

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

(повне найменування вищого навчального закладу)

**Інженерії машин, споруд і технологій**

(назва факультету)

**Харчової біотехнології і хімії**

(повна назва кафедри)

## ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА

до дипломного проекту (роботи)

**Магістр**

(освітній ступінь (освітньо-кваліфікаційний рівень))

Виконав: студент \_\_\_\_\_ 6 \_\_\_\_\_ курсу, групи МЛМ-61

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

**181 “Харчові технології”**

(шифр і назва спеціальності (напряму підготовки))

\_\_\_\_\_  
(підпис) Самуляк П.Ю.  
(прізвище та ініціали)

Керівник \_\_\_\_\_ Юкало В.Г.  
(підпис) (прізвище та ініціали)

Нормоконтроль \_\_\_\_\_ Покотило О.С.  
(підпис) (прізвище та ініціали)

Рецензент \_\_\_\_\_ Ворощук В.Я.  
(підпис) (прізвище та ініціали)

м. Тернопіль – 2019

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

Факультет Інженерії машин, споруд і технологій

Кафедра Харчової біотехнології і хімії

Освітньо-кваліфікаційний рівень Магістр

Напрямок підготовки Харчові технології  
(шифр і назва)

Спеціальність 181 "Харчові технології"  
(шифр і назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри \_\_\_\_\_

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_р.

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

Самуляка Петра Юрійовича  
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема проекту (роботи) Характеристика рідкого молокозсідального препарату для виробництва м'яких карпатських сирів

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

Затверджені наказом по університету від

2. Термін подання студентом проекту (роботи) 17.12.2019

3. Вихідні дані до проекту (роботи) карпатський молокозсідальний препарат "ГЛСК"

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
Характеристика молокозсідальних препаратів, Механізм зсідання молока, Значення процесів ферментативного зсідання молока у технології молочних продуктів, Отримання субстратів для характеристики специфічності протеаз, Визначення специфічності ензимного препарату "Глек" до казеїнових фракцій

6. Консультанти розділів проекту (роботи)

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Охорона праці	к.т.н., доцент Окіпний І.Б.	10.12.2019	13.12.2019
Безпека в надзвичайних ситуаціях	к.т.н., доцент Стадник І.Я.	28.11.2019	30.11.2019
Екологія	к.т.н. Зварич Н.М.	11.12.2019	12.12.2019
Нормоконтроль	д.б.н., професор Покотило О.С.	10.12.2019	12.12.2019

7. Дата видачі завдання 9.10.2018

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№ з/п	Назва етапів дипломного проекту (роботи)	Термін виконання етапів проекту (роботи)	Примітка
1.	Аналітичний огляд та патентний пошук інформації відповідно до теми магістерської роботи	10.10.2018	
2.	Складання схеми досліджень	15.10.2018	
3.	Опрацювання методики досліджень	3.11.2018	
4.	Виконання експериментальних досліджень (Частина І)	25.11.2018	
5.	Завершення експериментальних досліджень (Частина ІІ)	25.11.2019	
6.	Збір інформації до виконання розділу «Екологія» та «Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях»	28.11.2019	
7.	Закінчення написання розділів	13.12.2019	
8.	Подання магістерської роботи до захисту	17.12.2019	

Студент

\_\_\_\_\_ (підпис)

Самуляк П.Ю.

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

Керівник проекту (роботи)

\_\_\_\_\_ (підпис)

Юкало В.Г.

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

Зміст	2
Реферат	3
Вступ	4
Мета і завдання	5
Огляд літератури	6
1.1 Характеристика молокозсідальних препаратів	6
1.2.Механізм зсідання молока	17
1.3.Значення процесів ферментативного зсідання молока у технології молочних продуктів	21
Матеріали і методи проведення дослідження	28
Результати власних дослідження та їх обговорення	29
3.1.Результати власних досліджень та їх обговорення	29
3.1.2 Отримання субстратів для характеристики специфічності протеаз	31
3.1.3 Визначення специфічності ензимного препарату “Глек” до казеїнових фракцій	44
Техніко-економічні обґрунтування	55
Екологія	58
5.1 Екологічні інновації переробки вторинної молочної сировини	58
Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях	64
6.1 Організація та проведення деактивації продуктів харчування, харчової сировини і знезараження води від НХР	64
6.2 Охорона праці на молокоперобному підприємстві	71
Висновки	76
Бібліографія	77

## Реферат

Дипломна робота другого (магістерського) рівня вищої освіти на тему «Характеристика рідкого молокозсідального препарату “Глек”» містить 80 сторінок, 5 таблиць, 17 рисунків. Перелік посилань нараховує 51 найменувань

У роботі використані зразки рідкого молокозсідального препарату, виготовленого в Косівському районі за традиційною технологією. Для порівняння використовували стандартний сичужний ензим і пепсин. Загальний казеїн виділяли зі свіжого знежиреного молока ізоелектричним осадженням. Гомогенні фракції  $\alpha$ S1- і  $\beta$ казеїну виділяли диференційним осадженням. Гомогенний  $\kappa$ -казеїн отримували повторною гель-фільтрацією на сефадексі G-150. Гомогенність казеїнів та склад продуктів їх розщеплення за дії молокозсідальних препаратів аналізували електрофорезом в анодній системі однорідного поліакриламідного гелю. Для приготування електрофоретичних буферів і гелів використовували реактиви фірми «Reanal». Концентрацію казеїнових фракцій визначали спектрофотометрично в ультрафіолетовій області з використанням відповідних коефіцієнтів поглинання. Молокозсідальну активність препаратів визначали за методом Сокслета, а протеолітичну – за методом Бенкі. В результаті проведених досліджень встановлено, що молокозсідальна активність рідкого препарату зростає перші три місяці після виготовлення. Далі вона мало змінюється до 9 місяців, і після цього починає повільно знижуватись. За специфічністю дій карпатський рідкий препарат близький до хімозину. Він активно розщеплює  $\kappa$ -казеїн і майже не діє на  $\alpha$ S1- і  $\beta$ -казеїни. Результати свідчать про високу якість традиційного рідкого карпатського молокозсідального препарату.

Ключові слова: молокозсідальний препарат «Глек», молокозсідальна активність, протеолітична активність, казеїнові фракції.

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Самуляк П.Ю.			<b>Реферат</b>	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Юкало В.Г.					3	
Затв.		Покотило О.С.						

## Вступ

**Актуальність теми.** Важливе значення для якості сирів має специфічність протеолізу казеїнових фракцій під час ензимної коагуляції молока. Коагуляція молока відбувається в результаті розщеплення одного пептидного зв'язку (105-106) в молекулі κ-казеїну ензимом шлункового соку молочних телят – хімозином. В результаті казеїнові міцели молока втрачають гідрофільний фрагмент κ-каїзеїну – гліпомакропептид і коагулюють. Таке розщеплення κ-казеїну в процесі коагуляції казеїну називається специфічним протеолізом. Розщеплення інших казеїнових фракцій в біотехнології сиру відносять до неспецифічного протелізу. Неспецифічний протеоліз спричиняє втрати протеїну, зменшує вихід сиру і зумовлює утворення гірких пептидів. Неспецифічний протеоліз характерний для дешевих замінників хімозину мікробіологічного, рослинного і тваринного походження. У зв'язку з цим привертає до себе увагу традиційний рідкий молокозсідальний препарат, який виробляють у фермерських господарствах українських Карпат.

У 1955 р. Професор Рудавська Г.Б. описала процес виробництва сиру в Карпатах, використовуючи препарат «Глек». Однак детальних досліджень активності та специфіки дії ензиму з тих часів не було.

**Об'єкт дослідження:** рідкий карпатський молокзсідальний ензимний препарат «Глек».

**Предмет дослідження:** біохімічні зміни у рідкому карпатському молокзсідальному ензимному препараті «Глек».

**Особистий внесок.** Полягає в проведенні літературно-патентного огляду з обраної теми, а також формуванні висновків.

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Самуляк П.Ю.			<b>ВСТУП</b>	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Юкало В.Г.					4	
Затв.		Покотило О.С.						

## Мета і завдання роботи

**Метою роботи** було визначити активність специфічності дії традиційного карпатського ензиму рідкого молокозсідального препарату.

**Для досягнення мети потрібно виконати наступні завдання:**

1. Визначити молокозсідальну активність рідкого препарату .
2. Отримання казеїнових фракцій для характеристики специфічності протеолітичної дії молокозсідального препарату.
3. Порівняння протеолітичної дії препарату по відношенню до казеїнових фракцій з стандартними сичужними ферментами і пепсином.

					Вступ	Арк.
						5
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

# Основна частина

## Розділ 1

### Огляд літератури

#### 1.1 Характеристика молокозсідальних препаратів

У результаті дії молокозсідальних ензимних препаратів на протеїновий комплекс молока досить глибоких перетворень зазнає основний протеїн молока — казеїн.

Специфічність дії молокозсідальних ензимів полягає у їхній здатності розщеплювати пептидний зв'язок між 105(Фен) та 106(Мет) амінокислотами в ланцюгу пер винної структури  $\alpha$ -казеїну. В результаті цієї дії молекула  $\alpha$ -казеїну розщеплюється і утворюються пара- $\alpha$ -казеїн та глікомакропептид (ГМП). Процес відщеплення ГМП від  $\alpha$ -казеїну характеризує закінчення ензиматичної фази зсідання молока [1, 2]. Подальший протеоліз казеїну супроводжується повільним накопиченням поліпептидних фрагментів ензимів та залишків їх розщеплення.

З метою розширення даних про дію молокозсідальних ензимних препаратів на казеїновий комплекс молока, зокрема  $\alpha$ -казеїн, проведено порівняльні дослідження процесу накопичення ГМП залежно від виду ензимних препаратів.

Відомо, що склад ГМП гетерогенний. Він містить до 30% вуглеводів, зокрема залишок N-ацетилнейрамінової кислоти, локалізований на кінці вуглевод-поліпептидного ланцюга, — близько 8% [42, 43].

Виробництво сиру — яскравий приклад спрямованого і контрольованого перебігу протеолізу протеїнів молока. Ключовим процесом у виготовленні сиру є коагуляція молока ензимами, від видоспецифічності дії яких на казеїн значною мірою залежить якість і вихід готового продукту.

Молокозсідальна здатність ензимів залежить від багатьох чинників, насамперед від їхніх структурно-функціональних і фізико-хімічних властивостей, умов коагуляції (кислотності, температури, мінерального складу молока тощо).

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Самуляк П.Ю.			Огляд літератури	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Юкало В.Г.					6	
Затв.		Покотило О.С.						



Молокозсідальний ензим є визначальним чинником отримання молочного згустку, оскільки відіграє роль дестабілізатора колоїдно-дисперсної системи молока. При цьому від видоспецифічності його дії залежить весь хід технологічного процесу виробництва сиру і, в кінцевому підсумку, якість готового продукту. Встановлено, що необхідною умовою для зсідання молока і утворення згустку потрібної якості є здатність ензиму розщеплювати пептидний зв'язок у молекулі  $\alpha$ -казеїну, а саме Фен(105) — Мет(106). Здатність впливати на цей зв'язок виявлена у низки протеазрослинного, тваринного та мікробного походження.

Слід зазначити, що дія сичужного ензиму (ренін К.Ф. 3.4.23.4) на молекули казеїнового комплексу молока з моменту його внесення в підготовлену молочну суміш і до закінчення визрівання сиру настільки специфічна, що й на сьогодні він — поза конкуренцією серед інших подібних препаратів. Допускається використання його замінників у виробництві натуральних сирів [3, 4, 5]. У разі використання як зсідальних агентів різних протеазмікробного походження відзначаються як позитивні (швидше проходить зсідання молока й визрівання сирів), так і негативні (втрата сухих речовин під час оброблення згустку і сирного зерна, що призводить до більш ніжної структури, появи вад смаку та консистенції у сирів) явища [6–8]. Вищезазначені явища є наслідком головним чином того, що мікробним молокозсідальним ензимам, порівняно із сичужними, притаманна переважно підвищена протеолітична активність і відповідна дія на основні компоненти казеїнового комплексу [9–11].

З метою отримання більш повної інформації щодо протеолізу казеїну молокозсідальними ензимними препаратами доцільно докладніше розглянути структурну будову казеїнової міцели та її основних компонентів.

Міцела казеїну є колоїдною структурою змішаного складу, має властивості гідрофільного та гідрофобногозоля, який за певних умов (наприклад, під дією ензимів) необоротно переходить у гель. Структура міцели казеїну остаточно не з'ясована, хоча існує декілька її моделей [12–14], у тому числі — субодинична [15, 16].

					Огляд літератури	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		8

Субміцели утворюються внаслідок гідрофобних взаємодій, а міцели — за рахунок колоїдного фосфату кальцію. Казеїнова міцела є композицією сферичних субодниць, що містять  $\alpha$ s -,  $\beta$  і  $\alpha$ -казеїни в приблизному співвідношенні 3:3:1 [17–20].

Оскільки кожна міцелярна субоднина має гідрофільні та гідрофобні зони, побудова міцели, починаючи з центральної субоднини, не є однорідною за всіма напрямками. Результатом такої побудови є отримання пористої структури міцели казеїну, яка є легкопроникною для мономерів казеїну й ензимів, що мають близькі розміри. Garnier [21], припускаючи рівномірне розподілення субоднин у складі міцел казеїну, показав, що всі основні компоненти казеїну завдяки наявності порожнин і каналів у міцелах однаково доступні до взаємодії реагентів з молекулярною масою до 36 000.

Фізичні й хімічні властивості казеїну за лежать від його первинної структури, оскільки розташування амінокислотних залишків визначає просторову структуру молекул. Знання амінокислотної послідовності у поліпептидних ланцюгів молекул основних компонентів казеїну має вирішальне значення для розуміння механізмів утворення міцел, дії ензиматичних систем у процесах коагуляції молока, оброблення згустку і подальших перетворень під час визрівання сирів.

Аналіз опублікованих даних свідчить про те, що структурна будова казеїнової міцели та її основних компонентів є визначальною в процесі ензим-субстратних взаємодій. Молокозсідальні ензими піддають гідролізу цілий ряд поліпептидних зв'язків не тільки в молекулах  $\alpha$ -казеїну, а й  $\alpha$ s і  $\beta$  казеїнів [11].

Глибина дії молокозсідальних ензимів на казеїнові міцели залежить не тільки від їхньої структурної організації, а й від природи і властивостей використовуваних коагулянтів. Тому до останніх у сироробній галузі висувують особливі вимоги. Помірний і виключно специфічний характер протеолізу є одним з основних чинників у формуванні необхідних органолептичних і фізико-хімічних показників готового продукту.

									Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	Огляд літератури				9

Використання високоякісних препаратів сичужного ензиму для зсідання молока сприяє отриманню продукту гарантованої якості. Найкращих результатів можна досягти в разі використання «класичного» сичужного ензиму з оптимальним співвідношенням реніну та пепсину. Технічні препарати сичужного ензиму (препарати ВНИИМС) містять 30–40% пепсину. Коагуляція молока відбувається в разі використання будь якого з наведених ензимів, однак основне «навантаження» цього процесу припадає на ренін.

Стійкий дефіцит ензимних препаратів тваринного походження спонукав спеціалістів до пошуку подібних за дією замінників серед мікробних протеаз.

Здатність ензиму до коагуляції молока недостатня для того, щоб даний препарат вважати задовільним замінником «класичного» сичужного, оскільки не менш важливу роль має відповідна протеолітична активність. Підвищена протеолітична активність може призвести до виникнення низки негативних наслідків.

Вивчення численних опублікованих матеріалів, пов'язаних з питанням використання мікробних молокозсідальних протеаз, дозволяє зробити висновок, що у виробництві сирів доцільно застосовувати лише ті ензими, які за своїми функціональними властивостями близькі до натурального сичужного і відповідають сучасним критеріям оцінки молокозсідальних препаратів.

Основними характеристиками ензимних препаратів, що їх використовують як замінники сичужного ензиму, є такі: молокозсідальна, протеолітична активність, відношення молокозсідальної активності до протеолітичної.

Відомі результати дослідження, які свідчать про те, що в сироробстві слід використовувати ензимні препарати з конкретним відношенням молокозсідальної активності до протеолітичної. Показано, що за специфічністю гідролізу казеїну ензимні препарати, рекомендовані як замінники сичужного ензиму, мають відповідати таким вимогам: протягом 3 год за температури 35 °С та рН 6,5 гідролізувати не більше 10%  $\alpha$ s-фракції і 6%  $\alpha$ -фракції казеїнів [9, 22, 23]. На основі вивчення кінетики взаємодії міцел

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

казеїну з ензимами мікробного походження було запропоновано метод стандартизації промислових молокозсідальних ензимів турбодиметричним реєструванням процесу [24].

Слід зазначити, що для стандартизації молокозсідальних препаратів мікробного походження досі не розроблено уніфікованої методики визначення їхньої ензиматичної активності й дотепер для визначення характеристик ензимів, які використовують у сироробстві, застосовують різні методи.

У зв'язку з цим проблема розроблення методу, що дозволить оцінювати придатність мікробних коагулянтів для сироробної галузі, є вкрай актуальною.

Усі замітники сичужного ензиму досить чутливі до умов навколишнього середовища, що в поєднанні зі специфічністю дії може істотно впливати на мікробіологічні й біохімічні процеси під час визрівання сирів і, отже, на якість готового продукту. Ці аргументи зумовлюють необхідність вважати за потрібне диференціювання функціональних властивостей молокозсідальних препаратів та використання їх з урахуванням технологічних параметрів виробництва і визрівання різних видів сирів.

Біохімічні властивості ензимів залежать не тільки від їхнього амінокислотного складу, але й від послідовності розташування останніх в поліпептидному ланцюгу (первинна структура), яка й зумовлює виключно специфічні властивості конкретного ензиму. Вивчаючи дію молокозсідальних ензимів як тваринного, так і мікробного походження, встановили, що наявність трьох залишків по обидва боки від точки розщеплення в субстраті є мінімальною вимогою для отримання певної нормальної активності [25].

Послідовність амінокислот у поліпептидному ланцюгу визначено у багатьох ензимів, хоча третинну структуру — тільки для обмеженої кількості молокозсідальних ензимів [26].

Поліпептидний ланцюг вивчених протеаз складений у дві частини, що відокремлені глибокою порожниною, в якій локалізується активна частина. Значна частина молекули має так звану  $\beta$ -листову структуру, яку складають, в основному, гідрофобні

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

паралельно і не паралельно орієнтовані пептидні зв'язки. Встановлено, що ділянка по рожнини є місцем каталітичної дії. У порожнині активного центру дві карбоксильні групи залишків аспарагінової кислоти пере бувають у тісному контакті одна з одною. Ці групи відіграють вирішальну роль в каталітичному механізмі [11].

Проведений аналіз властивостей молокозсідальних ензимних препаратів, що їх якнайширше використовують останнім часом, свідчить про те, що характер їхньої дії на казеїн виключно індивідуальний і залежить від умов навколишнього середовища. Іншими словами, дія будь-якого ензиму абсолютно видоспецифічна.

Під час ензиматичного зсідання молока різниця в характері гідролізу казеїну зумовлена специфічністю дії молокозсідальних ензимів.

З повною достовірністю показано, що ренін розщеплює Фен(105)–Мет(106)-пептидний зв'язок молекули  $\alpha$ -казеїну [27–29]. Інші протеази, застосовувані як зсідальний агент, очевидно, також розщеплюють цей зв'язок [30].

Дія ензимів на такий складний субстрат, як казеїн, супроводжується розщепленням не тільки  $\alpha$ -казеїну, але й  $\beta$ - та  $\gamma$ -фракцій. Складність питання специфічності дії молокозсідальних ензимів полягає в тому, що чутливість до ензиму притаманна певним зв'язкам у казеїновій міцелі. Відповідь на це питання може слугувати рішенням до визначення повної специфічності дії молокозсідальних ензимів на казеїн та критеріїв ви значення їх використання у виробництві сиру.

