

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

Інженерії машин, споруд та технологій
(повна назва факультету)

Харчової біотехнології і хімії
(повна назва кафедри)

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня

магістр

(назва освітнього ступеня)

на тему: **Виділення біоактивних фосфосеринових
пептидів з білків молока**
(Bioactive phosphoserine peptides isolation from milk proteins)

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

(шифр і назва спеціальності)

	<hr/>	Голдаєвич Т.В. (прізвище та ініціали)
	(підпис)	
Керівник	<hr/>	Юкало В.Г. (прізвище та ініціали)
	(підпис)	
Нормоконтроль	<hr/>	Покотило О.С. (прізвище та ініціали)
	(підпис)	
Завідувач кафедри	<hr/>	Покотило О.С. (прізвище та ініціали)
	(підпис)	
Рецензент	<hr/>	Ворощук В.Я. (прізвище та ініціали)
	(підпис)	

Тернопіль
2020

Факультет Інженерії машин, споруд і технологій
(повна назва факультету)
Кафедра Харчової біотехнології і хімії
(повна назва кафедри)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
Покотило О.С.
(підпис) (прізвище та ініціали)
« » 2020 р.

ЗАВДАННЯ НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ

на здобуття освітнього ступеня магістр
(назва освітнього ступеня)
за спеціальністю 181 «Харчові технології»
(шифр і назва спеціальності)
студенту Голдаєвич Тетяні Василівні
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Виділення біоактивних фосфосеринових пептидів з білків молока

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 № 417-688

2. Термін подання студентом завершеної роботи грудень 2020 року

3. Вихідні дані до роботи Періодична та спеціальна література, нормативні документи з питань досліджень. Стандартні та уніфіковані методики та методи досліджень.

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

Провести огляд літератури та патентний пошук щодо відомостей про пептиди, а також білкові гідролізати.

Виділити фосфопротеїнові субстрати з білків молока.

Встановити значення рН для протеолізу фосфосеринових пептидів.

Визначити оптимальні концентрації ферментного препарату для отримання фосфосеринових пептидів.

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

Схеми, таблиці та графіки

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1	Аналітичний огляд літературних джерел та патентний пошук інформації	06.05.20р.- 03.06.20р.	
2	Складання схеми досліджень	04.06.р. - 11.06.20р.	
3	Опрацювання методик досліджень	12.02.20р.- 24.06.20р.	
4	Виконання експериментальних досліджень (Частина I)	05.09.20- 26.09.20р.	
5	Завершення експериментальних досліджень (Частина II)	29.09.20р.- 15.10.20р.	
6	Виконання розділу «Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях»	16.10.20р.- 25.11	
7	Закінчення написання розділів	11.12.2020р.	
8	Подання дипломної роботи до захисту		

Студент _____
(підпис)

Голдаєвич Т.В.
_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис)

Юкало В.Г.
_____ (прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

	Анотація	6
	Вступ	8
	Мета і завдання роботи	8
1.	Огляд літератури	10
1.1.	Пептиди та їх значення	10
1.1.1.	Поняття про пептиди	10
1.1.2.	Хімічний синтез пептидів	12
1.1.3.	Природні пептиди та їх значення	14
1.2.	Отримання білкових гідролізатів	17
1.2.1.	Загальні відомості про білкові гідролізати	17
1.2.2.	Методи гідролізу білків	18
1.2.3.	Додавання білкових гідролізатів у продукти харчування	20
1.2.4.	Використання продуктів на основі гідролізату молочного білка при харчовій алергії дітей раннього віку	21
1.3.	Отримання природніх біоактивних пептидів шляхом протеолізу білків молока	23
1.3.1.	Білковий склад молока. Біологічні функції білків молока	23
1.3.2.	Отримання біоактивних пептидів казеїну та сироваткових білків молока	25
1.3.3.	Казоморфіни і казок сини – агоністик й антагоністи оплатних рецепторів	26
1.3.4.	Казокініни – пептиди з антигіпертензивною активністю	27
1.3.5.	Антитромботичні пептиди казеїнового походження	27
1.3.6.	Імуномодуляторні пептиди	28
1.3.7.	Лакторфіни – пептиди з опіоїдною дією	28
1.3.8.	Вплив казеїнових фосфосеринових пептидів на засвоєння міренальних речовин	29
2.	Матеріали і методи досліджень	30

2.1.	Матеріали та реактиви	30
2.2.	Визначення кислотності титрованої	30
2.3.	Визначення рН	30
2.4.	Визначення концентрації білків	31
2.5.	Електрофорез у ПАГ	33
2.6.	Гель-фільтрація	35
3.	Результати власних досліджень та їх обговорення	38
3.2.	Встановлення значення рН для протеолізу фосфосеринових пептидів	41
3.3.	Визначення оптимальних концентрацій ферментного препарату для отримання фосфосеринових пептидів	47
4.	Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях	55
4.1.	Охорона праці	55
4.2.	Безпека в надзвичайних ситуаціях	59
	Висновки	61
	Список використаної літератури	62
	Додатки	68
	Апробація результатів магістерської роботи	69

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота складається із вступної частини, основної, висновків та пропозицій виробництва, переліку літературних джерел та додатків. Загальний обсяг роботи містить 72 сторінки, 10 таблиць і 12 рисунків. Список використаної літератури складеться з 70 найменувань, в тому числі 25 іноземних.

Дослідження на здобуття освітньо-кваліфікаційного рівня магістра за спеціальністю 181 «Харчові технології» – Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Тернопіль, 2020.

В роботі встановлювали оптимальні умови рН, співвідношення ензимного препарату і субстрату, концентрацію панкреатину для отримання біоактивних фосфосеринових пептидів з протеїнів молока.

У роботі використовували методи визначення концентрації білків, титрованої кислотності, рН, електрофорез та гель-фільтрацію

Ключові слова: білки молока, фосфосеринові пептиди, протеолітичні препарати.

ANNOTATION

Qualification work consists of an introductory part, main, conclusions and proposals for production, a list of references and appendices. The total volume of work contains 72 pages, 10 tables and 12 figures. The list of used literature consists of 70 items, including 25 foreign ones.

Research on education and qualification level of Master in the specialty 181 «Food technology» Ternopil National Technical University named Ivan Pulyuy, Ternopil, 2020.

The work established optimal pH conditions, the ratio of enzyme preparation and substrate, the concentration of pancreatin to obtain bioactive phosphoserine peptides from milk proteins.

Methods for determining protein concentration, titratable acidity, pH, electrophoresis and gel filtration were used.

Key words: milk proteins, phosphoserine peptides, proteolytic drugs.

ВСТУП

Актуальність досліджень: Протеїни казеїнового комплексу молока можуть використовуватись як легкозасвоювані амінокислоти в щоденному раціоні. Сучасні дослідження свідчать про те, що казеїнові протеїни є попередниками низькомолекулярних біологічно активних пептидних регуляторів, що можуть вплинути на діяльність фізіологічних систем організмів. Ці пептиди виникають *in vivo* в В результаті процесу перетравлювання білків молока травними ферментами. Пептидам характерна деякі фізіологічні властивості, зокрема антигіпертензивним ефектом волдіють «казокініни», опоїдною активністю – «казоморфіни», мінерал-зв'язуючими властивостями – «казофосфосеринові пептиди», імуномодуляторними – «казоімунопептиди», антитромботичними – «казоплателіни», бактерицидними – «казоцидини» та іншими ефектами.

В багатьох публікаціях описана цінність фосфосеринових пептидів та способи їх отримання. Фосфосеринові пептиди у деяких країнах додають до харчових продуктів. У нашій країні фосфосеринові пептиди не виробляють, тому це є актуальним завданням.

Мета досліджень. метою кваліфікаційної роботи є встановлення оптимальних значень рН та концентрації панкреатину для отримання біоактивних фосфосеринових пептидів.

Завданнями роботи є:

1. Виділення препарату фосфопротеїнів;
2. Встановлення його фракційного складу;
3. Проведення протеолізу фосфопротеїнових субстратів панкреатином при різних значеннях рН;
4. Характеристика молекулярної маси препарату фосфосеринових пептидів, отриманих при різних значеннях рН;
5. Визначення виходу фосфосеринових пептидів, в залежності від співвідношення «ензим – фосфопротеїн».

Об'єкт дослідження: біоактивні фосфосеринові пептиди.

Предмет дослідження: білки-попередники фосфосеринових пептидів, умови отримання фосфосеринових пептидів.

Методи дослідження: Було використано методи: визначено концентрацію білків; електрофорез; гель-фільтрація; встановлено титровану кислотність та активну кислотність.

Наукова новизна одержаних результатів: В роботі вперше встановлено умови утворення нативних фосфосеринових пептидів. Показано їх молекулярно-масовий розподіл.

Практичне застосування отриманих результатів: Отримані результати можуть бути використані в розробці фосфосеринових пептидів.

Апробація результатів. Участь в XIII Міжнародній науково-технічній конференції «Техніка і технологія харчових виробництв», 23–24 квітня 2020 року в Могильовському державному університеті продовольства.

Публікації. Згідно матеріалів магістерської роботи опублікована 1 наукова праця у тезах (Додаток А):

– Технология пасты творожной с гидролизатом белком сыворотки молока/ Дацишин Е.Е., Юкало В.Г., Голдаевич Т.В.// "Техника и технология пищевых производств Материалы XIII Международной научно-технической конференции 23–24 апреля 2020 года (Могилев, Апрель 23-24, 2020) / Министерство образования Республики Беларусь Учреждение образования «Могилевский государственный университет продовольствия», 2020. - Р. 332-333.

Структура та обсяг роботи. Кваліфікаційна робота складається із вступної, висновків, преліку літературних джерел та додатків. Загальний обсяг роботи містить 72 сторінки, 10 таблиць і 12 рисунків. Список використаної літератури складається з 70 найменувань, в тому числі 25 іноземних .

РОЗДІЛ 1

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Пептиди та їх значення

1.1.1 Поняття про пептиди

Пептиди – це речовини, які містять в своєму складі два або більше залишків α -амінокислот, які з'єднані нерозгалуженим пептидним ланцюгом (із зв'язків -C (O) NH-).

Ці сполуки бувають природного і синтетичного походження. В своєму складі вони можуть мати сотню або тисячу амінокислот.

В гідролізатах білків, які отримали шляхом ферментування, вперше було виділено гідролізати білків.

Е. Фішер запропонував термін пептид. У 1905 р. вченим була розроблена методика синтезу пептидів.

За допомогою цього методу В. Дю Виньо вдалось синтезувати окситоцин – гормон гіпоталамуса. В 1963 р. був створений автоматичний синтезатор пептидів, основою якого став твердофазний пептидний синтез. Застосування методик синтезу поліпептидів має важливе значення, адже завдяки ним вдалось одержати важливі речовини, зокрема синтетичний інсулін.

Протягом років вчені досліджували різні сполуки, вивчали їх будову, та методи розділення великих молекул на мономерні частинки, а також синтезували нові речовини. На сьогодні відомі понад 1500 різновидів пептидних ланцюгів. Науковці визначили їх структуру і методи синтезу.

Поліпептидний ланцюг, молекулярна маса якого більша 6 тис. дальтон називається білок. До складу пептидів можуть входити не лише фрагменти амінокислот.

Синтез пептидів проходить в будь-якому живому організмі. Ці сполуки необхідні для багатьох процесів. На властивості пептидного ланцюга впливають:

- Первинна структура (порядок амінокислот)

- Будова молекули (просторова структура) [45].

Пептидні молекули являють собою ланцюг із амінокислот. Якщо залишки амінокислот з'єднуються за допомогою амідного зв'язку, то утворюється пептид. Існує декілька класифікацій пептидів.

Розглянемо класифікацію за кількістю амінокислот в ланцюзі пептиду:

- олігопептиди – молекули, що вміщують до десятка амінокислотних залишків;
- Поліпептиди – містять більше 10 амінокислот;

Молекули, що містять більше 100 амінокислотних залишків прийнято вважати білками. Проте існують винятки, зокрема, глюкагон має тільки 29 амінокислот, але він належить до білкових гормонів.

За якісним складом амінокислоти поділяють наступним чином:

Гомомерні – речовини, до складу яких входять лише амінокислоти.

Гетеромерні – вміщують також небілкові сполуки. Наприклад до складу глікопептиду входять вуглеводні залишки [25].

За способом зв'язку амінокислот пептиди поділяють на :

Гомодетні – зв'язані тільки пептидним зв'язком;

Гетеродетні – окрім пептидного зв'язку наявні дисульфідні, ефірні та тіоефірні зв'язки.

Ланцюг атомів, що повторюються, називають пептидний остов (-NH-CH-OC-).

Пептиди різняться не лише за складом амінокислот. Вони відрізняються також розташуванням амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюзі.

Наприклад, набір одних і тих самих амінокислот, але у різній послідовності може утворити 2 абсолютно різні сполуки.

Пептидний зв'язок – це зв'язок, що виникає між α -аміногрупою одної амінокислоти і α -карбоксыльною групою іншої. Цей зв'язок є досить міцний. В нормальних умовах він не піддається розпаду. Для того, щоб зруйнувати амідний зв'язок необхідно залучити спеціальні ферменти протеази та пептигідролази [45].

1.1.2 Хімічний синтез пептидів

Синтез пептиду в лабораторних умовах – це довготривалий процес. Він може займати декілька діб. Проте синтез пептидів це досить перспективний напрям розвитку біохімії та біотехнології:

1. Шляхом синтезу можна підтвердити факт первинної структури молекул білків.

2. Штучно створені пептиди дають можливість встановити зв'язок між послідовністю амінокислот та їх активністю. Впродовж минулих років було проведено багато досліджень і встановлено, що заміна лише однієї амінокислоти в ланцюзі може збільшити біологічну активність пептиду або навіть поміняти біологічне призначення сполуки. Збільшення довжини амінокислотного ланцюга дозволяє знайти активні центри пептиду та ділянки, де взаємодіють рецептори.

3. Через модифікацію початкової послідовності амінокислот можна створювати препарати фармакологічного призначення. Винайдення замінників пептидів природного походження виявляє ефективніші структури молекул, що покращують біологічну дію пептиду.

4. Набагато дешевше синтезувати штучний пептид, який буде аналогом природного, ніж створювати препарати терапевтичного призначення на основі природних продуктів [37].

Тим більше, що у природі не існує окремих активних пептидів. Вони зазвичай перебувають в комплексі з іншими сполуками. Отримати шукані природні пептидні ланцюги можливо лише в лабораторних умовах.

Шляхи одержання синтетичних пептидів:

1. Хімічний синтез.

Він може складатись із традиційного синтезу в розчині та твердофазного методу. Твердофазний метод ефективніший. За допомогою нього можна одержувати поліпептиди із загальною кількістю 200 амінокислот. Процес здійснюють на автоматичному синтезаторі. Для утворення невеликих пептидів

(які містять до 10 залишків) варто застосовувати метод синтезу в розчині, через те, що можна одержати чисті речовини і у великій кількості.

2. Ферментний синтез.

Цей метод різними способами використовує властивості протеолітичних ферментів. Перевагою цього методу є те, що одержані пептиди мають високий степінь чистоти (це залежить від якості ферментів). Цю методику застосовують для:

- Синтезування пептидів незначних розмірів;
- З'єднання частин пептидів між собою;
- З'єднання штучних пептидів з іншими ділянками (таку операцію називають напівсинтезом). Саме таким способом одержують напівсинтетичний гормон інсулін.

3. Метод генної інженерії.

Цей метод винайшли в другій половині ХХ століття. Він ґрунтується на тому, що в клітину вживлюють необхідний ген, який несе інформацію про білок (будову, структуру, послідовність амінокислот). Після цього клітина синтезує і власні білки і білок, інформація про який закодована на вживленому гені. Такий ген можна створити штучно, або виділити із природного джерела. За допомогою цього способу можна синтезувати важливі гормони: інсуліну, гормону росту, інтерферону та ін. Метод генетичної інженерії використовують для синтезування білків та великих пептидів. За допомогою нього можна створити білки із заданими структурними змінами [37].

4. Безклітинний синтез.

Здійснюють в позаклітинній системі, з наявністю рибосом, АТФ, набору т-РНК та інших потрібних складових. Якщо в систему помістити будь-яку м-РНК, то отримаємо необхідний білок на матричній РНК. Цю методику зазвичай використовують в лабораторіях. Потрібну м-РНК створюють за допомогою методу рекомбінантних ДНК. Ця методика є хорошою в тому плані, що на виході отримуємо чистий білок, а не суміш білкових молекул, розділення яких є довготривалим і трудомістким процесом.

Кожна з чотирьох вище описаних методик має свої переваги та недоліки. Метод хімічного синтезу користується популярністю через можливість з'єднувати пептиди з неприродними амінокислотами та іншими нестандартними речовинами. В той же час метод генної інженерії дозволяє синтезувати білки лише з 20 амінокислот, які є в живих організмах.

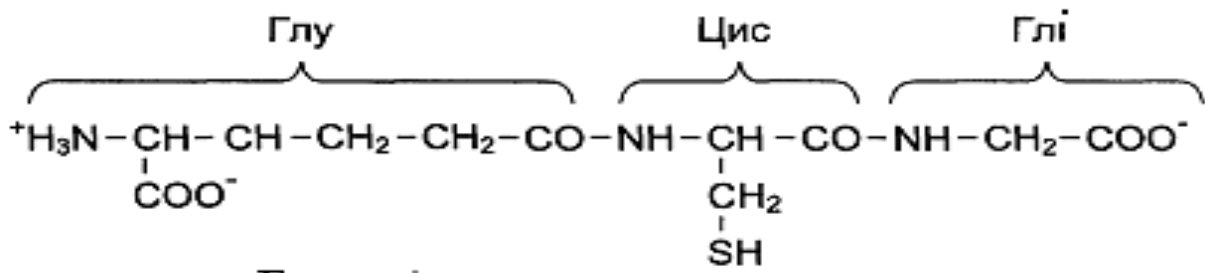
Отже, на сьогодні найважливішими методиками синтезу пептидів є традиційний хімічний синтез та ферментативний. Вони користуються попитом серед дослідників і промислових виробників, оскільки це доступні за ціною і прості у використанні методики [37].

