу;
- заданий темп і ритм роботи;
- обмежене число сенсорних і м'язових систем, що беруть участь в операції;
- змушена робоча поза.

На сьогоднішній день велике значення надається розробці заходів, спрямованих на зниження впливу монотонності. Заходи, впроваджені на деяких виробництвах, також можна розділити на дві групи, які найбільше прямо спрямовані на зняття одного із двох виділених умов виникнення стану монотонії. Перша спрямована на порушення регулярності, ритмічності однотипних рухів, дій, операцій. Це введення чергування операцій, періодичні зміни швидкості руху конвеєра, зняття примусового темпу й ритму, укрупнення операцій і т.д. Друга — зняття або зменшення дефіциту як зовнішніх, так і внутрішніх роздратувань. Це головним чином впровадження функціональної музики.

При організації монотонних робіт важливе значення має вибір темпу роботи. Темп може бути вільним або примусовим. Кожний з них має переваги і недоліки. Тому при виборі темпу роботи слід виходити зі специфіки конкретного виробництва. В одних випадках доцільним є оптимальний заданий темп з регулюванням швидкості конвеєра відповідно до кривої працездатності. Варіація швидкості не повинна перевищувати 10—15 %. В інших випадках ефективне самостійне регулювання робочого темпу. Останнє застосовується на автономних конвеєрах, що забезпечує не лише свободу ритму, а й регулювання змісту роботи.

На монотонність роботи вказують три групи ознак:

- психологічні — швидка поява суб'єктивного відчуття стомлення, сонливості, апатії, нудьги;
- фізіологічні — зниження частоти пульсу і дихання, зменшення споживання кисню, зниження м'язового тону;
- виробничі — періодичні коливання середньої тривалості виконання операцій, нерівномірність виробітку та його зменшення.

Ефективним засобом боротьби з монотонністю є бригадно-групова форма організації потоку. Суть її в тому, що бригада виконує операції всього циклу по виготовленню більш-менш закінченого продукту (вузла). Процеси виготовлення кожного вузла виділяються в самостійні виробничі секції. Робітники працюють у вільному ритмі, а вузли з'єднуються в монтажній секції. В цьому випадку трудовий процес менше розчленований і тісніше кооперований.

Зменшенню негативного впливу монотонних робіт на психічний стан працівників і показники їхньої праці сприяють такі заходи:

- раціоналізація режимів праці і відпочинку;
- естетизація виробничого середовища;
- застосування функціональної музики.

До факторів зменшення монотонності відносяться також психологічні заходи, покликані посилити внутрішні мотиви діяльності. Це, зокрема, психологічна стимуляція трудової діяльності за рахунок постановки проміжних

виробничих цілей, забезпечення працівників поточною інформацією щодо виконання роботи. Особливе значення мають залучення робітників до управління і розв'язання виробничих проблем, а також сприятливий соціально-психологічний клімат, створення умов для спілкування в процесі праці, якщо це можливо. Усе це формує позитивні емоційні стани у працівників, посилює їх монотоностійкість.

Монотонна робота, як і всяка інша, викликає втому і появу відчуття стомлення. Саме це і зумовило наявність двох точок зору на проблему монотонності. Одні вчені розглядають монотонність як різновид втоми. Інші, навпаки, вважають монотонність самостійним явищем, незважаючи на схожість фізіологічного механізму втоми.

Спільним для монотонності і втоми є те, що вони впливають на працездатність і переживаються як неприємне відчуття. Відмінність між ними полягає у тому, що:

- втома зумовлюється важкістю роботи, а монотонність може мати місце при виконанні легкої, невтомливої роботи;
- втома є фазовим процесом у динаміці працездатності, а монотонність характеризується хвилеподібною кривою, тобто періодичними підвищеннями і спадами;
- втома посилює психічне напруження, а монотонність послаблює його.

Монотонність як характеристику зовнішніх умов, що негативно впливають на працездатність, можна розділити на два види: регулярна повторюваність однотипних роздратувань (або рухів) і недостатність роздратувань (або рухів). Ці два види зовнішніх умов приводять до розвитку двох видів стану монотонії, що відрізняються як по механізмах свого виникнення, так і по деяких особливостях свого прояву: на відміну від монотонії, викликуваної однотипними роздратуваннями (монотонії одноманітності), монотонія, що є наслідком недоліку роздратувань (деприваційна монотонія), більшою мірою відбивається

на суб'єктивному стані людини й, відповідно, знаходить більше вираження в суб'єктивних показниках працездатності.