У результаті багаторічних досліджень ензим-субстратної (ренін–казеїн) взаємодії було зроблено такі висновки:

- специфічність дії реніну нанативний казеїн не обмежується гідролізом Фен — Мет-зв'язку в молекулі  $\alpha$ -казеїну [31, 25];
- специфічність дії реніну на  $\beta$ -казеїн залежить від агрегації субстрату а також від значення рН [11];
- $\beta$ -казеїн розщеплюється реніном тільки на декількох певних ділянках поліпептидного ланцюгу, які суттєво відрізняються за чутливістю до ензиму [27, 32, 33].

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

Після доведення факту розщеплення реніном тільки одного зв'язку в молекулі  $\alpha$ -казеїну, що локалізований в С-кінцевій частині, було синтезовано короткі пептиди, які моделюють амінокислотну послідовність навколо лабільного Фен — Мет-зв'язку, щоб використовувати їх як субстрати для виявлення специфічної протеолітичної активності реніну та його заміників мікробного походження. Встановлено, що поряд з очевидною схожістю в характері дії протеаз, отриманих із *Mucor miehei* і *Mucor pusillus*, існує різниця, зокрема стосовно величини константи Міхаеліса (0,1 мМ у мікробних протеаз проти 1,0 мМ у реніну) [34].

Як показано Nitschmann et al. [35], крива залежності NPN (непротеїнової азотистої фракції, що відщеплюється від  $\alpha$ -казеїну) від часу для реніну є специфічною. Після закінчення первинної реакції відщеплення ГМП від  $\alpha$ -казеїну крива йде паралельно осі часу, тобто NPN не збільшується.

У разі, якщо показник NPN продовжує зростати, можна говорити про нашарування двох реакцій — первинного і подальшого протеолізу. Низку експериментальних даних, які констатують наявність неспецифічного протеолізу казеїну пепсином і мікробними протеазами, наведено в роботах [2, 36].

Однак до останнього часу остаточної відповіді на питання щодо відщеплення ГМП від казеїнових міцел та змінення кількості NPN у процесі їх протеолізу під дією різних молокозсідальних ензимних препаратів не отримано.

Alais et al. [1] і Benkha [37] відзначають, що під час оцінювання показників якості молокозсідальних препаратів (особливо, ко ли йдеться не про ренін) недостатньо враховувати момент початку коагуляції. Слід звертати увагу на процеси дезагрегації казеїнових міцел з відщепленням ГМП від  $\alpha$ -казеїну, коагуляції і неспецифічного протеолізу.

Дія реніну на  $\alpha$ -казеїн супроводжується не тільки відщепленням розчинного в три хлороцтовій кислоті (ТХО) ГМП, але й по дальшим протеолізом  $\alpha_s$  та  $\beta$ -казеїнів.

					Огляд літератури	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		13

У нашій роботі ми використовували казеїновий комплекс, який отримували із сирого знежиреного молока методом кислотного осадження 1 М НСІ, рН 4,6 [38, 39]. Процедури осадження, промивання і розчинення проводили тричі. Після третього розчинення отриманого протеїну 1 М NaOH преципітат одержували за кисненням до рН 4,0 оцтовою кислотою і проводили екстрагування протеаз молока протягом 5 год за температури 4 °С. Осад двічі промивали дистильованою водою, перемішували, розчиняли, доводячи до рівня рН 6,8. Отриманий розчин пропускали на воронці Бюхнера крізь імпрегноване активоване вугілля, а фільтрат 15 хв центрифугували при 10 000 g для очищення від залишків вугілля. Після цього протеїн переосаджували з використанням деіонізованої води, стерилізували, про пускаючи крізь фільтр Зейтца, розчиняли в мінімальній кількості гістидин-НСІ-буфера при рН 7,0 і після заморожування за температури -40 °С сублімаційно висушували.

Використовували еталонний зразок сичужного ензиму (ренін) і ензимний препарат ВНИИМС із молокозсідальною активністю

300 000 умовних одиниць, виробництва фірми Meito Sanguo Co., LTD (Японія).

За необхідності очищення ензимів проводили таким чином. Попередньо розчинений і витриманий за постійного перемішування ензимний препарат підлягав центрифугуванню при 12 000 g на лабораторній центрифугі, тип 310 (Польща), проточному діалізу за 4 °С проти 0,01 М гістидин-НСІ-буфера, рН 7,0. Здійснювали холодну стерилізацію і сублімаційно висушували.

Модокозсідальну активність ензимних препаратів визначали за методом Машек і Гавлової [40], протеолітичну активність — за методом Benkhe [37].

Визначення кількості сіалових кислот (N-ацетилнейрамінової) проводили, послуговуючись методом Hess et al. [41], у нашій модифікації.

До 100 см<sup>3</sup> модельного розчину (2,8%-й розчин казеїнового комплексу в 0,01 М фосфатному буфері, рН 6,8) додавали відповідним чином розраховану кількість досліджуваного ензимного препарату (за еквівалентом ензим-субстратного

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

співвідношення у сироробстві), попередньо розчиненого в 0,01 М фосфатному буфері, і витримували за 32 °С у водяній бані. Через певні проміжки часу відбирали по 10 см<sup>3</sup> ферментованої проби, додавали 1,4 см<sup>3</sup> 10%-ї ТХО, ретельно перемішували і через 20 хв занурювали у киплячу водяну баню на 5 хв. Проби охолоджували і фільтрували.

До 2 см<sup>3</sup> фільтрату додавали 2,5 см<sup>3</sup> розчину 5%-ї сірчаної кислоти в льодяній оцтовій кислоті, витримували у кип'яченій воді 1 год і після охолодження центрифугували при 10 000 г. Наявність N-ацетилнейрамінової кислоти фіксували спектрофотометричним методом на приладі Opton PMQ-3 за довжини хвилі 450 нм.

Задля встановлення механізму дії молокозсідальних препаратів на міцели казеїну нами проведено порівняльні дослідження накопичення ГМПІ залежно від дії на них ензимних препаратів.

Криві, що відображають динаміку накопичення N-ацетилнейрамінової кислоти внаслідок розщеплення  $\alpha$ -казеїну молокозсідальними препаратами, показано на рисунку.

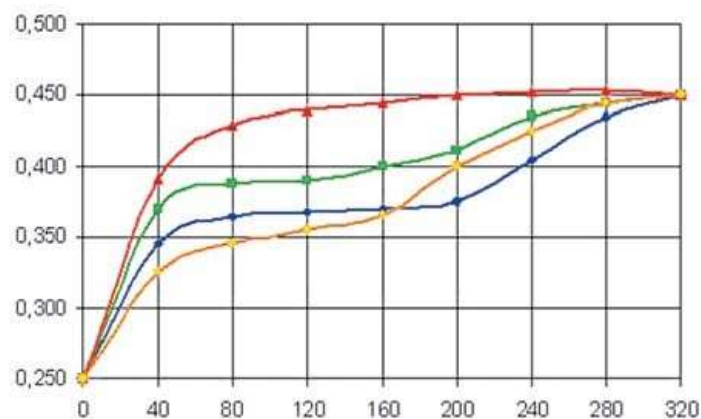
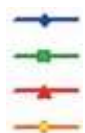


Рис. 1.1. Динаміка накопичення N-ацетилнейрамінової кислоти внаслідок розщеплення  $\alpha$ -казеїну молокозсідальними препаратами

Час, хв



сичужний ензим (0,25 мкг/мл)

ензимний препарат ВНИИМС (0,25 мкг/мл) препарат Мейто

Г20Х (0,16 мкг/мл) препарат Мейто Г20Х (0,08 мкг/мл)

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата



Дія сичужного ензиму на казеїнові міцели характеризується інтенсивним відщепленням ГМП упродовж перших 60 хв. Цей процес супроводжується підвищенням показника оптичної густини. Подальша двогодинна експозиція ензиму в розчині казеїну за температури 32 °С не призводить до зміни системи (величина оптичної густини практично не змінюється) до моменту реєстрації другої точки перегину.

Слід відзначити підвищення значення оптичної густини після другого перегину, оскільки отримані результати дозволяють зробити два припущення.

По-перше, логічно припустити, що на початковому етапі дії сичужного ензиму на казеїн (збільшення значення оптичної густини до першого перегину) відбувається відщеплення ГМП від  $\alpha$ -казеїнів, які містяться на поверхні казеїнових міцел. Це спричинює внутрішньомолекулярні (конформаційні) зміни субодиниць казеїнових міцел, що супроводжується молекулярною перебудовою, яка дозволяє активним центрам молокозсідальних ензимів впливати на глибинні сфери казеїнових субміцел. Унаслідок цього відбувається відщеплення ГМП від важко доступних внутрішньоміцелярних  $\alpha$ -казеїнів (збільшення значення оптичної густини після другого перегину).

По-друге, можна припустити, що зареєстроване збільшення оптичної густини після другого перегину пов'язано з неспецифічним протеолізом ГМП, який супроводжується відщепленням N-ацетилнейрамінової кислоти. При цьому вона переходить в інше фізико-хімічне оточення, яке сприяє збільшенню значення оптичної густини.

Більш детальний аналіз отриманих результатів дозволяє зробити висновок, що перше припущення суперечить існуючим даним про те, що ензим-субстратні взаємодії за вибраних нами концентраційних співвідношень, а також внутрішньо і міжмолекулярні структурні перебудови субодиниць казеїнових міцел є високошвидкісними процесами. Таким чином, інтервал між точками перегину, що дорівнює 2 год, малоймовірний. Водночас друге припущення добре узгоджується із загальноприйнятим уявленням, що сичужний ензим має високу специфічну й низьку неспецифічну протеолітичну

									Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	Огляд літератури				16

активність, а отже, інтервал між накопиченням реєстрованої кількості ГМП і фрагментів його розщеплення може бути досить тривалим.

Окрім того, таке припущення дозволяє з високим ступенем вірогідності інтерпретувати криву, що відображає процес ферментації казеїну препаратом Мейто, який має досить високу неспецифічну протеолітичну активність. При цьому не виключено, що цей препарат здатен розщеплювати вугле водно-амінокислотні зв'язки. Отже, зображена на рисунку характерна S-подібна крива ензим-субстратної взаємодії казеїну і сичужного ензиму добре узгоджується з даними літератури і переконливо підтверджує присутність двох етапів у дії реніну на казеїновий комплекс: перший — порушення захисного колоїдного стану казеїнової міцели, що призводить у подальшому до утворення молочного згустку, і другий — повільний неспецифічний протеоліз казеїнів молока, зокрема  $\alpha$ -казеїнів і ГМП.

Вплив ензимного препарату ВНИИМС на казеїн ідентичний дії сичужного ензиму з тією лише різницею, що ензими, які входять до складу першого, мають вищу неспецифічну протеолітичну активність. Так, упродовж першої години дії утворюється велика кількість N-ацетилнейрамінової кислоти.

Вплив на казеїновий комплекс еквівалентної за молокозсідальною активністю сичужного ензиму кількості препарату Мейто призводить до ще більш інтенсивного відщеплення ГМП, особливо протягом першої години інкубації, яке завершується через 3 год з моменту початку реакції. Це ще раз підтверджує значно вищу, порівняно із сичужним ензимом й ензимним препаратом ВНИИМС, протеолітичну активність досліджуваного мікробного ензимного препарату.

Слід наголосити, що використання у два рази зменшеної дози препарату Мейто зумовлює таку саму залежність відщеплення ГМП, як і в разі дії сичужного ензиму або препарату ВНИИМС. Таким чином, узагальнюючи вищенаведене, можна зробити висновок, що ферментація казеїнових міцел суттєво відрізняється залежно від дії на них досліджуваних ензимних препаратів.

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

При цьому препарат Мейто має високу неспецифічну протеолітичну активність, що спричинює інтенсивне розщеплення ГМП  $\alpha$ -казеїнів. Утім, варто зазначити, що за допомогою використаних під час проведення досліджень методів можна визначити лише сумарну молокозсідальну і неспецифічну протеолітичну активність. призводить до ще більш інтенсивного відщеплення ГМП, особливо протягом першої години інкубації, яке завершується через 3 год з моменту початку реакції. Це ще раз підтверджує значно вищу, порівняно із сичужним ферментом й ферментним препаратом ВНИИМС, протеолітичну активність досліджуваного мікробного ферментного препарату.

## 1.2.Механізм зсідання молока

Зсідання молока – основний прийом виділення молочного білка в сироваріння, зазвичай в згусток виділяється казеїн, інші білки відходять в сироватку, тому їх прийнято називати сироватковими.Зсідання молока може бути сичужовим і кислотним. За типом зсідання сири ділять на сичужні та кисломолочні.Сичужні зсідання походять від впливу сичужного ферменту на молоко.

Сичужний фермент виділяється залозистими клітинами IV відділу шлунка жуйних тварин – сичуга. У найбільшій кількості сичужний фермент утворюється в молочний період життя телят. Отримують його в заводських умовах за спеціальною технологією, яка передбачає сушку Сичугов, подрібнення, висолювання білків. Виділені таким чином білки висушують, подрібнюють на кульових млинах. Сухий препарат змішують з хлоридом натрію і отримують сичужний порошок. Визначають його згортаючу-ющу активність. Для отримання 1 кг сичужного порошку потрібні шлунки 13-ти телят. 1 кг порошку забезпечує вироблення 4 т сиру. В даний час використовуються не тільки шлунки телят, але і ягнят (приблизно тижневого віку).

Крім того, в сироваріння використовуються пепсину (яловичий, свинячий та других тварин). Є ряд молокозсідальної препаратів на основі використання пепсину тваринного походження. Молокозсідальної ферментний препарат ВНИИМС (ФП) складається з 50% сичужного ферменту і 50% яловичого пепсину. Його рекомендують

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата

Огляд літератури

Арк.

18

для виробництва сирів з низькою температура другого нагрівання. Препарат ФП-2 містить 25% сичужного фермента і 75% яловичого пепсину і використовується для сирів типу російського. ФП-6 – суміш курячого і яловичого пепсину.

Визначення зсідання активності і дози сичужного ферменту, внесення його в молоко

Сичужний фермент вносять в сироробний ванну з охолодження після пастеризації до 35 оС молоком, в яке попередньо доданий хлорид кальцію і необхідна для даного виду сиру закваска.

Доза сичужного ферменту, необхідного для зсідання молока, визначається за формулою:

$$X = M \cdot T_f / 600 \cdot T_t,$$

де X – кількість 1% -го розчину сичужного ферменту, дмЗ;

M – кількість молока, дмЗ,

T<sub>f</sub> – тривалість зсідання 100 смЗ підігрітого до температури зсідання молока 10 смЗ розчину ферменту, з (відлік ведуть від моменту внесення розчину до утворення нормального згустку);

T<sub>t</sub> – необхідна тривалість зсідання молока, хв.

На практиці необхідну кількість сичужного ферменту зручніше визначати за допомогою приладу ВНИИМС, який являє собою циліндр з каліброваним отвором у дні і зі шкалою, нанесеною на внутрішній стороні судини. У циліндр із закритим отвором наливають подго-лення до зсідання молоко (з температурою зсідання і внесеними в молоко закваскою і хлоридом кальцію) до нульової позначки. В молоко до-добавляють 10 смЗ 2,5% -го розчину сичужного ферменту, швидко перемішують і відкривають отвір. У той момент, коли відбудеться зсідання, молоко з отвору перестане витікати. Рівень залишився в циліндрі молока поки-жет потрібну кількість сичужного ферменту в г на 100 кг молока. Цей прийом необхідно проводити в кожній сироробній ванні, щоб врахувати різномірність молока і активність застосовуваного ферменту.

					Огляд літератури	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		19

Під зсідання активністю розуміють кількість частин молока, яке згортається однією частиною ферменту при температурі 35 ° С протягом 40 хвилин. Звідси, якщо активність сичужного ферменту становить 100 тис. Одиниць, це означає, що 1 частина сичужного ферменту згортає 100 тис. Частинок молока (1 г ферменту – 100 кг молока). Однак в сироваріння норма витрати ферменту більш висока: 2,5 г на 100 кг молока, так як температура зсідання може бути нижче 35 ° С і тривалість зсідання необхідно менше 40 хвилин.

#### Механізм дії сичужного ферменту

Зсідання молока сичужовим ферментом (або його замінником) являє собою два спільно протікають процеси. Процеси ці незворотні. Існує кілька теорій сичужного зсідання. З позиції гідролитической теорії механізм сичужової коагуляції пояснюється наступним чином \*.

Під дією внесеного сичужного ферменту відбувається гідроліз поліпептидних ланцюгів к-казеїну казеїнаткальційфосфатного комплексу між фенілаланином і метіоніном. В результаті молекули к-казеїну розпадаються на гідрофобний пара-до-казеїн і гідрофільний глікомакропептид.

В результаті відбувається втрата негативного заряду міцел, часткове руйнування гідратної оболонки – система втрачає стійкість, наслідком чого є поява пластівців білка (перша стадія – індукційна).

Втрата к-казеїном функцій захисного колоїду створює умови для інтенсивної коагуляції за участю в структуроутворенні параказеїна іонів кальцію (друга стадія). На цій стадії формується просторова сітка згустку.

Зсідання молока дозволяє отримати згусток, що розділяється після відповідної обробки на дві фази: тверду, в якій містяться переважно казеїн і жир, і рідку, яка містить розчинені у воді речовини молока (молочний цукор, розчинні білки і солі молока).

У виробництві сиру має значення міцність отриманого згустку, яка є умовою, що визначає вихід сиру, його консистенцію і відхід жиру в сироватку. Слабкий згусток

									Арк.
									20
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	Огляд літератури				

дробиться нерівномірно, утворюється багато дрібних частинок сирного пилю, які губляться з сироваткою.

Щільність згустку залежить від змісту в молоці казеїну, ступеня зрілості молока, температури зсідання, додавання солей кальцію і не залежить від дози сичужного ферменту. Тривалість зсідання молока в залежності від виду сиру становить від 25-ти до 60-ти хвилин і залежить від різних факторів.

Фактори, що впливають на процес сичужного зсідання

На швидкість зсідання впливають такі чинники:

- 1) температура зсідання;
- 2) рН середовища;
- 3) концентрація солей кальцію;
- 4) доза ферменту і ін.

Оптимум дії сичужного ферменту – 43-45 ° С; для пепсину – 40-41 ° С, при температурі нижче 10 ° С зсідання протікає дуже повільно, може навіть не відбутися. Температура зсідання встановлена 28-35 оС, що пояснюється необхідністю створення сприятливих умов не тільки для ферменту, а й для молочнокислої мікрофлори закваски.

При нормальній кислотності (кислотність 20 оТ) і жирності суміші температура зсідання становить 32-35 ° С, при підвищеній кислотності (22 оТ – це характерно у виробництві м'яких сирів) – 28-32 ° С. Знижені температури зсідання в виробництві м'яких сирів встановлюються також ще і з метою отримання більш вологого сирного зерна.

Зі збільшенням кислотності суміші слід знизити температуру свер-вання на 0,5-1,5 ° С на кожен градус кислотності.

Збільшення дози хлориду кальцію від 10 до 50 г на 100 кг нормалізованої суміші збільшує активність ферменту на 20-60%.

Швидкість коагуляції казеїну залежить від кількості доданого сичужного ферменту. Встановлено, що тривалість утворення згустку залежить від дози ферменту

					Огляд літератури	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		21

обернено пропорційно. Для певної проби молока (кислотності, ступеня зрілості, температури) ця закономірність може бути виражена таким рівнянням:

$$C \cdot t = \text{const},$$

де  $C$  – концентрація ферменту в г сухого препарату на 1 дм<sup>3</sup> молока;

$t$  – тривалість зсідання, с.

Цю ж закономірність можна записати у вигляді рівняння:

$$X \cdot t / m = \text{const},$$

де  $X$  – доза ферменту в г;

$m$  – маса молока, кг.

Чисельне значення константи збільшується при використанні сичужний-млявого молока і малої активності ферменту. Запропоноване рівняння з достатнім ступенем точності дозволяє на практиці визначити дозу сичужного ферменту для заданої тривалості зсідання певного зразка молока по проведеній пробі на зсідання. На підставі цього закону розроблено так званий прилад ВНИИМС, принцип дії якого описаний раніше.