1.1.3 Природні пептиди та їх значення

Людський організм щодня виробляє незліченну кількість пептидів. Вони регулюють різноманітні біологічні процеси та володіють високою фізіологічною активністю. Число амінокислотних залишків пептидів коливається в межах від 3 до 51. Найменший розмір пептидів мають тиреотропін та глутатіон. До їх складу входить лише 5 амінокислот. Проте більша частина пептидів містить більше десятка амінокислот, зокрема кортиколиберин містить 41 амінокислоту.

Синтез пептидних гормонів відбувається з білкових сполук, які вже неактивні. «Старі» пептиди розпадаються за допомогою протеолітичних ферментів, які розщеплюють пептидний зв'язок.

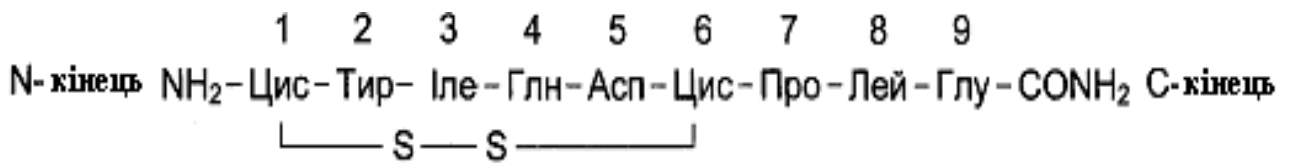
Деякі біологічні пептиди мають нетипові для білків зв'язки. Зокрема трипептид глутатіон вміщує в собі три ланки: глутамат, цистеїн та гліцин. N-кінцева амінокислота глутамату з'єднана з амінокислотним залишком цистеїну не α -карбоксільною групою, а γ -карбоксільною групою бокового радикалу.



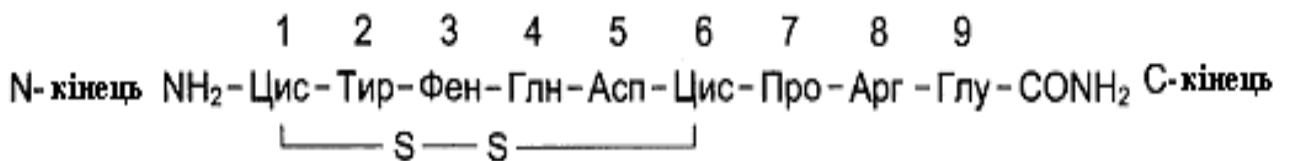
Г л у т а т і о н

Глутатіон – важлива речовина в людському організмі. Використовується в окисно-відновній реакції в якості донора і акцептора водню. Пептид потрібен для правильної дії деяких ферментів [10].

Первинна структура визначає призначення пептиду. Заміна амінокислот в пептидах спричиняє втрату і виявлення інакших якостей. Наприклад, гормони окситоцин і вазопресин утворюються в гіпоталамусі через частковий протеоліз попередніх більших білків. З гіпоталамуса гормони прямують до нервових закінчень (аксони) через нервові волокна. Внаслідок відповідної реакції гіпофіза вазопресин та окситоцин потрапляють в кров. Гормони схожі за своєю структурою. Відрізняються вони між собою послідовністю амінокислот лише у двох положеннях, проте фізіологічна роль речовин кардинально різна. Гормон окситоцин відповідає за виділення молока із молочних залоз та скорочення стінок матки під час народження дитини, а вазопресин – збільшує реабсорбцію водних розчинів в нирках при зниженні тиску в артеріях.



О к с и т о ц и н



В а з о п р е с и н

Біологічно активні пептиди – є регуляторами біологічних режимів. Їх використовують в якості лікарських препаратів. Недолік використання в терапії – є їхній прискорений розпад в організмі. Найважливіші результати дослідів полягають не лише у вивченні структури речовин, а й також одержання синтезованих відповідників пептидів природного походження із визначеними замінами їх структури та функцій. Для прикладу, синтезовано пептид 1-дезаміно-8-D-аргінін-вазопресин (ДАВ). Його будова (у порівнянні з гормоном вазопресин) характеризується відсутністю аміногрупи на N-кінці, і замість L-аргініну в положенні 8 наявний D-аргінін. Ця синтезована речовина володіє лише антидіуретичною активністю, проте є хімічно стійкою. Це означає, що при потраплянні в організм дія препарату буде тривалою. Отже, такий синтетичний замінник гормону буде дуже ефективним при лікуванні проблем гормонального фону [21].

Класифікацію відомих на сьогодні пептидів за фізіологічними ролями можна систематизувати наступним чином:

- ті, яким властива гормональна активність;
- ті, які контролюють травлення;
- ті, які контролюють гомеостаз судин і артеріального тиску;
- ті, які контролюють апетит;
- ті, які мають знеболювальну дію. Знеболювальна дія таких препаратів у сотню раз перевищує ефект від морфіну;
- ті, які задіяні в роботі вищої нервової системи;
- ті, яким характерна антиоксидантна дія.

Така систематика пептидів є досить умовною. З'являються відомості такі, що один пептид може мати багато фізіологічних функцій. Наприклад, основна функція меланоцитстимулювального гормону, є пігментоутворення, окрім цього гормон регулює апетит (у парі із лептином знижує рівень апетиту) і є антагоністом нейропептиду Y). Вазопресин, якому властива антидіуретична та судинозвужувальна дія, може також покращувати стан пам'яті [39].

1.2 Отримання білкових гідролізатів

1.2.1 Загальні відомості про білкові гідролізати

При виготовленні біологічно активних речовин, сировиною для яких є білкові речовини необхідно досконально переробити білкові молекули, а саме: розщепити великі речовини на мономери. Одним із основних напрямків розщеплення білкових речовин є їх гідроліз. Внаслідок цієї операції утворюються гідролізати – компоненти, які мають в своєму складі біологічно цінні речовини: пептиди та амінокислоти. Сировиною для виготовлення гідролізату білку може слугувати будь-який повноцінний за амінокислотним складом природний білок. Це може бути:

- кров або складові частини крові;
- тваринні і рослинні тканини;
- вторинна сировина молочної або харчової галузі;
- ветеринарний конфіскат;
- продукти, що не користуються попитом в харчових цілях, які отримали від переробки різних видів тварин, птиці, риби;
- виробничі відходи м'ясокомбінатних заводів.

Білкові гідролізати, які отримують для медицини і ветеринарії, виготовляють переважно з тваринних білків. Як сировину для виробництва беруть кров, м'язову тканину, білкову оболонку, молочну сироватку [22].

Гідролізати білків використовують у фармакології, косметології, медичній біології та в харчуванні. Для гідролізу можна використати будь-яку сировину. Деяка сировина має географічну прив'язку, а інша є продуктом виробничих циклів. Наприклад, у місцях вилову риби можна розташувати переробку рибних відходів. В Грузії існує метод гідролізу чайного листя, плодів тунгового дерева.

Відходи із виробництва сироватки крові пропонується гідролізувати в медичних та біологічних підприємствах. Казеїн і сироватку – на молокопереробних підприємствах. Відходи м'ясного виробництва – на м'ясокомбінатах.

Гідроліз білкових сполук є способом швидкої переробки, а гідроліз білкових відходів – один з найефективніших методів утилізації [35].

Найпоширенішими харчовій галузі є використання гідролізаців тваринних білків, а також білки молока.

1.2.2 Методи гідролізу білків

Існує три способи гідролізу білків:

- лужний;
- кислотний;
- ферментативний.

Під час лужного гідролізу утворюються токсичні речовини, які шкідливі для людей і тварин. Ці речовини називаються лантіонін та лізіноаланін. Під час лужного гідролізу розпадаються деякі важливі амінокислоти (аргінін, лізин, цистеїн). Через це сей спосіб не є практичним для виготовлення білкових гідролізаців.

Наступний гідроліз зазивають кислотним, через те, що процес гідролізу відбувається за допомогою сульфатної або хлоридної кислоти. Цей спосіб виробництва гідролізаців є значно поширенішим. Тривалість виготовлення гідролізаців може відбуватись від 3 до 23 годин. Це залежить від кислоти, яка використовується та її концентрації. Гідроліз сульфатною кислотою триває 3 – 5 год. ,при температурах 110 – 120 °С; хлоридною – тривалість становить 5 – 23 год., витримується температура кипіння.

Під час кислотного гідролізу пептидний ланцюг піддається глибокому розщепленню, бактеріальне обсіменіння продукту при цьому неможливе. Для медичної галузі це є великим плюсом, адже тут препарати можуть вводитись безпосередньо в кров. Гідролізати амінокровіну, гідролізіну, інфузаміну та ін дуже часто застосовують в медицині [35].

Проте кислотний гідроліз має недоліки. При цьому процесі повністю руйнується триптофан, частково окиснюються амінокислоти серин та треонін, руйнуються вітаміни, утворюються гумінові речовини. Коли нейтралізують

кислотний гідролізат виникає багато солей хлоридної та сульфатної кислот. Солі є дуже токсичні для людей. Через це кислотний метод потребує вдосконалення: очищення гідролізатів іонообмінною хроматографією.

Для того, щоб зменшити втрату корисних речовин під час гідролізу, можна використовувати м'якші ступені процесу, наприклад, використовувати атмосферу інертного газу замість звичайного повітря, або додавати антиоксидантні речовини. Проте, є ще інші фактори, які обмежують використання кислотного та лужного гідролізів, зокрема, швидке зношування обладнання через корозію, небезпека проведення дослідів через шкідливість кислот та лугів.

Отже, вище описані технології є трудомісткими, та такими, що вимагають використання складного і дорогавартісного обладнання, а отримані продукти потребують додаткового очищення.

Білок, що потрапляє в організм людини, піддається впливу травних ферментів. Внаслідок цього пептиди розпадаються на амінокислоти. В ферментативному гідролізі використовують тваринні або рослинні ферменти, а також протеази мікроорганізмів. Вміст отриманих гідролізатів буде залежати від самого ферменту, будови білка та тривалості процесу. Відомо, що ензим трипсин сприяє глибокому розщепленню білків [2].

Деякі органічні сполуки мають властивість активувати ферментний гідроліз.

Важливим явищем є вплив концентрації білку на ступінь гідролізу. Виявлено, що менший вміст білку, то швидше проходить процес [11].

Панкреатин – це найвідоміша ензимна система. До її складу входять ферменти трипсину та хімотрипсину.

Гідролізат є повноцінним, якщо в ньому присутня збалансована суміш амінокислот.

Гідролізати, які використовують в медицині, дієтичному харчуванні та ветеринарії повинні характеризуватись правильним співвідношенням вмісту незамінних амінокислот і замінних.

Отже, складні молекули білків при дії лугу кислоти чи ферменту розпадаються на речовини з меншою молекулярною масою. Під час гідролізу складно отримати одразу суміш чистих амінокислот, бо спочатку білки розпадаються на менші пептиди [2].

1.2.3 Додавання білкових гідролізатів у продукти харчування

Ще в середині минулого тисячоліття людство шукало спосіб покращення органолептичних якостей страв. Тоді почали використовувати різноманітні приправи та прянощі. Білковий гідролізат теж можна віднести до класу приправ. Його широко застосовують в кулінарії, як додаток для супу чи соусу.

В європейських країнах зазвичай використовують гідроліз за допомогою кислот (хлоридна кислота). На Далекому Сході, у свою чергу, більш поширений ферментний гідроліз.

Для виготовлення білкового гідролізату Чехія використовує сою, пшеницю та кукурудзу.

Якщо гідролізат виготовляється на підприємстві, то він повинен включати в себе наступні технологічні операції:

- Власне сам процес гідролізу;
- Нейтралізація;
- Дозрівання;
- Фільтрація;
- Дегідратація (іноді

Концентрація хлоридної кислоти повинна становити 6 моль/л. Якість гідролізу визначають за вільними амінокислотами. Нейтралізацію проводять за допомогою Na OH, кислотність повинна становити 4,5-7,0 за шкалою рН-метра. Після цього суміш направляється дозрівати. Процес триває 1 – 6 місяців. Під час дозрівання в продукті з'являються кращі органолептичні показники, а хлорид

натрію та нерозчинні амінокислоти седиментують. В рідкому продукті міститься 30 – 40 %.

При виготовленні сухого білкового гідролізату використовують сушарки розпилювального та барабанного типів. Для поліпшення органолептичних властивостей використовують екстракти різних рослин (овочі, ягоди, фрукти, а також гриби). Допускається додавання синтетичних ароматизаторів та барвників.

Глютамінова кислота займає найбільшу частку серед складників білкового гідролізату. Велика частка припадає також на аспарагінову кислоту.

Гістидин, тирозин, ізолейцин, гідроксипролін, сірковмісні амінокислоти – це компоненти гідролізату, які є в незначній кількості.

Карбонова кислота відповідає за аромат продукту.

Від швидкості травлення білкового гідролізату залежить біологічна цінність готової продукції.

1.2.4 Використання продуктів на основі гідролізату молочного білка при харчовій алергії дітей раннього віку

Травна система дітей сформована недокінця, тому їх організм чутливий до важкоперетравлюваних продуктів харчування. Стінки кишечника дітей володіють високим ступенем проникнення, тому в організм можуть потрапити нерозщеплені молекули. Перші пів року життя дитини характеризуються невеликим утворенням ферментів в травних органах.

Харчова непереносимість та алергії викликають певні розлади травної системи. Деколи з ростом організму ці проблеми зникають, але іноді залишаються на все життя [5,18].

Частим алергеном в ранньому віці є білок коров'ячого молока (БКМ). Оскільки молоко є дуже цінним і необхідним для дитячого раціону продуктом, то варто включати його для щоденного споживання.

Діти, в яких виявлена алергія, і які вигодовуються штучними сумішами, повинні перейти на харчування лікувальними сумішами. Високогідролізований

білок, який входить до складу таких сумішей, не володіє антигенними властивостями. Тому під час клінічного прояву алергічної реакції слід застосовувати таке харчування.

Високогідролізовані суміші це чудове рішення для дітей, які страждають харчовою непереносимістю.

Існують суміші високого та часткового гідролізу, вид залежить від ступеня розщеплення білку.

Існує залежність довжини білку до його здатності викликати алергічну реакцію. Доведено, що збільшення ланцюга пептиду (а значить збільшення молекулярної маси) призводить до більшої імовірності виникнення алергії [3].

Гідролізати сироваткових білків є більш функціональними, аніж казеїнових, бо перші володіють більшою біологічною цінністю. В них значно вищий вміст амінокислот: цистеїн та триптофан. Ці гідролізати характеризуються приємними органолептичними показниками [18].

Виникнення алергії від вживання гідролізованого білку в 300 – 900 раз нижчі порівняно з білком коров'ячого молока.

Виділені наступні молочні суміші, основним компонентом яких є гідролізат. Їх класифікують за наступними особливостями:

- Лікувальними;
- Лікувально-профілактичними;
- Профілактичними.

Належність продукту до якоїсь групи залежить від ступеня гідролізації, та клінічно підтвердженої ефективності.

Суміш, в якій наявний високий вміст гідролізату казеїнового білка справляє клінічно доведений значний розвиток толерантності до алергенів, в той же час, суміш з великим вмістом сироваткових білків майже не дає ніякої профілактичної дії.

Варто зазначити, що гідролізати, в яких високий степінь гідролізу білку можуть руйнувати біоценоз кишечника. Тим більше, що це дуже дорогі препарати.

До складу білкових сумішей можуть додавати жирні поліненасичені кислоти та лактозу. Вони сприяють покращенню біологічної цінності продукту.

Суміші з лактозою показані для вживання при дисбактеріозі, оскільки вуглевод сприяє росту корисної мікрофлори кишечника, а молочна кислота, яка утворюється при розкладанні лактози знижує рівень патогенної мікрофлори.

Не зважаючи на винайдені суміші з гідролізатом молочного білка. Дослідники шукають ще більш гіпоалергенні субстрати для процесу гідролізації [28].

1.3 Отримання природніх біоактивних пептидів шляхом протеолізу білків молока

1.3.1 Білковий склад молока. Біологічні функції білків молока

Масова частка білків в молоці незбираному становить від 2,5 до 4 %. Це сотні видів білків. Усі вони необхідні для розвитку та росту організму.

Класифікація білків молока розділяє їх на 3 групи:

Казеїни;

Сироваткові білки;

Міnorні білки.

Казеїни займають найбільшу частку усіх білків молока. Їх кількість може становити до 85 % від загальної кількості білкових речовин сировини. Казеїни у свою чергу діляться на 4 фракції.

У водному середовищі казеїни утворюють колоїдний розчин. Саме вони надають молоку білого забарвлення.

Казеїн – це харчовий білок. Нативний казеїн легко піддається дії травних протеїназ. В шлунку немовлят цей білок швидко згортається, утворюючи ніжний згусток, якому характерний високий рівень дисперсності. Казеїнові молекули утворюють комплекси з кальцієм та фосфором. Тому цей білок є необхідним в раціоні дітей.

Сироваткові білки – це білки, що знаходяться в сироватці. Її одержують при виробництві сирів. Вміст таких білків у молоці становить до 20 % від усіх білків. Сироваткові білки легко розчиняються.

Їх поділяють на наступні групи:

- α-лактоглобулін;
- β-лактоглобулін;
- альбумін сироватки крові;
- імуноглобулін;
- змішані білки.

Сироваткові білки містять дуже хороший амінокислотний склад, вони близькі до «ідеального» білку.

При нагріванні білки сироватки піддаються денатурації, при цьому, разом із казеїновими міцелами вони утворюють комплекси.

Імуноглобуліновим білкам властиво виконувати захисну функцію. Вони являють собою пасивний імунітет, який допомагає організму маленької дитини боротись з чужорідними тілами.

α-лактоглобулін бере участь в синтезі лактози

Застосування мембранних технологій дозволяють фракціонувати білки сироватки у промисловості.

Лізоцим та лактоферин характеризуються антибактеріальними властивостями.

Мінорні білки становлять лише 1 % від загального вмісту білку в молоці. Це біли, що формують оболонки жирових кульок молока. Вони допомагають стабілізувати краплинки жиру в об'ємі молока.

До білків молока належать також ферменти та гормони, що містяться в цій рідині.

1.3.2 Отримання біоактивних пептидів казеїну та сироваткових білків молока

Відомо, що усі молочні продукти характеризуються високою біологічною цінністю. Це зумовлено тим, що амінокислотний склад молока близький до ідеального харчового продукту. Білки молока легко піддаються розщепленню протеолітичними ферментами.