Для обґрунтування меж поопераційного поділу праці і розробки заходів щодо запобігання монотонності, проектування раціональної структури операції, темпу і ритму роботи необхідні об'єктивний аналіз трудових операцій, оцінка ступеня їх монотонності, виявлення так званих критичних і структурних психологічних особливостей.

Із вищесказаного, можна зробити висновок, що монотонність праці призводить до передчасного зниження трудової активності працівників та надто негативно впливає на кінцеві результати діяльності підприємств, саме тому доцільно застосовувати різні методи для боротьби з одноманітністю праці на виробництві.

4.3 Застосування спеціальних способів оброблення молочних продуктів з метою зниження вмісту радіонуклідів

При виготовленні гіпоалергенного молока молочна сировина не повинна містити радіонукліди, вище допустимих норм. У разі потреби застосовують спеціальні способи оброблення молочної сировини та продуктів з метою зниження вмісту радіонуклідів.

Взагалі із моменту освоєння людиною ядерної енергії у біосферу почали поступати радіонукліди, що утворюються на АЕС, при виробництві ядерного палива і випробуваннях ядерної зброї. Отже, постало питання про штучні радіонукліди і особливості їх впливу на організм людини. Серед радіонуклідів штучного походження виділяють 21 найбільш поширений, 8 з яких складають основну дозу внутрішнього опромінення населення: ^{14}C , ^{137}Cs , ^{90}Sr , ^{89}Sr , ^{106}Ru , ^{144}Ce , ^{131}I , ^{95}Zr . При оцінці радіоекологічних наслідків Чорнобильської катастрофи засадничими чинниками є наступні обставини: цезій-137 продовжує залишатися в кореневому шарі рослин, а отже, буде довго потенційно доступний для них; стронцій-90 наполовину перейшов у вільну форму, став легко

доступний для рослин і більшою мірою здатний включатися в харчові ланцюжки, потрапляти в організм людей і накопичуватися там, збільшуючи ризик для здоров'я. Стронцій-90 мігрує по харчових ланцюгах і накопичується в кістковій тканині людини. Стронцій-90, що відклався в кістковій тканині піддає хронічному опроміненню кістковий мозок і органи кровотворення.

Розрізняють поверхневе та структурне забруднення харчових продуктів радіонуклідами. При поверхневому забрудненні радіоактивних речовин, ті, що переносяться повітряним середовищем, осідають на поверхні продуктів, частково проникаючи всередину рослинної тканини. Однак поверхневе забруднення легко видаляється навіть через декілька тижнів. Структурне забруднення обумовлене фізико-хімічними властивостями радіоактивних речовин, складом ґрунту, фізіологічними особливостями рослин. При надходженні радіонуклідів з ґрунту через кореневу систему рослин, внаслідок дії сорбційних сил ґрунтового поглинального комплексу, відбувається сепарація радіонуклідів. Одні з них перебувають у ґрунті у порівняно доступному для рослин стані і тому велика їх кількість надходить у наземні частини рослин, а та частина, що міцно фіксується твердою фазою ґрунту, мало доступна для рослин.

Одним із шляхів включення радіонуклідів у біологічні і харчові ланцюги може бути заковтування тваринами разом з кормом часток ґрунту, що містять радіонукліди при випасанні. Основними каналами виведення радіонуклідів з організму ссавців є шлунково-кишковий тракт і нирки, а у лактуючих тварин, крім того – молочні залози. Частина продуктів ділення, яка надійшла в організм лактуючих тварин, виводиться разом з молоком. У дослідях на лактуючих козах і коровах доведено, що концентрація радіонуклідів у молоці завжди у 5 – 10 разів вища, ніж у плазмі крові. Найбільш високі концентрації радіонуклідів у молоці корів спостерігаються у зимові та весняні місяці, що пояснюється зменшенням потреби щитовидної залози в йоді і підвищенням поглинання його молочною залозою.

Зменшення поступлення радіонуклідів в організм з їжею можна досягти шляхом зменшення їх кількості в продуктах харчування за допомогою різних

технологічних та кулінарних обробок харчової сировини. За рахунок обробки харчової сировини – ретельного миття, чистки продуктів, відділення малоцінних частин можливо видалити від 20 до 60% радіонуклідів.