### **1.3.Значення процесів ферментативного зсідання молока у технології молочних продуктів**

Білки молока - найбільш важливі в біологічному відношенні органічні речовини. Одним із способів поліпшення властивостей білків є їх гідроліз. В результаті реакції білки розбиваються на більш дрібні одиниці: пептиди і амінокислоти, які йдуть на побудову клітин організму, ферментів, захисних тіл, гормонів і т.д. За змістом незамінних амінокислот (лізин, триптофан, метіонін, фені- лаланін, лейцин, ізолейцин, треонін, валін) білки молока відносять до білків високої біологічної цінності. Поживна цінність білкових харчових гідролізатів залежить від технології їх виробництва [1].

У світовій практиці широко використовуються процеси кислотного та лужного гідролізу білків, однак вони мають ряд недоліків. При лужному гідролізі практично

					Огляд літератури	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		22

повністю руйнуються такі важливі амінокислоти, як серин, треонін, аргінін, цистеїн, при цьому отримані гідролізати мають неприємним смаком.

Кислотний гідроліз протікає швидше і більш специфічно. Одна з важливих особливостей цього виду гідролізу полягає в тому, що досягається велика глибина розщеплення білка і виключається можливість бактеріального забруднення гідролізату. При застосуванні гідролізу виключається жорстке вплив на білкові молекули і розпад амінокислот, а також можливий підбір системи ферментів і умов протікання процесу, що дозволяє створити оптимальну технологію переробки різних видів молочно-білкового сировини. Шляхом підбору ферментів можна домогтися отримання гідролізату без гіркою присмаку [2, 3]. Максимально що досягається рівень гідролізу залежить в свою чергу від природи білка і специфічності ферментів. Харчова цінність білків при ферментативному гідролізі, який проводять, як правило, в м'яких умовах, збільшується.

Для отримання оптимальних результатів гідролізу необхідно дотримуватися таких умов: гідролізуємих сировина повинна мати гарне санітарно-гігієнічний стан, що дозволить обробляти його і в свіжому, і в пастеризованому вигляді; значення рН під час процесу має бути постійним, зави сям від властивостей використовуваного ферменту; з метою більш повного гідролізу необхідно регулювати гідродинамічні параметри процесу [3]. Також важливе значення мають умови протікання гид- Роліз, зокрема, температури і значення активної кислотності. Зміна структури білка внаслідок гідролізу робить його розчинною.

Від ступеня гідролізу залежать смакові і ароматичні якості, а також функціональні властивості гідролізатів, такі, як емульгуюча і гелеутворюючого здатність, пенообразующий і гігроскопіческій потенціал. Неповний гідроліз здатний поліпшити характеристики розчинності в деякій мірі денату- рировать, висушених розпиленням молочних білків. Більш глибокий гідроліз білків молока додатково покращує їх розчинність, але також призводить до деякого посилення гіркуватого смаку і збільшення вмісту вільних амінокислот [3, 4]

					Огляд літератури	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		23



Проведені дослідження були спрямовані на вивчення впливу гідромодуля середовища, температури, тривалості гідролізу, дозування препарату, ступеня гідролізу, тобто параметрів, що грають вирішальне значення для розроблюваної технології і впливають на економіку процесу.

Якість сичужного ферменту має великий вплив на формування сиру. Промисловий сичужний фермент повинен використовуватися відповідно до рекомендацій виробника. Дозування для кожного виду сичужного ферменту повинні бути чистими, інакше продукт зіпсується. Залишки сичужного ферменту не повинні бути повернуті у попередню ємність для зберігання. Найкраще, коли сичужний порошок точно відміряється в лабораторії і готується у спеціальних дозах для використання однієї партії сиру. Дозування на 100 л сирного молока залежить від ключових якостей зсідання молока.

- сичужна витяжка 1: 10 000 15 – 35 мл;
- сичужна витяжка 1: 15 000 12 – 30 мл;
- сичужний порошок 1: 100 000 1,5 – 3 г.

З цими дозами, враховуючи силу сичужного ферменту, час зсідання та зсідання молока може бути контрольоване. Час цих двох операцій скорочується зі збільшенням кількості сичужного ферменту і збільшенням концентрації ензимів. Кількість сичужного ферменту має тільки непрямий вплив на типовий процес зсідання і синерезис другої стадії, тому що ці процеси залежать від зменшення сили кальцій-сольових мостів у сичужному порошку. Збільшення концентрації сичужного ферменту в молоці (0,01 - 0,03%) збільшує активність зсідання. Від 0,04% і далі ця активність знову знижується, бо ефективність сичужного ферменту стає надмірною.

Більш високі температури потрібні для більш високих рівнів жирності сирної суміші, оскільки ефект сичужного ферменту знижується з підвищенням жирності сирного молока. При температурі вище 40 °C жорсткість згустку знову знижується. При цій температурі фосфат кальцію починає випадати в осад. Процентне

					Огляд літератури	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		24

співвідношення вільного кальцію, доступного для формування згустку, зменшується. Занадто високе збільшення температури зсідання призводить до казеїнових міцелових молекулярних ланцюжків і грудочок, утворюючи пористу плівку (матрицю). Казеїнові міцели з'єднуються більш чітко і волокнисті з'єднання (грона) є більш щільними і більшими. Тим не менше, структура стає більш відкритою і прохідність зростає. Діапазон температур потрібно враховувати відповідно до зростання якостей на початку використання культур. Оптимальна сичужна температура є результатом урегульованості між діяльністю ензимів та окислювальною діяльністю [4].

Оптимальна температура зсідання для промислового доступного сичужного ферменту - 38-42 °С. Нижче 10 °С глюкомакропептид відокремлюється від к-казеїну (початкова стадія), але злиття окремих частин та формування зв'язаних ланцюгів гранул (друга фаза) неможливе на задовільному рівні (незавершене).

Рівень ензимної реакції підвищується зі зростанням температури. Активність ензимів має значний вплив на величину рН. Зі зниженням цієї величини з 6,7 до 5,3 час зсідання знижується. Сиропридатне молоко, яке використовують при виготовленні м'якого сиру має бути окислено більше (7,8 - 8,6 °SH) ніж для твердого сиру (7,2 °SH), таким чином величина рН сирного молока нижча для м'яких сирів (6,3 - 6,2) ніж для твердих (6,5). Рисунок 2 описує 4 стадії зсідання молока при дії сичужного фермента.

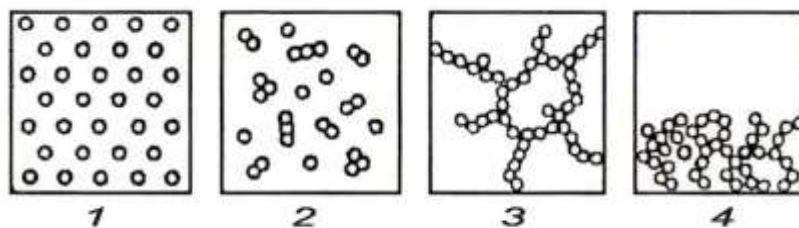


Рис.1.2. Стадії сичужного зсідання молока

1. Додавання сичужного ферменту.
2. З'єднання казеїнових міцел.Зсідання (згущення) молока.
3. Синерезис і ензимний перехід в сироватку [2].

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата

Зсідання молока з ензимами є основною операцією у виробництві сичужних сирів. Флокуляція це період, який займає до 14 хвилин, за якою слідує хвилинна ензимної фаза. Під час цих двох періодів відбуваються лише незначні структурні зміни. Подальше формування згустка досить швидко, що видно зі збільшення в'язкості (тягучості, клейкості)

Загалом сичужне зсідання відбувається у три фази.

- Ензимний гідроліз казеїну (первинна фаза);
- Об'єднання казеїнових міцел;
- Формування згустку, розвиток тривимірної структури;

Дві останні фази вважаються другою фазою (рисунки 3).

Е: ензимна фаза.

О: Об'єднання казеїнових міцел.

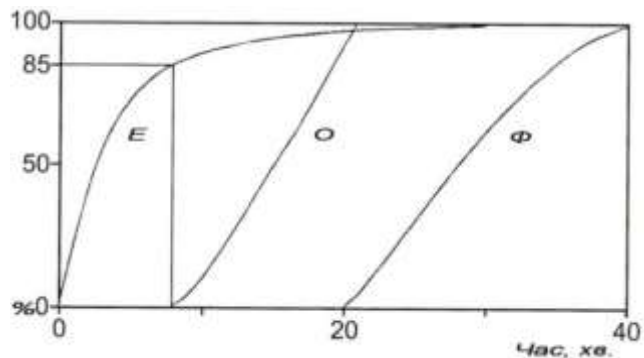
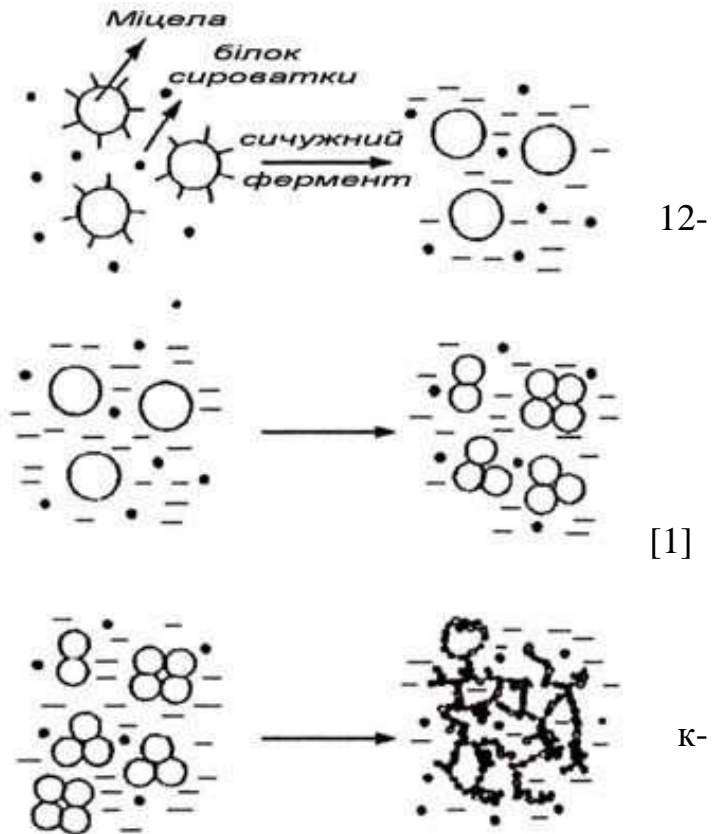


Рис.1.3. Друга фаза сичужного зсідання

Ф: Формування згустку (показане як відсоток затвердіння (кристалізації) через 40 хв).



Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата

На першій стадії згущувачі (хімосін, пепсин та інші) ензимно ділять молекули казеїну, при певних температурах і рН величині, між амінокислотами Phe<sub>105</sub> і Met<sub>106</sub>. Ця ензимна реакція досягає піку в перші 4 хвилини після додавання згущувача і потім сповільнюється. К-казеїн є не розчиним після розщеплення, його міцели втрачають свої гідратні шари, таким чином не є більше захищеними проти міжміцелярних зв'язків. Даний процес зображено на рисунку 3.

ГМП випускається із захисного колоїду к-казеїну і електричний заряд казеїнових міцел знижується на 50%. Відсоток сформованого ГМП (в кінці реакції) залежить від первинної концентрації к-казеїну. Схильність до об'єднання казеїнових міцел збільшується завдяки втраті гідратних шарів і зменшенню відштовхування. Зменшення електричного заряду відбувається у співвідношенні з гідролізом к-казеїну. При цьому зменшується гідродинамічний діаметр міцел. ГМП переходить в сироватку. Час згущення (зсідання) не повинен бути занадто коротким.

Базове рівняння для первинної (ензимної) фази:

*Сичужний фермент*

*К-казеїн = пара-к-казеїн + ГМП*

За першою реакцією слідує друга фаза або фаза зсідання. У цій фазі Са-чутливі казеїнові міцели приєднуються до кальцієвого моста у присутності Са-іонів. Завдяки об'єднанню створюються пов'язані ланцюжки групи частинок (глобули) і відбувається повільний розвиток тривимірної мережі (матриці), відбувається формування згустку, й таким чином молочного згустку, є форма синерезису. Казеїнові міцели змінюють свою форму з розвитком синерезису. Залежно від різноманітності сирів, синерезис повинен бути полегшений відповідними технологіями, більше для твердих сирів і менше для м'яких [3]

									Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	Огляд літератури				27

# Спеціальна частина

## Розділ 2

### Матеріали і методи проведення дослідження

В роботі використано взірці молокозгортального ензимного препарату «Глек» терміном зберігання близько одного місяця, пів року, одного року. Препарати були отримані у Косівському районі. Також для порівняння було використано стандартний сичужний ензим і пепсин (Каунас, Литва).

Загальний казеїн виділяли із свіжого знежиреного коров'ячого молока шляхом ізоелектричного осадження за умова інактивації природних протеїназ. Гомогенні фракції  $\alpha_{S1}$ -казеїну і  $\beta$ -казеїну  $\chi$ -казеїну виділяли гель- фільтрацію на сефадексі G150. Гомогенність казеїнів та фракційний склад продуктів їх розщеплення аналізували електрофорезом у вертикальних пластинках ПААГ в апараті Стадієра. При цьому використовували лужну буферну систему гелю (рН-7,9), що містила 25 мМ трис, 27 мМ діетилбарбітурат, 3 мМ ЕДТА і 4,5 М сечовину. Електрофореграми фіксували і проявляли загальноприйнятими методами. Фракційний склад молокозгортальних препаратів аналізували диск-електрофорезом на пластинках ПААГ в нативних умовах, як описано в роботі Електрофоретичні буфери і гелі готували використовуючи реактиви фірми «Keapai» (Угорщина).

Молокозгортальну активність за методом Сокслета та протеолітичну активність ензимних препаратів за методом Бенкі досліджували як описано раніше у роботі. Вологість препаратів визначали висушуючи їх до постійної маси при 100°C. Загальний білок у препаратах визначали за Кельдалем використовуючи для перерахунку коефіцієнт - 6,25. Концентрацію казеїнових фракцій визначали на спектрофотометрі СФ-46 ( $\lambda=280$  нм). При цьому використовували коефіцієнти поглинання ( $D_{1\text{см}}^{1\%}$ ): 10,0 - для  $\alpha_{S1}$ -казеїну; 4,6 - для  $\beta$ -казеїну; 9,6 - для  $\kappa$ -казеїну і 8,2 - для загального казеїну

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Літ.	Аркуш	Аркушів
Розроб.						28	
Переірив							
Затв.							

## Розділ 3

### Результати власних дослідження та їх обговорення

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

Для досліджень були використані ензимні молокозгортальні препарати «Глек» які зберігались в однакових умовах протягом одного місяця, пів року і одного року. Взірці препаратів різної тривалості зберігання показані на рис. 1,2,3.

Таблиця 3.1. Характеристика молокозгортальних препаратів «Глек» різного терміну зберігання.;(n±m; n=3)

Термін зберігання препаратів «Глек»	Загальний протеїн (г/100г препарату)	Вміст води (%)	Молокозгортальна активність по Сокслету (од/г препарату)	Молокозгортальна активність по Сокслету (од/г протеїну препарату)
1 місяць	5,1±0,3	8	3700±310	72550±3900
0,5 року	5,4±0,4	8	3500±340	64800±4300
1 рік	25,0±0,3	8	2700±400	54000±4200

Note: p<0.05

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Самуляк П.Ю.			<b>Результати власних дослідження та їх обговорення</b>	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Юкало В.Г.					29	
Затв.		Покотило О.С.						



Рис.3.1.Ензимні молокозгортальні препарати “Глек” різної тривалості зберігання:  
один місяць.

					Результати власних дослідження та їх обговорення	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		30



Рис.3.2 Ензимні молокозгортальні препарати “Глек” різної тривалості зберігання:  
пів року.

					Результати власних дослідження та їх обговорення	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		31





Рис.3.3 Ензимні молокозгортальні препарати “Глек” різної тривалості зберігання :  
один рік.

					Результати власних дослідження та їх обговорення	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		32

Результати засвідчили, що молокозгортальна активність протягом першого місяця зберігання зростала. І лише через пів року вона починала знижуватися. Також молокозгортальна активність «Глеку» є відносно низькою у порівнянні зі стандартним сичужним ензимом (100000 од./г). В процесі зберігання активність препарату зменшувалася у перерахунку на загальний протеїн за рік більше, ніж у два рази. Але у перерахунку на весь препарат вона майже не змінювалася. Такі зручні для застосування властивості препарату були забезпечені емпірично умовами його виготовлення і зберігання.

### 3.1.2 Отримання субстратів для характеристики специфічності протеаз

У літературі описано ряд методів виділення к-казеїну із застосуванням методу диференційного осадження його солями, етанолом та використанням різних варіантів іонообмінної хроматографії на колонці та в об'ємі, а також комбінацією цих методів. На мій погляд основним недоліком вказаних методів є вплив на к-казеїн екстремальних значень рН, іонної сили, а також денатуруючої дії органічних розчинників, що може призвести до змін у хімічному складі і просторовій структурі білка. Особливо чутливими є вуглеводневі компоненти к-казеїну. Крім того, вказані методи є довготривалими, що підвищує ймовірність денатуруючих змін у молекулах к-казеїну.

У зв'язку із сказаним привабливою для виділення к-казеїну залишається гель-фільтрація. Цей метод дозволяє проводити фракціонування білків в різних умовах, наближених до нативних. Було показано, що гель-фільтрація є малоефективною для аналізу і розділення білків казеїнового комплексу коров'ячого молока, що зумовлено подібністю їхньої молекулярної маси. Виключення становить лише к-казеїн, який може утворювати агрегати за рахунок міжмолекулярних дисульфідних зв'язків. Такі агрегати можуть мати молекулярну масу більше 100 000 Да і відповідно можуть бути відділені від інших казеїнів.

Враховуючи літературні дані, а також результати, отримані в нашій лабораторії,

					Результати власних дослідження та їх обговорення	Арк.
						33
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

для виділення к-казеїну було вибрано сефадекс G-150. Гель- фільтрацію свіжовиділеного загального казеїну проводили, на хроматографічній колонці (1,5\*70 см) без використання редуруючих реагентів. При проведенні гель-фільтрації відбирали по 2 мл елюенту. Результати типового розділення загального казеїну (117 мг), який перед нанесенням на колонку розводили в 7 мл хроматографічного буферу, показані на рис.3.4. На хроматограмі видно перший пік (*I*), який виходить з об'ємом елюенту, що дорівнює вільному об'єму колонки, а також два умовно виділені (заштриховані на рис. 3.4) піки (*II* і *III*), які чітко не розділяються.

Об'єднані фракції піку *I*, а також об'єднані фракції виділених піків *II* і *III* використовували при проведенні електрофоретичного аналізу на пластинках ПААГ, а також для подальшої очистки. Для приготування електрофоретичних зразків відбирали аліквоти з об'єднаних фракцій кожного піку і діалізували проти дистильованої води при 7°C у присутності консерванту. Після цього білки з кожного діалізного мішечка осаджували доведенням до ізоелектричної точки 0,1 N соляною кислотою. Вже на цій стадії було помітно різницю у властивостях білків з різних піків. Так, казеїни піку *II* випадали в осад вже в процесі діалізу без додавання соляної кислоти. Найбільшу стійкість у розчинах проявляли білки піку *I*. Осаджені ізоелектрично білки центрифугували (3000 g, 15 хв), отриманий осад промивали дистильованою водою і розчиняли в буфері для електрофоретичних зразків. Для вирівнювання концентрацій білків в отриманих зразках визначали оптичну густину при 280 нм на спектрофотометрі. Для проведення електрофоретичного аналізу в комірку наносили по 9 мкл зразків. Контролем служив загальний казеїн, частину якого піддавали фракціонуванню на сефадексі G-150. Результати електрофорезу показані на рис.3.5. На електрофореграмі видно, що до складу першого піку входить в основному к-казеїн і сліди β-казеїну. Мінорні фрагменти β-казеїну з низькою електрофоретичною рухливістю і низькою молекулярною масою були відсутні.