Казеїн вміщує 4 основні і деякі мінорні протеїнові фракції. Комітет з номенклатури, класифікації і методології молочних протеїнів у 2004 р. опублікував останні дані про фракційний склад та номенклатуру казеїнів.

За допомогою методу електрофореза в поліакриламідному гелі можна визначити фракції протеїнів казеїнового комплексу.

В 70-х роках минулого століття були встановлені факти, що частини первинної структури білків казеїнового комплексу, що виділяються як пептиди під час травлення, володіють фізіологічною активністю в організмі, коли особина харчується материнським молоком.

Також вчені виявили, що глікомакропептид – це сильний інгібітор роботи шлунку.

В 1979 р. в Мюнхені були вперше виділені біологічно активні пептидні ланцюги з білків казеїнового комплексу.

Наприкінці минулого століття були вивчені ензиматичні гідролізати казеїнів, які отримали *in vitro*, гастроінтестинальні гідролізати, які одержали *in vivo*, та синтетичні пептиди, що мали відповідність з первинною структурою казеїнів. В результаті досліджень були визначені біологічно активні пептиди, що утворюються при розщепленні фракцій протеїнів.

Ці сполуки мають вплив на фізіологічні системи організму.

Крім того, було визначено ряд агоністичних та антагоністичних опіатних рецепторів, інгібіторів ангіотензинперетворювальних ензимів, антитромботичних пептидів, імуномодуляторних пептидів, біоактивних фосфопептидів, пептидів, що перешкоджають розвитку патогенної мікрофлори.

Біоактивні пептиди, які одержують з казеїну, вивчають і сьогодні. Час від часу оновлюється база даних про виділені фракції з казеїнів, відкриті новітні напрямки біологічних активностей [70].

Білки сироватки також піддаються гідролізу. Ці білки характеризуються дуже вдалим поєднанням амінокислот, яке близьке до ідеального харчового білку.

Окрім того сироваткові білки важливі функції в організмі, до них належать: імунорегуляторна, транспортна, захисна, секреторна, та антиоксидантна дії [52].

На даний час протеоліз білків сироватки користується меншою популярністю, ніж протеоліз казеїнів.

Серед біоактивних пептидів білків сироватки виділено: інгібітор ангіотензинперетворювальний ензим, пептид з опіювальною дією, імуномодуляторний та гіпохолестеролемічний пептид, а також пептиди, що впливає на моторику кишечника.

1.3.3 Казоморфіни і казоксини — агоністи й антагоністи опіатних рецепторів

Казоморфіни — пептиди, які утворюються в результаті перетравлювання з білка, який міститься в молоці (казеїн). Характерною особливістю казоморфінів є опіювальний ефект.

Найбільш цінними сполуками коров'ячого молока є ті, які виникають в результаті перетравлювання β -казеїну.

Казоморфіни були виділені з гідролізатів казеїну [48]. Вчені дослідили, що він наділений опіювальною морфоподібною активністю. Тому пептид назвали β -казоморфін. Згодом вчені довели, що β -казоморфін і його штучний замінник є антагоністом μ і κ - опіювальних рецепторів.

Пептид, як і морфій викликає сонливість, сповільнення дихання та брадикардію.

В травному тракті казоморфіни можуть розщеплюватись, перетворюючись при цьому в неактивні дипептиди.

На сьогодні біохімія казоморфінів є не до кінця вивченою.

Якщо ввести β -казоморфін в організм, то найбільш активно він почне діяти через 10 хв., а через 30 хв. дія препарату зникає.

Існує гіпотеза, що β -казоморфін в материнському молоці впливає на немовлят як заспокійливе.

1.3.4 Казокініни — пептиди з антигіпертензивною активністю

Казокінін – це інгібітор перетворюючого ферменту пептидилдипептидази (АПЕ), який змінює ангіотензин I в ангіотензин II. Фермент є важливим в регуляції артеріального тиску.

В 1982 р. Маруяма та ін. з казеїну виділили інгібітор АПЕ.

Наступні роки пептид переважно одержували методом традиційного хімічного синтезу.

Те, що казокініни *in vitro*, гальмують активність АПЕ, дає можливість встановлення структурно-функціонального зв'язку між пептидними інгібіторами та поєднанням з АПЕ.

Важливою характеристикою пептидів, які вводяться перорально чи внутрішньовенно є резистентність до дії пероксидаз. Казокініни, які ввели перорально адсорбуються в кишечнику в активній формі.

1.3.5 Антитромботичні пептиди казеїнового походження

Існують біологічно-активні пептиди, виділені з протеїнів казеїнового комплексу молока, які беруть участь у процесах зсідання крові.

Якщо на шкірі виникає рана, то за допомогою тромбоцитів кров на рані зсідається. Таким чином організм захищається від значних втрат крові. Згортання крові та згортання молока – це схожі біологічні процеси. Існує думка, що людський білок фібриноген і коров'ячий κ -казеїн утворились від спільного гену 450 млн. років тому. Так, первинна структура обох білків схожа.

Також наявна структурна та функціональна подібність частин ланцюгів обох білків.

Фібриноген розщеплюється за допомогою тромбіну, а κ-казеїн – за допомогою молокозсідального ферменту хімозину.

1.3.6 Імуномодуляторні пептиди

Імуноглобуляторні пептиди сприяють підсиленню функціоналу імунних клітин. Це може виявлятися як активація і поліферація лімфоцитів, синтез антитіл, активність імунних клітин, регуляція створення цитокінів.

Пептиди можуть зменшувати прояви алергій та підсилювати імунні клітини слизової оболонки [61].

Існує багато наукових досліджень щодо впливу сироваткових білків на явище поліферації лімфоцитів.

Гідролізат лактоферину може брати участь в синтезі антитіл.

1.3.7 Лакторфіни — пептиди з опіюдною дією

Це група біологічно активних пептидів, які отримують з білків молока. Характерною їх особливістю є фармакологічна схожість з опіумом та морфіном.

Визначено, що ці речовини при потраплянні в організм, здійснюють вплив на емоції, гальмують перистальтику кишечника, характеризуються антисекреторною дією.

Найвідомішими представниками цієї групи є α-лакторфін, β-лакторфін та лактофероксин А. Вище наведені пептиди є антагоністами опіюдних рецепторів μ-виду.

Біохімічні відомості про лактоферин не докінця вивчені, тому для застосування цих пептидів в інших цілях, необхідно провести ряд ґрунтовних досліджень.

1.3.8 Вплив казеїнових фосфопептидів на засвоєння мінеральних речовин

Найважливішою особливістю казеїнового фосфопептиду (КФП) є його властивість зв'язування кальцію і переведенням в розчинну форму. КФП запобігає осіданню йонів кальцію, коли в лужному середовищі наявні фосфати.

Дефосфорильований пептид втрачає можливість з'єднувати кальцій та залізо. Кальцій, що міститься в складі молочних продуктів, потрапляє в організм завдяки здатності КФП приєднувати і переносити іони кальцію у вигляді розчину.

Як підтвердження цього є результати, що показують створення КФП в травній системі, та його витривалість до дії протеолітичних ферментів.

З вище викладеного огляду літератури можна зробити наступний висновок.

Отже, під час протеолізу білків молока можна виділити біологічно активні пептиди. Серед них дуже багато речовин, необхідних для забезпечення життєдіяльності людини. Біологічно активні пептиди можуть застосовуватись для лікування та профілактики захворювань. Також ці речовини можна застосовувати в якості харчових добавок до щоденного раціону.

Доцільним є вивчення методів гідролізу, адже від способу отримання залежить якість готового продукту.

Гідролізовані білки широко застосовуються в харчуванні. Багато людей страждають непереносимістю певних білків. В маленьких дітей часто виникає алергія на білок коров'ячого молока. Суміші гідролізованих білків є гіпоалергенними. Їх можуть вживати усі.

Протеоліз білків молока ще раз доводить цінність молочних продуктів в харчуванні. Протеїни молока забезпечують не лише надходження необхідної кількості амінокислот, а й виконують багато важливих фізіологічних властивостей: захисну, будівельну, регуляторну дії.

РОЗДІЛ 2

2. Матеріали і методи досліджень

2.1 Матеріали та реактиви

В роботі використовували свіже молоко кислотністю 16-17°Т та значенням рН 6,7-6,8. Його було використано для отримання загального казеїну, розчин якого в подальшому піддавали ферментативному протеолізу з метою отримання породних біоактивних фосфосеринових пептидів.

Протеоліз здійснювали з використанням панкреатину вітчизняного виробництва (приватне акціонерне товариство «Технолог»).

Поліакриламідний гель (ПАГ), а також буферні розчини для виконання електрофоретичного аналізу приготувляли з використанням реактивів угорської фірми «Reanal».

Під час проведення гель-фільтрації було використано різні сефадекси від фірми шведської «Pharmacia». Крім цього в роботі використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «ХЧ» і «ЧДА».

2.2 Визначення кислотності титрованої

У конічну колбу місткістю 150см³ вносили 10 см³ молока, яке використовували для отримання казеїну, додавали 20 см³ дист. води та спиртовий розчин фенолфталеїну концентрацією 1% (3 краплі), суміш перемішували і титрували розчином гідроксиду натрію концентрацією 0,1моль/дм³ поки не появиться слабке рожеве забавлення.

При цьому для знаходження кислотності молока (°Тернера) необхідно помножити на десять той об'єму розчину натрію гідроксиду, який використано для відтитрування вільних кислот у молоці.

2.3 Визначення рН

Значення рН визначали з використанням потенціометра. Для його калібрування застосовували стандартні буферні розчини, призначені для рН-метрії.

2.4 Визначення концентрації білків

Проводили відповідно до методу Лоурі, який є найбільш чутливим. В його основу покладено прямопропорційна залежність між інтенсивністю зафарбовування розчинів і вмістом у них білків. Зафарбовуючі речовини утворюються у результатів протікання наступних біохімічних реакцій: біуретова; реакція з використанням реактиву Фолін. Перевагою цього методу є вища порівняно з іншими чутливість, він дає змогу визначити концентрацію, виражену у десятках міліграму.

Визначення проводили з використанням стандартного розчину білку, 2 мг/дм³; реактиву Фоліна, 1 моль/дм³; реактиву I – 10%-й розчин карбонату натрію в 0,5 моль/дм³ розчині натрію гідроксиду; реактив II – 0,5%-й розчин купруму сульфату. Вимірювання оптичної густини зафарбованого розчину виконували фотометром «КФК–3».

Порядок виконання дослідження показано на схемі (рис. 2.1).

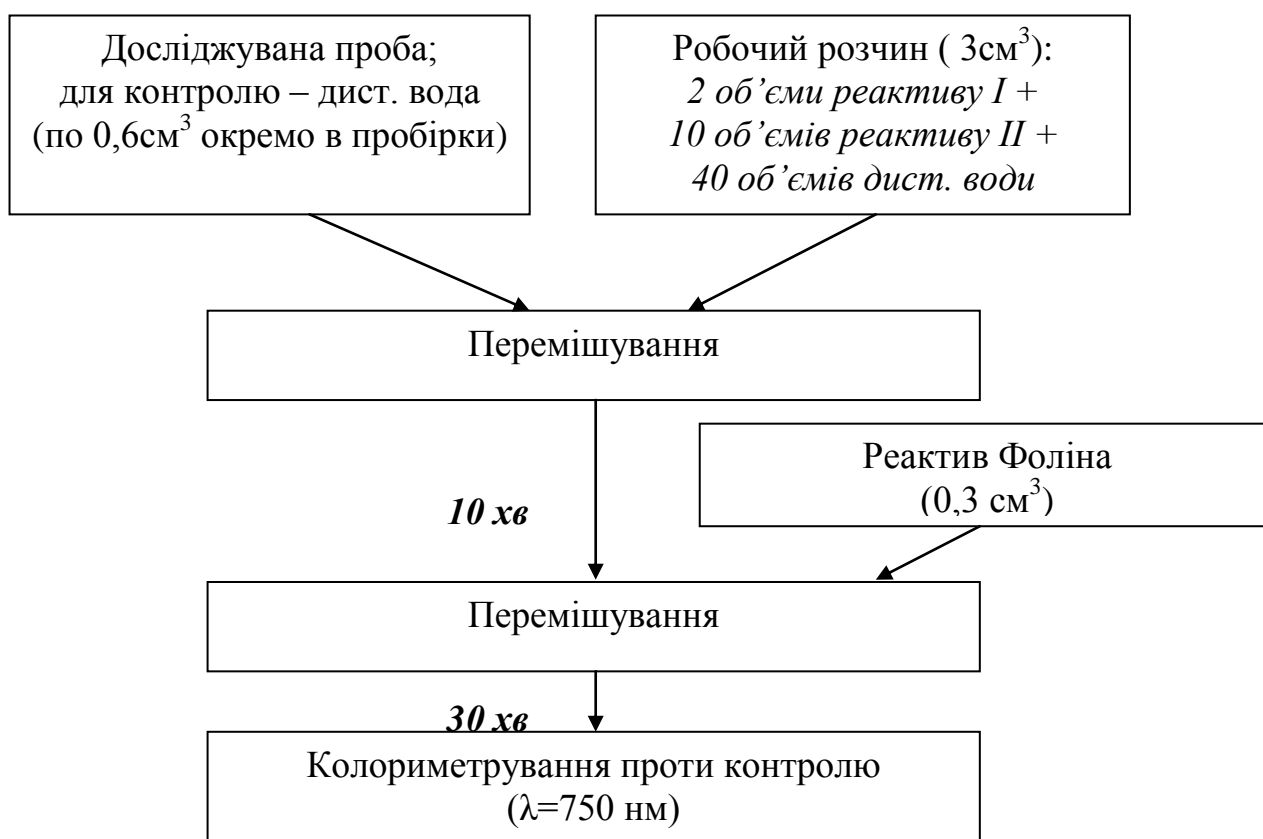


Рисунок 2.1 – Порядок внесення реактивів

Після того, як була визначена екстинція у досліджуваній пробі, вміст білка в ній визначають за калібрувальною кривою.

Для її побудови готують робочі розчини відповідних концентрацій (табл. 2.1), використовуючи стандартний розчин білку концентрацією 2 мг/см³.

Таблиця 2.1 – Склад розчинів білка при побудові калібрувального графіку

№ проби	Стандартний розчин білка, мл	Дистильована вода, мл	Концентрація білка, мг/см ³
I	0,1	3,9	0,05
II	0,2	3,8	0,10
III	0,3	3,7	0,15
IV	0,4	3,6	0,20
V	0,5	3,5	0,25
VI	0,8	3,2	0,40
VII	1,0	3,0	0,50

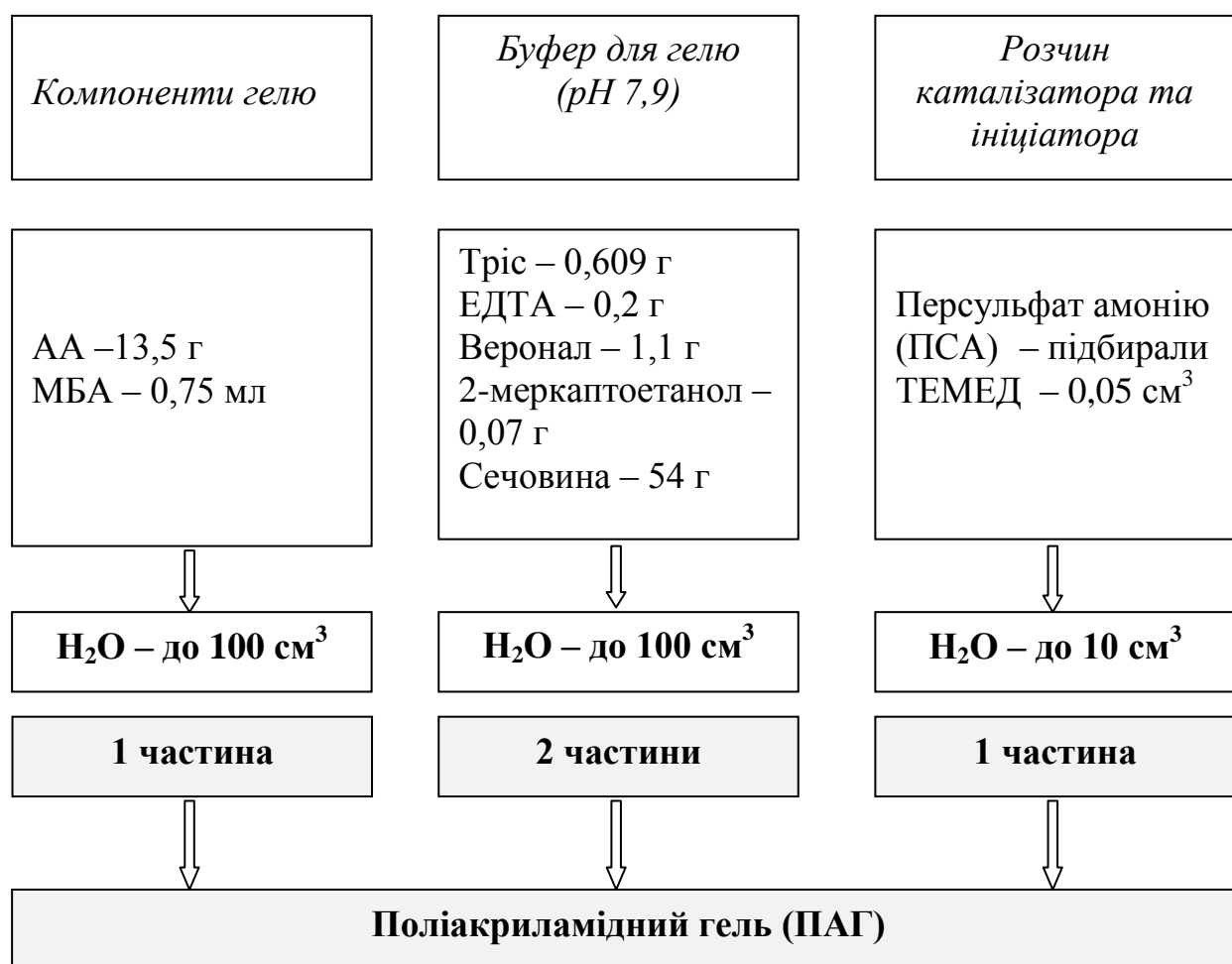
До кожної із приготовлених проб об'ємом по 0,6 см³ додають реактиви, як показано на рис. 2.1 і потім також колориметрують навпроти контролю, приготовленого з використанням дист. води замість розчинів білку ($\lambda=750$ нм). За отриманими при колориметруванні даними, будують калібрувальну криву (залежність екстинції відповідного розчину від його концентрації).