Для зменшення концентрації радіоактивних речовин молоко можна переробляти на молочні продукти, тим самим виключаючи потрапляння в організм людини значної кількості радіоактивних речовин. Зниження складу радіонуклідів у молочних продуктах можна досягти шляхом отримання із молока жирових та білкових концентратів. При переробці молока у вершки залишається не більше 9% цезію і 5% стронцію, в сирі – 21% цезію та 27% стронцію, у сирах 10% цезію і 45% стронцію. У вершковому маслі біля 2% цезію від його складу в молоці.

У молоці ^{137}Cs в основному зосереджений у водній фазі, тоді як близько 65% ^{90}Sr утримується білком молока – казеїном. У зв'язку з цим засоби технологічної переробки молока, що викликають значні кількісні зміни його складових частин, перш за все вологи та білку, суттєво впливають на вміст вказаних радіонуклідів в молочних продуктах, таких як: вершки, сметана, масло, натуральні сири, харчовий казеїн, згущене і сухе молоко. Так, при сепаруванні молока в обезжиреному молоці залишається біля 85% загальної кількості радіоцезію, що вміщується в молоці. Радіоцезій практично не зв'язується з жиром. При перетопці масла весь радіоактивний цезій залишається у плазмі. У молочному жирі даний радіонуклід практично не виявляється.

Численними експериментальними дослідженнями Інституту сільськогосподарської радіології і випробуванням у виробничих умовах на підприємствах молокопереробної промисловості (1988-1996 рр.) встановлено, що із зростанням масової частки жиру у вершках відбувається зниження вмісту ^{137}Cs . Це обумовлено зменшенням вмісту вологи і білку. Так, наприклад, при сепаруванні молока на 20% вершки (волога – 72,4%, білок – 2,5%) в них переходить 15% ^{137}Cs , тоді як при переробці на 60% високо жирні вершки (волога – 35,4%, білок – 1,5%) переходить 7% ^{137}Cs .

Згортання молока та відділення сироватки – технологічні процеси, на яких ґрунтується виробництво сирів і харчового казеїну. Процес згортання молока приводить до коагуляції казеїну, якщо він проходить за участю молокозгортаючого ферменту, або до денатурації практично всіх білків молока, як це має місце при термокислотному способі осадження. Отриманий в результаті згортання згусток підлягає подальшій механічній обробці з метою забезпечення інтенсивного видалення сироватки.

Поведінка радіоцезію відносно слабо залежить від способу отримання молочного згустку. Так, у сирі, що отриманий кислотним способом, вміст цього ^{137}Cs радіонукліду складав 10,9%, тоді як в сирі, отриманому кислотно-сичужним способом – 12,1%. Однак у процесі промивки кислотного згустку відбувається подальше ефективне вимивання радіоцезію. Така поведінка радіоцезію свідчить про те, що він зосереджений у водній фазі.

Із світових літературних джерел цікавою є публікація «Процеси, що сприяють очищенню сиру від радіоактивного цезію». Її автори роблять висновок, що радіоцезій залишається у водній фазі. Неодноразова зміна розсолу дозволяла знижувати вміст радіоактивного цезію без змін складу і якостей сирів. За даними Вознякоса Ф. та ін., перехід радіоцезію з молока в сироватку складав 82,4%.

Деякими авторами було встановлено, що 90% радіоцезію видаляються з сироваткою, тоді як радіостронцій на 80% зв'язується з казеїновою фракцією. На їхню думку, будь-який технологічний процес, що призводить до демінералізації згустку, знижує вміст радіонуклідів у сирі.

Із наведених вище даних можна зробити висновок, що на перехід радіоактивного цезію з молока у сири впливають ті технологічні процеси виробництва сирів, що викликають кількісні і якісні зміни водної фази. За рахунок глибокого видалення сироватки і промивок білку водою досягається отримання харчового казеїну з питомою активністю радіоцезію в 33 рази нижчою, ніж у вихідному молоці.