Результати власних дослідження та їх  
обговорення

Арк.

34

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата
-----	------	---------	--------	------

Відсутність у складі першого піку  $\alpha_{s2}$ -казеїнів підтверджує припущення, що  $\alpha_{s2}$ -казеїни, які також містять залишки цистеїну, утворюють переважно внутрішньомолекулярні сульфгідрильні зв'язки і не утворюють високомолекулярних агрегатів. Дві інші фракції (піки *II* і *III*) включають суміш  $\alpha_s$ -CN і  $\beta$ -CN, що відомо з літератури. При цьому слід звернути увагу на непропорційність розподілу казеїнів між піками *II* і *III*. На електрофореграмі чітко видно, що до складу фракцій піку *II* входить більше  $\beta$ -казеїну, а до складу піку - значно більше  $\alpha_s$ -казеїнів.

					Результати власних дослідження та їх обговорення	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		35

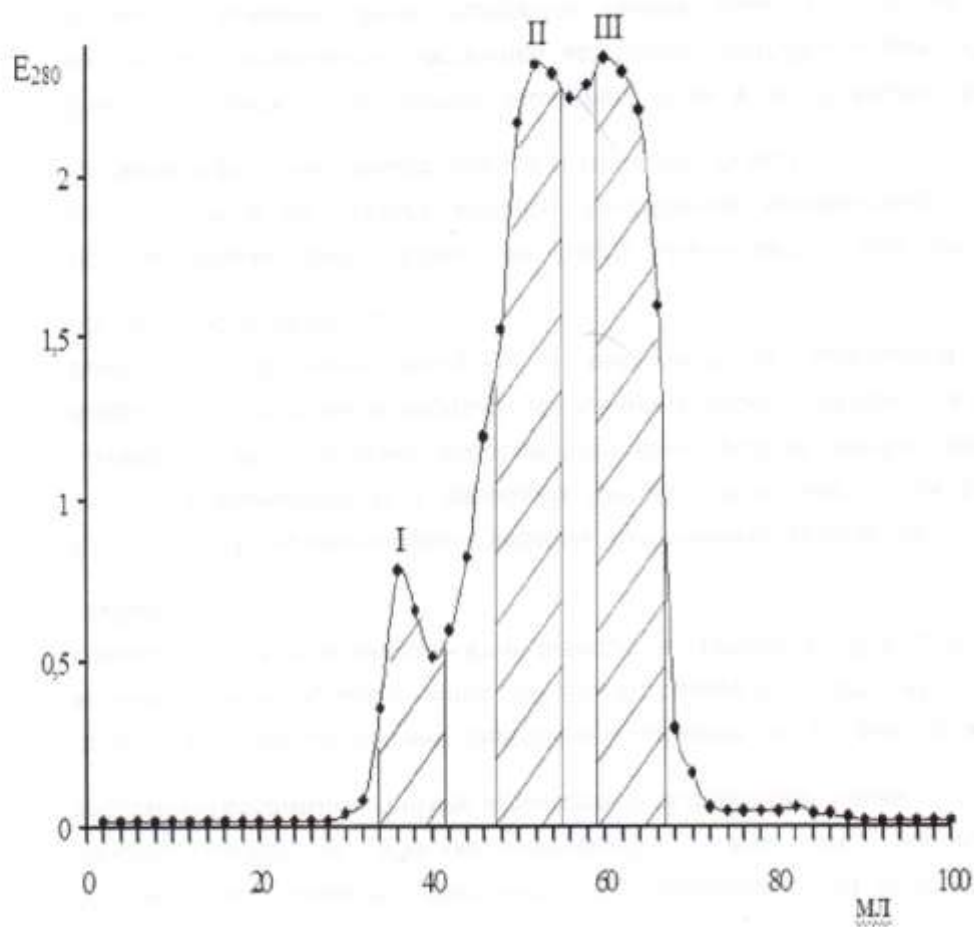


Рис. 3.4. Хроматограма загального казеїну, одержана на сефадексі 6-150.

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата

Результати власних дослідження та їх обговорення

Арк.
36

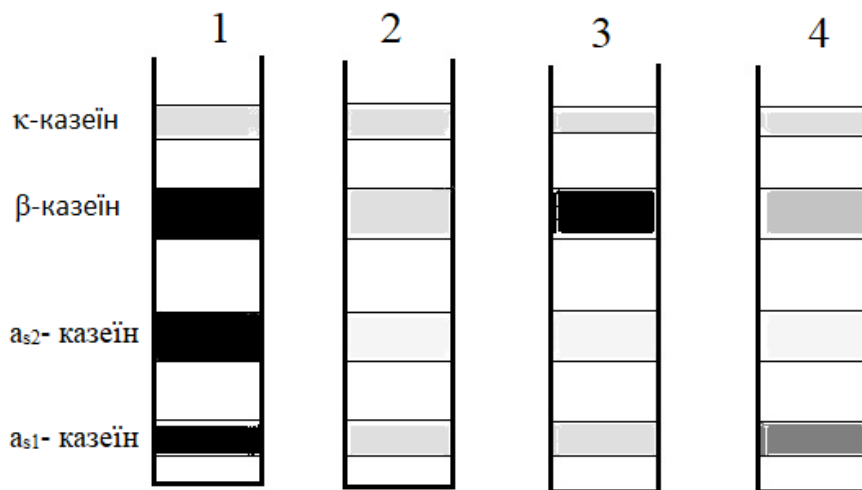


Рис.3.5 . Електрофореграма загального казеїну (1), а також об'єднаних фракцій піків I(2),II(3),III(4) після гел'фільтрації на сефадексі G-150

Фракції заштрихованих секторів відбирали для подальшої очистки і електрофоретичного аналізу. Враховуючи наявність незначних домішок р-казеїну, об'єднані фракції піку I (рис. 3.4) повторно фракціонували на тій же колонці з сефадексом G-150, в умовах, що використовувались для розділення загального казеїну. У колонку вносили 4 мл зразка з  $E_{280}=0,577$ . Результати гель-фільтрації показані на рис. 3.6. На хроматограмі видно один основний пік, об'єм виходу якого співпадає з об'ємом виходу першого піку, отриманого під час гель-фільтрації загального казеїну (рис.3.4.). Крім того, незначна частина білків виходить більшим об'ємом і може включати  $\beta$ -CN і  $\alpha_s$ -CN, а також  $\kappa$ -CN, що не входить до складу агрегатів. Білок із об'єднаних фракцій заштрихованої частини піку (рис. 3.6.) діалізували, осаджували в ізоелектричній точці з допомогою 0,1 Н НСІ, розчиняли в електрофоретичному буфері для зразків і аналізували методом електрофорезу на пластинках ПААГ. Результати електрофорезу показані на рис. 3.7. На електрофореграмі видно  $\kappa$ -казеїн, що утворює характерні розмиті смуги за рахунок варіації у складі олігосахаридів. Розділення  $\alpha_s$ - і  $\beta$ -казеїнів при фракціонуванні загального казеїну на сефадексі не ефективно. Це в першу чергу зумовлено малою різницею їхніх молекулярних мас - близько 400 Да. Проте нерівномірність співвідношення фракцій  $\alpha_s$ - і р-казеїнів при відборі піків II і III свідчить про те, що розділення цих казеїнів певною мірою відбувається (рис. 3.5.). У зв'язку з цим, з метою отримання гомогенних фракцій  $\alpha_s$ - і  $\beta$ -казеїнів ми відбирали не всі хроматографічні фракції, а лише певні сектори піків. Для визначення меж фракцій було проведено повторно гель-фільтрацію об'єднаних фракцій заштрихованої частини піків II і III (рис. 3.4.) на колонці з сефадексом G-150. Для визначення складу об'єднаних фракцій піку II ( $E_{280}=2,797$ ) 4 мл елюату повторно фракціонували на колонці з сефадексом G-150. Результати гель- фільтрації показані на рис. 3.8. На хроматограмі видно один симетричний пік, а також незначну кількість білків, що виходять з колонки з більшим об'ємом елюенту. Фракції піку розділили на три сектори, як показано на

					Результати власних дослідження та їх обговорення	Арк.
						38
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

рисунку. Білки кожного сектору діалізували, осаджували і аналізували методом електрофорезу в ПААГ. Результати електрофорезу показані на рис. 3.9.

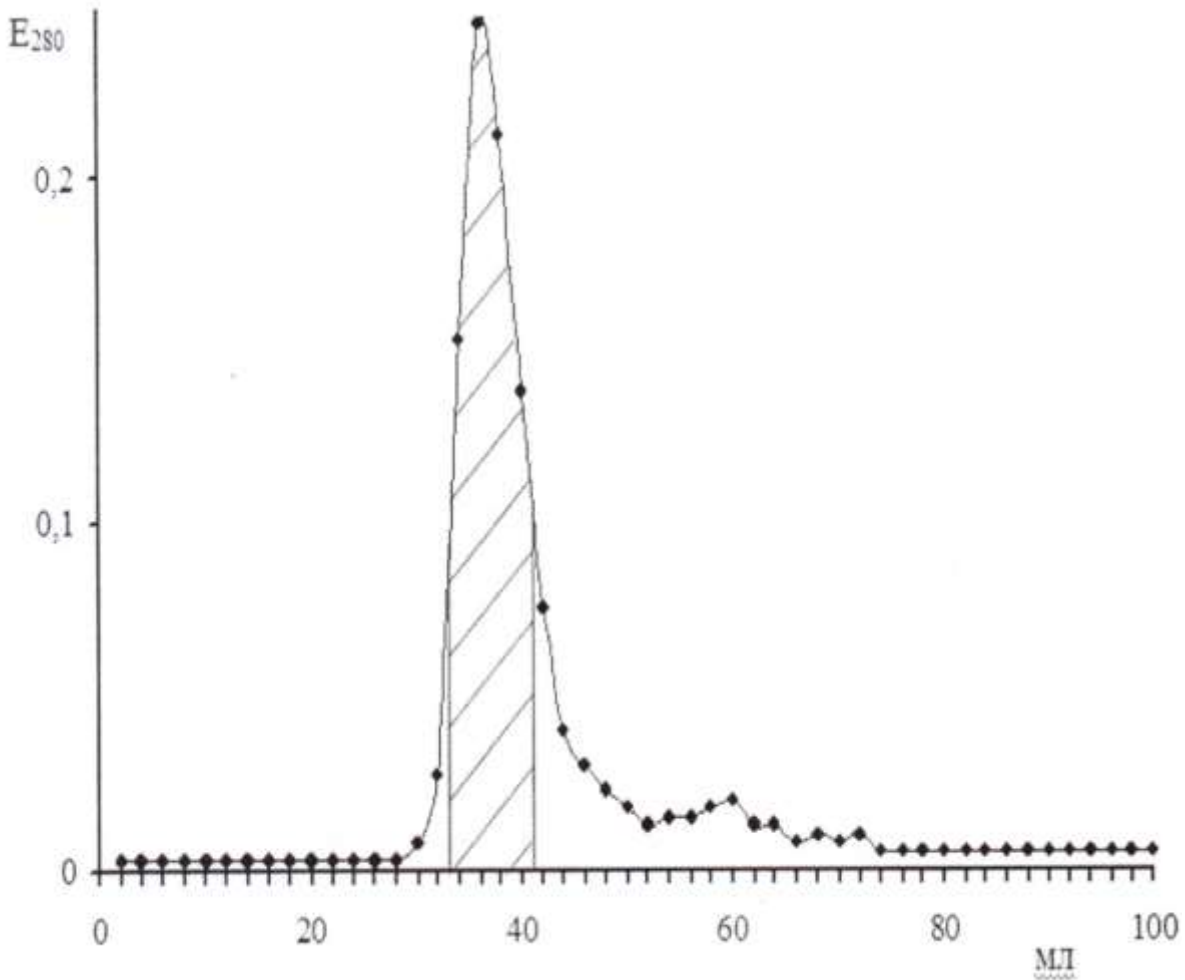


Рис.3.6.Хроматограма білків об'єднаних фракцій піку I після розділення на сефадексі G-150

					Результати власних дослідження та їх обговорення	Арк.
						39
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		



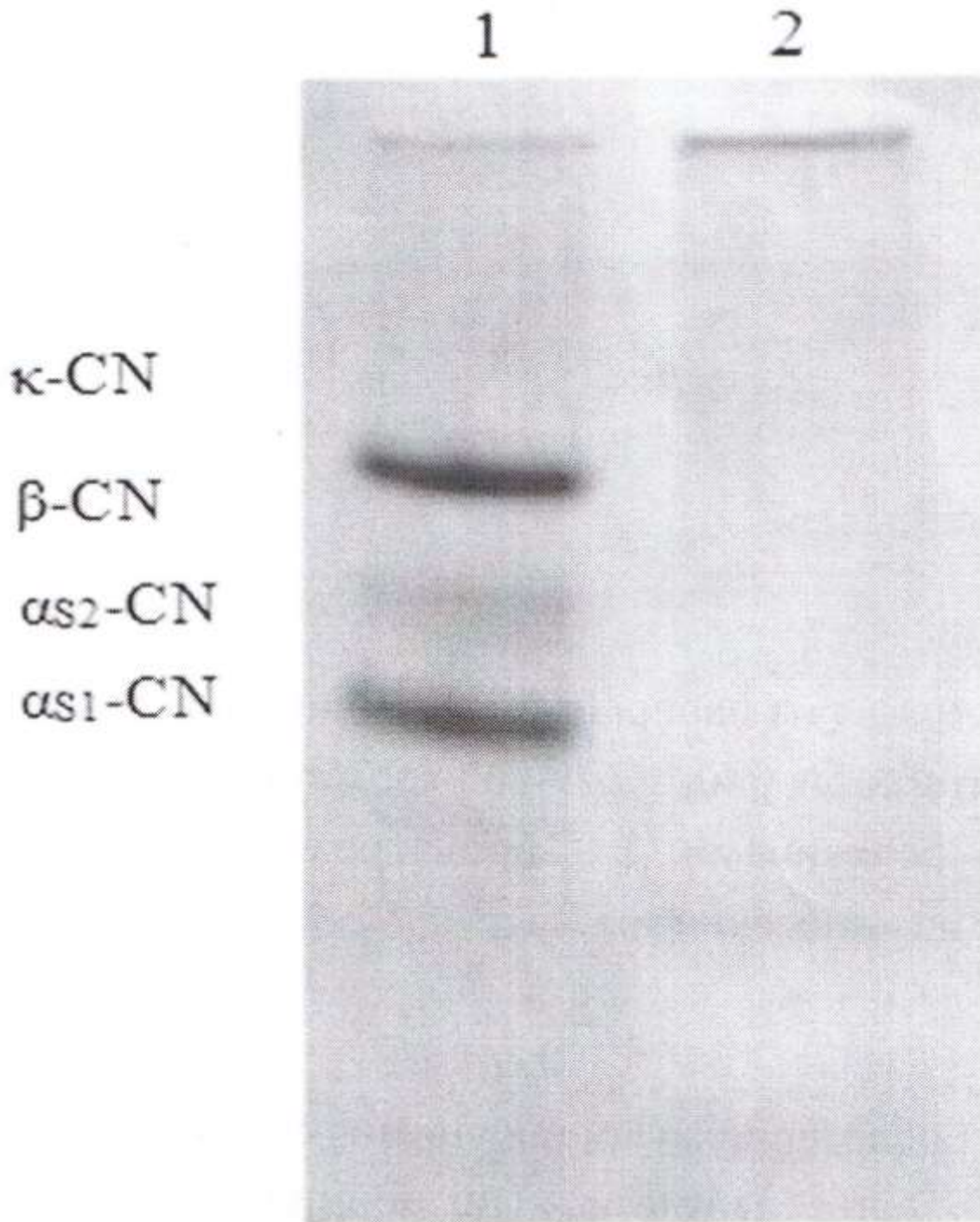


Рис.3.7. Електрофореграма білків, об'єднаних після повторної хронографії піку I(2). Загальний кезеїну-1

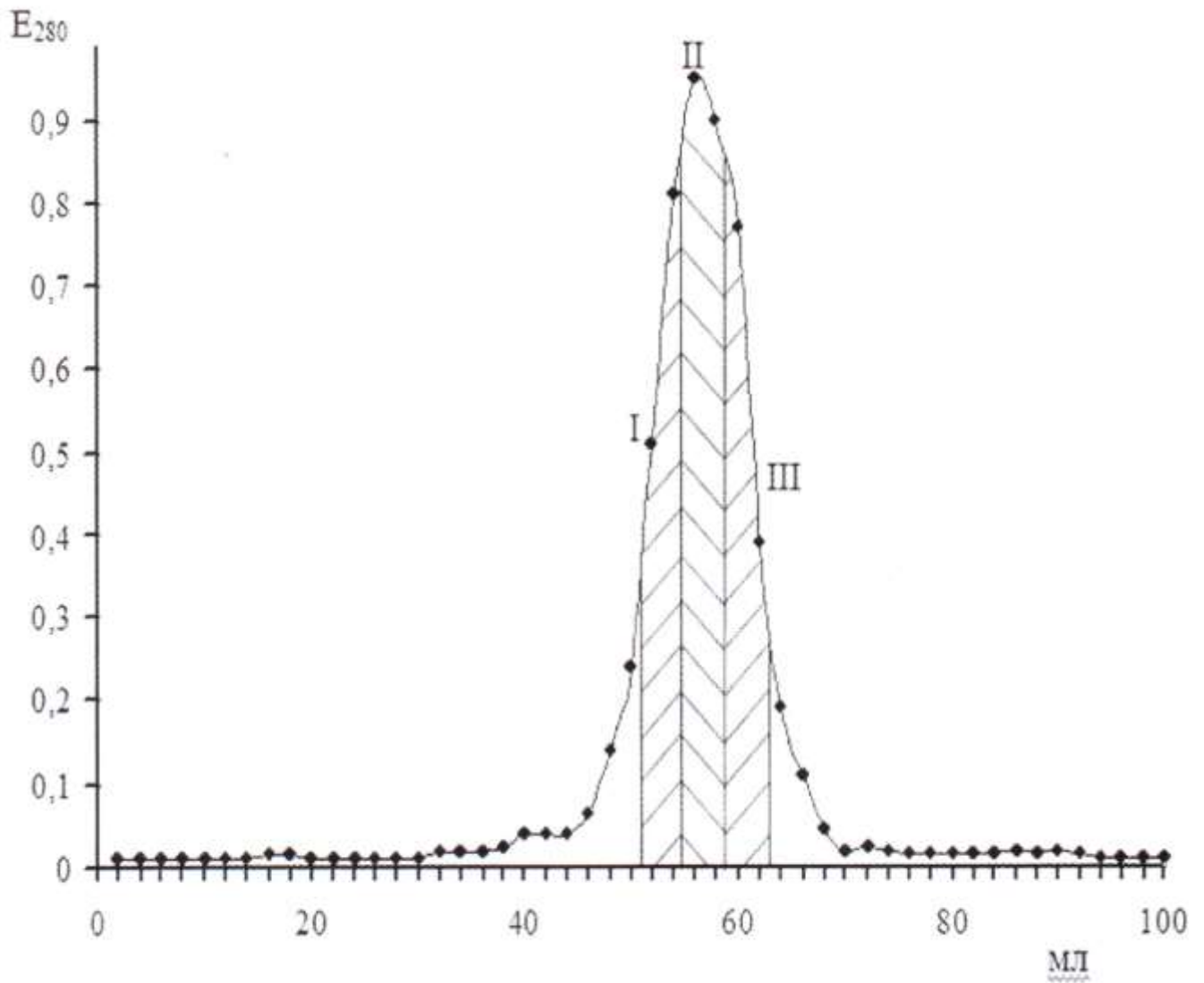


Рис.3.8.Хроматограма білків об'єднаних фракцій піку II(рис.3.4) після загальному казеїну на сефадексі G-150

Результати власних дослідження та їх обговорення

Арк.