Концентрацію білків також визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46 (довжина хвилі 280 нм). Для загального казеїну молока застосовували коефіцієнт поглинання $D_{1\text{см}}^{1\%} = 8,2$, який було раніше встановлено.

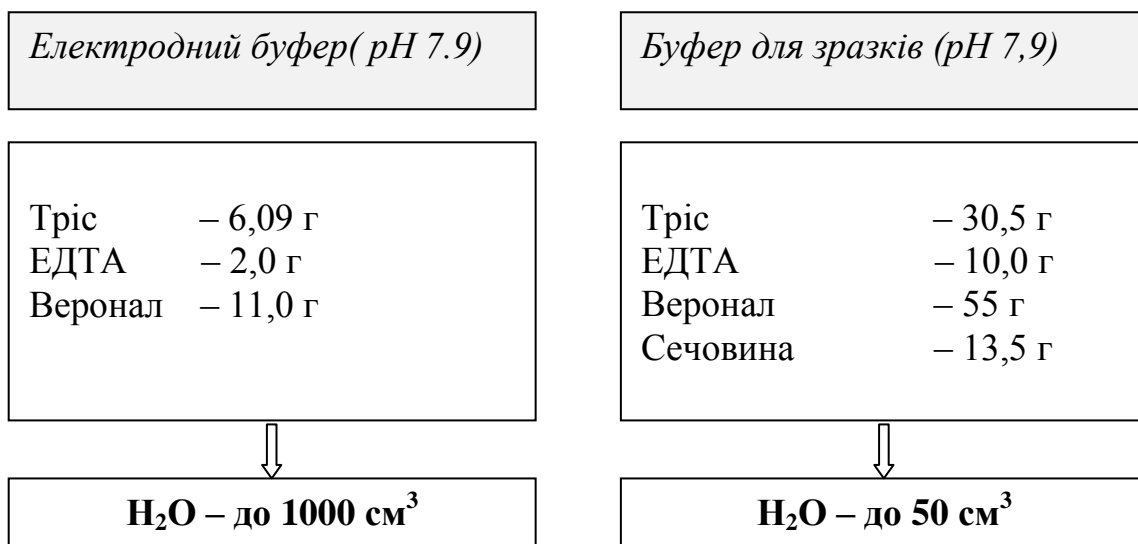
2.5 Електрофорез у ПАГ

Для проведення електрофорезу було використано прилад Стадієра, який виготовляли із органічного скла та поліакриламідний гель з концентрацією акриламіду 35 мг/см^3 . Така концентрація буде забезпечувати високу швидкість та ефективність розділення протеїнів.

Для приготування ПАГ потрібно розчин наступного складу:



Також були приготовлені буфер: 1 – електродний; 2– для приготування зразків казеїнів:



Підготовлену робочу камеру з готовим гелем встановлювали у нижній буферний резервуар приладу Стадієра. В буферні резервуари і верхню частину робочої камери над ПАГ вливали приготовлений електроодний буфер.

Досліджувану пробу білка в кількості 0,015 см³ вносили мірним капіляром під буфер в стартові комірки. При цьому проба має рівномірно осісти на дні в комірці ПАГ. Внесення проби потрібно виконувати акуратно, оскільки від якості внесення буде у значній мірі залежати розділення. Після того як була нанесена проба необхідно сполучити буферні розчини, які знаходяться робочій камері над ПАГ і верхньому електроодному резервуарі приладу. Роблять це за допомогою смужки, вирізаної з фільтрувального паперу. Після цього можна підключати електроди до джерела електричного струму. Електрофорез проводили, задаючи постійну силу струму – 50мА. У ході розділення контролювали просування сигнального барвника, внесеного у пробу до початку нанесення на ПАГ. Коли барвник досягне нижньої лінії поліакриламідного гелю відключали струм. Камеру з пластинкою гелю виймали з приладу, обережно розклеювали, діставали з неї гель для фіксації білків і їх зафарбовування з метою проявлення на пластині ПАГ.

Фіксування і зафарбовування пластинок ПАГ

Пластинку гелю поміщали у кристалізатор, куди вливали 1%-й розчин барвника (амідошварц 10 Б) в 7%-й кислоті оцтовій. Пластинку витримували там 30-40 хвилин. При цьому білки зафіксувалися у гелі і зафарбовувались. Фарбу, яка не була зв'язана білками, вимивали з використанням суміші 7%-ї оцтової кислоти і 20%-го етилового спирту. Розчин час від часу міняли, відмивання вели до моменту отримання повністю прозорого фону.

На зафіксованій електрофореграмі проводили ідентифікацію проявлених у вигляді окремих плям фракцій білків з врахуванням відстані, яку вони пройшли в поліакриламідному гелі під час виконання електрофорезу. Результати були оформлені у вигляді електрофореграм.

2.6 Гель-фільтрація

Одним із видів розподільчої хроматографії є гель-фільтрація, під час якої молекули розділяються відповідно до розмірів і форми. При гель фільтрації на колонку, заповнену частинками пористого інертного матеріалу подається суміш молекул.

Відповідно до моделі, запропонованої Флодіним, під час пропускання крізь таку колонку розчину, молекули якого мають різну величину, у випадку, коли розмір молекул буде більшим за розмір пор, вони будуть безперешкодно незатримуючі рухатися в просторі між частинок. В цей же час менші за розміри пор молекули будуть зворотно дифундувати у ці частинки. Тим самим їх рух по колонці буде повільнішим. В результаті цього молекули будуть з колонки виходити по мірі зменшення їхнього розміру або молекулярних мас, в тому випадку, якщо вони мають подібну форму [26].

Власне процедура проведення гель-фільтрації передбачає відбирання невеликих, однакових за об'ємом порцій елюенту на виході із хроматографічної колонки. Потім отримані зразки після розділення досліджують, встановлюючи у кожному з них вміст того чи іншого компонента, котрі входили до складу вихідний зразок, нанесеного на колонку.

У роботі було використано гелі на основі декстрину, зокрема сефадекс. Він виготовляється винятково шведською фірмою «Pharmacia». Декстран – це полісахарид, який побудований із залишків моносахариди глюкози. Його отримують під час при вирощування мікроорганізму *Leuconostoc mesenteroides* на розчині сахарози.

Перевагою сефадексів є їх стійкість до температур, розбавлених кислот та лугів, вони не розчиняються в органічних розчинниках.

Підготовка хроматографічної колонки

Для виконання розділення гель-фільтрацією встановлювали у штатив колонку фірми «Reanal» строго вертикально. Потім під'єднували з'єднувальні трубки невеликого діаметру і на нижній адаптер ставили фільтр, який необхідний для підтримування гелю.

Підготовку гелю здійснювали шляхом його декантації та набухання у тому розчині, який в подальшому використовувався як елюент. Певну кількість гелю (з врахуванням об'єму колонки) вносили в надлишок елюенту у склянку при перемішуванні. Після повного осідання гелю зливали супернатант, який містив пошкоджені гранули. Цю операцію необхідно повторити три рази.

Щоб заповнення хроматографічну колонку набухлим гелем виймали з неї верхній адаптер, встановлювали лійку з мішалкою. Потім колонку заповнювали елюентом, подаючи його через нижній адаптер. У лійку з мішалкою вливали суспензію декантованих гранул набухлого гелю. Гель повинен рівномірно осісти на дно колонки. Після заповнення верхній адаптер ставили на місце з'єднували його за допомогою розподільного крана з буферним резервуаром та міскістю для проб.

Заповнену колонку перед нанесенням на неї дослідної проби промивали трьома об'ємами елюенту, встановлювали потрібну швидкість його витікання. Вірець білків і фосфосеринових пептидів вносили на верхню поверхню сефадексу, зафіксували верхній адаптер та приступали до відбору окремих фракцій певного об'єму в проградуйовані пробірки.

Вміст білків та фосфосеринових пептидів у відібраних фракціях аналізували спектрофотометрично. Результатом проведеної гель-фільтрації є хроматограма.

РОЗДІЛ 3

3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Виділення фосфопротейнових субстратів з білків молока

Казеїни – природні субстрати для протеолітичних ферментів у молочнокислих бактерій, а також і молокозгортальних протелітичних ферментів. Відомо, що протеолітичні ферменти молочнокислих бактерій розщеплюють казеїни з утворенням великої кількості пептидів.

Під поняттям “загальний казеїн” розуміють препарат, який складається з різних фракцій α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN, κ -CN, і поліпептидів з бета-казеїну. У процесі отримання загального казеїну у першу чергу молоко очищають від ліпідів, відділяють протеїни сироватки, низькомолекулярні пептиди протеозопептонної фракції, вуглеводи, різні сполуки з малою молекулярною масою. У даній роботі при виділенні загального казеїну необхідно було досягнути високого ступеню його очистки без використання екстремальних значень рН, концентрації солей, різкої зміни температури та денатуруючих факторів, які можуть призвести до глибоких змін у структурі білків казеїнового комплексу. Крім того, необхідно передбачити стадію інгібування протеаз, які завжди присутні в загальному казеїні і не відділяються від нього .

У науковій літературі описано цілий ряд способів виділення загального казеїну. Вони включають відділення казеїнів молокозсідними препаратами, нагрівом до високих температур, іонами Ca^{2+} . Всі ці методи призводять до значних незворотних змін складу і просторової структури, а в першому випадку – і первинної структури казеїнів. Тому ми взяли за основу найбільш близький до природного процес осадження казеїнів при рН 4,6, що має місце в шлунку телят.

В першу чергу проводили відділення від казеїну ліпідів. Процес включає дві стадії і проходить при двох різних температурах. Серед багатьох кислот, які використовували раніше для осадження казеїну (сірчана, молочна, оцтова, соляна), була вибрана соляна, оскільки ця кислота використовується при

нормальному травленні. Розчиняли осад казеїн за допомогою NaOH, слідкуючи, щоб значення рН при цьому не перевищувало 7,5, оскільки при більш високих значення рН може відбуватись дефосфорилування казеїнів. Стадії виділення казеїну показані на схемі:

Свіже збірне молоко

Центрифугування при 4000 g протягом 10 хвилин (30°C). Виділення шару ліпідів.



Знежирене молоко I

Центрифугування при 4000 g протягом 10 хвилин (4°C). Виділення шару ліпідів.



Знежирене молоко II

(500 мл, рН 6,7)

Додаємо 100 мл дистильованої води.

По краплях додаємо 1 н HCl до рН 4,6 при перемішуванні (7°C).



Осад загального казеїну I

Промиваємо дистильованою водою (150,0 мл).

Диспергуємо у 50,0 мл дистильованої води.

Додаємо 1 н NaOH при перемішуванні (рН \leq 7,5).



Розчин загального казеїну I

Додаємо 1000 мл дистильованої води.

Додаємо по краплях 1 н HCl до рН 4,6 при перемішуванні.



Осад загального казеїну II

При розведенні знежиреного молока дист. водою проходить для дестабілізації міцел. Це треба для більш повного видалення низькомолекулярних компонентів. Описано, що переосадження казеїну при рН 4,6 потрібно проводити три рази. Для інактивації природних протеаз використовували розчин ацетату (рН 4,0). Після інкубації осад загального казеїну промивали надлишком дистильованої води, розчиняли його з додаванням NaOH і висушували ліофільно. Одержаний загальний казеїн зберігали при 4⁰C. Через три місяці зростання ТХО-розчинних пептидів не встановлено. Це свідчить про інактивацію протеаз молока.

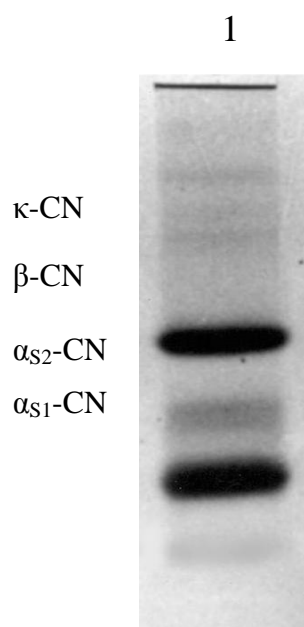


Рисунок 3.1 – Електрофореграма осаду загального казеїну I.

1- Електрофорез у лужній системі на пластинках ПААГ.

Якісний і кількісний склад фракцій відповідає результатам, описаним в літературі [39, 40]. Виділений таким чином загальний казеїн був використаний для проведення протеолізу та виділення фосфосеринових пептидів.

3.2 Встановлення значення рН для протеолізу фосфосеринових пептидів

Відомо, що рН суттєво впливає на активність протеолітичних ферментів. Ферменти активні в певному інтервалі рН і для дії кожного фермента відоме певне значення оптимуму. Наявність оптимуму за М.Діксоном і Е.Уеббом [14] зумовлено наступним:

1. Зворотній вплив рН на швидкість реакції в умовах, коли фермент насичений субстратом;
2. Вплив рН на спорідненість фермента до субстрату. В цьому випадку випадкове падіння активності по обидві сторони від оптимуму буде пов'язане зі зниженням насиченості ферменту субстратом;
3. Вплив рН на стабільність ферменту, який може незворотно інактивуватися по одну або обидві сторони від оптимального значення рН.

Ці фактори можуть діяти в комбінації. Падіння активності по одну сторону може бути результатом зменшення спорідненості ферменту до субстрату, а по іншу – результатом інактивації ферменту.

Використаний в нашій роботі ферментний протеолітичний препарат панкреатин містить ряд ферментів, які знаходяться в підшлунковій залозі. Основними протеолітичними ферментами панкреатину є трипсин та хімотрипсин.

Відомо, що трипсин гідролізує пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами L-аргініну та L-лізину. При значеннях рН нижче 6 - трипсин стабільний, при вищих значеннях рН в розчинах він розпадається внаслідок самоперетравлення. В залежності від природи білків-субстратів оптимум його активності може знаходитись при значеннях рН від 7 до 9.

Хімотрипсин розщеплює пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами ароматичних амінокислот. На відміну від трипсину, хімотрипсин

стабільний не тільки в кислих розчинах, а й в нейтральних. Оптимум активності у хімотрипсину в залежності від субстрату знаходиться в значеннях рН 7 - 9.

Крім цих ферментів в панкреатині, в меншій мірі, присутні також еластаза, колагеназа, а також пептидаза.

Для встановлення оптимальних значень рН при отриманні фосфосеринових пептидів ми проаналізували хід протеолізу і вихід фосфосеринових пептидів за дії панкреатину на загальний казеїн в діапазоні рН від 5 до 11.

Для цього готували 200 мл 2%-го субстрату в універсальному буфері (рН 7,3). Розливали в склянки по 20 мл розчину субстрату і доводили рН додаванням NaCl. Протеоліз казеїнового субстрату панкреатином проводили за співвідношення «ензим : субстрат» - 1: 20.

Наважку ферментного препарату змішували з 20 мл 2%-го розчину субстрату. Протеоліз проводили при температурі 37°C та заданим значенням рН. Проби відбирали кожні 30 хвилин. Після кожного етапу до відібраних проб (3 мл) додавали по 3 мл 10% -го розчину трихлороцтової кислоти і витримували протягом 30 хв, після чого фільтрували через паперовий складчастий фільтр. До 1 мл відфільтрованих проб додавали 9 мл 5%-го розчину оцтової кислоти та визначали оптичну густина на спектрофотометрі при довжині хвилі 280 нм.

Решту гідролізату доводили до рН 4,6 хлоридною кислотою, після чого центрифугували протязі 15 хвилин при 5000 об/хв. Для отримання фосфосеринових пептидів використовували супернатант, який утворився внаслідок центрифугування. До 9 мл супернатанту додавали 1 мл 10%-ного розчину хлориду кальцію та 10 мл етилового спирту і проводили осадження фосфосеринових пептидів в холодильнику. Після цього знову проводили центрифугування протягом 15 хвилин при 5000 об/хв., в результаті чого отримали осад фосфосеринових пептидів. Осад висушували при температурі 75°C і визначали вихід фосфосеринових пептидів за гравіметричним методом. Результати показано в табл.3.2 і на рис.3.2.