При виробництві натуральних сирів, крім названих основних процесів їх виробництва, ефективними технологічними операціями, що знижують перехід

радіоактивного цезію, являються довготривале соління (зниження питомої радіоактивності в 1,6 рази) та повна заміна сироватки водою (зниження питомої радіоактивності в 1,5 рази). На відміну від радіоцезію, основна частина якого видаляється з сироваткою, 45-85% радіостронцію надходить у сирне зерно. Це викликано тим, що радіостронцій, подібно до кальцію, у молоці зв'язаний з казеїнокальцій-фосфатним комплексом. Міцний зв'язок стронцію з білком, у м'яких і твердих сирах, що отримані з молока із однаковим рівнем забруднення, радіонукліди можна розкласти за зменшенням у наступний ряд: стронцій, цезій, йод.

Радіостронцій надходить у сири аналогічно до кальцію. Останній ефективно відщеплюється від казеїнового комплексу при закисленні молока. Ця картина чітко спостерігалася у досліджах з дезактивації молока шляхом іонообміну. Встановлено, що навіть при незначному зниженні рН значно покращується очистка. Технологічні процеси виробництва вершків, сметани, масла, натуральних сирів і казеїну, навіть при великих затратах сировини, забезпечують зниження питомої радіоактивності за ^{137}Cs в готовому продукті в порівнянні з молоком в декілька разів.

Таким чином, молоко і ряд молочних продуктів, що мають рівень радіоактивного забруднення, не потрібно знищувати. Залежно від ступеня зараження можна виготовити з них продукти, які в подальшому використовуються для харчових або кормових цілей.

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

У даній магістерській кваліфікаційній роботі:

1. Виділено і концентровано білки у системі «знежирене молоко – полісахарид». Концентрат нативного казеїну отримано зі знежиреного молока з використанням полісахариду пектину.

2. Проведено поділ системи на фази через деякий час після відстоювання. Як результат, при розділенні осаджуються білки молока. Основні фракції білків сироватки присутні в надосадовій (сироватко-пектиновій фракції) рідині. В осаді міститься концентрат нативного казеїну, який володіє високими функціональними властивостями.

3. Розроблено рецептурний склад гіпоалергенного молока на основі концентрату нативного казеїну з використанням гідролізату сироваткових білків, який додатково підвищує біологічну цінність, дозволяє отримати продукт із зниженими алергенними властивостями та водночас відтворити природній склад молока. Виготовлено зрізці гіпоалергенного молока з різним вмістом наповнювачів згідно запропонованих рецептур і встановлено, що найбільш оптимальними варіантами є внесення кави в кількості 2% та ваніліну – 0,02% до маси готового продукту, що забезпечує збалансовані органолептичні показники.

4. Визначено фізико-хімічні та органолептичні показники якості готового продукту і встановлено, що вони відповідають вимогам нормативної документації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Holt C., Carver J. A., Ecroyd H., Thorn D. C. Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*. 2013. Vol. 96, № 10. P. 6127–6146.
2. Тепел Альфред. Химия и физика молока / А. Тепел; ред. С. А. Фильчакова. : [пер. с нем]. – СПб. : Профессия, 2012. – 832 с.
3. Осинцев А.М. Теоретические и экспериментальные исследования коагуляции молока [Текст] // Диссертация на соискание ученой степени д.т.н. - К., 2005. - 324 с.
4. Fox P.F. et al., *Dairy Chemistry and Biochemistry Second Edition (2015)* Springer International Publishing – 584 p.
5. Broyard C., Gaucheron F. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. // *Dairy Sci. & Technol*, 2015 : 95 – P. 831–862.
6. Горбатова К.К. Физико-химические и биохимические основы производства молочных продуктов / К.К. Горбатова. – СПб.: Гиорд, 2004. – 352 с.
7. Владыкина Т.Ф. Модель структуры мицеллы казеина. Каунас, 1988. 13 с.
8. Богатова О.В., Догарева Н.Г. Химия и физика молока: Учебное пособие – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004.-137 с.
9. Крусъ Г.Н. К вопросу строения мицеллы и механизма сычужной коагуляции казеина. // *Молочная промышленность*, 1992. – № 4. – С. 23–28.
10. Holt C. Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by sephacryl column chromatography. // *Journal of Dairy Science*, 1998 – V. 81 – P. 2994–3003.
11. Walstra P. Casein sub-micelles: Do they exist? // *Int. Dairy J.* 1999 – V. 9 – P. 189–192.