41

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата
-----	------	---------	--------	------

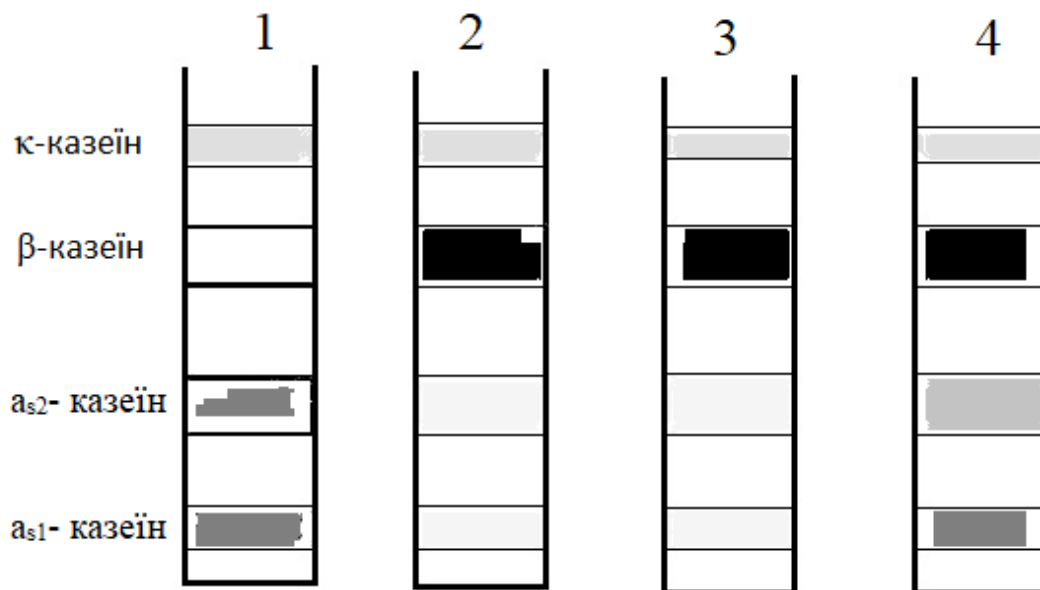


Рис.3.9. Електрофореграма загального казеїну (1) ,секторів I(2),II(3) і III(4) після повторної хроматографії фракцій II(рис.3.8) на сефадексі G-105

Результати власних дослідження та їх обговорення

Арк.

42

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата
-----	------	---------	--------	------

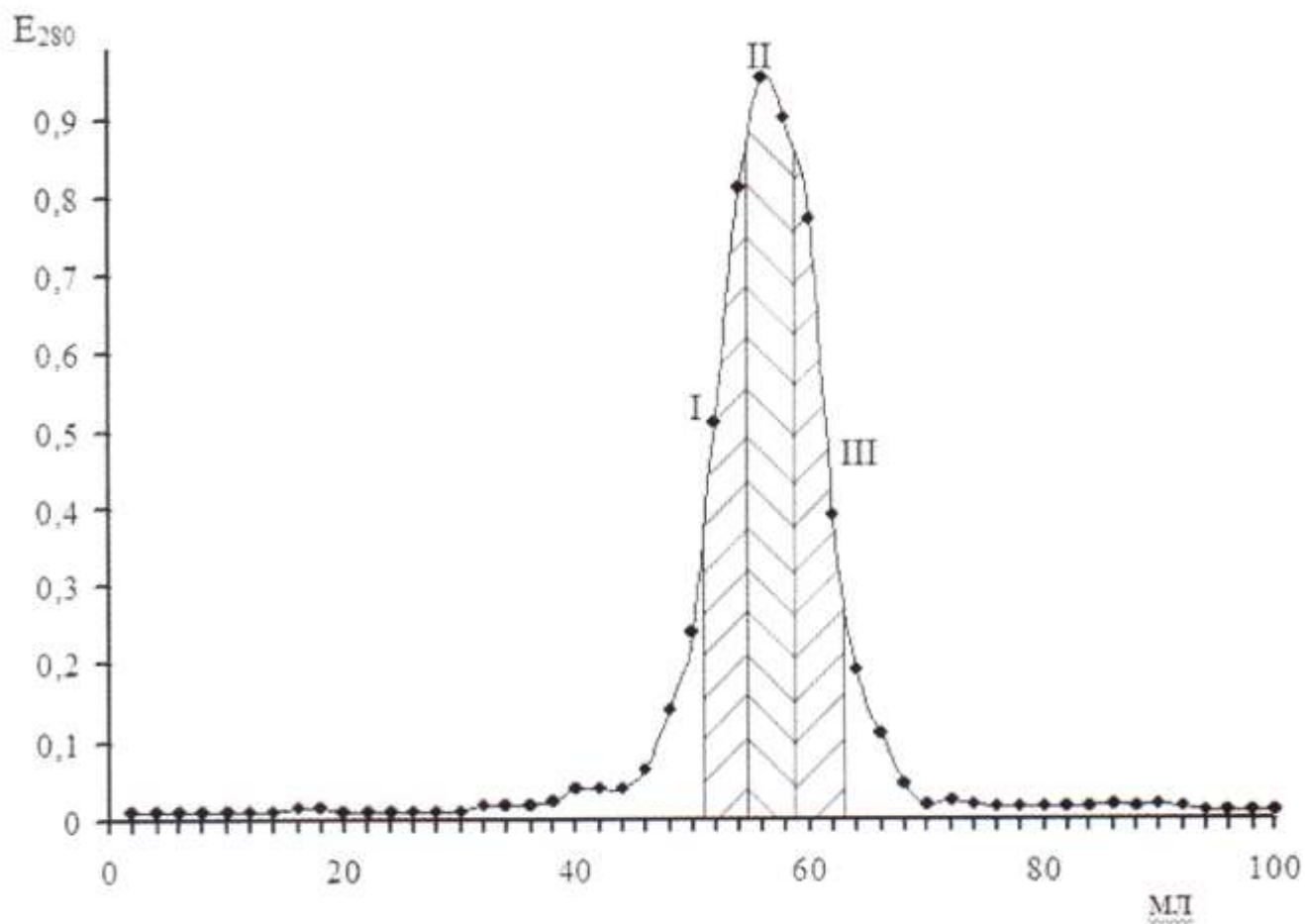


Рис.3.10.Хроматограма об'єднаних фракцій піку III(рис.3.14) після розділення загального казеїну на сефадексі G-150

Результати власних дослідження та їх обговорення

Арк.

43

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата
-----	------	---------	--------	------

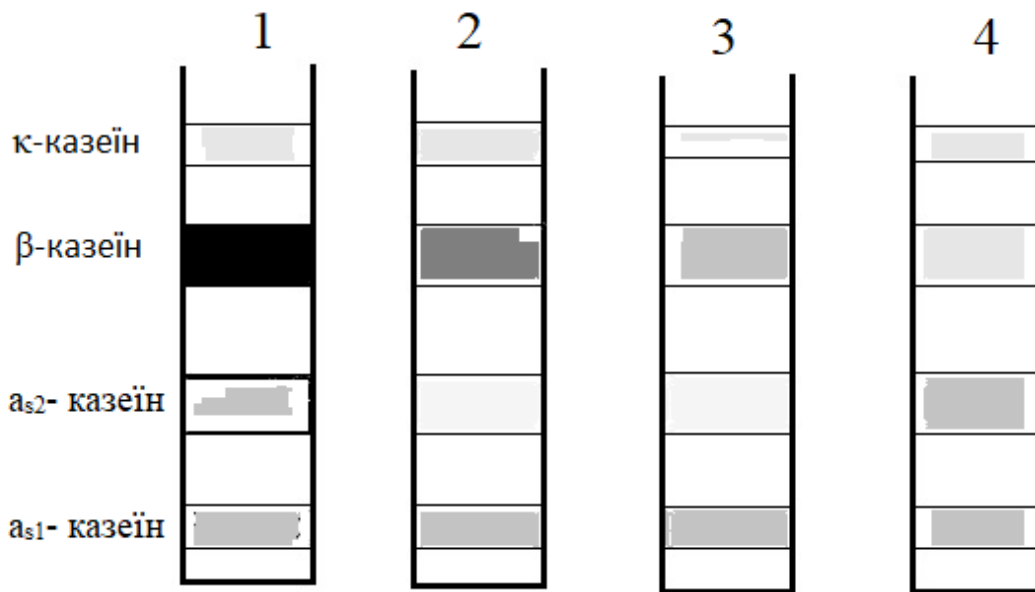


Рис.3.11 Електрофореграма загального казеїну (1),секторів I(2),II(3) та III(4) після повторної хроматографії фракції III(рис.3.10) на сефадексі G-150

Отже, шляхом повторної гель-фільтрації загального казеїну на сефадексіб-150 у присутності сечовини можна виділити гомогенний к-казеїн і частину β-казеїну. Для визначення виходу білків нами була розрахована їхня кількість на різних етапах одного повного циклу фракціонування загального казеїну. Концентрацію казеїнів при цьому визначали спектрофотометрично за відомими коефіцієнтами поглинання -  $E \frac{1\%}{280}$  (8,2 загальний казеїн) і 9,6 (к-казеїн). Після повторної гель-фільтрації кількість білків визначали гравіметрично у діалізованих і ліофільно висушених препаратах. Результати показані в таблиці 3.2 :

Етап фракціонування казеїну		Об'єм, мл	$E_{280}$	Кількість білків, мг	Вихід, %
Загальний казеїн після переосадження із знежиреного молока		7	9,3	79,0	100
Гель-фільтрація загального казеїну (пік 1)		8	0,684	6,0	7,5
Повторна гель-фільтрація піку 1 (к-казеїн)				4,2	5,1
Повторна гель-фільтрація піку II (р-казеїн)	Сектор I			6,2	7,7
	Сектор II			8,3	10,5

Таблиця 3.2

Вихід к- і β-казеїнів при фракціонуванні загального казеїну (79,1 мг) на колонці з сефадексом G-150

					Результати власних дослідження та їх обговорення	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		45

Примітки: 1) Маса препаратів ліофільно висушених після діалізу.

2) Препарати містять сліди  $\alpha_{51}$ -казеїну.

Проведені розрахунки показали, що вихід електрофоретично чистого  $\kappa$ -казеїну після повторної гель-фільтрації становить близько 5 %. За літературними даними, трьохстадійне виділення  $\kappa$ -казеїну шляхом використанням сірчаної кислоти (рН 1,5) і осадження етанолом дає вихід 6,5 %. На нашу думку таке виділення відбувається в дуже жорстких умовах і може привести до змін в структурі  $\kappa$ -казеїну. При диференційному осадженні  $\kappa$ -казеїну етанолом і  $\text{CaCl}_2$  вихід становить біля 1 %. Запропонована нами схема дозволяє забезпечити достатньо високий вихід електрофоретично чистого  $\kappa$ -казеїну у відносно „м'яких” умовах. При цьому отримали також препарати очищеного  $\alpha_{31}$ казеїн і частково очищеного  $\beta$ -казеїну з і

### 3.1.3 Визначення специфічності ензимного препарату “Глек” до казеїнових фракцій

Окрім молокозгортальної активності важливою характеристикою молокозгортальних препаратів є їх протеолітична активність. Попереднє визначення протеолітичної активності препарату «Глек» по відношенню до загального казеїну показало, що вона подібна до активності сичужного ензиму і значно нижча ніж у пепсину. Це може свідчити, що до складу препарату входить переважно хімозин. Для перевірки цього були проведені протеолізи основних казеїнових фракцій за модифікованою методикою Бенкі. Як субстрати використовували 0,5% розчин казеїнових фракцій:  $\alpha_{51}$ -,  $\beta$ - і  $\kappa$ -казеїни. Протеолітичні препарати («Глек» - 1 місяць, сичужний ензим і пепсин) брали у концентраціях, які забезпечували однакову молокозгортальну активність. Співвідношення ензим-субстрат становило 1:100 для пепсину. Концентрацію інших препаратів задавали так, щоб у них була однакова молокозгортальна активність. Протеоліз проводили при значенні рН-7,2 і температурі 35°C. Розчинні у 12% трихлороцтовій кислоті продукти протеолізу визначали

Результати власних дослідження та їх обговорення

Арк.

46

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата
-----	------	---------	--------	------

спектрофотометрично по оптичній густині при  $\lambda=280\text{nm}$ . Але просте визначення оптичної густини не дає можливості об'єктивно порівнювати протеоліз різних фракцій казеїну, оскільки вони відрізняються значеннями коефіцієнтів поглинання (див. «Матеріали і методи»). Тому, щоб значення оптичної густини були пропорційними концентрації продуктів протеолізу, ми їх приводили у відповідність до оптичної густини продуктів протеолізу  $\alpha_{si}$ - казеїну. При цьому значення оптичної густини для гідролізатів  $\theta$ -казеїну множили на 2,17 ( $D_{1\text{cm}\alpha_{si-CN}}^{1\%}/D_{1\text{cm}\beta-CN}^{1\%}$ ) і для  $\kappa$ -казеїну - на 1,04 ( $D_{1\text{cm}\alpha_{si-CN}}^{1\%}/D_{1\text{cm}\beta-CN}^{1\%}$ ). Результати протеолізу представлені на графіках (рис. 3.12; 3.14 і 3.16). Кожна точка є середнім значенням з п'яти вимірів. В результаті видно, що всі препарати активно розщеплюють  $\kappa$ -казеїн. Вищі значення протеолізу у пепсину очевидно досягаються за рахунок неспецифічного протеолізу  $\kappa$ -казеїну (рис.3.16).

					Результати власних дослідження та їх обговорення	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		



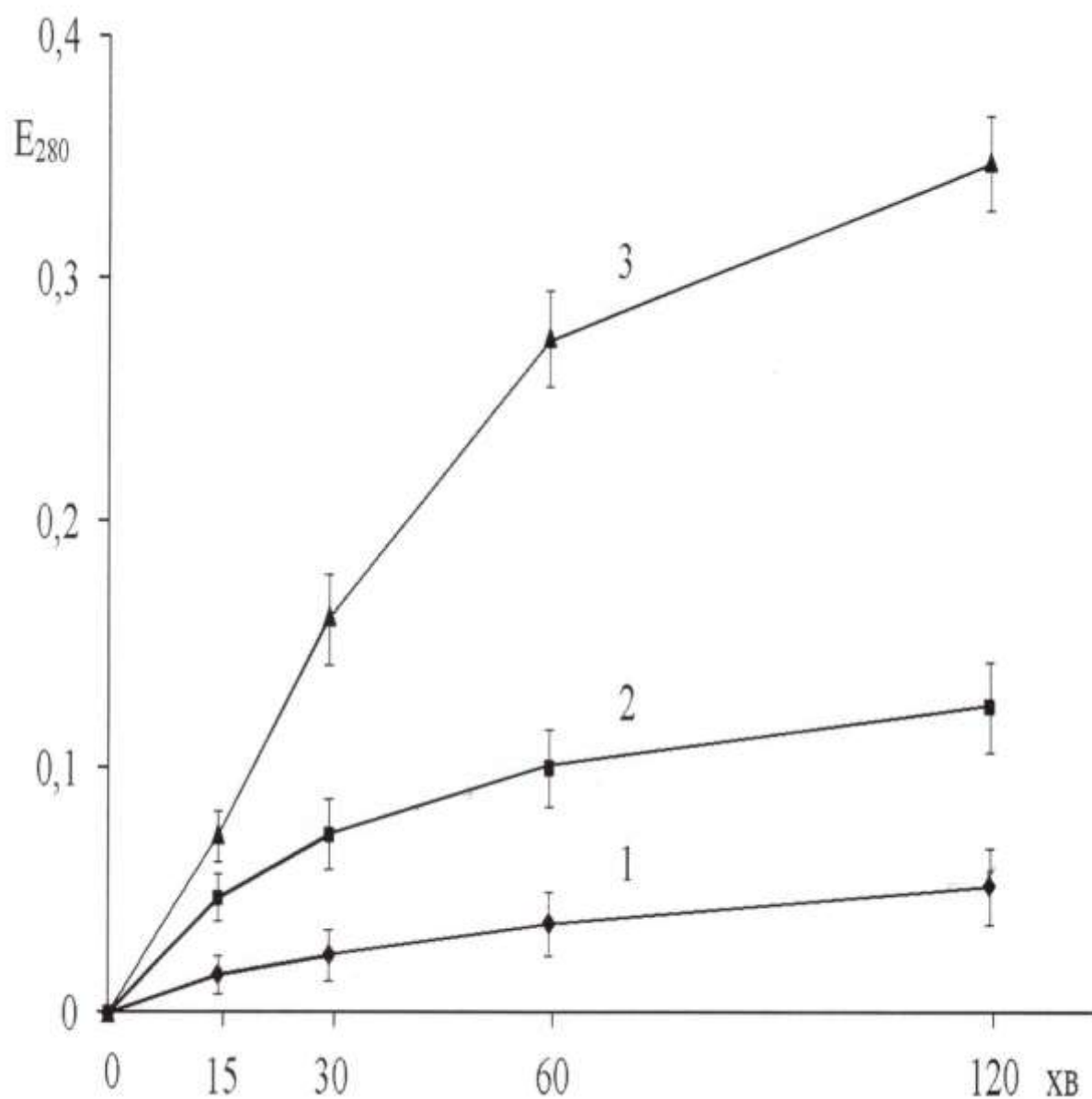


Рис.3.12.Протеоліз  $\alpha_{si}$ -казеїну:1 – молокозгортальний препарат “Глек”; 2-сичужним ензимом; 3- пепсином

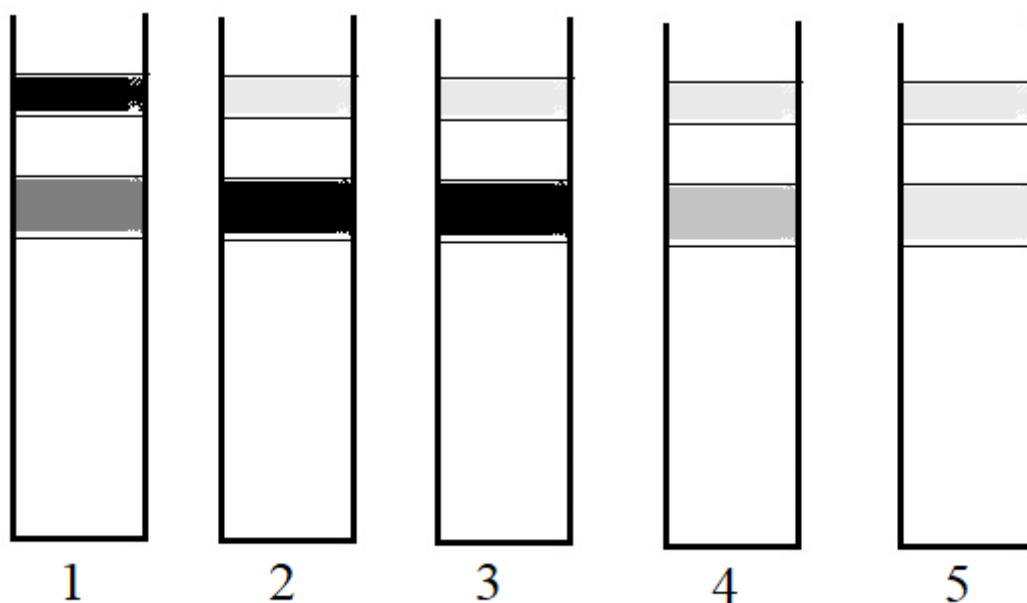


Рис.3.13. Електрофореграма : 1-загального казеїну;2-  $\alpha_{s1}$  – казеїну;3-  $\alpha_{s1}$  – казеїну після протеолізу препаратом “Глек”(60хв); 4-  $\alpha_{s1}$ - казеїну після протеолізу сичужним ензимом(60хв);5-  $\alpha_{s1}$ - казеїну після протеолізу пепсином(60хв)

Результати власних дослідження та їх обговорення

Арк.