Таблиця 3.2 – Визначення виходу фосфосеринових пептидів після центрифугування гідролізатів отриманих при різних значеннях рН

рН	E ₂₈₀	Маса центрифужної пробірки, г	Маса пробірки з осадом фосфосеринових пептидів, г	Маса фосфосеринових пептидів, мг
6,1	0,580	10,28400	10,34700	63,00
6,5	0,642	10,47910	10,54655	67,45
6,9	0,638	10,66325	10,72810	64,85
7,3	0,723	10,48250	10,54500	62,50
7,5	0,728	10,62910	10,68400	54,90
7,7	0,736	10,65006	10,71274	62,68
7,9	0,741	10,24316	10,30701	63,85
8,1	0,702	10,52414	10,57934	55,20
8,3	0,714	10,31762	10,36831	50,69
8,5	0,698	10,51515	10,56965	54,50
8,7	0,681	11,02913	11,08515	56,02
8,9	0,671	10,22855	10,28443	55,88
9,3	0,536	10,25295	10,30615	53,20
9,7	0,654	10,58745	10,64753	60,08
10,1	0,557	10,62143	10,66750	46,00

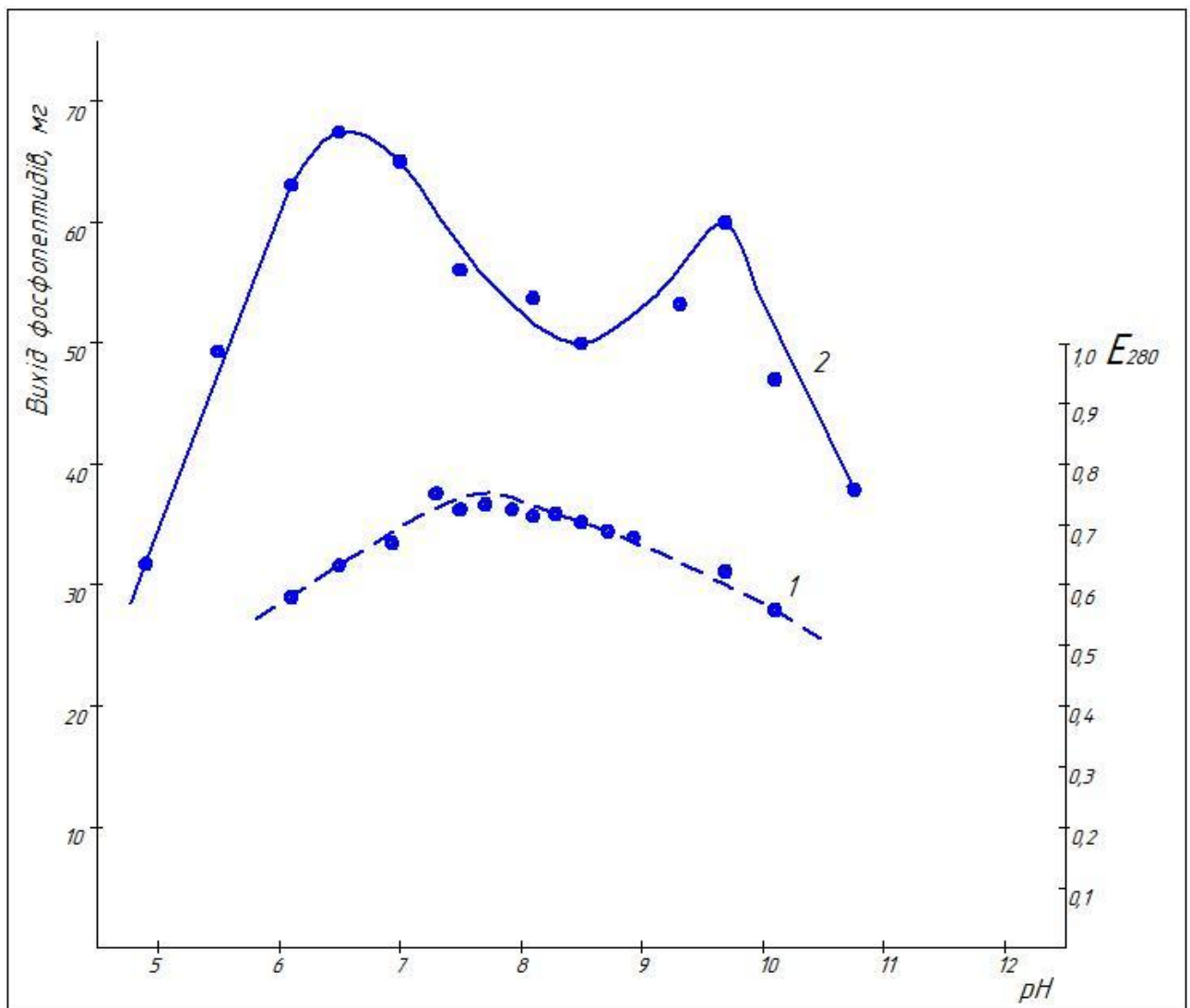
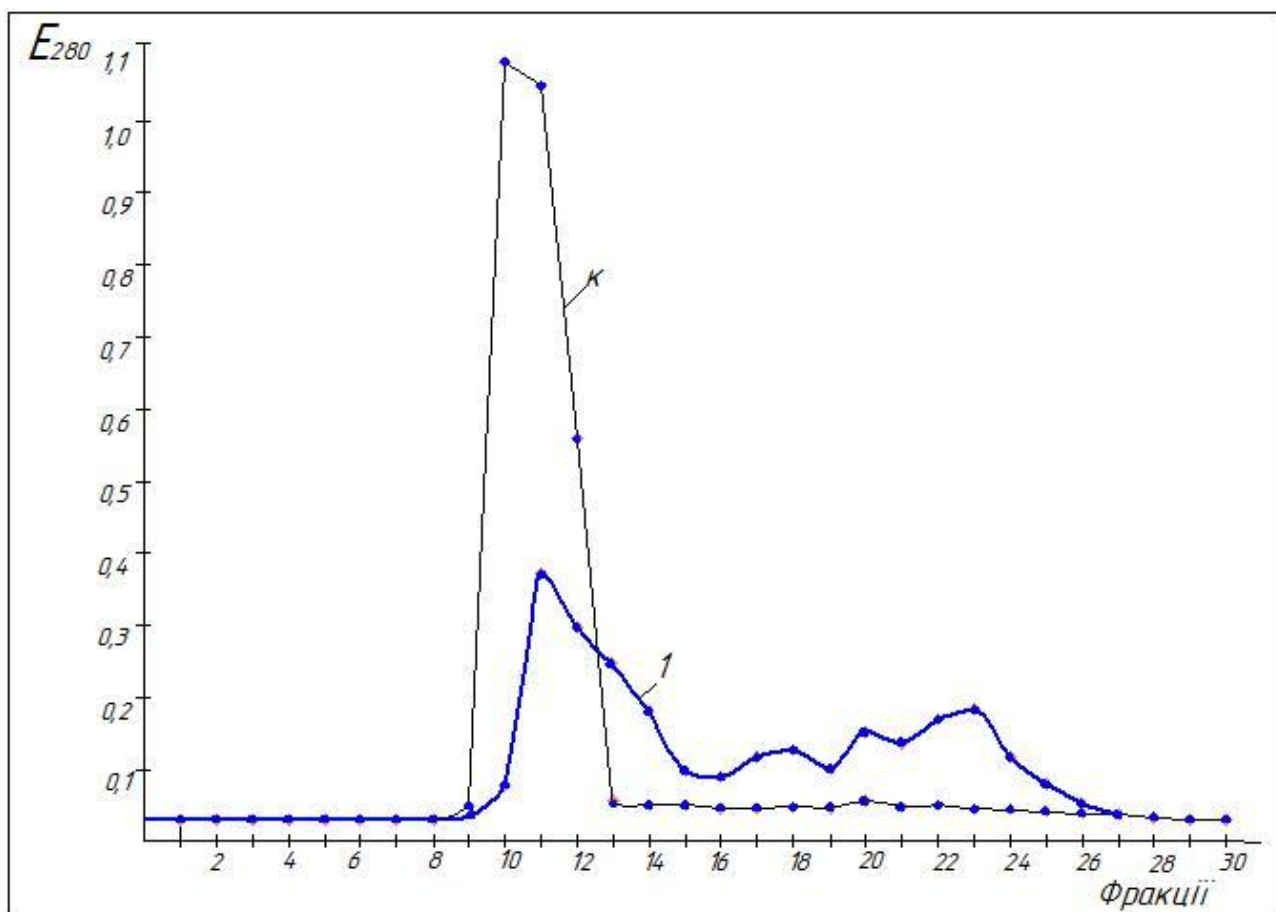


Рисунок 3.2 – Залежність протеолізу фосфопротеїнового субстрату (1) та виходу фосфосеринових пептидів (2) від рН-середовища за дії панкреатину

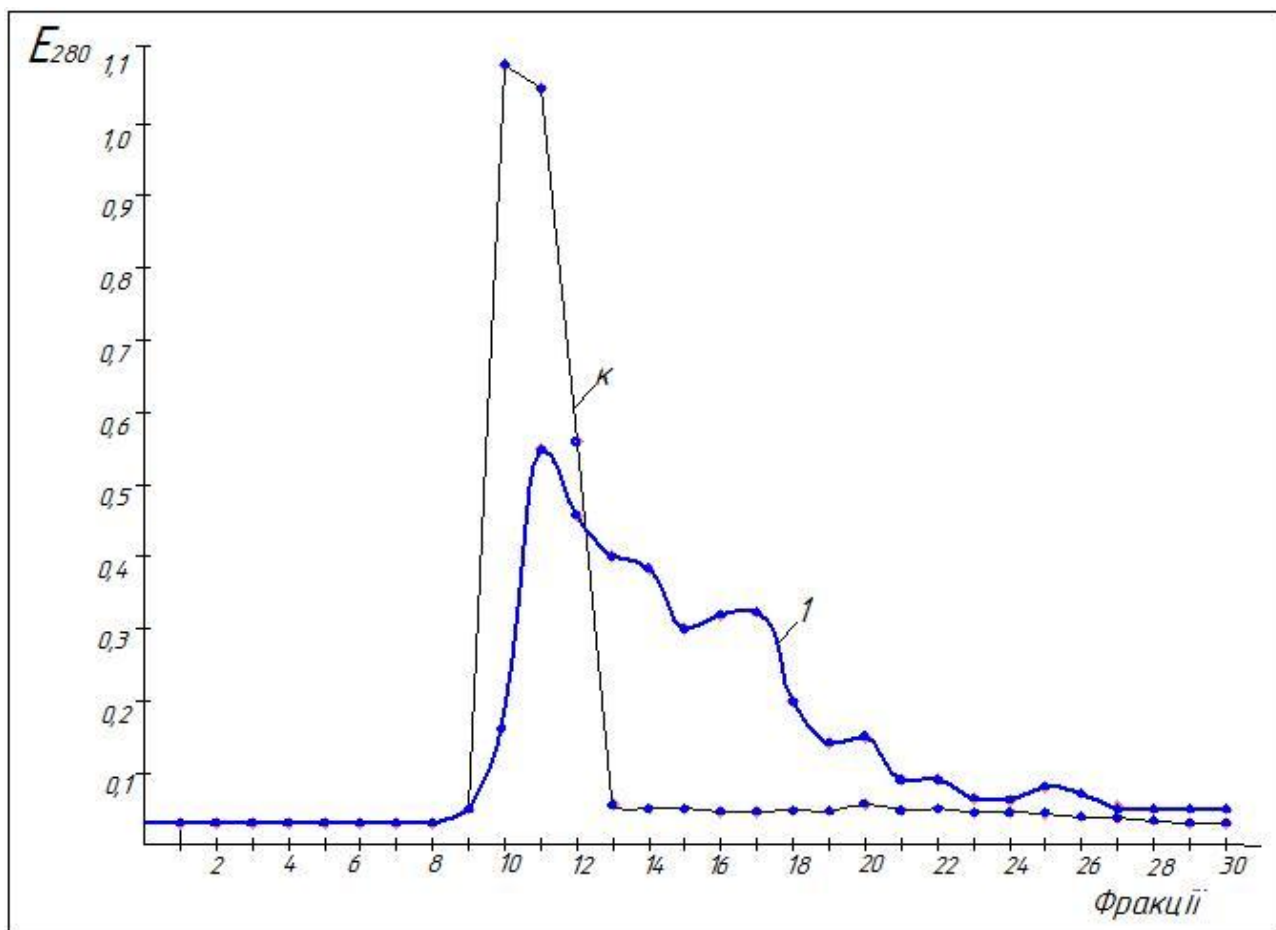
Отримана залежність (крива 1, рис.3.2) характерна для панкреатину і показує оптимальне значення в розчині близько рН 7,9.

Що стосується виходу фосфосеринових пептидів, то залежність виявилась складнішою (крива 2, рис.3.2), оскільки має два максимуми, жоден з яких не співпадає з оптимальним значенням рН на кривій 1.

Для пояснення цієї ситуації нами запропонована можливість утворення фосфосеринових пептидів різної величини в результаті дії панкреатину при різних значеннях рН. Для перевірки цього була проведена гель-фільтрація виділених фосфосеринових пептидів.



Рисункок 3.3 – Гель фільтрація контрольного фосфопротейного субстрату (κ) і фосфосеринових пептидів (1) отриманих за дії панкреатину при рН 7,9.



Рисункок 3.4 – Гель фільтрація контрольного фосфопротеїнового субстрату (κ) і фосфосеринових пептидів (1) отриманих за дії панкреатину при рН 6,5

При цьому аналізували фосфосеринові пептиди, отримані при рН 7,9 (оптимум для протеолітичної активності) та 6,5.

Протеоліз тривав 2 години при 37°C. Результати показано на рис. 3.3 і 3.4. Видно, що об'єм виходу фосфосеринових пептидів з колонки збільшений в обох випадках, порівняно з контролним фосфопротеїновим субстратом. Також необхідно відзначити, що препарат фосфосеринових пептидів, отриманих при рН 7,9, містить значну кількість фосфосеринових пептидів з низькою молекулярною масою, які виходять з повним об'ємом колонки. Об'єм виходу фосфосеринових пептидів, отриманих при рН 6,5, менший. Молекулярна маса їх може становити 1000-5000 Да. Тобто, при оптимальних значеннях рН утворюється більше низькомолекулярних фосфосеринових пептидів, які, очевидно, утворюються при реальному протеолізі *in vivo*.

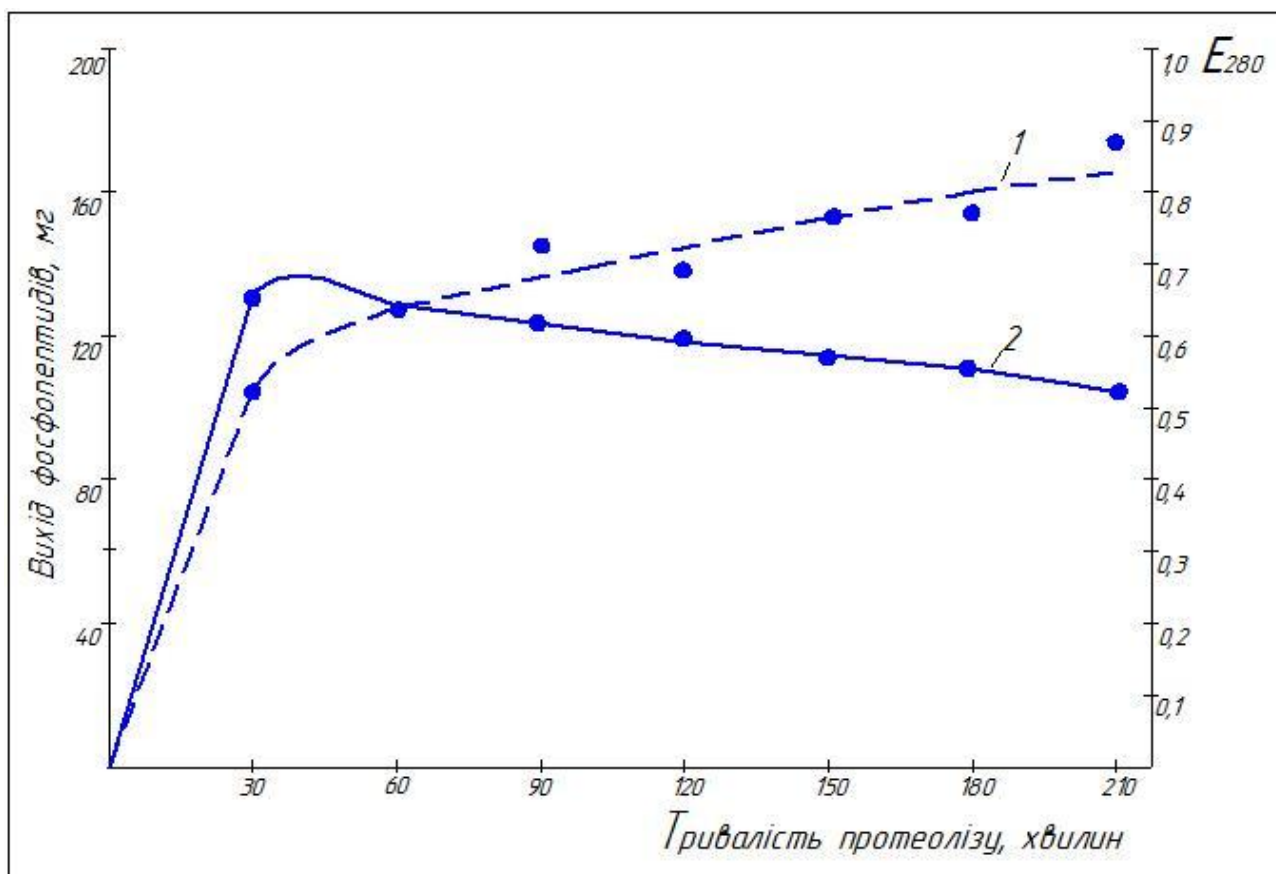
3.3 Визначення оптимальних концентрацій ферментного препарату для отримання фосфосеринових пептидів

Для знаходження оптимальних значень концентрації ферменту проводили протеоли з різними кількостями ензиму. При цьому на різних етапах визначали концентрацію фосфосеринових пептидів. Протеолізи проводили при значеннях температури 37°C і рН 7,9. Концентрація казеїнового субстрату становила 9%. Співвідношення «ензим : субстрат» задавалось в діапазоні від 1:20 до 1:260. Такий діапазон було встановлено на основі попередніх наших досліджень а також з врахуванням літературних даних. Проби відбирали через кожні 30 хв, починаючи з 30 хв. від початку протеолізу і до 210 хв включно. Фософпептиди виділяли і визначали їх вихід як було описано в розділі 3.2.2.

Результати досліджень, ходу протеолізу і виходу фосфосеринових пептидів при співвідношенні «ензим : субстрат» 1:20, 1:60, 1:100, 1:140, 1:180, 1:220, 1:260, показані на рис.(3.5; 3.6; 3.7; 3.8; 3.9; 3.10; 3.11).

Табл. 3.3 - Маса фосфосеринових пептидів після центрифугування і висушування з гідролізату отриманого при співвідношенні «ензим : субстрат» - 1:20

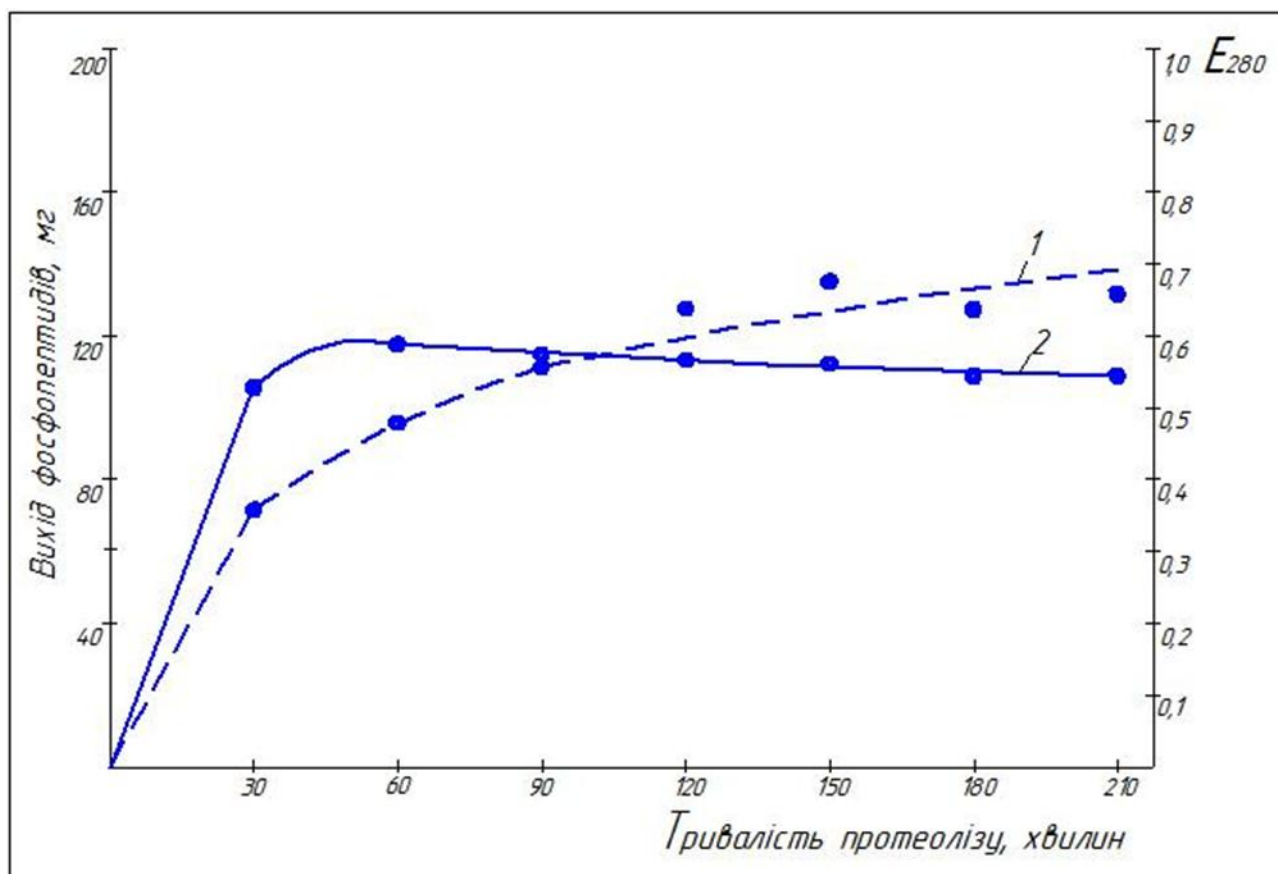
Час протеолізу, хв	E ₂₈₀	Маса центрифужної пробірки, г	Маса пробіки з осадом фосфосеринових пептидів, г	Маса фосфосеринових пептидів, мг
30	0,525	10,47875	10,61157	132,82
60	0,699	10,23730	10,36345	126,15
90	0,759	10,28007	10,40610	126,03
120	0,695	10,45060	10,56925	118,65
150	0,771	10,61737	10,73385	116,48
180	0,783	11,02173	11,13115	109,42
210	0,883	10,64122	10,74516	103,94



Рисункок 3.5 – Хід протеолізу (1) і вихід фосфосеринових пептидів (2) при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 20

Табл. 3.4 - Маса фосфосеринових пептидів після центрифугування і висушування з гідролізату отриманого при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 60

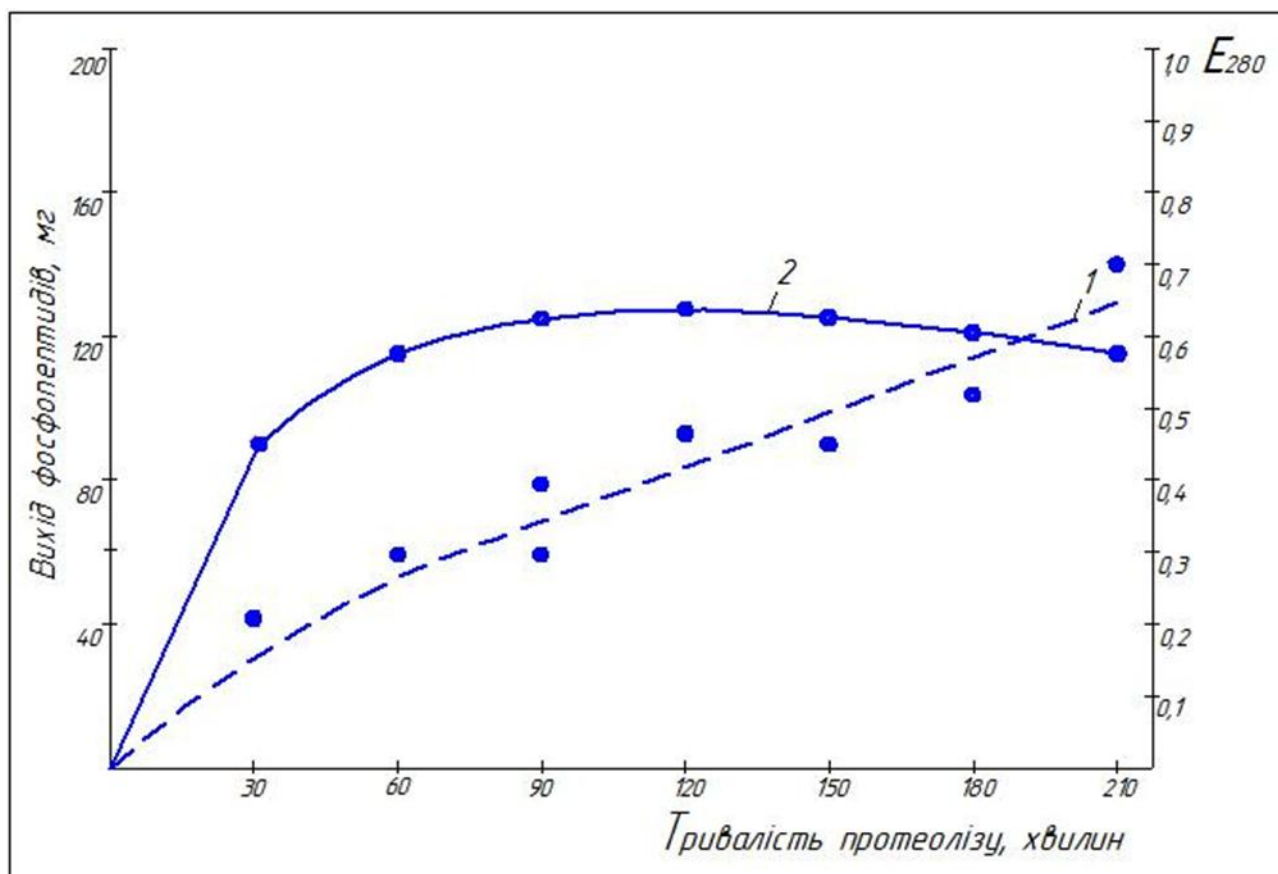
Час протеолізу, хв	E_{280}	Маса центрифужної пробірки, г	Маса пробірки з осадом фосфосеринових пептидів, г	Маса фосфосеринових пептидів, мг
30	0,364	10,61948	10,72504	105,56
60	0,478	10,47641	10,59043	114,02
90	0,560	10,58470	10,70993	125,23
120	0,664	10,23933	10,35592	116,59
150	0,696	10,22385	10,33600	112,15
180	0,641	11,02410	11,13379	109,69
210	0,663	10,24080	10,34096	100,16



Рисункок 3.6 – Хід протеолізу (1) і вихід фосфосеринових пептидів (2) при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 60

Таблиця 3.5 – Маса фосфосеринових пептидів після центрифугування і висушування з гідролізату отриманого при співвідношенні «ензим : субстрат» - 1:100

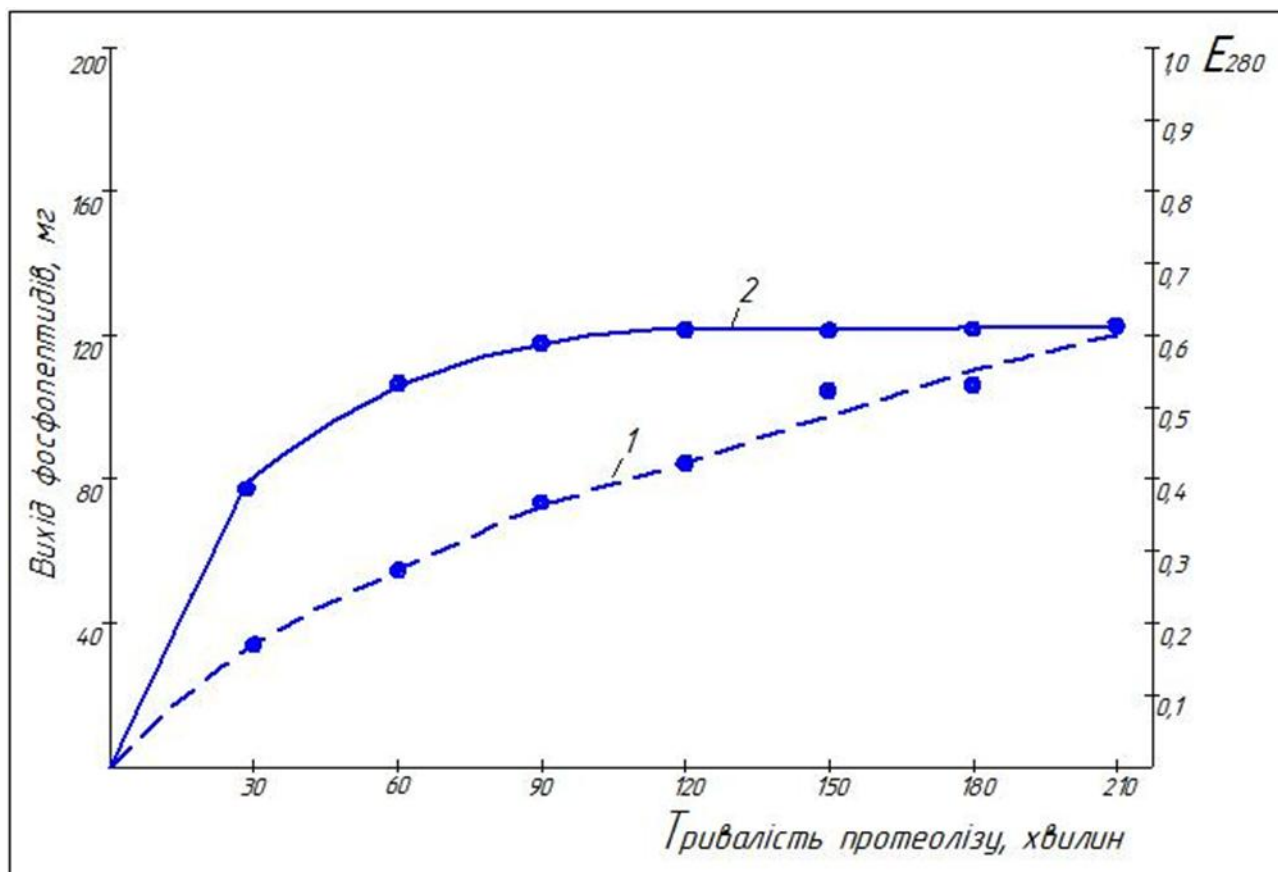
Час протеолізу, хв	E_{280}	Маса центрифужної пробірки, г	Маса пробіки з осадом фосфосеринових пептидів, г	Маса фосфосеринових пептидів, мг
30	0,219	10,24958	10,34057	90,99
60	0,297	10,62338	10,73551	112,13
90	0,396	10,47890	10,59775	118,85
120	0,479	10,31295	10,43272	119,77
150	0,425	10,64360	10,76284	119,24
180	0,518	10,28150	10,39762	116,12
210	0,741	10,77695	10,89109	114,14



Рисункок 3.7 – Хід протеолізу (1) і вихід фосфосеринових пептидів (2) при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 100

Таблиця 3.6 – Маса фосфосеринових пептидів після центрифугування і висушування з гідролізату отриманого при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 140

Час протеолізу, хв	E_{280}	Маса центрифужної пробірки, г	Маса пробіки з осадом фосфосеринових пептидів, г	Маса фосфосеринових пептидів, мг
30	0,172	10,62015	10,70755	77,40
60	0,276	10,47875	10,57822	99,47
90	0,370	10,58630	10,70703	120,73
120	0,433	10,24205	10,36410	122,05
150	0,504	10,22635	10,34883	122,48
180	0,531	11,02600	11,14903	123,03
210	-	10,24084	10,36415	123,31



Рисункок 3.8 – Хід протеолізу (1) і вихід фосфосеринових пептидів (2) при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 140

Таблиця 3.7 – Маса фосфосеринових пептидів після центрифугування і висушування з гідролізату отриманого при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 180

Час протеолізу, хв	E_{280}	Маса центрифужної пробірки, г	Маса пробіки з осадом фосфосеринових пептидів, г	Маса фосфосеринових пептидів, мг
30	0,133	10,25355	10,32407	70,52
60	0,240	10,62715	10,72478	97,63
90	0,280	10,48253	10,60700	124,47
120	0,342	10,31584	10,44154	125,70
150	0,413	10,64819	10,77836	130,17
180	0,488	10,28470	10,42167	136,97
210	0,497	10,78014	10,91760	137,46

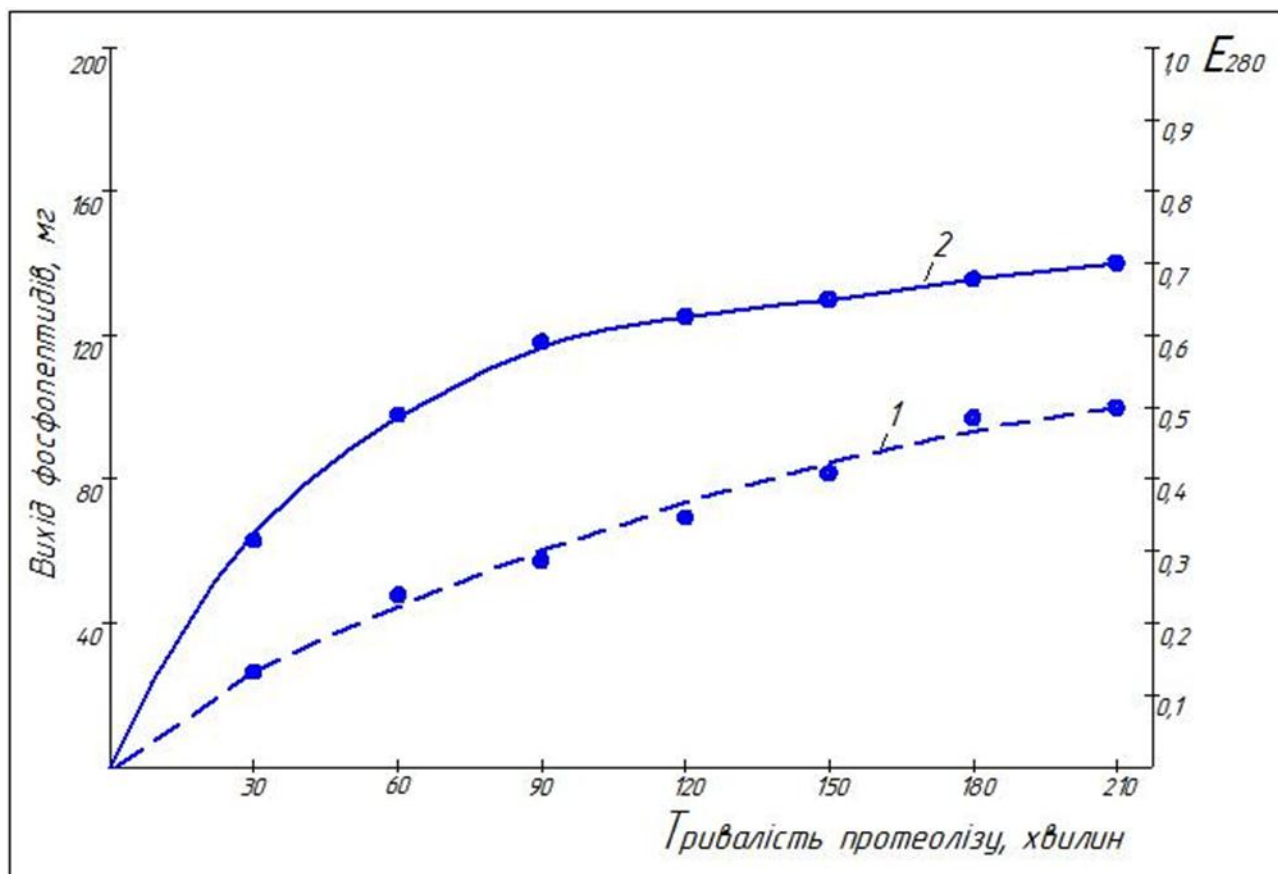


Рисунок 3.9 – Хід протеолізу (1) і вихід фосфосеринних пептидів (2) при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 180

Таблиця 3.8 – Маса фосфосеринних пептидів після центрифугування і висушування з гідролізату отриманого при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 220

Час протеолізу, хв	E_{280}	Маса центрифужної пробірки, г	Маса пробірки з осадом фосфопептидів, г	Маса фосфопептидів, мг
30	0,130	10,63194	10,67785	45,91
60	0,179	10,48073	10,55281	72,08
90	0,249	10,58803	10,68262	94,59
120	0,297	10,24389	10,35245	108,56
150	0,327	10,22813	10,34433	116,20
180	0,414	11,02800	11,14885	120,85
210	0,455	10,24252	10,36732	124,80

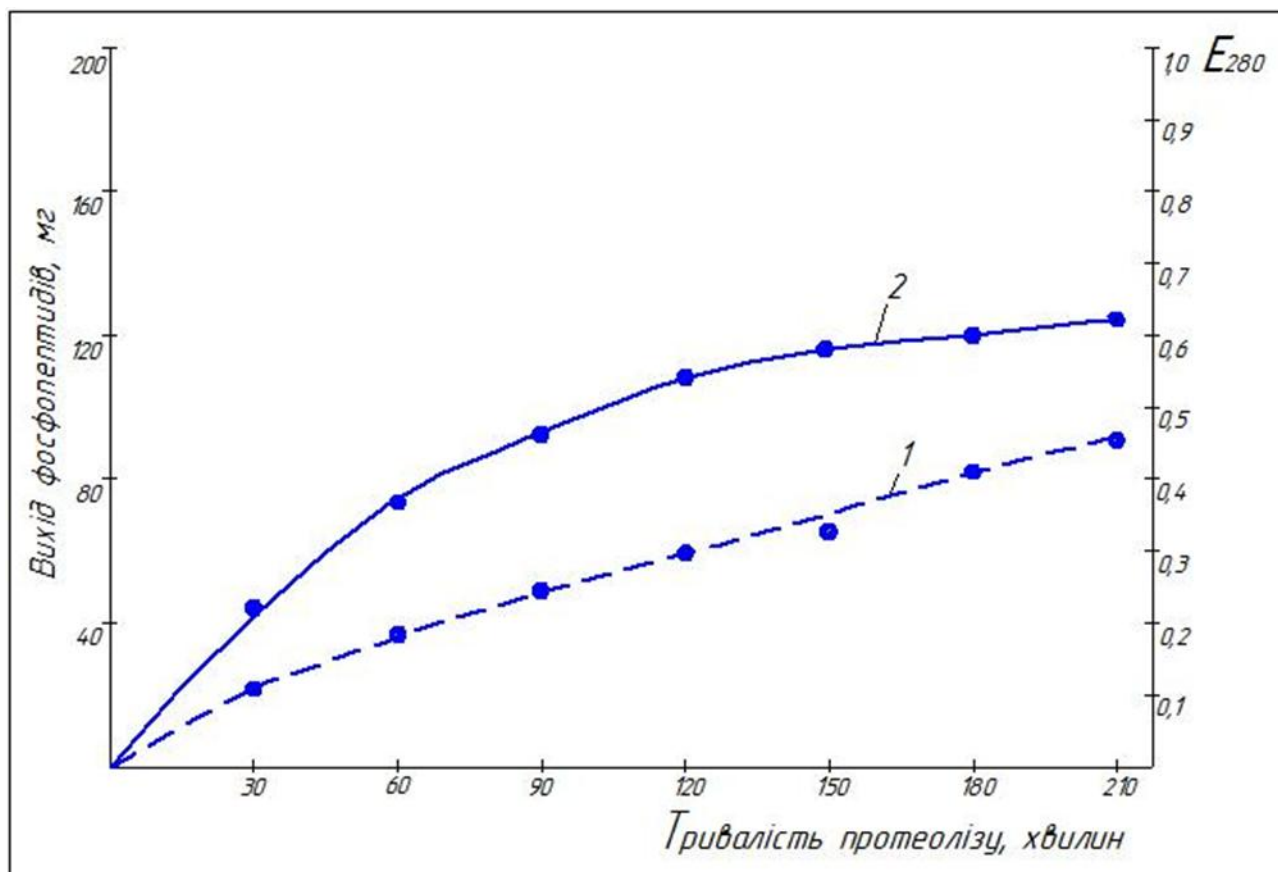


Рисунок 3.10 – Хід протеолізу (1) і вихід фосфопептидів (2) при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 220

Таблиця 3.9 – Маса фосфопептидів після центрифугування і висушування з гідролізату отриманого при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 260

Час протеолізу, хв	E_{280}	Маса центрифужної пробірки, г	Маса пробірки з осадом фосфосеринових пептидів, г	Маса фосфосеринових пептидів, мг
30	0,139	10,77612	10,80826	32,14
60	0,145	10,24962	10,30854	58,92
90	0,189	10,62283	10,70318	80,35
120	0,250	10,31216	10,40336	91,20
150	0,278	10,23900	10,34007	101,07
180	0,343	10,47447	10,58652	112,05
210	0,377	10,22213	10,33756	115,43

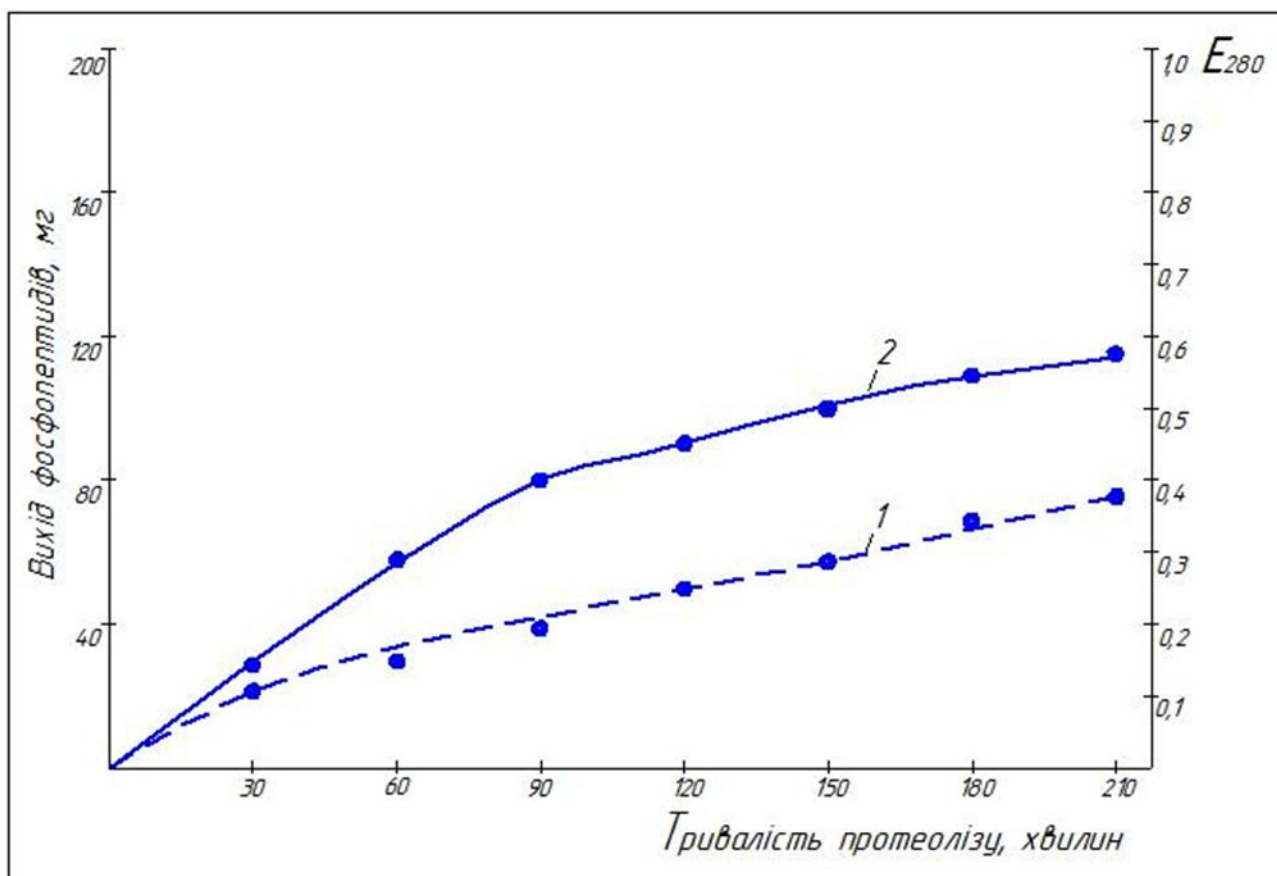


Рисунок 3.11 – Хід протеолізу (1) і вихід фосфосеринових пептидів (2) при співвідношенні «ензим : субстрат» -1: 260

Аналіз результатів виходу фосфосеринових пептидів показує, що після досягнення найвищого, значення починають зменшуватися.

При вищих кількостях ензиму вихід фосфосеринових пептидів зростає без досягнення максимуму. Це свідчить про зміне величини фосфосеринових пептидів. Такі висновки підтверджуються даними гель-фільтрації фосфосеринових пептидів, отриманих на різних стадіях протеолізу.

У випадку низьких концентрацій ферменту в реакційному середовищі максимуму виходу фосфосеринових пептидів протягом усього періоду протеолізу не досягають.

РОЗДІЛ 4

4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ

4.1 Охорона праці

Атестація робочих місць за умовами праці має проводитися на підприємствах, де технологічний процес, використовуване обладнання, сировина та матеріали є потенційними джерелами шкідливих і небезпечних виробничих факторів, що можуть несприятливо впливати на стан здоров'я працівників, а також на їхніх нащадків як тепер, так і в майбутньому.

Атестація проводиться на виконання вимог Закону України «Про охорону праці» (ст. 7, 13) згідно з порядком, затвердженим постановою КМ України від 01.08.92 р. №442, і відповідно до Методичних рекомендацій щодо проведення атестації робочих місць за умовами праці, затверджених постановою Міністерства праці України і Головним санітарним лікарем України від 01.09.92 р. №41.

Головна мета атестації - регулювання відносин між роботодавцем та працівниками щодо реалізації їхніх прав на охорону здоров'я і безпечні умови праці, пільги й компенсації за роботу в несприятливих умовах.

Результати атестації є основою для вирішення питань надання пенсій за віком на пільгових умовах відповідно до Закону України «Про пенсійне забезпечення», інших пільг та компенсацій (таких як - щорічна додаткова відпустка, доплата працівникам за умови праці, скорочена тривалість робочого тижня), а також розроблення і реалізації організаційних, технічних, економічних та соціальних заходів (включаючи і колективний договір) щодо покращання умов трудової діяльності [29].

Періодичність атестації встановлюється підприємством у колективному договорі, але не рідше одного разу на 5 років.

Атестація робочих місць полягає у:

- виявленні на робочому місці шкідливих і небезпечних виробничих факторів та причин, що їх створюють;

- проведенні санітарно-гігієнічних досліджень факторів виробничого середовища, важкості та напруженості праці на робочому місці;
- комплексній оцінці факторів виробничого середовища щодо відповідності їх характеристик - стандартам, санітарним нормам і вимогам нормативно-правових документів;
- обґрунтуванні віднесення робочого місця до категорії зі шкідливими умовами праці;
- підтвердженні і встановленні права працівника на пільгове пенсійне забезпечення, додаткову відпустку, скорочений робочий день та інші пільги і компенсації залежно від умов праці;
- перевірці правильності застосування Списків виробництв, робіт, професій, посад і показників, що дають право на пільгове пенсійне забезпечення;
- вирішенні спірних питань, які можуть виникнути між роботодавцем та працівниками щодо умов праці і оздоровлення.

Організаційне, методичне керівництво і контроль за проведенням всіх етапів атестації на підприємстві здійснює призначена наказом керівника постійно діюча атестаційна комісія. В цю комісію, як правило, можуть входити фахівці служби охорони праці, відділу кадрів, праці і заробітної плати, головні спеціалісти підприємства, медичні працівники органів охорони здоров'я підприємства тощо. На великих підприємствах із цеховою структурою інколи створюються кілька цехових атестаційних комісій [27].

Приблизний порядок дій комісії з атестації щодо організації атестації включає:

- визначення і залучення до проведення атестації та санітарно-гігієнічних досліджень потрібної організації;
- виготовлення планів розташування обладнання по кожному підрозділу з урахуванням його експлікації, визначення меж робочих місць (робочих зон) та присвоєння їм відповідного порядкового номера;
- складення переліку робочих місць, що підлягають атестації;

- визначення обсягу досліджень шкідливих і небезпечних факторів виробничого середовища та організація цих досліджень;

- аналіз, порівняння застосовуваного технологічного процесу, обладнання, сировини і матеріалів із передбаченими в проектах;

- виявлення утворення шкідливих і небезпечних факторів на робочих місцях;

- встановлення на основі Класифікатора професій ДК 003:2005 та Довідника кваліфікаційних характеристик професій працівників відповідність найменування професій і посад, зайнятих на цих робочих місцях, характеру фактично виконуваних робіт. У разі відхилень назва професії (посади) приводиться у відповідність до ДК 003:2005 за фактично виконуваною роботою;

- складання Карти умов праці (далі - Карта) на кожне визначене робоче місце або групу аналогічних місць;

- складання за результатами атестації загального переліку робочих місць, виробництв, професій та посад з несприятливими умовами праці;

- перегляд діючих і внесення пропозицій керівництву підприємства на встановлення пільг і компенсацій залежно від умов праці;

- розробка заходів з покращання умов праці і оздоровлення працівників.

Лабораторно-інструментальні дослідження фізичних, хімічних, біологічних, визначення психофізіологічних факторів проводяться в процесі роботи працівників у характерних (типових) виробничих умовах, при справних і ефективно діючих засобах колективного і індивідуального захисту [29].

При цьому визначаються: рівні запиленості та загазованості шкідливими хімічними речовинами; рівні вібрації; рівні звукового тиску; рівні неіонізуючого випромінювання; параметри мікроклімату у приміщенні та ззовні приміщення; біологічні фактори; важкість і напруженість праці, робоча поза; рівні освітлення; змінність роботи тощо.

За оцінку умов праці керівників та спеціалістів береться оцінка умов праці керованих ними працівників, якщо вони зайняті виконанням робіт в

умовах, передбачених у Списках №1 і №2 для їхніх підлеглих протягом повного робочого дня.

Результати досліджень оформляються протоколами (форма яких затверджена наказом №91 Міністерства охорони здоров'я України від 21.04.1999 р.). На підставі даних протоколів досліджень заповнюється один із основних документів атестації - Карта умов праці.

Карта умов праці оформляється на кожне визначене робоче місце або групу аналогічних місць відповідно до вимог Інструкції по заповненню Карти умов праці при проведенні атестації робочих місць (затверджена за №06-4148 від 20.11.1992 р. Головним державним експертом України з умов праці і заступником Головного державного санітарного лікаря України від 27.11.1992 р.) [27].

Карта умов праці підписується всіма членами атестаційної комісії і з її змістом ознайомлюють працівників, зайнятих на робочому місці.

За результатами атестації складається перелік:

- робочих місць, виробництв, робіт, професій і посад, працівникам яких підтверджено право на пільги і компенсації, передбачені законодавством;

- робочих місць, виробництв, робіт, професій і посад, працівникам яких пропонується встановити пільги і компенсації за рахунок коштів підприємства згідно з ст. 26 Закону України «Про підприємства», і ст.13 Закону України «Про пенсійне забезпечення»;

- робочих місць з несприятливими умовами праці, на яких необхідно здійснити першочергові заходи щодо їх поліпшення.

Перелік робочих місць, виробництв, робіт, професій і посад, працівникам яких підтверджено право на пільги і компенсації, зокрема, на пільгове пенсійне забезпечення, передбачене законодавством, підписує голова комісії за погодженням з профспілковим комітетом. Він затверджується наказом по підприємству. Витяги з наказу додаються до трудової книжки працівників, професії і посади яких внесено до переліку [29].

Матеріали атестації робочих місць є документами суворої звітності і зберігаються на підприємстві протягом 50 років.

4.2 Безпека в надзвичайних ситуаціях

Вибухи при роботі компресорів можуть відбуватися внаслідок перевищення тиску стисненого повітря, підвищення його температури при стисненні та утворення вибухонебезпечних сумішей кисню з продуктами розкладу мастил, а також при порушенні вимог безпеки в процесі обслуговування, експлуатації та догляду за технічним станом компресорів. Вони призводять до руйнування обладнання, будівлі, а також можуть призвести до травмування обслуговуючого персоналу [16].

Холодильні установки небезпечні, тому що холодоагенти, які використовуються в них, можуть спричинити отруєння, а суміш холодоагенту із повітрям може бути вибухонебезпечною.

Для безаварійної експлуатації компресорних і холодильних установок необхідно суворо дотримуватися правил безпеки.

Компресорні установки є небезпечними, тому що при стисненні повітря від атмосферного тиску до 1 МПа його температура може підвищитись з 20 °С до 300 °С, мастила при цьому частково випаровуються, а при надмірному змащуванні розпилюються у вигляді туману, що може утворювати вибухонебезпечну суміш з повітрям. Дотримання вимог до мастил та режимів змащування у поєднанні з надійним охолодженням є основним заходом попередження вибухів парів мастила при його розкладі. У компресорах низького тиску і малої продуктивності достатньо повітряного охолодження, а в інших необхідно застосовувати водяне охолодження [27].

Кожна компресорна установка повинна бути оснащена системою автоматики та контролю, арматурою, манометрами, запобіжними клапанами, термометрами і термопарами, контактними пристроями та іншими приладами контролю, що забезпечують її надійну і безаварійну роботу. Компресори

продуктивністю біля 50 м³/хв мають бути обладнані пристроями для автоматичного регулювання тиску нагнітання.

Компресорні станції з трьома і більше компресорами обладнуються системою дистанційного контролю, сигналізацією роботи установок і блокуючими пристроями, які автоматично вимикають привод компресора за перевищення температури і тиску стисненого повітря та температури води, що надходить з компресора після охолодження.

Вибухи та аварії холодильних установок інколи трапляються внаслідок гідравлічного удару, відмови запобіжних пристроїв і розриву нагнітального трубопроводу чи балонів з холодильним агентом та витоків холодоагента (аміаку або фреону) крізь нещільні з'єднання. Аміак утворює з повітрям вибухонебезпечну суміш, що особливо небезпечно при ремонтних роботах з відкритим полум'ям. Газоподібний аміак токсичний, його гранично допустима концентрація у повітрі робочої зони дорівнює 20 мг/м³. Рідкий аміак викликає тяжкі опіки шкіри та опіки очей, що може призвести до сліпоти.

Компресори, як правило, слід розміщувати в окремих одноповерхових будівлях. Допускається розміщення компресорів продуктивністю до 20 м³/хв у прилягаючих приміщеннях за умови відокремлення від суміжних приміщень перегородкою, висотою не менше як 3 м і товщиною не менше ніж 12,5 см. Окремі компресори продуктивністю до 10 м³/хв можуть встановлюватися на нижніх поверхах багатоповерхових виробничих будівель за умови їх відокремлення глухими вогнестійкими стінами [16].

Аміачні холодильні установки розміщують з дотриманням протипожежних норм. Машинне й апаратне відділення холодильних установок не слід з'єднувати проходом з виробничими приміщеннями. Вони обладнуються проточною вентиляцією з підігрівом повітря у холодний період року, яка забезпечує двократний повітрообмін, аварійною вентиляцією, аварійним освітленням та двома евакуаційними виходами.

ВИСНОВКИ

1. В результаті проведених досліджень було виділено і проаналізовано фракційний склад природних фосфопротеїнових субстратів.

2. Встановлено, що в залежності від рН можуть утворюватись фосфосеринові пептиди з різною молекулярною масою. І за кількістю виходу фосфосеринових пептидів знайдено два максимуми при низьких і високих значеннях рН. Молекулярна маса цих фосфосеринових пептидів є більшою від фосфосеринових пептидів, отриманих при оптимальному фізіологічному значенні рН (7,9).

3. Фосфосеринові пептиди, аналогічні природним, утворюються при середніх значеннях співвідношення «ензим:субстрат».

4. При нижчих концентраціях панкреатину максимум виходу фосфосеринових пептидів протягом 3-х годин протеолізу не досягається. При цьому, значна частина утворених фосфосеринових пептидів має високу молекулярну масу, яка не властива природнім фосфосериновим пептидам.

5. При розробці технологій отримання біоактивних фосфосеринових пептидів пропонується врахувати закономірності їх утворення від рН і концентрації ензимного препарату, що може відобразитися на їх біологічній активності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аналитический обзор. - Серия: Экология. - Изд- во ГПНТБ СО РАН, 1994. -101 с.
2. Антонов К.К. Химия протеолиза. - М: Наука,1991. - 504 с.
3. Аряев М.Л., Клименко В.А., Кожем'яка А.І., Фьоклін В.О. Атопічний дерматит у дітей. - К., 2006. - 88 с.
4. Барышников И.И. Экологическая токсикология: В 2 ч. / И.И. Барышников, А.О. Лойт, М.Ф Савченков. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1991. - Ч. I,- 164 с.
5. Боровик Т.Э., Ладодо К.С., Рославцева Е.А. и др. Современные взгляды на организацию прикорма детей с пищевой аллергией [Текст] / Е.А. Рославцева, К.С. Ладодо, Т.Э. Боровик // Вопр. дет. диетол. - 2003. - Т.1, №1. - С. 79–82.
6. Вредные вещества в окружающей среде. Кислородсодержащие органические соединения; под. ред. В.А. Филова, Б.А. Ивина, Ю.И. Мусийчука: - СПб.: Професионал. - 2004. - 344 с.
7. Ганонг В. Ф. Фізіологія людини: Пер. з англ. - Львів: БаК, 2002. - 784 с.
8. Голиков С.Н. Общие механизмы токсического действия / С.Н. Голиков, И.В.Саноцкий, Л.А. Тиунов - М.: Медицина, 1986. - 280 с.
9. Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов. - СПб: Гиорд, 2001. - 320 с.
10. Гринштейн Дж., Виниц М., Химия аминокислот и пептидов, пер. с англ., М., 1965.
11. Гріщенко Г.В.Розробка технології сухих сумішей з гідролізованим білком для дитячого харчування.(автореферат). - Київ,2007.
12. Губський Ю.І. Біологічна хімія: Підручник. - Київ - Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. - 508с.
13. Джигирей В.С. Екологія та охорона навколишнього природного середовища / В.С. Джигирей - Київ: Знання, 2004. - 310 с.
14. Діксон М., Уебб Е., Ферменти, пер. з англ., М., 1966.

15. Дмитренко І.П. Джерела утворення та надходження діоксинів в організм людини / І.П. Дмитренко // Екологічний вісник. - 2005 - №5. - С. 10-11.
16. Долин П. А. Справочник по технике безопасности. / П. А. Долин - М.: Энергоатомиздат, 1985. - 824 с.
17. Екологія довкілля. Охорона природи: навчальний посібник для студентів вузів / В. Грицик, Ю. Канарський, Я. Бедрій. - К.: Кондор, 2009.-290 с.
18. Эксль Б.-М., Нетребенко О.К. Гипоаллергенное питание у детей первого года жизни [Текст] / О.К. Нетребенко, Б.М. Эксль // Педиатрия. – 2003. –№2. – С. 42–45.
19. Исидоров В.А. Экологическая химия: учебное пособие для вузов / В.А. Исидоров – СПб .: Химиздат, 2001. - 304 с.
20. Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков / В.И. Кулинский // Соросовский Образовательный журнал. - 1999. - № 1. - С. 8-12.
21. Ленинджер А. Основы биохимии : в 3 т. / А. Ленинджер; пер. с англ. В. В. Борисова, М.Д. Гроздовой, С.Н. Преображенского [под ред. В.А. Энгельгардта, Я. М. Варшавского]. - М. : Мир, 1985. - 1055 с.
22. Максимюк Н.Н., Марьяновская Ю.В. О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов // Фундаментальные исследования. - 2009. - № 1 - стр. 34-35.
23. Микросомная монооксигеназная система живых организмов в биомониторинге окружающей среды / Л.Ф. Гуляева, А.Ю. Гришанова, О А. Громова и др. // Аналитический обзор. - Серия: Экология. - Изд- во ГПНТБ СО РАН, 1994. -101 с.
24. Мусієнко М.М. Екологія. Охорона природи: словник-довідник / М.М. Мусієнко, В.В. Серебряков, О.В. Брайон - К.: Знання, 2002. - 550 с.
25. Овчинников Ю.О. Биоорганическая химия. - М.: Просвітництво, 1987. - 815с.
26. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. - 536с.

27. Охорона праці та промислова безпека: навч. посіб. / [К.Н. Ткачук, В.В. Зацарний, Р.В. Сабарно, С.Ф. Каштанов та ін.]; за ред. К.Н. Ткачука і В.В. Зацарного. - К., 2009. - 454 с.
28. Охотнікова О.М., Яковлева. Організація гіпоалергенного харчування у дітей раннього віку, 2009 - №2 (58).
29. Протоєрейський О.С. Охорона праці в галузі: навч. посіб./О.С. Протоєрейський, О.І. Запорожець - К.: Книжкове вид-во НАУ, 2005. - 268с.
30. Рогожин В.В. Біохімія молока та молочних продуктів / В.В. Рогожин. - СПб: ГІОРД, 2006.
31. Связь между химическим строением и детоксицирующей активностью некоторых синтетических полимеров, содержащих третичные аминогруппы, при интоксикации эпихлоргидрином / И.Ю. Высоцкий, И.П. Федорова, В.Д. Лукьянчук и др. // Физиологически активные вещества. -1995. - Вып. 26. - С. 39-44.
32. Сидорин Г.И. Об адаптации к действию химических веществ / Г.И. Сидорин, Л.В. Луковникова // II съезд токсикологов России: тез. докл. Москва, 10 - 13 ноября 2003 г. - М., 2003. - С. 240-242.
33. Сидоренко Л.І. Сучасна екологія. Наукові, етичні та філософські ракурси: навчальний посібник / Л.І. Сидоренко - Київ, 2002. -150 с.
34. Телитченко М.М. Введение в проблемы биохимической экологии / М.М. Телитченко, С.А. Остроумов. - М.: Наука, 1990. - 288 с.
35. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты: получение, состав, применение.// Аграрная наука.-2000.
36. Фрумин Г.Т. Экологическая химия и экологическая токсикология / Г.Т. Фрумин - СПб.: изд. РГГМУ, 2000. - 198 с.
37. Химический синтез пептидов / Гершкович А. А., Кибирев В. К.; Отв. ред. Серебряный С. Б.; АН Украины. Ин-т биоорган, химии и нефтехимии.-Киев : Наук, думка, 1992. - 360 с.

38. Чагаровський О.П. Хімія молочної сировини: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / О.П Чагаровський, Н.А Ткаченко, Т.А Лисогір. – Одеса.: «Сімекс-прінт», 2013. - 268с.
39. Шугалей И. В. Химия белка : учебное пособие / И. В. Шугалей, А. В. Гарабаджиу, И. В. Целинский. - СПб. : Проспект Науки, 2011. - 200с.
40. Юкало А.В. Біоактивні пептиди протеїнів сироватки молока корів (*Bos taurus*) / А. В. Юкало, К. Є. Дацишин, В. Г. Юкало // *Biotechnologia Acta*. - 2013. - 6, № 5. - С. 49-61. - Бібліогр.: 77 назв. - укр.
41. Юкало А.В. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів / А. В.Юкало, Л. А. Сторож, В. Г. Юкало // *Біотехнологія*. - 2012. - 5, № 4. - С. 21-33. - Бібліогр.: 91 назв. - укр.
42. Юкало В. Г. Електрофорез білків молока // *Мед. хімія*. - 2000. - № 4. - С. 79–82.
43. Юкало В. Г. Електрофорез білків казеїнового комплексу в анодній системі поліакриламідного гелю // *Вет. біотехнол.* - 2007. - № 11. - С. 246-251.
44. Юрин В.М. Основы ксенобиологии. - Минск: Новое знание, 2002. - 268 с.
45. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем. - М.: Мир, 1985. - 456 с.
46. Berrocal R., Chanton S., Juillerat M. et al. Tryptic phosphopeptides from whole casein II. Physicochemical properties related to the solubilisation of calcium // *J.Dairy Res.*-1989.-Vol.56.-P.335-341.
47. Brandsch M., Brust P., Neubert K. В Casomorphins - chemical signals of intennstinal transport system. - Weinheim: VCH, 1994. - P. 207-219.
48. Brantl V., Neubert K. Opioid peptides derived from food proteins // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1986. - V. 7, N 1. - P. 6-7.
49. Brommage R.,Jullerat M.,Jost R. Influence of casein phosphopeptides and lactulose on intestinal calcium absorption in adult female rats//*Leit.*-1991. -Vol.71.-P.173-180.

50. Chabance B., Marteau P., Rambaud J.C. et al. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt // *Biochimie*, - 1998. - Vol.80, №2. - P.155-165.
51. Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision // *J Dairy Sci.* - 1984. - Vol.67, №8. - P.1599-1631.
52. 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.
53. Fitz Gerald R.J. Potential uses of casein phosphopeptides // *Int. Dairy J.* - 1998. - Vol.8. - P.451-457.
54. Gauthier S. F., Pouliot Y., Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins // *Int.*
55. 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.
56. Holt C., Timmins P.A., Errington N., Leaver J. A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by beta-casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron scattering measurements // *Eur. J. Biochem.* - 1998. - Vol.252. - 73-78.
57. Jolles P., Loucheux Lefebvre M. H., Henschen A. Structural relatedness of κ -casein and fibrinogen γ -chain // *J. Molec. Evol.* - 1978. - V. 11. - P. 271-277.
58. Jullerat M., Beachler R., Berrocal R. et al. Tryptic phosphopeptides from whole casein I. Preparation and analysis by FPLC // *J Dairy Res.* - 1989. - Vol.56. - P.603-611.
59. 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.
60. Kopra N., Seholz-Ahrens K.E., Barth C.A. Effect of casein phosphopeptides on utilization of calcium in vitamin D-replete and vitamin D-deficient rats // *Milchwiss.* - 1992. - Vol.47. - P.488-493.
61. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality // *Ibid.* 2006. - V. 16, N 9. - P. 945-960.

62. Lee Y.S., Noguchi T., Naito H. Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet // *Brit.J.Nutrit.* - 1980. - Vol.43. - P.457-467.
63. Maeno M., Yamamoto N., Takano T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP 790 // *J.Dairy Sci.* - 1996. - V. 79, N 8. - P. 1316-1321.
64. 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.
65. Mc Donagh D., FitzGerald R.J. Production of caseinophosphopeptides (CPPs) from sodium caseinate using a range of commercial protease preparation // *Int.Dairy J.* - 1998. - Vol.8. - P.39-45.
66. 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.
67. Pihlanto-Leppala A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins // *Trend. Food Sci. Tech- nol.* - 2001. - V. 11, N 9–10. - P. 347-356.
68. Pointellart A., Gueguen L. Absence d'effet de l'incorporation d'un phosphopeptide du lait sur l'utilisation du calcium et du phosphore chez le jeune porc // *Reproduc. Nutr. Develop.* - 1989. - Vol.29. - P.477-486.
69. Schusdziarra V., Schick R., Dela Fuente A. Effect of β -casomorphins and analogs on insulin release in dogs // *Endocrinology.* - 1983. - V. 112. - P. 1948-1951.
70. Silva S. V., Malcata F. X. Caseins as source of bioactive peptides // *Intern. Dairy J.* —2005. — V. 15. — P. 1–15.

ДОДАТКИ

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ МАГІСТЕРСЬКОЇ РОБОТИ

Результати експериментальних досліджень і вивчення літератури за темою магістерської роботи регулярно обговорювались на семінарах лабораторії біохімії харчових білків кафедри харчової біотехнології і хімії Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя.

Результати роботи були узагальнені і доповідались на XIII Міжнародній науково-технічній конференції «Техніка і технологія харчових виробництв», 23-24 квітня 2020 року в Могильовському державному університеті продовольства.

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

ТЕХНОЛОГИЯ ПАСТЫ ТВОРОЖНОЙ С ГИДРОЛИЗАТОМ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ МОЛОКА

Дацишин Е.Е., Юкало В.Г., Голдаевич Т.В.

Тернопольский национальный технический университет имени Ивана Пулюя
г. Тернополь, Украина

Белкам сыворотки свойственны хорошие функциональные свойства, благодаря чему их широко используют в пищевой промышленности. Особый интерес в последние годы вызывает их применение как в нативном, так и в гидролизованном состоянии, в продуктах специального назначения [1]. Это связано с тем, что протеины сыворотки молока, кроме обеспечения протеинового питания, выполняют ряд важных биологических функций, а также являются предшественниками многих биоактивных пептидов (антигипертензивные пептиды, антагонисты опиатных рецепторов, регуляторы моторики кишечника, иммуномодулирующие, антимикробные и антиканцерогенные пептиды, регуляторы аппетита и др.). Все природные биоактивные пептиды (БАП) из белков сыворотки молока были получены за действия пищеварительных протеаз в физиологических условиях [2]. В то же время, в качестве источника протеиназ в промышленности используются растения и клетки микроорганизмов, животные ткани. Однако, только при использовании пищеварительных протеолитических ферментов можно ожидать образования природных активных пептидов, которые выполняют определенные биологические функции в организме человека [3]. Поступление с пищевым продуктом гидролизованных сывороточных белков может быть перспективным решением проблемы обеспечения биологически полноценным белком детей, людей с заболеваниями пищеварительного тракта, тех, кому необходимо усиленное белковое питание, например, спортсменам, а также лиц, страдающих аллергией на белки сыворотки молока [4].

Целью работы было разработать технологию молочного продукта на основе творога с гидролизатом сывороточных белков.

Гидролизат получали путем протеолиза раствора концентрата сывороточных белков панкреатином, в физиологических условиях (температура 37⁰С и рН 7,9) [5, 6]. Полученный гидролизат сушили на распылительной сушилке. Для производства пасты творожной с гидролизатом белков сыворотки молока проводили смешивание сухого гидролизата с творогом кисломолочным.

Для анализа гидролизата проводили гель-фильтрацию отобранных проб после осаждения нерасщепленных белков 5% трихлоруксусной кислотой, на колонках с сефадексом G-50. Хроматограмму условно разделяли на несколько секторов (рис. 1) в которых было исследовано содержание продуктов протеолиза с $M < 1500$ Да, $1500 \text{ Да} < M < 30000$ Да, $M > 30000$ Да. Количество низкомолекулярных пептидов ($M < 1500$ Да) в полученном гидролизате составляло 25% (процент от количества протеинов образца, взятого для гель-фильтрации).

Паста творожная с ГЭС характеризовалась хорошими органолептическими показателями. Как оказалось, гидролизат сывороточных белков придает готовому продукту вкус альбумина и незначительный кремовый оттенок. Такие недостатки проявляются при добавлении гидролизата в количестве большем 3% от массы творога.

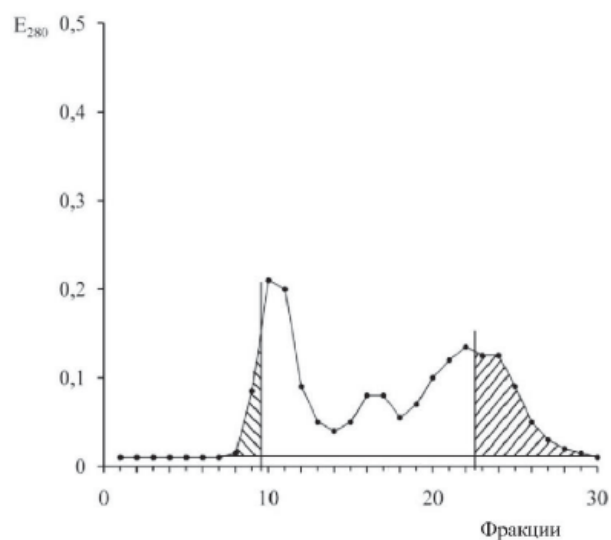


Рисунок 1 - Хроматограмма продуктов протеолиза концентрата сывороточных белков панкреатином

По результатам органолептической оценки, оптимальной дозой внесения ГБС было определено 2,5% от массы творога. При этом готовый продукт характеризовался чистым кисломолочным запахом, белым цветом и отсутствием альбуминного привкуса.

Литература

1. Park, Y.W. Bioactive components in milk and dairy products / Y.W. Park. - Boston: Wiley-Blackwell, 2009. – 426 p.
2. Fox, P.F. Dairy chemistry and Biochemistry (Second Edition) / P.F. Fox, T. Uniacke, P.L.H. Mc Sweeney, J.A. O'Mahony. – New York: Springer, 2015. – 585 p.
3. Brandelli, A. Wheyas a source of peptides with remarkable biological activities / A.Brandelli, D. J.Daroit, A. P. F. Corrêa // Food Research International. – 2015. – Vol. 73.– P. 149–161.
4. Храпцов, А. Г. Феномен молочной сыворотки / А. Г. Храпцов // СПб.: Профессия, 2011. – 804 с.
5. Yukalo, V., Datsyshyn K., Storozh L. Comparison of products of whey proteins concentrate proteolysis, obtained by different proteolytic preparations / V. Yukalo, K. Datsyshyn, L. Storozh // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. – 2019. – Vol. 5, №11 (101). – P. 40-47.
6. Головач Т. Н. Гидролиз белков молока ферментными препаратами и протеолитическими системами молочнокислых бактерий / Т. Н. Головач, В. П. Курченко // Труды БГУ. – 2012. – Т. 7, Ч. 1. – С. 106–126.