12. Fox P.F. Coagulants and their action // XXII Inter. Dairy Congress, 1986 – P. 61–73.
13. Holt C. Ability of a β -casein phosphopeptide to modulate the precipitation of calcium phosphate by forming amorphous dicalcium phosphate nanoclusters / C. Holt, N. M. Wahlgren, T. Drakenberg // *Biochem. J.*, 1996. –V. 314. – P. 1035–1039.
14. Holt C. Caseins as rheomorphic proteins: Interpretation of the primary and secondary structures of the α -, β - and κ -caseins / C. Holt, L. Sawyer // *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions*, 1993. – V. 89. – P. 2683–2692.
15. Esther J.P. de Kort Influence of calcium chelators on concentrated micellar casein solutions: from micellar structure to viscosity and heat stability 153 p. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, NL (2012).
16. Dalgleish, D.G. On the structural models of bovine casein micelles – review and possible improvements. // *Soft Matter*, 2010 – V. 7 – P. 2265– 2272.
17. Holt, C. and D.S. Horne, The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. // *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 1996 – V. 50 – P. 85–111.
18. Paquin P., Britten M., Laliberte M.-F., Boulet M. Interfacial properties of milk casein proteins.// *Proteins at Interfaces*, Am. Chem. Soc, Washington, 1987 – P. 677–686.
19. Home D. S., Parker T. G., Dalgleish D. G. Casein micelles, polycondensation and fractals. // *Food Colloids, Spec. Publ. No. 75. R. Soc. Chem.*, London, 1989 – P. 400–405.
20. Dalgleish D. G, Casein micelles as colloids: Surface structure and stabilities. // *J. Dairy Sci.* 1998 – V. 81 – P. 3013–3017.
21. Юкало В. Г. Виділення міцел казеїнового комплексу коров'ячого молока / В. Г. Юкало // *Біологія тварин* — 2004 — Т. 6, № 1-2. — С. 397—400.
22. Юкало А. В., Сторож Л. А., Юкало В. Г. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів / А. В. Юкало, Л. А. Сторож, В. Г. Юкало // *Біотехнологія* — 2012. — Т. 5, № 4. — С. 21—33.

23. Farrell H. M. Nomenclature of the proteins of cow's milk – sixth revision / H. M. Farrell, R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck // *J. Dairy Sci.* — 2004. — Vol. 87, № 6. — P. 1641—1674.

24. Fox P. F. Dairy chemistry and biochemistry / P. F. Fox, P. L. H McSweeney. — London: Tomson Science, 1998. — 478 p.

25. Holt C. Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, behavior in foods / C. Holt, J.A. Carver, H. Ercoyd, D. C. Thorn. // *J. Dairy Sci.* — 2013. — V. 96, № 10. — P. 6127—6146.

26. Tolstoguzov V. B. Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels / V. B. Tolstoguzov // *Food Hydrocolloids.* — 1995. — V. 9, № 4. — P. 9—57.

27. Walstra P. On the stability of casein micelles / P. Walstra // *J. Dairy Sci.* — 1996. — V. 73, № 8. — P. 1965—1979.

28. Brandelli, A., Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73, 149–161. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.016>

29. Yukalo, A. V., Datsyshyn, K. Ye., Yukalo, V. G. (2013). Bioactive peptides of the cow milk whey proteins (*Bos taurus*). *Biotechnologia Acta*, 6 (5), 49– 61. doi: <https://doi.org/10.15407/biotech6.05.049>

30. Slyvka, I. M., Tsisaryk, O. Y., Dronyk, G. V., Musiy, L. Y. (2018). Strains of lactic acid bacteria isolated from traditional Carpathian cheeses. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9 (1), 62–68. doi: <https://doi.org/10.15421/021808>

31. Farrell H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T. Nomenclature of the proteins of cows' milk — sixth revision // *J. Dairy Sci.* — 2004. — V. 87, N 6. — P. 1641–1674.

32. Юкало А. В., Сторож Л. А., Юкало В. Г. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів // *Біотехнологія.* — 2012. — Т. 5, N 4. — С. 21–33.

33. Капрельянц, Л. В. (2009). Ферменты в пищевых технологиях. Одесса: Друк, 468.