49

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата
-----	------	---------	--------	------

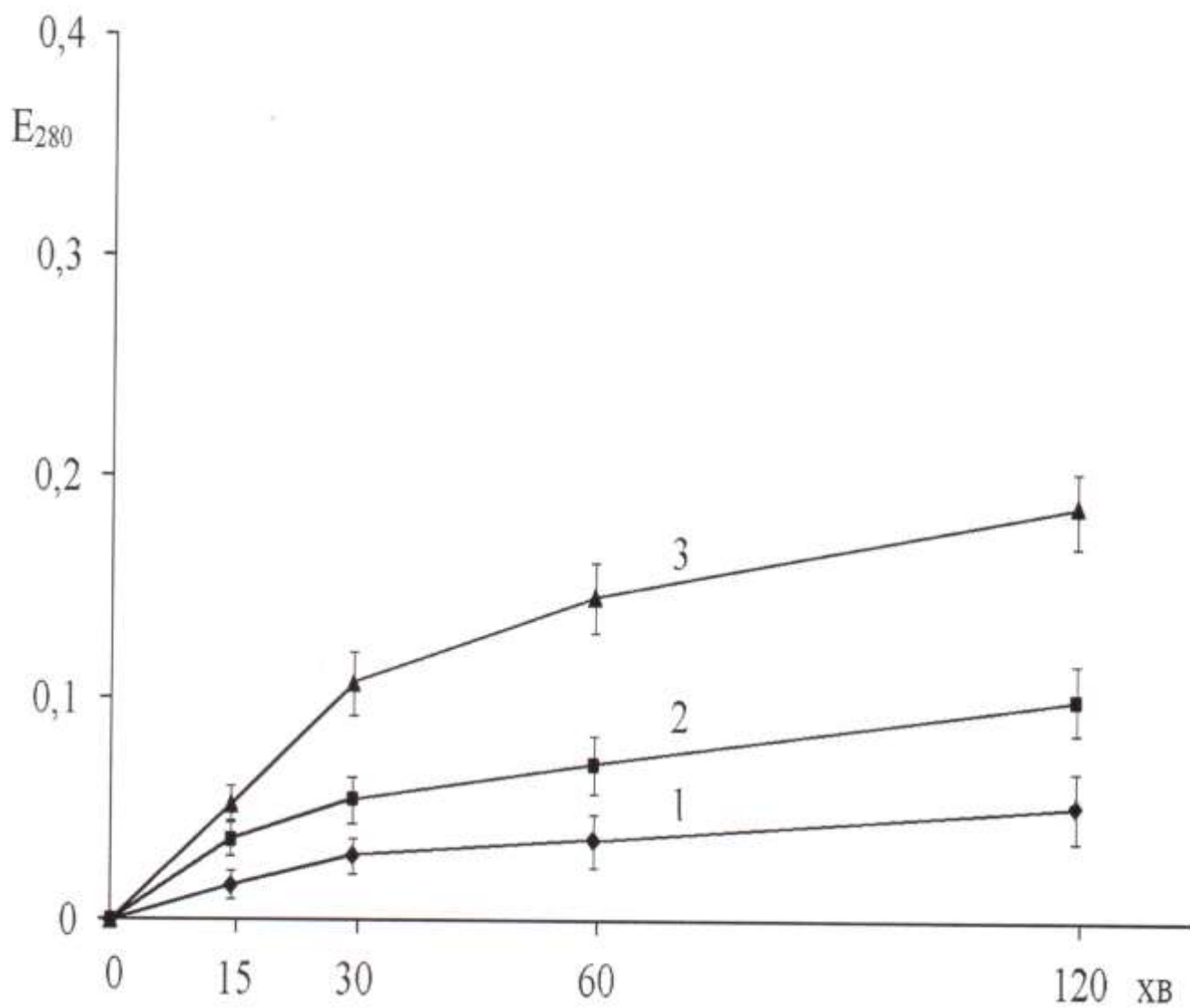


Рис.3.14.Протеоліз  $\beta$ -казеїну :1-молозгортальним препаратом “Глек”;

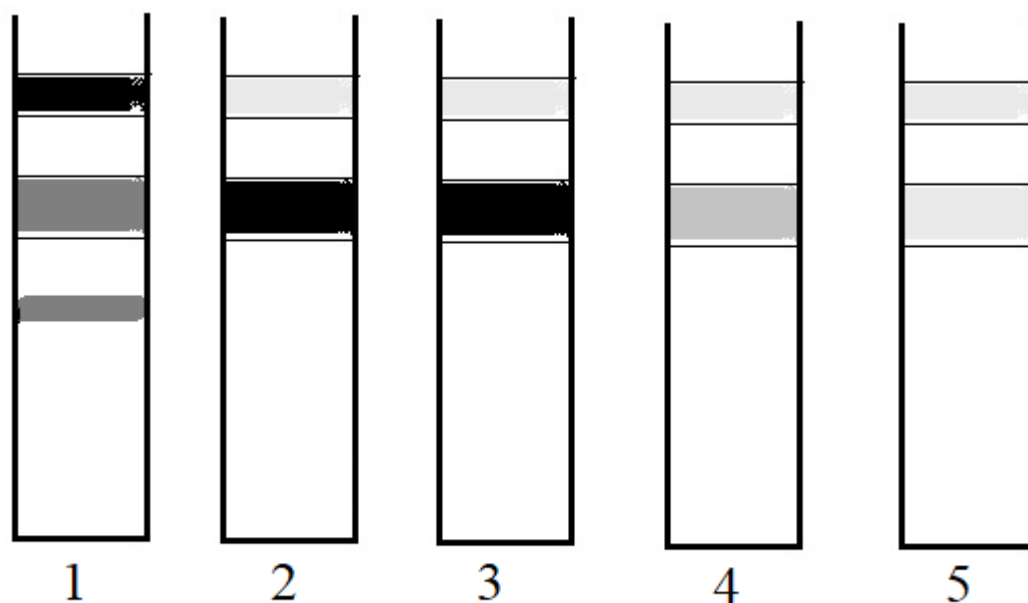


Рис.3.15. Електрофореграма : 1-загального казеїну;2-  $\beta$ - казеїну;3-  $\beta$ - казеїну після протеолізу препаратом “Глек”(60хв); 4-  $\beta$ - казеїну після протеолізу сичужним ензимом(60хв);5-  $\beta$ - казеїну після протеолізу пепсином(60хв)

Результати власних дослідження та їх обговорення

Арк.

51

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата
-----	------	---------	--------	------

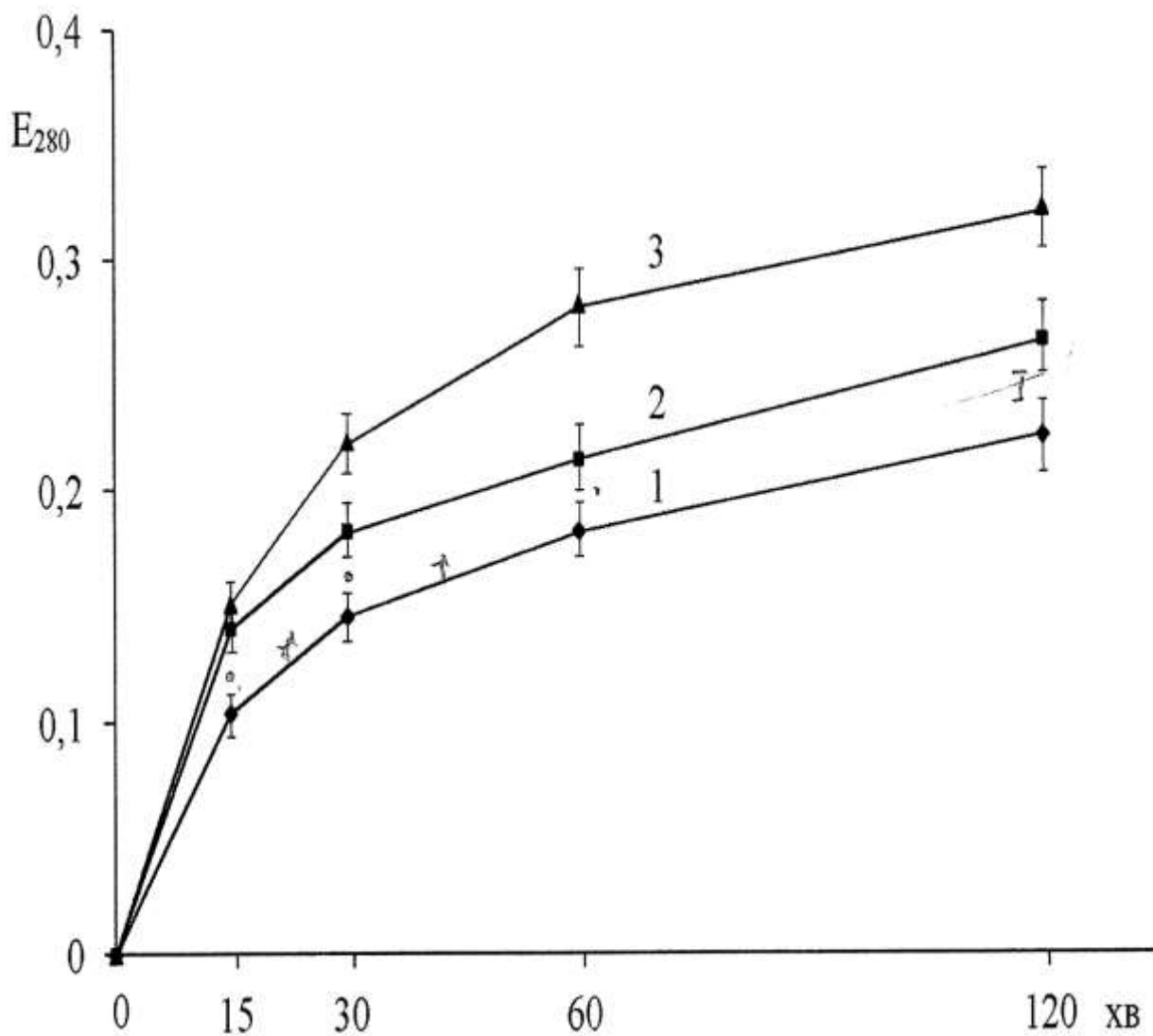


Рис.3.16. Протеоліз κ-казеїну : 1- молокозгортальним препаратом “Глек” ; 2- сичужним ензимом; 3 – пепсином.

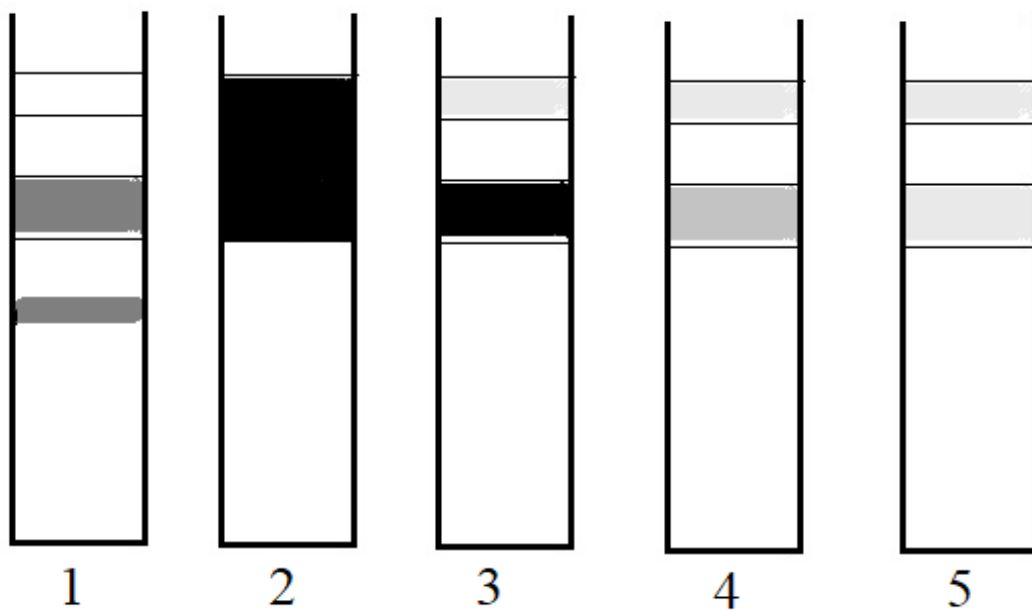


Рис.3.17. Електрофореграма : 1-загального казеїну;2- κ- казеїну;3- κ- казеїну після протеолізу препаратом “Глек”(60хв); 4- κ- казеїну після протеолізу сичужним ензимом(60хв);5- κ- казеїну після протеолізу пепсином(60хв)

При цьому глікомакропептид відсутній, оскільки у лужній буферній системі він не входить у гель. Також на електрофореграмах видно, що  $\alpha_{s1}$ - і  $\beta$ -казеїни за дії препарату «Глек» практично не розпадаються. В той же час сичужний ензим при рівній молокозгортальній активності показує помітний протеоліз  $\alpha_{s1}$ - і  $\beta$ -казеїнів. На рис.3.15 видно характерні пептиди з  $\beta$ -казеїну, які утворюються за дії як сичужного ензиму так і пепсину. Специфічність протеолізу казеїнових фракцій пов'язана з появою дефекту у сирів - гірким смаком. Він проявляється завдяки акумуляції гірких пептидів. Ці пептиди включають багато гідрофобних амінокислот. Серед казеїнових фракцій найбільш гідрофобним є  $\beta$ -казеїн. Особливо його С-кінцева ділянка. Пептиди з цієї ділянки мають екстремально гіркий смак. Також багато гірких пептидів утворюється з  $\alpha_{s1}$ -казеїну.

					Результати власних дослідження та їх обговорення	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		54

## Розділ 4

### Техніко-економічні обґрунтування

Будь-який напрям агробізнесу за умов забезпечення компетентного підходу до його організації і ведення стає зазвичай прибутковим. Зокрема, виробництво сиру в невеликих господарствах фермерського типу є одним із найбільш вигідних видів діяльності у багатьох країнах світу.

Нині займатися виробництвом молока в більшості господарств стало не вигідно, про що досить красномовно свідчить вітчизняна статистика. Якщо раніше поголів'я корів скорочувалося здебільшого в аграрних підприємствах, то останнім часом це відбувається також в фермерських господарствах та у населення. І справа полягає не лише у надто низьких закупівельних цінах, які періодично все-таки зростають та молочній продуктивності корів, що вже досягла в багатьох господарствах рівня 6000-7000 кг.

Вітчизняне виробництво сирів сичужних (тертий, порошоківий, голубий та інший неплавлений сир; крім свіжого сиру, сиру із молочної сироватки та кисломолочного сиру) згідно коду найменування продукції за номенклатурою продукції промисловості (НПП) 10.51.40.50 включає, відповідно сири тверді, м'які і розсільні.

Обсяги виробництва вказаних видів сиру за останні п'ять років щорічно знижувалися за виключенням незначного його росту у 2017 р. За січень-липень 2018 р. загальне виробництво його становить майже 55 тис. тонн, в тому числі за липень — 8 тис. тонн. Наслідком зниження пропозиції продукції на ринку призвело до зростання ціни на неї, а попит населення зменшився.

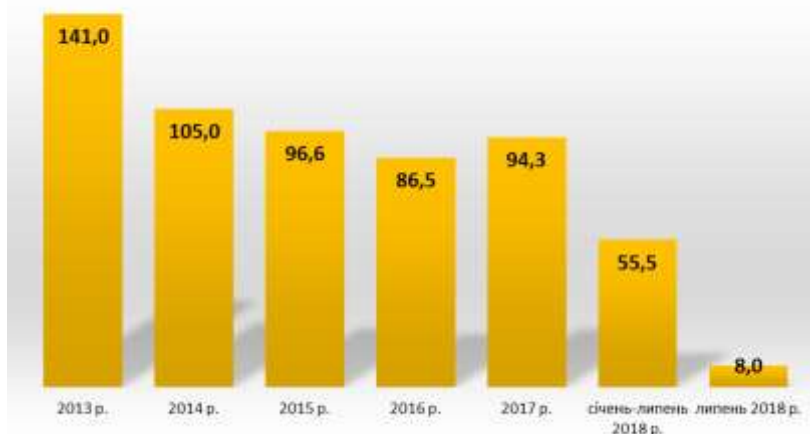
Звідси об'єктивно виникає замкнуте коло проблем у підприємств вітчизняної молокопереробної промисловості, які з однієї сторони відчують дефіцит якісної молочної сировини, а з іншої втрачають внутрішній ринок збуту через високі ціни, що доповнюється окремими перепонами на шляху експорту вказаної продукції на світовий

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Самуляк П.Ю.			<b>Техніко-економічні обґрунтування</b>	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Юкало В.Г.					55	
Затв.		Покотило О.С.						



ринок внаслідок неузгодженості її вимогам сертифікації і високої конкуренції зі сторони місцевих виробників.

Однак, страждає, передусім, вітчизняний його споживач, який через занадто високі ціни та низьку пропозицію якісних сирів змушений обмежувати себе в цьому вкрай корисному продукті харчування.



**Таблиця 4.1 Динаміка обсягу виробництва сирів сичужних за НПП 10.51.40.5 молокопереробними підприємствами України (у тис. тонн).**

Також скорочується безпосередньо шлях аграрної продукції від виробника до споживача, адже зменшується кількість посередників, а отже продукт стає більш доступним для нього за прийнятною ціною. Можна також організувати виробництво сиру безпосередньо між декількома фермерськими господарствами на кооперативних засадах. Саме у цьому полягає сенс сучасного сталого розвитку фермерських господарств за кордоном, який варто і нам запозичити.

Гуцульська бринза стала першим зареєстрованим географічним брендом в Україні. Овеча бриндзя може похвалитися багатовіковою історією. Бо виготовляють її жителі Карпатських гір — у Польщі, Румунії, Словаччині та в трьох областях України: Закарпатській, Івано-Франківській і Чернівецькій — ще з XIV ст. В гуцулів вона вважається більш витриманою, гострішою й тому смачнішою. Але праця вівчарів рік у

рік втрачає популярність, бо вона важка й недооцінена. Вівця дає молоко для сиру тільки чотири місяці на рік (120 днів), а утримувати її треба цілорічно. Овечий сир нині коштує недорого — 100–120 грн за кілограм, максимум — 150–200 грн під час проведення фестивалів. І зовсім не дивно, що поголів'я овець в Україні зменшується. За даними Держстату, нині загальне стадо овець і кіз у господарствах населення не дотягує до 1,4 млн голів. А ще 10 років тому це поголів'я перевищувало 2 млн особин. Ринок бриндзі поки що вельми обмежений. Нині її споживають переважно в карпатському регіоні, де й виробляють. Люди купують бриндзю здебільшого на полонині або вдома у вівчаря. І це не дає можливості підвищити неї ціну. Ще одна проблема — ця назва ніяк не захищена від вільного (вважайте — незаконного) використання: нею можуть користуватися будь-які виробники й торговці на внутрішньому ринку.

Отримавши марку географічного зазначення, виробники цінного виду сиру — гуцульської овечої бринзі, а згодом і коров'ячої — можуть захистити свої права на внутрішньому ринку і вийти на зовнішні ринки, зокрема країн ЄС, таким чином підвищити свої доходи у десятки разів, продаючи цей продукт харчування відчутно дорожче зовнішнім експортерам. З іншого боку — споживачі матимуть гарантію якості сиру з місцевими (регіональними) особливостями. Бо саме географічні зазначення свого часу допомогли здобути визнання далеко за межами зони виробництва таким регіональним продуктам, як, наприклад, алкогольні напої — шампанське, коньяк, сири фета, рокфор, пармезан та інші.

Враховуючи вище наведені дані, актуальним і перспективним є проведення досліджень з визначення процесу виробництва сиру в Карпатах, використовуючи рідкий молокозсідальний препарат «Глек».

					Техніко-економічне обґрунтування	Арк.
						57
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

## Розділ 5

### Екологія

#### 5.1 Екологічні інновації переробки вторинної молочної сировини

Вичерпне використання компонентів молока, одержаного від різних тварин, є проблемним питанням і крім економічної складової містить екологічну складову. На більшості вітчизняних підприємств з переробки молока вторинну молочну сировину (знежирене молоко, пахта, молочна сироватка) переробляють в неповній мірі. З цієї причини втрачається суттєва кількість компонентів - складових молока. Сучасні екологічні вимоги орієнтують підприємства молочної галузі агропромислового комплексу на замкнутий технологічний цикл з «нульовими» скидами в навколишнє природне середовище.

В даний час в процесі отримання молочних продуктів за технологією, що існує на більшості молокопереробних підприємств, отримують побічні продукти - знежирене молоко, пахту і молочну сироватку відповідно до ДСТУ «Продукти молочні і молоковісні. Терміни і визначення» умовно позначені як вторинна молочна сировина.

З неї виробляють молоковісні продукти широкого асортименту, наприклад, сирну продукцію, яка має попит у населення і з цієї причини термін «відходи» по відношенню до вторинної молочної сировини є неприйнятним.

Той факт, що загальні ресурси молочної білково-вуглеводної сировини складають до 70% об'ємів молока, що переробляється, вимагає спеціального підходу до організації вичерпної переробки молочної сировини.

Новий підхід є основою створення безвідходних молокопереробних виробництв, що працюють за замкнутим технологічним циклом, з покращеними екологічними показниками, що також відповідає рекомендаціям провідних міжнародних організацій. На теперішній час такий підхід є актуальним.

<i>Зм. Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			<i>Літ.</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
Розроб.	Самуляк П.Ю			<b>Екологія</b>			58	
Перевіри	Юкало В.Г.							
Консул	Зварич Н.М.							
Затв.	Покотило О.С.							

Продукти, що отримують з вторинної молочної сировини, класифікують, виділяючи продукти із знежиреного молока; продукти з пахти; продукти з молочної сироватки; продукти з суміші знежиреного молока і пахти; продукти з суміші знежиреного молока і/або пахти і молочної сироватки.

При виробництві 1 т вершкового масла отримують до 20 т знежиреного молока і 1,5 т пахти; при виробництві 1 т твердого і кисломолочного сиру - до 9 т молочної сироватки. Знежирене молоко отримують також при нормалізації цілісного молока по жиру.

Світове виробництво сиру складає приблизно 20 млн. тон із виходом сироватки - 160 млн.тон, причому молочна промисловість розвинутих країн переробляє до 95% молочної сироватки. Щорічне виробництво сироватки в Україні становить 2,4 млн.тон і в подальшому її переробляють на сухий продукт.

Неминучість нормативних втрат при переробці молока слід компенсувати шляхом їх зниження за рахунок впровадження нової технології і техніки з критерієм оцінки за втратами окремих компонентів (жир, білок, лактоза); аналізу виробничих процесів за цією ж схемою і постановкою виробничого обліку і контролю у системному вигляді.

Найважливішими складовими інноваційної політики стосовно молокопереробних підприємств є екологічність і безпека продуктів харчування. При цьому головними пріоритетами виступають: технологічне переозброєння молокопереробних підприємств на основі новітніх біотехнологій і нанотехнологій, економія енергетичних і сировинних ресурсів, підвищення рівня конкурентоздатності молокопродуктів.

Оцінка рівня безвідходної технології молочних продуктів і закінченості технологічного циклу слід розраховувати за вартістю продукції з 1 т молочної сировини, ступеня використання сухих речовин і окремих компонентів (жир, білки, лактоза, мінеральні солі, біологічно-активні речовини) або їх енергетичної цінності

					Екологія	Арк.
						59
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

(калорійності).

Вибір умов і оптимізація процесів переробки вторинної молочної сировини припускає присутність інноваційних методів і комп'ютерної підтримки (рис.1).

Основу сучасних безвідходних методів переробки молока складають баромембранні технології, котрі дозволяють максимально використовувати цінні компоненти молока і продуктів його переробки на всіх стадіях процесів.

Класичним прикладом широкого промислового впровадження нанотехнологій в молочну галузь є нанофільтрація і зворотний осмос. Напівпроникні мембрани виготовляють з різних матеріалів - скла, кераміки, полімерної плівки і ін.

Нажаль, в Україні баромембранними методами переробляють лише 1% сироватки від її загальної кількості.



**Рис 5.1.** Вибір умов переробки вторинної молочної сировини

Технології баромембранної фільтрації знайшли широке застосування в різних галузях промисловості для очищення або концентрації рідких середовищ. Основу технологій складають однозначно протікаючі процеси, згідно яким компоненти молочної сировини або концентруються, або видаляються. Вказані процеси розділення при високій ефективності мають мінімальне споживання енергетичних ресурсів і води.

Об'єктами баромембранних технологій є вторинна молочна сировина - знежирене молоко, підсирна і сирна сироватка. Конструктивно розроблені різноманітні типи напівпроникних мембран з органічних і неорганічних матеріалів (полімерні і керамічні).

Устаткування для нанофільтрації також успішно застосовують для очищення розчинів після промивки технологічного устаткування молокозаводів, отримуючи в результаті воду для технічних потреб і осад, що відправляється на регенерацію.

У випадках, коли вторинні молочні ресурси використовуються не повністю, вони потрапляють в стічні води, водоймища і/або ґрунт, що завдає суттєвої шкоди навколишньому природному середовищу. Класичний приклад: 1 тонна молочної сироватки, яка потрапила із стічними водами у водоймище, забруднює його еквівалентно 100 м<sup>3</sup> господарчо-побутових стоків.

При використанні баромембранних пристроїв з метою мікрофільтрації вторинних ресурсів молокопереробних підприємств вдається досягти максимальної проникності для молекул води і мінімальної - для значно більших за розміром, зокрема, молекул білкових компонентів, жирів, вітамінів, комплексів мікро- і макроелементів.

Застосування трекових і ядерних напівпроникних мембран з сумарною поверхнею фільтрації більше 200 тис. м<sup>2</sup> дозволило максимально використовувати молочну сировину і напівфабрикати для отримання цінних харчових продуктів.

Сучасні мембрани у складі плоско-камерних модулів по очищенню молочних продуктів відбирають всі цінні компоненти молочної сировини, а пропускають лише чисту воду, яку використовують у водооборотному циклі і/або для обробки харчового

					Екологія	Арк.
						61
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

устаткування.

У трекових мембран, котрі також використовують з цією метою, всі пори є такими, що "калібруються" - це унікальна їх властивість. Трекові мембрани працюють за ситовим механізмом затримки мікрочасток і тому їх також використовують як еталони для визначення селективності інших типів фільтраційних матеріалів.

Трекові мембрани характеризуються мінімальною дисперсією пір за розмірами (5- 10%), високою селективністю і продуктивністю. Типова трекова мембрана - плівка з поліетилентерефталату або полікарбонату завтовшки від 10 до 25 мкм, в якій створена система крізних пір.

Трекова мембрана - це екологічно чиста полімерна плівка, оброблена на потужному циклотроні шляхом бомбардування іонами інертних газів для отримання найдрібніших пір діаметром 0,1 мкм з щільністю до 400 мільйонів каліброваних мікроотворів на 1 см<sup>2</sup>, що забезпечує гарантовану якість нанофільтрації.

Впровадження баромембранних і нанотехнологій дозволяє отримувати нові продукти і удосконалювати існуючі, при максимальному витяганні з вторинних молочних ресурсів корисних компонентів.

Поява нового покоління кисломолочних продуктів із знежиреного молока і пахти зв'язана також з використанням біфідобактерій, що володіють підвищеною біологічною цінністю, дієтичними властивостями і лікувально-профілактичною спрямованістю для функціонального живлення.

До перспективних відносять і нову технологію із застосуванням біополімерів для направлено розділення знежиреного молока на компоненти і отримання ангіогеніну, тауріну і деяких інших унікальних складових молочної сировини.

Особливо показове використання інноваційних технологій для отримання додаткової кількості молочного білка, наприклад, з підсирної і сирної сироватки, що дозволило збільшити вихід сиру, скоротити виробничі витрати.

В цілому, наукове обґрунтування, розробка і реалізація принципів безвідходних

					Екологія	Арк.
						62
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

технологій дозволить використовувати всі види вторинної молочної сировини і їх окремі компоненти для виробництва якісних, біологічно повноцінних, екологічно безпечних продуктів харчування, кормових і не кормових засобів, технічної товарної продукції, котрі конкурентоздатні на світовому ринку.

					Екологія	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		63



## Розділ 6

### Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях

#### 6.1. Організація та проведення дезактивації продуктів харчування, харчової сировини і знезараження води від НХР

Молочна промисловість уже зараз стикається з певними труднощами у виробництві екологічно чистої продукції. В основному вони пов'язані з високим рівнем забруднення молочної сировини токсичними сполуками, в тому числі і важкими металами. Важкі метали не тільки негативно впливають на організм, але і часто погіршують технологічні властивості сировини тваринного походження, ускладнюючи або роблячи неможливим приготування високоякісних продуктів харчування. В процесі звичайної переробки молочної сировини з'єднання важкі метали з компонентами молока не піддаються значним змінам і їх концентрація в готовому продукті практично аналогічна такій у вихідній. У зв'язку з цим великий інтерес представляють роботи, спрямовані на розробку технологій, впровадження яких у виробництво не вимагає великих капітальних вкладень і високих витрат в процесі роботи. Тому в даний час актуальна розробка найбільш оптимальних способів переробки екологічно неблагополучного молока і вивчення впливу технологічних параметрів виробництва на розподіл важких металів між компонентами молока.

Вся тваринницька продукція, вироблена на забруднених радіонуклідами землях і використовувана для продовольчих цілей, переробки і реалізації на внутрішньому і зовнішньому ринках, повинна відповідати вимогам нормативів, встановлених технічними регламентами та міжнародними договорами. В Україні щодо сільськогосподарської продукції діють наступні державні гігієнічні нормативи вмісту радіонуклідів "Допустимі рівні вмісту радіонуклідів  $^{137}\text{Cs}$  та

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Самуляк П.Ю			Безпека в надзвичайних ситуаціях	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевіри		Юкало В.Г.					64	
Консул		Стадник І.Я.						
Затв.		Покотило О.С.						

90Sr у продуктах харчування та питній воді"(таблиця 1).Молоко з перевищують рівнями забруднення в реалізацію не допускають. Воно може здаватися на молокоприймальних пунктів і перероблятися в молочні продукти (масло, сири). На переробних підприємствах допускається прийом молока з вмістом цезію-137 до 370 Бк/л, стронцію до 18 Бк/л.

№	Найменування продукту	ДР,Cs Бк/кг	ДР,Sr Бк/кг
1	Вода питна	10	5
2	Сире товарне молоко для промислової переробки	100	20
3	Масло вершкове	200	40
4	Сири сичужні тверді,сири розсольні , сири плавлені ,сири голубі	200	100
5	Молоко та вершки концентровані або згущені з наповнювачем	300	60
6	Продукти молочні сухі, у т.ч. молоко, вершки , казеїн та інші; сухі молочні суміші ,концентратори харчові на основі молока	500	100
7	Сире товарне молоко для промислової переробки ( для продуктів дитячого харчування)	40	5

Таблиця 5.1. Допустимі рівні вмісту радіонуклідів 137Cs та 90Sr у продуктах харчування та питній воді

В системі заходів щодо зниження концентрації радіонуклідів в продукції тваринництва застосовуються такі прийоми:

- виробництво кормів з допустимим вмістом радіонуклідів;
- зміна умов утримання і раціонів годівлі великої рогатої худоби, використання найменш забруднених кормів на заключній стадії відгодівлі;

Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата

- введення в раціон спеціальних добавок, що знижують перехід радіонуклідів в продукти тваринництва;
- технологічна переробка продуктів тваринництва;
- перепрофілювання галузей тваринництва (заміна молочного скотарства на м'ясне або скотарства на свинарство, птахівництво).

Технологічна обробка продукції тваринництва дозволяє в значній мірі скоротити надходження цезію-137 і стронцію-90 в організм людини. Різні способи технологічної обробки можуть призводити як до зниження, так і концентрування радіонуклідів в готових до вживання продуктах. В процесі сепарування основна маса радіоізотопів видалається зі знежиреним молоком, і виходять вершки з вмістом радіоактивних речовин в значно менших кількостях. При сепарування молока близько 85% цезію-137, 92% стронцію-90 і 84% йоду-131 переходить в знежирене молоко, в 20% -них вершках знаходиться тільки близько 15% цезію-137, 8% стронцію-90 і 16% йоду -131.

Отримання на сепараторі з молока вершків і подальше розбавлення їх чистою кип'яченою водою - ефективний спосіб зменшення вмісту радіонуклідів в дитячих продуктах харчування. Дво-триразове промивання вершків теплою водою дозволяє знизити кількість радіонуклідів в 50-100 разів по відношенню до вихідного молока.

Вид продукта	Стронцій -90	Йод-131	Цезій-137
Молоко	100	100	100
Вершки	92	84	85
Маслянка	8	16	15
Масло вершкове	6,7	12	13
Масло топлене	1,3	3,5	2,2

Таблиця 5.2 - Перехід радіонуклідів з молока в різні молочні продукти при заводському виготовленні, в% від вмісту в цілісному молоці

Знежирене молоко, в якому залишилася основна частина радіонуклідів, може бути використана для отримання білкових концентратів - сиру і сиру. За здатністю переходити з молока в сир при кислотному способі згортання радіонукліди утворюють ряд: йод-131 > цезій-137 > стронцій-90. Після промивання кислотного згустку відбувається активне вимивання йоду -131 і цезію-137, тоді як стронцій-90 залишається в згустку. У кислотний казеїн з молока надходить 6,3 - 8,2%  $^{90}\text{Sr}$ , 3,0 - 3,9%  $^{137}\text{Cs}$  і лише 1,0 - 1,6%  $^{131}\text{I}$ .

У сирі, отриманому з молочної сироватки, залишається від 74 до 96% радіонуклідів. У кислому сирі міститься до 12%, а в сичужним - 4-23% радіонуклідів від змісту їх у цілісному молоці. З знежиреного молока може бути вироблений домашній сир, в який переходить лише 2,7%  $^{90}\text{Sr}$  і 1,1%  $^{137}\text{Cs}$ . Свіжі сири, одержувані з молока, що згорнулося під дією кислоти або нагрівання, вживають в їжу відразу після приготування, такі сири не зберігаються. Дезактивація молока сорбентами методом іонного обміну із застосуванням іонообмінних смол заснована на їх здатності обмінюватися на катіони  $^{90}\text{Sr}$  і  $^{137}\text{Cs}$  або аніони  $^{131}\text{I}$ , що знаходяться в забрудненому молоці. Метод має два різновиди.

Перша «дозований обмін», тобто змішування смоли і забрудненого радіонуклідами молока з подальшою фільтрацією. Друга передбачає використання іонообмінних колонок, де забруднене молоко пропускається через шар іонообмінної смоли. Після того, як воно пропущено через смолу, вміст стронцію і цезію в ньому зменшується на 80 - 90%. Якщо ж пропустити через аніонообмінна смолу, вміст йоду знизиться більш ніж на 90%. Для дезактивації 1 л молока потрібно 35 - 40 г целюлозного волокна

Знезараження води - це процес видалення мікроорганізмів, вірусів і бактерій. Є два способи провести знезараження води: реагентний спосіб, тобто за допомогою окислювачів, які вбивають живі клітини; безреагентний метод шляхом ультрафіолетового знезараження води, впливу ультразвуку або високих температур. Сьогодні однаково популярні обидва методи, вони успішно застосовуються в поєднанні з різними реагентами і технологіями. Реагентний метод знезараження води здійснюється шляхом додавання в воду сильних хімічних речовин, які володіють окисними властивостями. Серед таких речовин хлор, кисень, озон. Реагентне знезараження води проходить в два етапи, на кожному етапі поступово додається окислювач. Це може бути як один окислювач, так і поєднання, наприклад, озону і хлору. Можливо поєднання і двох методів реагентного і безреагентного, щоб знизити дозу хімічних речовин.

**Знезараження води хлором.** Хлор потрапляє в воду у вигляді газу, де вступає в реакцію з водою, через що відбувається гідроліз хлору і утворюється хлорноватиста кислота. Знезараження води хлором відбувається при низьких температурах і високому тиску. Оскільки хлор є сильною отрутою, зберігають його в ємностях з гарною ізоляцією. Сам же процес хлорування вимагає обережності і особливої уваги.

**Знезараження води натрієм.** Знезараження води натрієм, а точніше його гіпохлоритом, застосовується в промислових масштабах, коли витрата води дуже великий, а зберігати газоподібний хлор немає можливості. Ефективність такого знезараження води не менше, ніж за участю звичайного хлору. Гіпохлорид натрію отримують шляхом електролізу розчину кухонної солі. Цей процес не викликає ніяких труднощів і є хорошою альтернативою хлоруванню газоподібним хлором. Він дуже часто використовується для знезараження стічних вод.

**Озонове знезараження води.** Озон - це один з найпотужніших окислювачів. Більш того озонування найбезпечніший і чистий метод знезараження води. Окислення забруднювачів озоном найефективніший спосіб знезараження стічних вод. Єдиний недолік полягає в швидкості розпаду, тому іноді озон просто не встигає окислити всі органічні сполуки. Через це знезараження води озоном найчастіше застосовують не як окремий процес, а як доповнення до обробки хлором або гіпохлоритом натрію.

Безреагентне знезараження води відбувається за рахунок бактерицидної випромінювання, високої температури або ультразвуку. Але, на жаль, цей метод не може дати стовідсоткової гарантії повного видалення вірусів і бактерій.

**Бактерицидне знезараження води.** У спеціальних установках вода безперервно опромінюється ультрафіолетовими променями. Швидкість цього процесу дуже висока, тому установка працює в безперебійному режимі. Ультрафіолетові промені проникають крізь стінки клітини, і руйнує її. На сьогоднішній день ультрафіолет найпоширеніший метод безреагентного знезараження води, завдяки високій ефективності і недорогій експлуатації.

**Ультразвукове знезараження води.** Ультразвук механічно ушкоджує стінки клітини, після чого вона руйнується повністю. Ультразвук добре працює при високій мутності, великій кількості розчинених речовин і мікроорганізмів. Знезараження ультразвуком - це сучасний метод дезінфекції. Поки він ще не так сильно поширений, як ультрафіолет, але все більше ведуться розмови про його перспективності.

Отже, збільшення техногенного навантаження на навколишнє середовище і як наслідок, погіршення екологічної ситуації, не залишає сумнівів в тому, що вже в самий найближчий час проблема токсикологічної безпеки продуктів харчування придбає особливу значимість. З харчових продуктів, з якими радіонукліди надходять в організм людини, одне з провідних місць займають продукти

тваринництва. У нашій країні основними джерелами надходження радіонуклідів в організм людини є хліб і молоко і в меншій мірі овочі і м'ясо, що пов'язано з особливостями харчування населення. При тому, що після аварії на ЧАЕС звичайні схеми переробки молока можуть бути цілеспрямовано перебудовані для зниження споживання, збереження повноцінного раціону харчування для населення залишається важливою задачею, і цим не слід нехтувати. Зокрема, інтенсивні заходи по виведенню радіостронцію з молока можуть привести до дефіциту кальцію в раціоні. Таким чином, на території з підвищеною щільністю забруднення  $^{90}\text{Sr}$  і  $^{137}\text{Cs}$  молочне тваринництво може служити постачальником сировини для молокопереробної промисловості за умов правильного вибору методу знезараження води.