34. FitzGerald R. J., Meisel H. Lactokinins: Whey protein — derived ACE inhibitory peptides // *Nahrung*. — 1999. — V. 43, N 3. — S. 165–167.
35. Meisel H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins // *Bio Factors*. — 2004. — V. 21, N 1–4. — P. 55–61.
36. Robert M. C., Razaname A., Mutter M., Juillerat M. A. Identification of angiotensinI-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765 // *Agric. Food Chem.* — 2004. — V. 52, N 23. — P. 6923–6931.
37. Lopes-Fandino R., Otte J., van Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity // *Int. Dairy J.* — 2006. — V. 16, N 11. — P. 1277–1293.
38. Pripp A. H., Asaksson T., Stepaniak L., Sorhaug T. Quantitative structure–activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins // *Europ. Food Res. Technol.* — 2004. — V. 219, N 6. — P. 579–583.
39. Gobbetti M., Stepaniak L. De Angelis M. et al. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* — 2002. — V. 42, N 3. — P. 223–239.
40. Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Pülola K. et al. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory properties of whey proteins digests: Concentration and characterization of active peptides // *J. Dairy Res.* — 2000. — V. 67, N 1. — P. 53–64.
41. Vermeirssen V., Van Camp J., Decroos K. et al. The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein // *J. Dairy Sci.* — 2003. — V. 86, N 2. — P. 429–438.
42. Mullally M. M., Meisel H., FitzGerald R. J. Identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin // *FEBS Lett.* — 1997. — V. 402, N 2–3. — P. 99–101.

43. Pellegrini A. Antimicrobial peptides from food proteins // *Curr. Pharmaceut. Design.* — 2003. — V. 9, N 16. — P. 1225–1238.
44. Hartmann R., Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2007. — V. 18, N 2. — P. 163–169.
45. Gobetti M., Minervini F., Grizzello C. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides // *Int. Dairy J.* — 2004. — V. 57, N 2/3. — P. 173–188.
46. Pan Y., Rowney M., Guo P., Hobman P. Biological properties of lactoferrin: an overview // *Austral. J. Dairy Technol.* — 2007. — V. 62, N 1. — P. 31–42.
47. Sz wajkowska M., Wolanciuk A., Barłowska J. et al. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system — a review // *Anim. Sci. Papers Rep.* — 2011. — V. 29, N 4. — P. 269–280.
48. Madureira A. R., Tavares T., Gomes A. M. P. et al. Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins // *J. Dairy Sci.* — 2010. — V. 93, N 2. — P. 437–455.
49. Korhonen H. Antibacterial and antiviral activities of whey proteins, the importance of whey and whey components in food and nutrition // *Proc. 3rd Int. Whey Conf.* — Munich, Germany. — 2001. — P. 303–321.
50. 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.
51. Van der Kraan M. I. A., Groenink K., Nazmi K. et al. Lactoferrampin: A novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin // *Peptides.* — 2004. — V. 25, N 2. — P. 177–183.
52. Van der Kraan M. I. A., Nazmi K., Teeken A. et al. Lactoferrampin an antimicrobial of bovine lactoferrin exhibits its candidacidal activity by a cluster of positively charged residues at the C-terminus in combination with a helix facilitating N-terminal part // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 386, N 1. — P. 137–142.

53. Gifford J. L., Hunter H. N., Vogel H. J. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2005. — V. 62, N 22. — P. 2588–2598.
54. Pellegrini A. Antimicrobial peptides from food proteins // *Curr. Pharmaceut. Design.*
55. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality // *Ibid.* — 2006. — V. 16, N 9. — P. 945–960.
56. Pihlanto-Leppala A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACEinhibitory peptides // *Trend. Food Sci. Tech - nol.* — 2001. — V. 11, N 9–10. — P. 347–356. 64. Shimizu M. Food-derived peptides and intestinal functions // *Bio Fact.* — 2001. — V. 21. — P. 43–47.
57. Gauthier S. F., Pouliot Y., Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins // *Int. Dairy J.* — 2006. — V. 16, N 11. — P. 1315–1323.
58. Taha S., Mehrez M., Sitohy M. et al. Effectiveness of esterified whey proteins fractions against Egyptian Avian Influenza A (H5N1) // *Virolog. J.* — 2010. — V. 7, N 1. — P. 330–334.
59. Kamau S. M., Cheison S. Ch., Chen W. et al. Alpha-Lactalbumin: its production technologies and bioactive peptides // *Compreh. Rev. Food Sci. Food Safety.* — 2010. — V. 9. — P. 197–212.
60. Madureira A. R., Pereira C. I., Gomes A. M. P. Bovine whey proteins — Overview on the main biological properties // *Food Res. Int.* — 2007. — V. 40, N 10. — P. 1197–1211.
61. Mahmud R., Matn M. A., Otani H. Mitogenic effect of bovine β -lactoglobulin and its proteolytic digests on mouse spleen resting cells // *Pakist. J. Biol. Sci.* — 2004. — V. 7, N 12. — P. 2047–2050.
62. Kayser H., Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins // *FEBS Lett.* — 1996. — V. 383, N 1–2. — P. 18–20.

63. Miyauchi H., Kaino A., Shinoda I. et al. Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolyzate on murine splenocytes and Peyer's patch cells // *J. Dairy Sci.* — 1997. — V. 8, N 10. — P. 2330–2339.

64. Nagpal R., Behare P., Rana R. et al. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update // *Food Funct.* — 2011. — V. 2, N 1. — P. 18–27.

65. Sieber R., Butikofer U., Egger Ch. et al. ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties // *Dairy Sci. Technol.* — 2010. — V. 90, N 1. — P. 47–73.

66. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функций клетки. — М.: Мир, 1974. — С. 12.

67. Migliore-Samour D., Jolles P. Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn // *Experientia.* — 1988. — V. 44. — P. 188–193.

68. Korhonen H., Pihlanto A. A food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods // *Curr. Pharmaceut. Design.* — 2003. — V. 9. — P. 1297–1308.

69. Park Y. W. Bioactive components in milk and dairy products. — USA: Wiley–Blackwell, 2009. — 426 p.

70. Corredig M. Dairy-derived ingredients: food and nutraceutical uses. — USA: CRC Press, 2010. — 690 p.

71. Chandan R. C., Kilara A. Dairy ingredients for food processing. — USA: Wiley–Blackwell, 2011. — 522 p.

72. Hurley W. L. Milk protein. — Croatia: In Tech, 2012. — 340 p.

73. Спосіб виготовлення гідролізату молочної сироватки: пат. 143805 Україна: МПК А23J 3/00, А23J 3/08 (2006.01), А23J 3/30 (2006.01), А23J 3/34 (2006.01); заявл. 13.03.2020; опубл. 10.08.2020, Бюл. № 15/2020. 6 с.

74. Юкало В.Г., Дацишин К.Є. Технологія низькоалергенного молока з гідролізатом білків сироватки — 2019. — Т. 21, N 92. — С. 14–18.

ДОДАТКИ

Министерство образования Республики Беларусь

Учреждение образования
«Могилевский государственный университет продовольствия»

ТЕХНИКА И ТЕХНОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ

**Материалы XIII Международной
научно-технической конференции**

23–24 апреля 2020 года

В двух томах

Том 1

Могилев
МГУП
2020

TECHNOLOGY OF MILK WITH REDUCED ALLERGENIC PROPERTIES

Yukalo V.G., Datsyshyn K.Ye., Borys L.I.
Ternopil Ivan Puluj National Technical University
Ternopil, Ukraine

Cow's milk allergic diseases affect from 0.6% to 3% of children under 6 years of age, 0.3% of older children and teenagers and 0.5% of adults. 15% of patients remain allergic throughout adulthood. Other children with a milk allergy outgrow it, becoming able to consume milk and dairy products [1]. It has been proven that some of the strongest milk allergens are the major whey fractions β -lactoglobulin (β -LG) and α -lactalbumin (α -LA). Much less commonly reported in the literature is allergy to other whey proteins such as immunoglobulin (IG), serum albumin (BSA) or lactoferrin (LF) [2]. The removal or complete replacement of whey protein is a common way of reducing allergies. In this case, other food non-allergenic proteins are using. Another way to reduce allergenicity is to use whey protein hydrolyzates. However, the analysis of the literature shows that in most cases such hydrolyzates are obtained using cheap active proteolytic preparations, characterized by a wide specificity of action. The hydrolyzates formed by them include short peptides with low allergenicity.

In recent decades, it has been shown that the whey proteins β -LG, α -LA and, to a lesser extent, other fractions are precursors of numerous biologically active peptides. Antihypertensive peptides, opiate receptor antagonists, regulators of intestinal motility, immunomodulatory and antimicrobial peptides can be formed from different whey proteins. Also, new types of bioactive peptides that have anticancer and antioxidant effects, lower blood cholesterol levels, regulate appetite, and affect calcium absorption have been discovered [3]. Almost all natural bioactive peptides from milk whey proteins have been obtained by the action of digestive proteases in physiological conditions [4]. While using active proteolytic preparations with wide specificity mainly of microbiological origin, the probability of the natural BAP formation in the obtained low-allergenic whey proteins hydrolyzates is low. This generally reduces the biological value of the final product. Therefore, in order to save natural BAP low-allergenic dairy product obtained by the combination of native casein with hydrolyzed whey proteins can be promising. In this case, the hydrolyzate must be obtained by the action of digestive proteases in physiological conditions. Important is that whey proteins hydrolyzates (WPH), unlike casein, do not have a bitter taste. Such a product will contain casein precursors of BAP and natural BAP from whey proteins and no major milk whey allergens.

The aim of the work was to develop a technology of milk with reduced allergenic properties which would contain natural biologically active peptides from whey proteins.

The technology of milk drink with reduced allergenic properties with WPH includes:

- native casein concentrate obtaining according to TU 49 1169-85;
- production of whey protein hydrolyzate;
- mixing and pasteurization.

Native casein concentrate (NCC) for drink production was obtained by layering of the «milk-pectin-water» system. Samples from the upper polysaccharide phase and the lower protein phase after separation of the system were selected to evaluate the NCC isolation process. The analysis of the samples was performed using two systems of electrophoresis: for casein complex proteins - electrophoresis in a homogeneous PAG in the presence of urea [5], for whey proteins - disc-electrophoresis in native conditions for neutral and acidic proteins

[6]. The results of electrophoresis indicate that all major milk allergens (β -LG, α -LA, IG, BSA, LF) and the new unidentified protein fraction with low electrophoretic mobility (casein fraction β -CN-5P) penetrate into the polysaccharide phase. Analysis of the protein phase composition indicates that it includes all the casein complex protein fractions, among which are the main BAP precursors of casein origin. Whey milk allergens have not been detected in the protein phase.

Pancreatin proteolysis of whey proteins concentrate solution was performed to obtain the hydrolyzate. The composition of the obtained hydrolyzate was analyzed by gel filtration on Sephadex G-25. Unsplitted proteins, in the hydrolyzate samples selected for gel filtration, were precipitated with trichloroacetic acid. Gel filtration results indicate that about 85% of proteolysis products have a molecular weight less than 5000 Da and about 40% less than 1000 Da. The obtained hydrolyzate was characterized by electrophoretic express analysis and has confirmed the allergens absence in it.

Consistency, taste of the obtained product are characteristic to dairy products of this group. The results of the organoleptic and tasting evaluation indicate that the use of whey protein hydrolyzate does not significantly change the organoleptic characteristics, in particular taste and flavour.

Obtained results of electrophoretic and chromatographic studies indicate the absence of major whey proteins allergens. This allows to recommend a product for people who are allergic to whey proteins.

References:

1. Park, Y.W. Bioactive components in milk and dairy products / Y.W. Park. - Boston: Wiley-Blackwell, 2009. – 426 p.
2. Villa, C. Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review / C. Villa, J. Costa, M.B.P.P. Oliveira, I. Mafra // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2018. – V.17, № 1. – P.137-164.
3. Iukalo, A.V. Bioaktyvni peptydy proteiniv syrovatky moloka koriv (Bos Taurus)/ A.V. Iukalo, K.Ye. Datsyshyn, V.G. Yukalo // Biotechnologia Acta. – 2013. – V. 6, № 5. – P.49-61.
4. Kim, H. Comparison of Allergic Parameters between Whey Protein Concentrate and Its Hydrolysate in Rat Basophilic Leukemia (RBL)-2H3 Cells / Kim H., S.L Ahn, J.W. Jhoo and G.Y. Kim // Korean J. Food Sci. An. – 2018. – V. 38, № 4. – P.780-793.
5. Yukalo, V.G. Electrophoretic systems for the preparative fractionation of proteins-precursors of bioactive peptides from cow milk / V.G. Yukalo, L.A. Storozh., K.Ye. Datsyshyn O.M. Krupa // Food science and technology. – 2018. – V. 12, № 2. – P. 26-32.
6. Yukalo, V.G. Electrophoretic system for express analysis of whey protein fractions / V.G. Yukalo, K.Ye. Datsyshyn, L.A. Storozh // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. – 2019. – V. 2, №11 (98). – P. 37–44.