					Безпека в надзвичайних ситуаціях	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

## 6.2 Охорона праці на молокоперобному підприємстві

Перед молочною промисловістю поставлено завдання підвищення якості продукції, що випускається, для вирішення якої необхідно постійно вдосконалювати матеріально-технічну базу промисловості, прискорювати заміну і модернізацію застарілого обладнання, запровадять нові технологічні процеси, автоматизовані лінії, прогресивні методи та засоби контролю за якістю продукції, покращувати санітарний режим і культуру виробництва, збільшувати випуск продукції в розфасованому вигляді. На всіх підприємствах молочної промисловості має бути впроваджена комплексна система управління якістю продукції з підсистемою санітарно-гігієнічного забезпечення виробництва.

Забезпечити споживачеві повну епідеміологічну безпеку при вживанні молока може лише чітка організація протиепідемічних та санітарно-гігієнічних заходів і контроль на всіх етапах отримання, обробки та надходження молока до споживача.

Випуск промисловістю безпечною для вживання в їжу молочної продукції - серйозне завдання не лише підприємств молочної промисловості, відповідних міністерств, а й державного санітарного нагляду. Чітка організація систематичного, жорсткого контролю з боку санітарно-епідеміологічної служби за дотриманням санітарних норм і правил, правильним веденням технологічного процесу виробництва молочних продуктів, системою виробничого контролю за якістю продукції, що випускається; розробка протиепідемічних заходів та проведення заходів щодо підвищення санітарної рівня і культури виробництва мають важливе значення у випуску епідеміологічно безпечної продукції високої якості.

Відповідно до “Кодексу законів про працю України (КЗпПУ)” проекти будівництва та реконструкції виробничих об'єктів, а також машини, механізми та інше виробниче обладнання, технологічні процеси повинні відповідати вимогам охорони праці.

Нові або реконструюються виробничі об'єкти не можуть бути прийняті в експлуатацію без висновків відповідних органів державного нагляду і контролю за дотриманням вимог охорони праці.

					Охорона праці	Арк.
						71
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		



Дотримання цих вимог починається з вибору необхідної для будівництва підприємства території, розміщення на ній будівель і споруд, визначення їх габаритів, інженерної організації та благоустрою території підприємства. Рішення перерахованих завдань передбачається при розробці генерального плану підприємства і регламентується санітарно-епідеміологічними правилами “Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів” На підприємствах з переробки молока, підлоги у виробничих приміщеннях повинні мати покриття з неслизькою, кислото-і лугостійкі, водонепроникних матеріалів (дозволених до застосування органами і установами держсанепіднагляду України), рівну поверхню без вибоїн з ухилом в бік критих лотків та трапів.

У виробничих приміщеннях повинні бути встановлені педальні бачки з кришками для сміття, а також ємності з полімерних матеріалів для збору санітарного браку. Зберігання у виробничих приміщеннях відходів, а також інвентарю та обладнання, що не використовуються в технологічному процесі, забороняється. Біля робочих місць поблизу технологічного обладнання повинні бути вивішені пам'ятки щодо дотримання санітарно-гігієнічного та технологічного режимів, плакати, попереджувальні написи, графіки та режими миття обладнання, результати оцінки стану робочих місць та інших матеріалів, призначені для виробничого персоналу.

У планах роботи підприємства слід передбачати санітарні дні, не рідше одного разу на місяць, для проведення генерального прибирання та дезінфекції всіх приміщень, обладнання, інвентарю, а також поточного ремонту.

Графік проведення санітарних днів на квартал повинен узгоджуватися з органами та установами держсанепіднагляду. На великих підприємствах допускається проведення санітарних днів по окремих цехах. Для організації проведення санітарного дня на кожному підприємстві повинна бути створена санітарна комісія під головуванням головного інженера, за участю інженерно-технічних працівників, представників громадських організацій, робочих, ВТК і санітарної служби.

Технологічне обладнання, апаратура, посуд, тара, інвентар, плівка та вироби з полімерних та інших синтетичних матеріалів, призначені для розфасовки молока і

					Охорона праці	Арк.
						72
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

молочних продуктів, повинні бути виготовлені з матеріалів, дозволених органами держсанепіднагляду для контакту з харчовими продуктами. Ванни, металевий посуд, спуски, лотки, жолоби і т.д. повинні мати гладкі, легко очищаються внутрішні поверхні, без щілин, зазорів, виступаючих болтів або заклепок, що ускладнюють очистку. Слід уникати використання дерева та інших матеріалів, які погано миються і дезінфікуються. Робочі поверхні (покриття) столів для обробки харчових продуктів повинні бути гладкими, без щілин і зазорів, виготовлені з нержавіючого металу або полімерних матеріалів, дозволених органами держсанепіднагляду для контакту з харчовими продуктами.

Технологічне обладнання та апаратура пофарбовані фарбою світлих тонів (крім обладнання, виготовленого або облицьованого нержавіючим матеріалом), що не містить шкідливих домішок. Забарвлення посуду та інвентарю фарбами, що містять свинець, кадмій, хром не допускається. Розстановка технологічного обладнання повинна проводитися відповідно до технологічної схеми, забезпечення, потоковість технологічного процесу, короткі і прямі комунікації молокопроводів, виключати зустрічні потоки сировини і готової продукції. При розстановці обладнання повинні бути дотримані умови, що забезпечують вільний доступ працюючих до нього, проведення санітарного контролю за виробничими процесами, якістю сировини, напівфабрикатів і готової продукції, а також можливості мийки, збирання та дезінфекції приміщень та обладнання.

Обладнання, апаратура та молокопроводи повинні бути змонтовані таким чином, щоб забезпечувався повний злив молока, миючих і дезінфікуючих розчинів. Всі частини, які контактують з молоком і молочними продуктами, повинні бути доступні для чищення, миття та дезінфекції. Металеві молокопроводи повинні бути роз'ємними. Скляні термометри без захисної оправки до використання не допускаються.

Резервуари для виготовлення і зберігання молока, вершків, сметани та ін молочних продуктів (крім використовуваних для вироблення сиру і сиру) повинні бути забезпечені щільно закриваються кришками. Внутрішньозаводський транспорт і внутріцехова тара

					Охорона праці	Арк.
						73
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

повинні бути закріплені за окремими видами сировини та готової продукції і відповідно промарковані.

Виробнича санітарія - це система організаційних заходів і технічних засобів, що запобігають або зменшують вплив шкідливих факторів на працюючих. Гігієна праці - профілактична медицина, вивчає умови і характер праці і розробляє наукові основи та практичні заходи, спрямовані на профілактику шкідливої і небезпечної дії факторів виробничого середовища і трудового процесу на працюючих.

При проектуванні та реконструкції підприємств молочної промисловості необхідно враховувати санітарно-гігієнічні норми і правила, які пред'являються до організації та гігієни праці. Контроль за умовами праці повинен включати оцінку виробничих факторів (параметри мікроклімату; виробничого шуму на робочих місцях; природного та штучного освітлення; забруднення повітря робочої зони аерозолями і газами; психофізіологічні чинники, пов'язані з характером праці; побутові умови на виробництві; організація харчування; медичне обслуговування). Мікроклімат приміщень (температура, відносна вологість, швидкість руху повітря) повинен відповідати вимогам "Санітарних норм мікроклімату виробничих приміщень". На підприємствах молочної промисловості повинні бути передбачені побутові приміщення відповідно до вимог СНиП "Адміністративні та побутові будівлі" і "Норм технологічного проектування підприємств молочної промисловості".

Адміністрація зобов'язана організувати харчування працюючих (їдальня, буфет, кімнати для прийому їжі). Режим роботи підприємства громадського харчування встановлюється з урахуванням кількості робочих змін, їх тривалості, часу обідньої перерви. Особи, які піддаються впливу шкідливих і несприятливих виробничих факторів, підлягають обов'язковим попереднім і періодичним медичним оглядам відповідно до наказу "Порядку проведення медичних оглядів працівників певних категорій" від 21.05.2007 № 246.

Медичні працівники медико-санітарних частин, підприємства спільно з санітарними лікарями територіальних центрів держсанепіднагляду повинні проводити аналіз стану здоров'я працюючих на підставі вивчення захворюваності з тимчасовою

					Охорона праці	Арк.
						74
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

втратою працездатності, професійної захворюваності і результатів періодичних медичних обстежень. За результатами вивчення стану здоров'я розробляється план оздоровчих заходів. Всі цехи повинні бути забезпечені аптечками для надання першої медичної допомоги.

На підприємствах молочної промисловості особлива увага повинна бути приділена контролю за станом здоров'я працюючих, підвищення санітарної грамотності виробничого персоналу, дотримання ними правил особистої гігієни. Кожен працівник підприємства молочної промисловості несе відповідальність за виконання правил особистої гігієни, стан свого робочого місця, суворе виконання технологічних та санітарних вимог на своїй ділянці. На кожного працівника при вступі на роботу повинна бути оформлена медична книжка, в яку вносять результати всіх медичних обстежень і досліджень, відомості про перенесені інфекційні захворювання, дані про походження навчання за програмою гігієнічної підготовки.

					Охорона праці	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

## Висновки

- Рідкий молокозсідальний препарат володіє високою активністю і залишається стабільним до одного року зберігання.
- Для характеристики специфічності дії рідкого препарату виділені 3 основні субстрати :  $\alpha$ -казеїн,  $\beta$ -казеїн,  $\kappa$ -казеїн.
- На основні порівняння специфічності протеолітичної дії показано, що препарат розщеплює в основному  $\kappa$ -казеїн, тим самим забезпечуючи високу активність.
- Проведені дослідження показали, що рідкий традиційний молокозгортальний препарат характеризується цінними біохімічними властивостями і може забезпечити високу якість сирів, зокрема гуцульської бринзи.

					Висновки	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

## Бібліографія

1. Alais C., Mocquot G., Nitschmann H. S., Zahler P. Das lab und seine wirkung und das Casein der ber die Abapaltung von Nicht-Pro- tein-Stickstoff (NPN) aus casein durch Lab. und ihre Besiehung zur Primarreaktion der Labgerinnug der Milch // *Helv. Chim. Acta.* — 1953. — V. 36. — P. 1955–1968.

2. Fox P. F. Proteins. — *Developments in Dairy Chemistry.* — London — New-York, 1983. — 283 p.

3. Звягинцев В. И., Сергеева Е. Г., Гудков А. В. Заменители сычужного фермента и возмож- ные пути улучшения их качества // *Прикл. биохим. микробиол.* — 1971. — Т. 7. — Вып. 3. — С. 259–371.

4. Применение молокосвертывающих фермен- тов микробного происхождения в сыроделии// *Экспресс-информация. ЦНИИТЭИмясо- молпром. Серия Молочная промышлен- ность. Отечественный производственный опыт.* — М., 1986. — Вып. 8. — 36 с.

5. Сергеева Е. Г., Звягинцев В. И., Крашени- нин П. Ф. Исследование возможности совме- стного применения протеаз микробного и животного происхождения для производ- ства сыра // *Труды ВНИИМС.* — М.: Пище- вая промышленность, 1974. — Вып. XVI. — С. 42–46.

6. Баркан М. С., Рамазанова О. Х., Юлиус А. А. О применении в сыроделии комплекса протео- литических ферментов, выделенных из *Vac. mesentericus* // *Изв. вузов. пиц. технол.* — 1964. — № 6. — С. 58–61.

7. Пакала Э., Антила В. Протеолиз, вызванный молокосвертывающими препаратами при выработке сыра // *Труды XXI Международ- ного молочного конгресса. Краткие сообще- ния.* — М.: ЦНИИТЭИмясомолпром, 1982. — Т. 1. — Кн. 1. — С. 329.

8. Fox P. F. Egzogene proteinaze u mljekarakoj tehnologiji // *Mljkarstvo.* — 1980. — V. 30. — N 12. — P. 363–378. Звягинцев В. И., Сергеева Е. Г., Юлиус А. А.

<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Самуляк П.Ю.</i>					<i>Літ.</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірів</i>	<i>Юкало В.Г.</i>						76	
<i>Затв.</i>	<i>Покотило О.С.</i>							

Исследование характера гидролиза отдельных компонентов казеина некоторыми ферментными препаратами // Вопр. питания. — 1973. — № 3. — С. 26–30.

9. Лебедев А. Б., Толкачев А. Н. Действие сычужного фермента и его заменителей на казеин // Мол. пром. — 1978. — № 1. — С. 19–20.0

10. Visser S. Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review // Neth. Milk Dairy J. — 1981. — V. 35. — P. 65–88.

11. Parry R. M. J., Carrol R. J. Location of  $\alpha$ -casein in milk micelles // Biochim. Biophys. Acta. — 1969. — V. 194, N 1. — P. 138–150.

12. Rose D. A proposed model of micelle structure in bovine milk // Dairy Sci. Abstr. — 1969. — V. 31. — N 4. — P. 171–175.

13. Schmidt D. J. Colloidal aspects of casein // Neth. Milk Dairy J. — 1980. — V. 34, N 1. — P. 42–64.

14. Morr C. V. Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles // J. Dairy Sci. — 1967. — V. 50. — P. 1744–1751.

15. Slattery C. W., Eward R. A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition // Biochim. Biophys. Acta. — 1973. — V. 317. — P. 529–538.

16. Davis D. T., Law A. J. R. An improved method for the quantization fractionation of casein mixtures using ion-exchange chromatography // J. Dairy Res. — 1977. — V. 44. — N 2. — P. 213–221.

17. Grappin R., Rank T. C., Olson P. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review // J. Dairy Sci. — 1985. — V. 68. — N 3. — P. 513–540.

18. Kirchmeier O. Chemismus der milchgerinnung // Milchwissenschaften. — 1969. — V. 24. — P. 336–343.

19. Mc Meekin T. L., Hipp N. I., Groves M. L. The separation of the components of  $\alpha$ s-casein The separation of  $\alpha$ s-casein // Arch. Biochem. Biophys. — 1959. — V. 38. — P. 35–39

						Арк.
						77
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

20. Garnier J. Models of casein micelle structure // *Neth. Milk. Dairy J.* — 1973. — V. 27, N 2–3. — P. 240–248.
21. Звягинцев В. И., Сергеева Е. Г. Методы оценки пригодности молокосвертывающих препаратов — М.: Пищепромиздат, 1962. — 62 с.
22. Калунянц К. А., Смирнова Т. А., Карликанова Н. Р. Интенсификация производства на основе применения протеолитических ферментных препаратов микробного происхождения в молочной промышленности
23. // Обзор. информ. АгроНИИТЭИ. Сер. Молочная промышленность. — М., 1987. — 48 с.
24. Сурков Б. А., Краюшкин В. А., Климовский И. И. Новый подход к стандартизации молокосвертывающих ферментных препаратов // Тр. Междунар. мол. конгресса. Краткие сообщения. — М.: ЦНИИТЭИмясомолпром, 1982. — Т. 1. — Кн. 2. — С. 323–324.
25. Visser S., Van Rocijen P. J., Schattenkern C., Kerling K. E. T. Peptide substrated for chymosin (rennin). Kinetics studies with peptides of different chain length including parts of the sequence 101–112 of bovine  $\alpha$ -casein // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1976. — V. 438. — P. 256–272.
26. Dayhoff M. O. Atlas of proteins sequence and structure. — V. 5. — National Biomedical Research Foundation. — Washington: DC, 1972, 1973, 1976.
27. Hill R. D., Wake R. G. Amphiphil nature of  $\alpha$ -casein as the basis for its micelle stabilizing property // *Nature.* — 1969. — V. 221. — P. 635–639.
28. Jolles J., Alais C., Jolles P. The tryptic peptide with the rennin sensitive linkage of cow's  $\alpha$ -casein // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1968. — V. 168. — N 3. — P. 591–593.
29. Mercier J. C., Uro J., Ribadeau-Dumas B., Grosclaude P. Structure primaire des caseinomacropéptide de la casein  $\alpha$ -B1 bovine // *Eur. J. Biochem.* — 1972. — V. 27. — N 3. — P. 535–547.
30. Green M. L. Review of the progress of dairy science. Milk coagulants // *J. Dairy Res.* — 1977. — V. 44, N 1. — P. 159–188.

						Арк.
						78
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		



31. Visser S., Van Rooijen P. J., Shattenkern C., Kerling K. S. T. Peptide substrates for chy- mosin (rennin). Kinetics studies with bovine  $\alpha$ -casein — (103–108) — hexapeptide ana- logues // Biochim. Biophys. Acta. — 1977. — V. 48. — P. 171–176.

32. Mulvihill D. M., Fox P. F. Proteolytic speci- ficity of chymosins and pepsins on  $\beta$ -casein // Milchwissenschaft. — 1979. — V. 34. — P. 680–683.

33. Visser S., Slangen K. J. On the specificity of chymosin (rennin) in its action on bovine  $\beta$ -casein // Neth. Milk. Dairy J. — 1977. — V. 31. — P. 16–30.

34. Garnot P., Molle D. Influence de la nature et du taux d'inactivation sur le dosage de la chymosine et de la pepsine bovine par electro immuno-diffusion // Lait. — 1982. — V. 62. — P. 671–680.

35. Nitschmann H., Bohner H. V. Kinetic mea- surement of the primary reaction of the ren- net curdling of milk // Helv. Chim. Acta. — 1955. — V. 36. — P. 1953–1963.

36. Vanderpoorten R., Weckx M. Breakdown of casein by rennet and microbial milk- clotting enzymes // Neth. Milk. Dairy J. — 1972. — V. 26. — P. 47–59.

37. Benkha U. Unterauchungen sar wirkung von labraparaten verschiedener heekunft // Milch- wiasenschaft. — 1967. — V. 29, N 9. — P. 563–569.

38. Янковский Д. С., Попова Т. В., Федин Ф. А. Методы выделения и изучения степени очистки казеинового комплекса,  $\alpha$ s- и  $\beta$ - казеина // Направления рационального использования вторичного сырья в молоч- ной промышленности. — К.: УкрНИИТИ, 1981. — С. 113–123.

39. Garnier J., Ribadeau–Dumas B., Mocquot G. A new method for the preparation of an immunologically homogeneous  $\beta$ -casein // J. Dairy Res. — 1964. — V. 31, N 1. — P. 131–137.

40. Теплы М., Машек Я., Гавлова Я. Молоко- свертывающие ферменты животного и микробного происхождения. — М.: Пищевая промышленность, 1980. — 272 с.

						Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		

41. Hess L. E., Alvin F. A new method for measuring sialic acid levels in serum and its application to rheumatic fever // J. Clin. Invest. — 1957. — V. 37, N 3. — P. 449–455.

42. Раманаускас Р., Урбене С. Изменение количества свободных сиаловых кислот во время формирования сгустка // Тр. Лит. фил. ВНИИМС. — Вильнюс: Мокслас, 1973. — Вып. VIII. — С. 145–150.

43. Черников М. П., Никольская Г. В. Роль гликомакропептида в процессе свертывания молока // Прикл. биохим. микробиол. — 1971. — Т. 7. — Вып. 3. — С. 272–273.

44. Мюнх Г., Заупе Х. и др. Микробиология продуктов животного происхождения. — М.: Агропромиздат, 1985. — 590 с.

45. Самойлов В. А., Нистеренко П. Г. и др. Сыр. Технология молочного производства. Том VII. — СПб., 2004. — 826 с.

46. Сирегин И. Г., Михайлов Л. П. и др. Производственно санитарный контроль молока и молочных продуктов. — М., 2009. — 401 с.

47. Скотт Р., Робинсон Р. К. и др. Производство сыра: научные основы и технологии. — СПб.: Профессия, 2005. — 464 с.

48. Мюнх Г., Заупе Х. и др. Микробиология продуктов животного происхождения. — М.: Агропромиздат, 1985. — 590 с.

49. Самойлов В. А., Нистеренко П. Г. и др. Сыр. Технология молочного производства. Том VII. — СССР., 1989. — 826 с.

50. Сирегин И. Г., Михайлов Л. П. и др. Производственно санитарный контроль молока и молочных продуктов. — СССР., 1979. — 401 с.

51. Скотт Р., Робинсон Р. К. и др. Производство сыра: научные основы и технологии. — Астана.: Профессия, 2005. — 464 с.

						Арк.
						80
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата		