

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

Інженерії машин, споруд і технологій

(повна назва факультету)

Харчової біотехнології і хімії

(повна назва кафедри)

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня

Магістр

(назва освітнього ступеня)

на тему: Експрес-метод аналізу білків казеїнового комплексу молока
Express-method of milk casein complex proteins analysis

Виконав(ла): студент(ка) 6 курсу, групи МЛІмз-61
спеціальності 181 «Харчові технології»

(шифр і назва спеціальності)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Керівник

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Нормоконтроль

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Завідувач кафедри

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Рецензент

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Тернопіль, 2020

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Охорона праці.	Окіпний І.Б., в.о.зав. каф		
Безпека у надзвичайних ситуаціях	Клепчик В.М., ст. викл.		
Нормоконтроль			

7. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Аналітичний огляд та патентний пошук інформації	01.07.2020-22.07.2020	
	відповідно до теми дипломної роботи		
2.	Виконання технологічної частини дипломної роботи	01.09.2020-13.09.2020	
3.	Викреслювання листів технологічної частини	14.10.2020-27.10.2020	
4.	Опрацювання методики досліджень	28.10.2020-03.11.2020	
5.	Виконання експериментальних досліджень	04.11.2020-24.11.2020	
6.	Підготовка аркушів науково-дослідної роботи	25.11.2020-1.12.2020	
7.	Збір інформації до виконання розділу «Охорона праці і безпека в надзвичайних ситуаціях»	2.12.2020-8.12.2020	
8.	Закінчення написання розділів	10.12.2020	
9.	Подання дипломної роботи до захисту	24.12.2020	

Студент

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Робота складається із вступу (3), основної частини (61), висновків (1), переліку посилань (6) та додатків (5).

На сьогоднішній день відкрито цілий ряд біологічно активних, пептидів, котрі, власне, утворюються в процесі протеолізу різноманітних казеїнових фракцій. Дослідження і використання цього білкового комплексу, глибоко пов'язане з потребою їх оперативного визначення. Відповідно, метою роботи є розробка електрофоретичної системи для визначення за малі проміжки часу окремих фракцій при серійних дослідженнях і розділенні казеїнового комплексу. Аномальні особливості реакції казеїнів з додецилсульфатом натрію та значення молекулярних мас, що незначно відрізняються, відповідно, за основу було взято систему електрофорезу анодного типу в однорідному поліакриламідному гелі. В цій системі досліджувані казеїни розділяються по зарядах та встановлюються на електрофореграмі у повній відповідності із теперішньою класифікацією. В якості дезагрегуючого агенту до вмісту гелю додається сечовина. На основі аналізу результатів досліджень у виготовленому в лабораторії приладі типу Стадієра із формою електрофоретичної камери змінного типу були встановлені умови швидкого визначення фракцій казеїнового типу. При цьому змінено склад гелевих речовин з включенням 6,6 М сечовини, 3,3% ПААГ та 0,03 М трис-НСІ буферу, рН якого збільшено до 8,3. Термін фарбування скорочено до 1,5 хв. Все це забезпечило можливість вже за 45 хв. визначати всі основні фракції казеїнів. Методика може бути корисною для оперативного визначення фракцій казеїну та при експрес-аналізі натуральності молока і протеїнових молочних продуктів. В такій системі стандартна електрофореграма казеїну суттєво відрізняється від тієї, яка є власне характерною для протеїнів бобів сої.

Ключові слова: *казеїн, ідентифікація казеїнових фракцій, електрофорез.*

ABSTRACT

The work consists of introduction (3), main part (61), conclusions (1), list of references (6) and appendices (5).

On to date, tens of active biologically formed peptides during proteolysis of various fractions of casein are discovered. Taking into attention the complicate nature of heterogeneity of casein the investigations and using this protein complex are closely connected with the necessity of its identification rapid. Therefore, the aim of work is the creation of an electrophoretic system for rapid check of fractions in the studies serial and at the isolation of the casein complex from milk. "Given the anomalous nature of the interaction of the sodium dodecyl sulfate with caseins and close of their molecular masses values the electrophoresis anode system in a polyacrylamide homogeneous gel was taken as a basis". In such a system all caseins are according to their charge separated and on electrophoregram in accordance with the modern classification are located. Urea was only added in gel as disaggregating agent. During investigations on the device manufactured in the laboratory such as variable Stadiera form of the electrophoretic chamber it was established conditions for the rapid identification of casein fractions. The modified gel composition includes: 6.6 M urea, 3.3% SDS and 0.03 M Tris-HCl buffer with increased pH value to 8.3. Staining time is reduced to 1.5 min. Such changes allow fulfilling identification of the main fractions of α -casein during 45 min. This technique may be useful for the quick identification fractions of the casein at their allocation, research, as well as at the rapid analysis of natural milk protein and milk products. In this system the typical electrophoregrams of casein are significantly different from that which characterize soybean proteins.

Keywords: *fractions identification, electrophoresis, casein,*

ЗМІСТ

ВСТУП	7
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1 Будова і властивості протеїнів сої	10
1.1.1 Білкові речовини	10
1.1.2 Харчова цінність білків насіння сої	16
1.1.3 Інгібітори протеїназ	18
1.1.4 Лектини	22
1.1.5. Ліпоксигеназа	23
1.2 Будова і властивості протеїнів казеїнового комплексу	26
1.2.1 Класифікація і номенклатура білків	26
1.2.2 Біологічні функції	27
1.2.3 Казеїн	28
1.3 Протеїни сироватки молока	34
1.3.1 Сироваткові білки	34
2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ	40
2.1 Матеріали і методи дослідження	40
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	45
3.1 Виділення загального казеїну	45
3.2 Виділення казеїнових фракцій молока препаративним електрофорезом	47
3.3 Виділення і очищення $\alpha S1$-казеїну	49
3.4 Ідентифікація протеїнових фракцій казеїнового комплексу	58
4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ	63
4.1 Охорона праці	63
4.1.1 Засоби захисту людини від шкідливих речовин	63
4.1.2 Надання долікарської допомоги при опіках та відмореженні	64
4.2 Безпека в надзвичайних ситуаціях	68
4.2.1 Проведення інструктажу охорони праці у надзвичайних ситуаціях	68
4.2.2 Оцінка стійкості виробництва до надзвичайних ситуаціях	70
ОСНОВНІ ВИСНОВКИ ДИПЛОМНОЇ РОБОТИ	73
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	74

ВСТУП

Протеїни казеїнового комплексу молока мають складну гетерогенну природу [1], яка обумовлена: 1) відмінностями у первинній структурі чотирьох основних фракцій (α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN і κ -CN); 2) обмеженому протеолізу β -CN у процесі синтезу молока природною протеїназою плазміном з утворенням трьох поліпептидів: γ^1 - [β - CN - 1P(f 29 - 209)] , γ^2 - [β - CN - (f106 - 209)], γ^3 ~ [β - CN - (f108 - 209)], які раніше помилково відносили до окремих казеїнових фракцій, 3) відмінностями у кількості фосфорильованих залишків серину, в результаті чого в молоці існує дві групи казеїнів: α_{S1} – і α_{S0} -CN (в основі первинна структура α_{S1} -CN) і α_{S2} -, α_{S3} -, і 2 α_{S6} -CN (в основі первинна структура α_{S2} -CN) і, на кінець, 4) різниці в будові та кількості олігосахаридних груп у κ -CN. Все це зумовлює існування одного основного фосфопротеїну (κ -CN) і дев'яти мінорних фосфоглікопротеїнів. Причому, одночасно у молоці від однієї тварини їх буває від 3 до 5 [20].

Питання ідентифікації казеїнових фракцій тісно пов'язане з дослідженнями їх основної функції - забезпечення протеїнового живлення організму ссавців у постнатальний період. В останні роки інтерес до виділення гомогенних казеїнових фракцій значно виріс у зв'язку з відкриттям нової групи біоактивних пептидів-формонів (від food hormones). Такі пептиди проявляють широкку гаму біологічного впливу на фізіологічні системи організму. Формони утворюються в результаті протеолізу казеїнів у травному тракті або в результаті дії на казеїн протеаз молочнокислих бактерій та молокозгортальних ензимів. На сьогоднішній день виділено декілька десятків біоактивних пептидів з різних казеїнових фракцій [49]. Деякі з них вже знайшли застосування як біоактивні добавки, функціональні інгредієнти.

Найчастіше для ідентифікації протеїнів казеїнового комплексу використовують електрофоретичні методи. Проте, нажаль, найбільш поширені електрофоретичні системи для аналізу протеїнів у поліакриламідному гелі (ПААГ) з додецилсульфатом натрію (ДСН) виявилися малоефективними. Це пов'язано з аномальним характером взаємодії фракцій казеїну з ДСН, а також близькими значеннями молекулярних мас окремих фракцій α_{S1} і α_{S2} - груп казеїнів. Анодні системи електрофорезу за присутності сечовини дозволяють ідентифікувати казеїнові фракції у відповідності до сучасної класифікації (7). Проте вони не розраховані на проведення оперативного дослідження великої кількості зразків і основним їх недоліком є висока тривалість аналізу.

Метою роботи: є створення електрофоретичної системи для експрес-аналізу фракційного складу білків казеїну молока.

Об'єкт дослідження – казеїни молока.

Предмет дослідження – методи аналізу білків казеїнового комплексу молока.

Методи досліджень: біохімічні, електрофорезні, РН, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше розроблено методику експрес-фракційного складу білків казеїнового комплексу молока на основі аналітичного варіанту електрофорезу в однорідному ПААГ у присутності сечовини.

Практичне значення одержаних результатів.

Запропонована методика може бути використана для експрес-аналізу в процесі контролю виробництва молочних білкових продуктів. Ця методика може бути корисна при встановленні натуральності молочних продуктів.

Особистий внесок. У роботі патором особисто було виконано патентно-літературного огляду з теми кваліфікаційної роботи, проведенні-хіміко фізичних досліджень, а також формуванні висновків та підготовці матеріалів до публікації.

Апробація результатів. Виступ на IV Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» на тему: «Електрофоретичний аналіз продуктів протеолізу казеїну».

Структура і обсяг роботи. Робота складається із вступу (3), основної частини (68), висновків (1), переліку посилань (6) та додатків (1).

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Будова і властивості протеїнів сої

1.1.1 Білкові речовини

Білки відіграють в харчуванні людини надзвичайно важливу роль, так як є головною складовою частиною всіх клітин організму. Білки не утворюються в організмі людини з інших харчових речовин і не накопичуються. Тому вони повинні постійно надходити в наш організм з їжею. Відповідно до віку, статі, фізіологічного стану організму, характеру трудової діяльності людини потреба білка різна. Добова норма білку в середньому становить 80-120 г. За рахунок білків в їжі повинно забезпечуватися 11-13% енергетичної потреби організму. Поданим Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я нижня межа споживання білка для дорослих становить 0,75 г / кг маси тіла [5].

Недостатність надходження білка з їжею, а також, власне, тривале вживання білків з низькою біологічною цінністю призводять до білкової недостатності, що виявляється в зниженні маси тіла, уповільненні зростання і розвитку, зниженні імунітету, відповідно, порушення функції печінки, також підшлункової залози, кровотворних органів. У той же час надмірне споживання білка викликає гіпертрофію печінки і нирок, пригнічення кишкової мікрофлори і, відповідно, посилення процесів гниття в кишечнику. Відбувається накопичення похідних сечової кислоти (пуринів, уратів), що призводить до розвитку подагри і сечокам'яної хвороби [2,11].

В організмі білки їжі розпадаються на окремі амінокислоти, з яких будуються білки, необхідні людині. З 20 амінокислот, що входять до складу білків, 8 є незамінними, так званими есенціальними, оскільки не

синтезуються в організмі людини. Дефіцит будь-який з цих амінокислот в раціоні веде до порушення синтезу білка.

Якість харчового білка визначається його біологічною цінністю і засвоюваністю. Біологічна цінність залежить від змісту і співвідношення входять до складу білків незамінних амінокислот і відображає ступінь відповідності амінокислотного складу білка потребам організму людини.

Найбільшою біологічною цінністю володіють білки тваринного походження. За змістом незамінних амінокислот, скажімо, білки рослинного походження значно їм поступаються. Однак білки насіння сої, відповідно, займають проміжне положення по біологічній цінності між білками тваринного і, власне, рослинного походження, наближаючись за амінокислотним складом до стандартного білку з ідеальним амінокислотним складом (табл.1.1). [49] За змістом такої найважливішої амінокислоти як метіонін насіння сої рівноцінні сиру, як відомо, триптофану в них в 3 рази більше, аніж в хлібних злаках.

Засвоюваність білків рослинного походження нижче, ніж білків тваринного походження, оскільки вони укладені в щільні оболонки з клітковини, що ускладнює проникнення травних ферментів всередину клітини. Засвоюваність білків м'яса і риби становить 93-95%, молока і яєць - 96-98%, овочів і круп - 80%, бобових - 70%. Однак дезінтеграція клітинних структур насіння сої або виділення білків з них в ході переробки підвищує засвоюваність білків насіння сої до 91-94%. За анаболічної ефективності білки насіння сої, як правило, не поступаються білкам тваринного походження.

Якщо порівняти вміст білка в 100 г продукту, то насіння сої виходять на перше місце серед всіх продуктів харчування. У насінні сої міститься в 2 рази більше білка, ніж в телятині, в 3 рази більше, ніж в яйцях, в 11 разів більше, ніж у коров'ячому молоці, і набагато більше, ніж в будь-яких рослинних продуктах.

Таблиця 1.1 - Вміст незамінних амінокислот у деяких білках (г / 100 г білка)

Амінокислота	Ідеальний білок (по шкалі ФАО/ВОЗ)	Білок насіння сої	Білок пшениці	Білок молока	Білок яловичини
Ізолейцин	4,0	4,7	3,3	5,4	4,3
Лейцин	7,0	7,9	8,1	9,5	7,8
Лізин	5,5	6,3	2,7	8,1	8,3
Метіонін+цистин	3,5	3,0	3,8	3,2	4,0
Фенілаланін+тирозин	6,0	9,1	7,8	10,2	7,7
Треонін	4,0	3,9	2,9	4,7	4,2
Триптофан	1,0	1,3	1,2	1,4	1,2
Валін	5,0	5,1	4,3	7,7	5,4

Білки насіння сої мають ряд унікальних властивостей. Регулярне вживання білків насіння сої надає специфічну позитивну дію на вміст холестерину в крові - знижує рівень загального і "шкідливого" холестерину (ліпопротеїнів низької щільності) і підвищує рівень "корисного" холестерину (ліпопротеїнів високої щільності), знижує рівень сироваткових ліпідів. У зв'язку з цим білки насіння сої розглядаються як засіб профілактики і лікування таких захворювань, як атеросклероз, цукровий діабет, гіпертонічна хвороба, ендокринні розлади при гінекологічних захворюваннях, остеопороз, ожиріння, алергії, захворювання нирок, онкологічні захворювання, порушення моторної функції кишечника.

Білок насіння сої ефективно покращує сумарна якість харчового білка при використанні його спільно з іншими білками, наприклад, рослинними. Вчені рекомендують щодня споживати 25 г соєвого білка.

Необхідно відзначити, що технологія переробки насіння сої досягла такого рівня, який при заміні тваринного білка соєвим дозволяє їжі зберігати звичний смак і якість і набувати при цьому дієтичні властивості.

Згідно біологічної класифікації білки насіння сої поділяють на метаболічні та запасні. Метаболічні білки - це ферменти і структурні білки, які забезпечують клітинну активність, включаючи синтез вторинних продуктів обміну речовин. Запасні білки разом з резервними ліпідами синтезуються в процесі розвитку насіння сої. При проростанні насіння вони служать джерелом азоту та вуглецю. Більшість білків є запасними.

За розчинності білки насіння сої поділяють на водорозчинні альбуміни і соле розчинні глобуліни. Більшість білків насіння сої (близько 50%) відноситься до глобулінів, які в свою чергу поділяються на легуміни і віціліни. Легуміни - високомолекулярні білки, які мають меншу розчинність в сольових розчинах і велику термостабільність. Вони становлять більшу частину глобулінів бобових. У соєвому насінні містяться також специфічні білки – гліцинін і конгліциніни.

Як відомо, найбільш поширеною є класифікація білків по розчинності, проте в деяких випадках вона не дуже зручна. Більш зручною в цьому випадку є класифікація, заснована на швидкості осадження при ультрацентрифугуванні. Соєвий білок підрозділяють, таким чином, на 4 фракції: 2 S, 7 S, 11 S та 15 S, (S- коефіцієнт Сведберга, який виражає швидкість седиментації на одиницю прикладеної сили), що складають відповідно 8%, 35%, 52% і 5% від загального вмісту білків в насінні сої. Склад і номенклатура резервних соєвих білків показані на рис. 2

Як показали дослідження, є суттєві відмінності в будові цих фракцій. 11 S та 15 S є чистими білками - протеїнами. Фракції 2 S і S Б є протеїдами. Сюди входять деякі ферменти (амілази, ліпоксигенази), цитохром С, гемагглютіни. Фракції 11 S і 7 S складають близько 30% екстрагується білка, фракція 2 S - 20% і 15 Б-10% [69].

2 S і 7 S фракції являються гетерогенними. 2 S становить 20% білків, які екстрагуються, і включає інгібітори трипсину (Кунітца і Баумана-Бирка) і цитохром С.

7 S фракція складається з α -амілази, ліпоксигенази і гемаглютеніна.

7 S глобуліни (β -конгліцинін) є олігомером з молекулярною масою близько 180 кДа. Він утворюється переважно з трьох типів субодиниць, які називаються α -, α -, β - і мають відповідні молекулярні маси - 57, 57 і 42 кДа.

α -, α -субодиниці близькі за амінокислотним складом, вони містять багато цистеїну і мало метіоніну.

β -субодиниці взагалі не містять метіоніну, вони є глікопротеїдами і містять 4-5% вуглеводів.

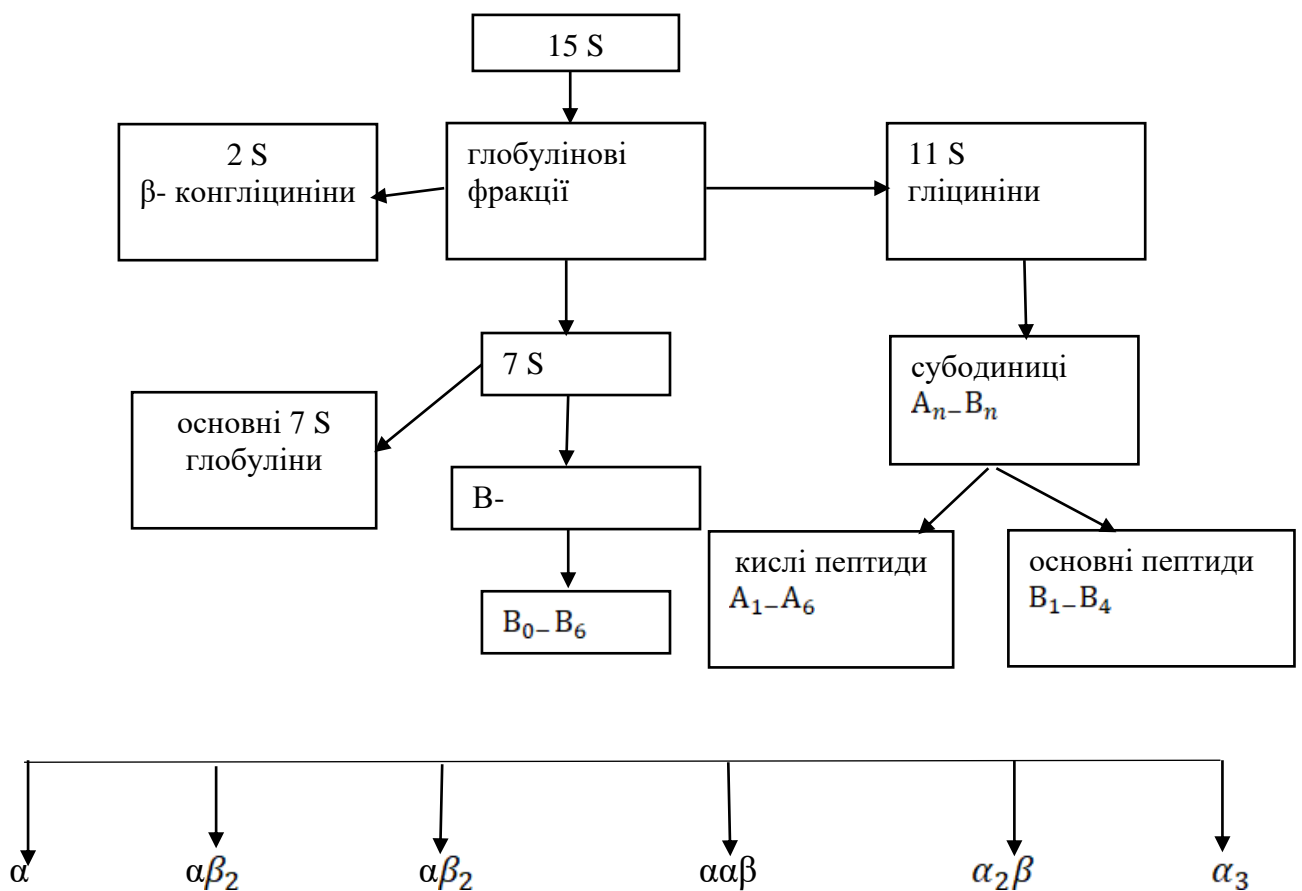


Рисунок 1.1 -Номенклатура і склад резервних соєвих глобулінів

11 S фракція (гліцинін) становить 40% всіх глобулінів насіння сої. Це гексамерів з молекулярною масою близько 360 кДа, мономерні субодиниці якого мають A-S-S-B структуру, де A - кислий поліпептид з молекулярною

масою 34-44 кДа, В - лужної поліпептид з молекулярною масою 20 кДа, S-S - дисульфідні зв'язки. Субодичні гліциніни включені до складу четвертинної білкової структури, яка складається з двох шарів гексамерів, кожен з яких має три кислі і три лужні поліпептидні пари, утримуються дисульфідними і водневими зв'язками [68].

Різниця в складі і структурі двох найбільших фракцій глобулінів насіння сої обумовлює різницю харчових і функціональних властивостей соєвих білків. 11 S глобуліни містять в 3-4 рази більше метіоніну і цистеїну на одиницю білка, ніж 7 S білок. Беручи до уваги, що інші білки насіння сої дефіцитні то білки 11 S є найбільш цінними з харчовою точки зору.

Білки фракцій 7 S та 11 S розрізняють і за функціонально технологічними властивостям. 11 S білки мають кращу гелеутворюючого здатність, а 7 S білки - кращу емульгуючу здатність і стійкість [70-71]. Узагальнені характеристики соєвих білкових фракцій – гліцинін і β -конгліцинін представлені в таблиці 1.2 [72].

Таблиця 1.2 - Фізико-хімічні властивості гліциніна і β -конгліциніна

Властивість	Гліцинін	β -конгліцинін
Молекулярна маса субодичниць(Да)	A: 37000-45000 B: 22500	a: 57000-72000 й: 57000-68000 P: 42000-52000
Глікозилювання(%)	0	~5
Б-Н-груп	0-2 (гексамерна молекула)	0
Б-Б-зв'язку	18-20 (гексамерна молекула)	2 (тривимірна) молекула
Газоелектричний рН	4,9	4,6

1.1.2 Харчова цінність білків насіння сої

Насіння сої є найважливішим джерелом рослинних білків в дієті людей і тварин у багатьох країнах світу. Подібно іншим білкам, соєві протеїни забезпечують організм калоріями, незамінними амінокислотами і азотом. Харчова цінність білків є функцією багатьох факторів, включаючи амінокислотний склад, потреба організму в білкових речовинах. Білки високої харчової цінності повністю перетравлюються, і їх амінокислотний склад практично ідентичний ідеального білку ФАО / ВООЗ (табл. 1.3) [13,14].

Соєві білки містять достатню кількість лізину, яким бідні більшість білків зернових культур. Це робить цінним комбінування білків насіння сої з білками зернових культур, в яких недостатньо лізину і метіоніну.

З таблиці 2.3 випливає, що за амінокислотним складом соєві білки різних сортів насіння сої дуже близькі. Найбільша кількість припадає на глютамінової кислоти (до 20% від загальної кількості амінокислот). Кислі амінокислоти (глютамінова і аспарагінова кислоти) складають приблизно 1/4 від суми присутніх в білку насіння сої амінокислот. Основні амінокислоти (лізин, аргінін, гістидин) складають 1/5 від усіх амінокислот білків насіння сої. Масові частки амінокислот з гідрофобними групами (гліцин, аланін, валін, лейцин і ізолейцин) складають 19-20%, ароматичні амінокислоти (фенілаланін, тирозин, триптофан) - 9-10% від загальної кількості білків насіння сої. Масова частка амінокислоти пролін становить 5-15% від загальної кількості білків насіння сої [13, 14].

Білки соєвих бобів містять у своєму складі, як відомо, всі незамінні амінокислоти, необхідні для розвитку людини і тварин: ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, цистеїн, тирозин, треонін, триптофан, валін і гістидин, хоча вони лімітовані за двом амінокислотами - метіоніну і триптофану .

Таблиця 1.3 - Амінокислотний склад соєвих білків (мг / г білка)

Амінокислота	Сорт Maple Arrow (США)	Сорт Аркадія одеська (Україна)	Сорт Успіх (Україна)
Незамінні			
Цистеїн	25,0	19,8	23,1
Гістидин	34,4	29,6	30,3
Ізолейцин	51,6	45,2	49,4
Лейцин	81,7	68,2	70,9
Лізин	68,4	64,4	69,3
Метіонін	10,70	13,4	11,3
Фенілаланін	56,2	47,3	52,3
Треонін	41,9	36,6	40,2
Триптофан	12,7	13,1	12,9
Тирозин	41,6	36,5	41,0
Валін	54,3	48,0	51,2
Замінні			
Аланин	40,2	37,6	39,7
Аргінін	77,2	69,6	71,1
Аспарагінова	68,9	108,7	89,9
кислота Глутамінова	190,2	177,7	185,3
кислота Гліцин	36,7	45,3	41,7
Пролин	52,9	45,3	50,1
Серін	54,0	45,8	49,2

Біологічна цінність білків насіння сої лише трохи менше білків м'яса (відповідно, 68-70% і 80-83%), але значно вище біологічної цінності протеїнів зернових. Переваримість соєвих білків також ненабагато нижче переваримості м'ясних білків (близько 90% і 97-99%). В результаті дещо меншою біологічної цінності та переваримості білків соєвих продуктів у порівнянні з білками м'яса перші характеризуються і зниженою використовуваних в організмі (нетто-протеїнова утилізація -NPU). Так, NPU

соєвих білків близько 62, а м'яса близько 80, але зате NPU білків пшеничного борошна всього близько 46. Переваримість білків насіння сої залежить від методів їх технічної обробки. У таблиці 1.4 наведені дані по цьому показнику різних соєвих продуктів.

Існує чітка кореляція між перетравністю соєвих білків і активністю інгібіторів трипсину і α -хімотрипсину в соєпродуктів. Інгібітори протеїназ значно знижують перетравність білків шляхом зниження активності панкреатичних ферментів .

Таблиця 1.4 - Переваримість білків різних соєвих продуктів

Соєві продукти	Переваримість білків (%)
Піджарена соя	78
Ферментована соя (натто)	90
Тофу	91
Варені соєві боби	92
Заморожене сояве тафу	93
Соєвий білок (юба)	100

1.1.3 Інгібітори протеїназ

Інгібітори протеїназ являють собою білки або пептиди, здатні пригнічувати каталітичні активності протеолітичних ферментів. Їх поділяють на інгібітори серинових, цистеїнових, аспарагінової протеїназ та металлопротеїназ. Інгібітори протеїназ - джерело запасних білків і фактор імунного захисту організму - широко поширені в багатьох типах рослин. Два основних сімейства інгібіторів серинових протеїназ представлені інгібіторами типу Кунітца і Боумана-Бирка (рис.1.2). Вони розрізняються за своїм молекулярним масам, змісту дисульфідних зв'язків, тривимірної

структурі і стійкості до нагрівання і денатуруючих агентів. У біологічних системах протеїнази інактивуються шляхом протеолітичної деградації або шляхом взаємодії з інгібуючими псевдосубстратами, які відрізняються по спорідненості до каталітичних центрів ферментів.

Інгібітори протеїназ позиціонуються як запасні білки і як ендogenous регулятори протеолітичної активності. Вони відіграють важливу фізіологічну роль у регулюванні різноманітних процесів (наприклад, внутрішньоклітинного розпаду білків, транскрипції, послідовності подій клітинного циклу, клітинної інвазії та апоптозу), до яких залучені протеїнази. Передбачається, що інгібітори серинових протеїназ регулюють активності та інших протеїназ, залучених в різні фізіологічні процеси. Тим не менше, їх функції *in vivo* до кінця не зрозумілі. Було показано, що рослинні інгібітори протеїназ діють як захисний механізм проти шкідників і зараження рослинними екзопаразитами [71].

У сирому насінні сої присутні два типи інгібіторів - інгібітор Кунітца і інгібітор Боумана-Бирка, що є речовинами білкової природи. Інгібітор Кунітца водорозчинний, складається з 181 амінокислотного залишку і має молекулярну масу близько 25 кДа. При нагріванні його активні центри легко руйнуються. Активний центр інгібітора Кунітца розташовується між залишками Arg 63 і Pe n 64 (рис.1.2) [73].

Інгібітор Кунітца був виділений з насіння сої та отриманий в кристалічному вигляді шляхом екстракції водою з наступним осадженням з екстракту спиртом [73, 75].

Інгібітор Кунітца проявляє високу інгібіторну активність по відношенню до трипсину: 1 моль інгібітора інактивує 1 моль трипсину.

Інгібітор Боумана-Бирка був описаний і виділений як ацетон-нерозчинний фактор, на відміну від спіртонерастворимого інгібітора Кунітца. Його виділення включає екстракцію розчином з масовою часткою спирту 60% з подальшим осадженням інгібітора ацетоном.

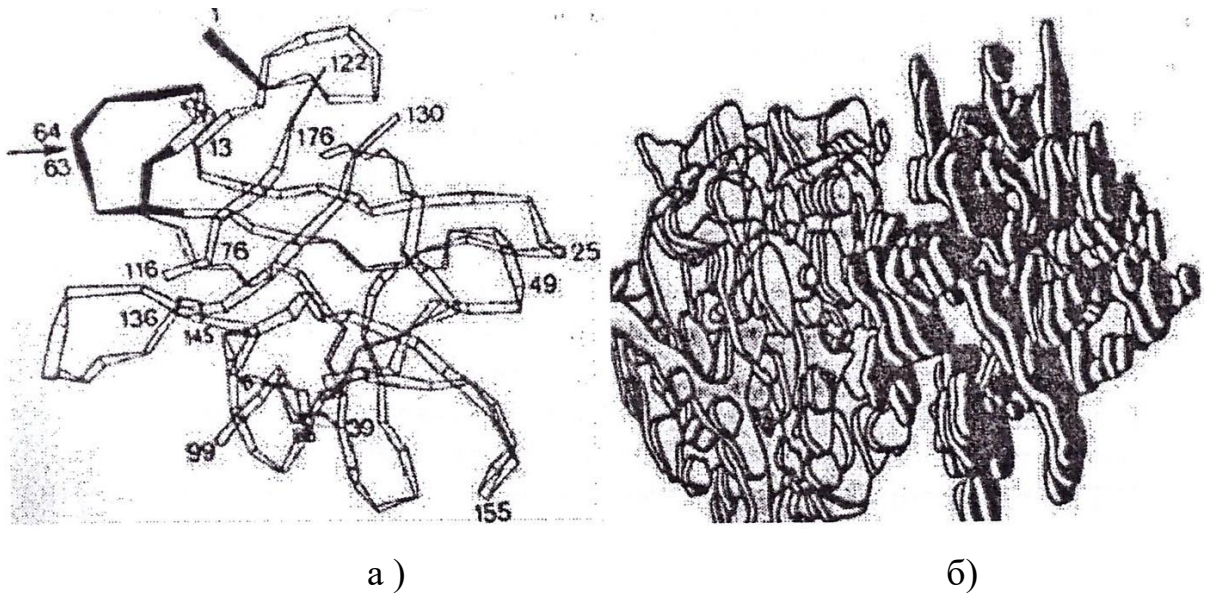


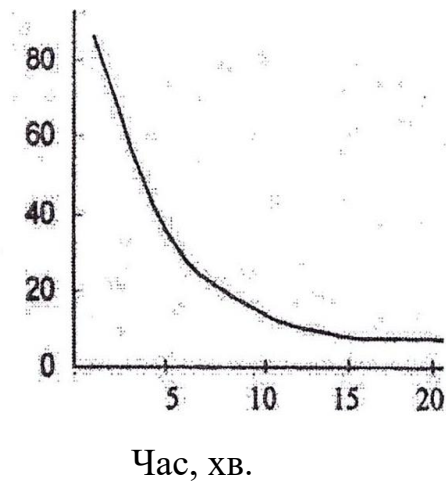
Рисунок 1.2 - Будова інгібітора Кунітца (а) і Боумена-Бирка (б)

У інгібітора Боумена-Бирка поліпептидний ланцюг складається з 71 амінокислотного залишку і включає 7 дисульфідних зв'язків. Вивчення вторинної структури цього білка показало, що він має стійку конформацію навіть після руйнування дисульфідних зв'язків. Тому інгібітор Боумена-Бирка більш стійкий до впливу термообробки, кислот і лугів. Молекулярна маса інгібітора Боумена-Бирка знаходиться в межах від 6 до 10 кДа [71].

П'ять близьких за складом і будовою інгібіторів Боумена-Бирка були виділені і охарактеризовані як PI-1 ... PI-V пептиди [73]. Всі ці пептиди містять два незалежних зв'язуючих сайти: тріпсіновий активний центр (Lys 16 Ser 17) і хіотріпсиновий (Leu 433 і Ser 44) (рис.1.2). На відміну від інгібітора Кунітца, інгібітор Боумана-Бирка містить 7 дисульфідних зв'язків, що сприяє утворенню щільної компактної тривимірної структури [55].

Досить докладно вивчено вплив термообробки на активність інгібіторів трипсину. На графіку 1.3 показана залежність змісту інгібіторів від тривалості термообробки, яка вказує на те, протягом 10 хв при 100 ° С

знижує вміст цих речовин в 5 разів і становить величини безпечні для здоров'я людини і тварин.



Графік 1.3- Вплив тривалості обробки при температурі 100 ° С на активність інгібіторів трипсину в соєвому борошні

Інгібітори протеаз є антиферменти. Вони інгібують дію травних ферментів, чим обумовлений їх терапевтичний ефект при ряді захворювань травного тракту. Встановлено, що ці речовини здатні запобігати мутації в молекулах ДНК, попереджаючи цим злоякісне переродження клітин. Інгібітори протеаз можуть уповільнювати або припиняти розвиток раку товстої кишки, легенів, печінки, підшлункової залози та стравоходу. Значні кількості інгібіторів протеаз здатні чинити негативний вплив на підшлункову залозу. Однак як білкові речовини вони легко денатурують при тепловій обробці, крім того, частина інгібіторів протеаз насіння сої руйнуються під впливом шлункового соку. У сирому насінні сої присутні близько 14% інгібіторів Кунітца і 0,6% інгібіторів Боумана-Бирка.

1.1.4 Лектини

Лектини, звані також гемагглютенінами, є глікопротеїдами і входять до складу насіння сої в кількості 1-3%. Лектини здатні вибірково і оборотно зв'язувати вуглеводи, не викликаючи їх хімічних перетворень [16, 20].

Лектини рослин є поліфункціональними молекулами з широким спектром біологічної активності [18].

Специфічність лектинів до вуглеводів впливає на прояв конкретного фармакологічного ефекту. Залежно від специфічності лектини можуть проявляти імуностимулюючу, протипухлинну, противірусну або антимікробну активність. Ідентифікація лектинів базується на їх здатності агглютинувати еритроцити завдяки вуглеводним детермінантам на мембранах еритроцитів. Лектини по вуглеводній специфічності поділяють на 4 групи. Лектини специфічні до:

- 3,4-ОН цис, L-форм (L-фруктоза, L-галактоза);
- 3,4-ОН цис, D-формам (D-галактоза)
- 3,4-ОН транс, D-формам (глюкоза, маноза);
- 3,4-ОН транс, L-форм (L-глюкоза, ідоза, гулоза) [41].

Лектини насіння сої відносяться до третьої групи специфічності.

При центрифугуванні лектини осідають з 7 S фракцією білків насіння сої. У лабораторних умовах ці речовини здатні зв'язувати червоні кров'яні клітини. Лектини насіння сої характеризуються високим вмістом 4-оксипролина, завдяки цьому вони здатні зв'язувати цукру і утворювати «містки» на поверхні клітин слизової оболонки кишечника, чим знижують їх активність і здатність до поглинання поживних речовин. Однак ці речовини не становлять ніякої небезпеки здоров'ю людства, оскільки дуже чутливі до гідротермічної обробці, яка руйнує лектини майже повністю [62].

Соєві лектини в основному локалізовані в білкових тільцях клітин сім'ядоль. Лектини з насіння сої вперше були виділені і вивчені Pallansch і Liener .

Гемагглютеніни насіння сої мають молекулярну масу приблизно 120 кДа і складаються з 4-х ідентичних субодиниць, молекулярна маса кожної з яких 30 кДа. Соєві лектини, будучи глікопротеїнами, містять 5 залишків глюкозаміна і 3-7 залишку манози на один моль. Тривалий період лектини привертали увагу нутриціологів як білки, токсичні для тварин. Було показано здатність соєвих лектинів гальмувати зростання мишей .

Також дослідженнями на тваринах встановлено, що соєві лектини крім затримки росту, можуть викликати збільшення підшлункової залози, знижувати рівень інсуліну в крові, пригнічувати дісахарідази і протеази в тонкому кишечнику, приводити до дегідративное змін у печінці та нирках, перешкоджати абсорбції негеминового заліза і ліпідів з їжі [61]. Подібно трипсиновим інгібіторів соєві лектини легко руйнуються шляхом волого теплової обробки насіння. Однак, лектини насіння сої кілька стійкі до сухої термообробці. Цим можна пояснити, чому залишкові кількості лектинів виявляються в соєпродуктів, призначених для харчування.

1.1.5. Ліпоксигеназа

Ліпоксигеназа (ЛОГ), КФ 1.13.11.12 - лінолеатоксидоредуктаза - є залізовмісної діоксигеназа, яка каталізує окислення деяких поліненасичених жирних кислот, утворюючи пов'язані ненасичені гідроперекиси жирних кислот. Фермент володіє здатністю утворювати вільні радикали, які потім можуть атакувати інші компоненти. ЛОГ знайдені в рослинах, тварин і грибах [53-55]. Особливий інтерес до ЛОГ проявляється при переробці насіння сої, тому з нею пов'язують причину появи небажаного запаху і смаку, відомого як «бобовий», що асоціюється з соєвими продуктами. Численні

публікації були присвячені питанням ідентифікації і характеристиці соєвих ЛОГ та їх ролі у формуванні речовин, що визначають бобове смак. Соєпродуктів [12].

Насіння сої - найбільш багате джерело ЛОГ. Чотири ізофермента були виділені і ідентифіковані як L-1, L-2, L-3а і L-3в. Два останніх ізофермента однакові за властивостями і складом і часто розглядаються як просто тип L-3. Всі ізоферменти є мономерними білками з молекулярною масою в межах 100 кДа і містять один атом міцно зв'язаного заліза на одну молекулу.

Серед усіх інших ізоферментів насіння сої L-1 ізофермент вивчений найбільш повно і він відрізняється термостабільністю, значенням рН оптимуму (в межах 9) і перевагою аніонних субстратів (лінолева, ліноленова кислоти).

L-2 ізоферменти менш термостабільним, бажають етерифіцирування субстратів мають рН оптимум близький до нейтрального .

L-2, L-3 форми ЛОГ найбільш поширені ферменти, присутні в зрілих насінні сої. L-1 ізофермент менш поширений, але має найбільшу специфічну активність по відношенню до поліненасичених жирних кислот [66].

ЛОГ каталізує окислення лінолевої кислоти та інших поліненасичених кислот, що містять т, cis,cis-1,4-пентадієнові зв'язки, у присутності молекулярного кисню. Первинні продукти окислення - гідроперекиси - потім перетворюються в летючі сполуки (альдегіди, кетони, спирти) з неприємним запахом. Гексаналь найбільш інтенсивно забезпечує специфічний бобовий смак насіння сої та соєпродуктів.

ЛОГ також каталізує окислення таких пігментів як каротиноїди і хлорофіл, через вільнорадикальних механізм у присутності поліненасичених жирних кислот. Ця здатність ЛОГ використовується для освітлення (окислення каротиноїдів) пшеничного борошна, шляхом застосування повножирного соєвого борошна при тістоприготування. Соєве борошно

також сприяє звільненню пов'язаних ліпідів, покращуючи тим еластичність тіста і збільшуючи об'єм хліба [59].

У тістоприготування застосовують звичайно до 0,5% соєвого борошна. В роботі показано, що L-2 і L-3 ізоферменти беруть участь у дегідратації SH-груп в соєвому молоці під час розмелювання насіння сої, що сприяє поліпшенню гелеутворюючої здатності соєвих білків при виробництві тофу.

Оскільки ЛОГ є причиною бобового смаку соєпродуктів, то велика увага в технологіях переробки насіння сої приділяється їх дезактивації. Більшість промислових методів інактивації ЛОГ засноване на їх термочутливості. Зазвичай з цією метою при отриманні соєвого молока використовують гарячу воду. Термічна обробка цілих бобів дозволяє отримувати хорошої якості соєву муку [15].

Однак, застосування термообробки, достатньої для інактивації ЛОГ, часто призводить до часткової втрати розчинності соєвих білків і їх функціональності. З цієї причини деякі прийоми включають м'яку теплову обробку насіння сої та застосування етанолу. Наприклад, ЛОГ можуть бути денатуровані шляхом замочування насіння сої в розчині з масовою часткою етанолу 10-15% при 45 ° С 24 години. Низька концентрація спирту не дозволяє денатурованого соєвим білкам. ЛОГ більш стійки при рН 6,0; значення нижче і вище цього показника сприятимуть інактивації ферменту. Метод дозволяє шляхом регулювання значення рН при замочуванні насіння сої скоротити час інактивації ферментів. Активність ЛОГ значно зростає при дробленні насіння сої. Більшість інактиваційних методів ефективні тільки для інтактних насіння сої.

1.2 Будова і властивості протеїнів казеїнового комплексу

1.2.1 Класифікація і номенклатура білків

На даний момент найбільш визнана номенклатура і класифікація різновидів молочних білкових сполук, яка створена «Комітетом з номенклатури, класифікації і методології білків молока Американської асоціації молочної промисловості (ADSA)». Останній раз вона була переглянута у 2004 році і внесені деякі зміни, які ураховують досягнення науки. Розроблена номенклатура імуноглобулінів відповідно до міжнародного стандарту, виявлені кілька нових генетичних варіантів основних білків молока, дана повна характеристика лактоферину тощо.

Усі молочні білкові сполуки розділяють на три великі підгрупи - казеїн, білки сироваткового типу і оболонкові білки кульок жиру. Власне відносна концентрація фракції казеїнового типу становить біля 79,5 %, білків сироваткового типу близько - 19,3 %, оболонкових білків кульок жиру - 1,2 %. Білки казеїнового типу існують основними фракціями - α_{s1} - α_{s2} - β - і κ -казеїном, їх складовими і варіантами генетичного типу, суттєва відмінність яких полягає в тому, що замінюється кілька або один залишок амінокислотного типу, рідше - скороченням ланцюга на декілька залишків амінокислотного типу. Також у молочних типах продуктів присутні протеолізи β -казеїну нативним плазмінним ферментом - казеїни γ типу ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$) і протеозопептони.

Основними представниками сироваткових білків є α -лактальбумін, β -лактоглобулін, альбумін сироватки крові імуноглобуліни. У незначній кількості також присутні інші є білки: лактоферін, ферулоплазмін, β_2 -мікроглобулін. До білків молока відносять також ферменти і деякі гормони.

Оболонокові білки кульок жиру досліджені у найменшій мірі, ще не володіють точними класифікаторами.

В табл. 1.5 показано вміст, номенклатурне порзначення, і переважні властивості білків молочних продуктів.

1.2.2 Біологічні функції

Молочні білки зазвичай забезпечують виконання різних функцій. Для основної їх маси всі властивості як вправило достатньо вивчені. І власне кажучи, казеїн є одним з основних білків харчового типу.

Для більшості білків вони визначені на цей час. Казеїн молока є основним харчовим білком. Він виконує пластичні функції. Таблиця 1.5 - Номенклатура, вміст і властивості основних білків молока

Білок	Вміст у молоці, %	% від загально го вмісту білків	Молекулярна маса, кДа	Ізоелектрична точка	Генетичні варіанти
Казеїн	2,6	79,5			
У т.ч	1,2...1,5	30,6	22,1...23,7	4,44...4,76	A,B,C,D,E
α_{s1} -казеїн (α_{s1} -Кн)	0,3...0,4	8,0	25,2	-	A,B,C,D
α_{s2} -казеїн (α_{s2} -Кн)	0,9...1,1	28,4	23,9...24,0	4,83...5,07	A ₁ ,A ₂ ,A ₃ B,C,D,E
β -казеїн (β -Кн)	0,2...0,4	10,1	19,0	5,45...5,77	A,B
γ -казеїн	0,08	2,4	-	-	
Сироваткові білки	0,63	19,3			
α -лактальбумін (α -Ла)	0,06...0,17	3,8	18,2...19,0	4,2...4,5	A,B
β -лактоглобулін (β -Лг)	0,2...0,4	9,8	14,1...14,2	4,7...4,9	A,B,C,D, E,F,G
Альбумін сироватки крові (СА)	0,4	1,2	66,3	4,7...4,9	A
Імуноглобуліни (Іг)	0,04...0,07	2,1	-	5,5...6,8	
Інші (включно лактоферін, церулоплазмін, β_2 -мікроглобулін та ін.)	0,08	2,4	-	-	
Білки оболонки жирових кульок	0,04	1,2	-	-	

Імуноглобуліни створюють важливу функцію захисту, і є, як відомо, частиною імунітету, забезпечуючи роль антитіл.

Лактоферін і деякі ферменти (лізоцим, лактопероксидаза, ксантиноксидаза) мають антимікробну дію.

1.2.3 Казеїн

Казеїн - це поєднання фосфопротеїдів, які можуть бути перетворення в осад при пониженні рН до 4,6...4,7 знежиреного молока. концентрація казеїну у коров'ячому молоці знаходиться в межах від 2,1 до 2,8 %. Казеїнбездомішое це порошок аморфного типу білого кольору, який не має ніякого запаху і власне смаку, не є фактично розчинним у водних середовищах, проте розчиняється у слабких розчинах лугів.

В табл.1.6 наведено амінокислотний склад основних фракцій казеїну

Таблица 1.6 Амінокислотний склад основних фракцій казеїну

Амінокислота (скорочене позначання)	α_{s1} -казеїн		α_{s2} - казеїн		β -казеїн		к-казеїн	
	число	% вмісту	число	% вмісту	число	% вмісту	число	% вмісту
Аспарагінова (Асп)	7	3,52	4	1,93	4	1,91	4	2,37
Аспарагін (Асн)	8	4,02	14	6,76	5	2,39	7	4,14
Глутамінова (Глу)	24	12,06	25	12,08	18	8,61	13	7,69
Глутамін (Глн)	15	7,54	15	7,25	21	10,05	14	8,28
Гліцин (Глі)	9	4,52	2	0,97	5	2,39	2	1,18
Аланін (Ала)	9	4,52	8	3,86	5	2,39	15	8,88
Валін (Вал)	11	5,53	14	6,76	19	9,09	11	6,51
Лейцин (Лей)	17	8,54	13	6,28	22	10,53	8	4,73
Ізолейцин (Іле)	11	5,53	11	5,31	10	4,78	13	7,69
Серин (Сер)	16	8,04	17	8,21	16	7,66	13	7,69
Треонін (Тре)	5	2,51	15	7,25	9	4,31	14	8,28
Цистеїн (Цис)	-	-	2	0,97	-	-	2	1,18

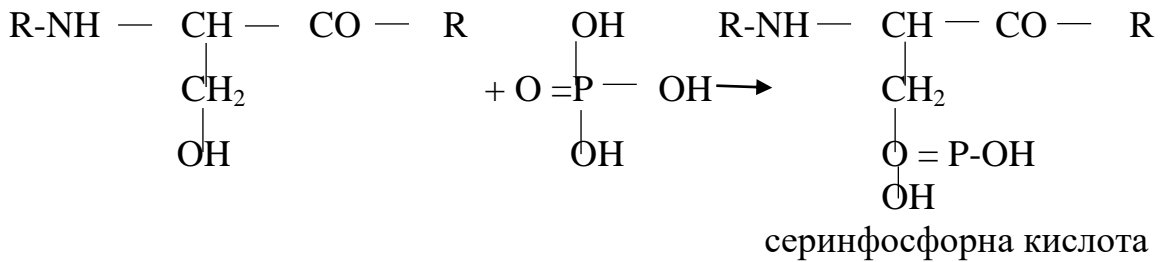
Метіонін (Мет)	5	2,51	4	1,93	6	2,87	2	1,18
Лізин (Ліз)	14	7,04	24	11,58	11	5,26	9	5,33
Гістидин (Гіс)	5	2,51	3	1,45	5	2,39	3	1,78
Аргінін (Арг)	6	3,01	6	3,00	4	1,91	5	2,96
Тирозин (Тир)	10	5,02	12	5,80	4	1,91	9	5,33
Фенілаланін (Фен)	8	4,02	6	3,0	9	4,31	4	2,37
Пролін (Про)	17	8,54	10	4,83	35	16,75	20	11,83
Триптофан (Три)	2	1,00	2	0,97	1	0,48	1	0,59
Усього	199	100	207	100	209	100	169	100

Аналізуючи наведені дані слід зазначити, що фракції казеїну відрізняються за кількістю амінокислот в ланцюзі і їх складом. На вміст окремих груп амінокислот впливає порода, стадія лактації, індивідуальні особливості тварин та інші фактори. Порівняно з глобулярними білками інших харчових продуктів казеїнові фракції містять багато лейцину, ізолейцину, лізину, валіну, проліну, серину, а також моноамінодикарбонових кислот - глютамінової та аспарагінової, які є носіями від'ємного заряду і кислих властивостей, та їх амідів - аспарагіну і глютаміну. Такі фракції казеїну як α_1 - та β - взагалі не містять цистеїну, а α_2 - та κ -казеїн містять по 2 залишки у пептидному ланцюзі [42]. Фракції казеїну характеризуються високим вмістом неполярних (гідрофобних) амінокислот.

Короткий опис казеїнових фракцій. Усі фракції казеїну є створеними у молочній залозі у її клітинах, є фосфопротеїдами, а останній κ -казеїн відносять до так званих глікофосфопротеїдів.

В табл. 1.7 показано показники деяких фракцій казеїнового типу.

Фосфорна кислота приєднується до залишку серину естерним зв'язком і цю діляночку ланцюга називають серинфосфорною кислотою.



Таблиця 1.7. - Характеристика фракцій казеїну (Schmidt, 1982, Walstra, 1984)

Показник	α_{s1} -Кн	α_{s2} -Кн	β -Кн	κ -Кн
Кількість в молекулі амінокислотних залишків	199	207	209	169
Кількість залишків цистеїну	0	2	0	2
Кількість залишків фосфатних груп	8-9	10-13	5	1-2
Кількість залишків проліну	17	10	35	20
Гідрофобність, кДж/залишок	4,9	4,7	5,6	5,1
Заряд при рН 6,6, мВ	-20,9	- 14,8	-12,3	-3,0
Чутливість до кальцію	++	+++	+	-
Чутливість до хімозину	низька	відсутня	низька	висока

α_{s1} -Казеїн. Це поєднання із двох білків - компонентів власне головного і мінорного типів. α_{s1} – володіє 5 типами варіантів генетичного типу «А, В, С, D, Е», які можна розрізнити по концентрації у їх складі окремих амінокислот.

α_{s2} -Казеїн. У цю фракцію входять частинки α_{s} -казеїнів, що відмінні за ознакою концентрації залишків фосфорної кислоти « α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} , α_{s6} ». Наприклад α_{s2} містить 13 фосфосеринових залишків і за останньою номенклатурою власне називається α_{s2} - Кн А-13Р, α_{s3} -казеїн - 12 втім

фосфосеринових як правило залишків (α_2 -Кн А-12Р), α_4 - 11 (α_2 -Кн А-11Р); α_6 -казеїн - 10 (α_2 -Кн А-10Р).

Молекула - α_2 безумовно казеїну має у своєму складі 207 амінокислотних залишків і на, скажімо, відміну від α_1 , проте, 1- казеїну містить, між іншим, 2 залишки цистеїн, вочевидь, у, 11 фосфатних, зазвичай, груп. Гідрофобність, якраз, цієї фракції нижча, власне кажучи, , ніж інших, якраз, він дуже, як відомо, чутливий до іонів, скажімо, кальцію, але, власне кажучи, нечутливий до хімозину, зокрема. Величина заряду, відповідно, менша порівняно з, якраз, α_1 -казеїном. Рухомою силою, загально прийнято, агрегації є електростатичні, відповідно, взаємодії.

β -Казеїн має, либонь, сім генетичних варіантів, може бути, - А2, А3, В, С, D, Е. Ця фракція казеїну містить, втім, 209 амінокислотних залишків, проте, і 5 фосфатних груп. Генетичні варіанти відрізняються заміною, либонь, деяких амінокислот у, між іншим, ланцюзі і кількістю залишків, як правило, фосфорної кислоти, вочевидь.

κ -Казеїн не випадає в осад при контакті з кальцієм іонами, виконує захисну функцію.

В табл. 1.8 показано казеїнові фракції вторинних структуроутворень, власне їх характеристики.

Склад і фізичні параметри казеїнових міцел. Дослідження складу і механізму утворення міцел проводили і продовжують проводити вчені різних країн (Thompson, Moor, Schmidt, Walstra, Slattery & Eward, Fox, Payens, Дьяченко П.Ф., Оно, Obata, Kimura та ін.). За допомогою сучасних методів дослідження (електронної мікроскопії, ультрацентрифугування, світлорозсіювання) визначено, що міцели казеїну мають вигляд сфер, діаметр яких коливається від 50 до 300 нм, (за деякими даними від 20 до 600 нм), молекулярну масу 107...109. Вважають, що частинки, які мають розмір до 50 нм, представляють собою не міцели, а субміцели або полімери. їх частка невелика (біля 3 %). Зустрічаються і міцели розміром понад 600 нм, але рідко.

Таблиця 1.8 Вміст типів вторинної структури у фракціях казеїну

Типи вторинної структури	α_{s1} -казеїн	α_{s2} -казеїн	β -казеїн	κ -казеїн
α -спіралі	0...2	0	9...10	23
паралельної β -структури	0...7	0...6	13...25	31
антипаралельної β -структури	0	0	0	24
неупорядкованої структури	90...98	100	66...77	22

Міцели казеїну містять 92...94% білкових фракцій та 6...8% (на суху масу) неорганічних компонентів. Крім того, до них приєднується значна кількість води, від 0,7 до 4 г на 1 білка. Відносно невелика частина цієї води (біля 0,5 г) складає зв'язану воду, а остання кількість поглинається внутрішньою частиною міцели [39].

Основними білковими компонентами міцел є α_{s1} , α_{s2} -, (β - та κ -казеїни. Співвідношення фракцій у міцелі на думку різних вчених несуттєво відрізняється: 3,0:1,0:3,0:1,0; 3,0:0,8:3,0:1,0 та ін.

Казеїнові міцели мають такі середні фізичні параметри:

Діаметр, нм.....	130... 160
Площа поверхні, см ³	$8 \cdot 10^{-10}$
Об'єм, см ³	$2,1 \cdot 10^{-15}$
Густина гідратованої міцели, кг/м ³ ...	1063,2
Маса, г.....	$2,2 \cdot 10^{-15}$
Масова частка води, %	63
Ступінь гідратації, г H ₂ O/1 г білка.....	3,7
Молекулярна маса міцели	
гідратованої.....	$1,3 \cdot 10^9$

негідратованої $5 \cdot 10^8$

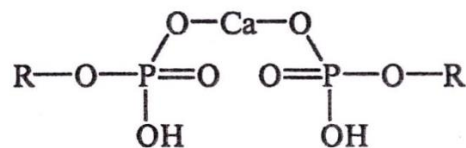
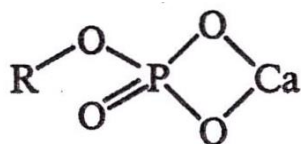
Число пептидних ланцюгів

(молекулярною масою 30000) у міцелі 10^4

Число міцел в 1 см^3 молока..... 10 ...10

Мінеральна частина міцел представлена кальцієм (до 2,9 %), магнієм (0,2%), фосфором (до 4,3 %), натрієм (0,1 %), калієм (0,3 %). Крім того, до складу міцел входять солі лимонної кислоти - цитрати (0,5 %). Кальцій у міцелах міститься у двох формах - органічний, який приєднується до карбоксильних і фосфатних груп, і неорганічний, який входить до складу фосфатів і цитратів кальцію.

Кальцій може приєднуватись до серинфосфатних груп в межах однієї молекули або поєднувати два поліпептидні ланцюги. В останньому випадку його називають структуроутворюючий, оскільки він може брати участь у побудові субміцел і міцел.



Комплекс органічного кальцію з казеїном називають казеїнатом кальцію (КК).

Фосфор, який приєднується до залишків серину у ланцюзі (серинфосфорна кислота), відносять до органічного, а фосфор фосфату кальцію вважають неорганічним. Вміст органічного і неорганічного фосфору і кальцію в міцелах непостійний і залежить від стадії лактації, пори року, індивідуальних особливостей тварин тощо. Точний склад фосфату кальцію, який входить до казеїнових міцел, до цього часу не з'ясований. Це може бути гідрофосфат кальцію $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ або аморфний фосфат кальцію

$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ або комплекс фосфату кальцію і цитрату за типом апатиту та ін. Оскільки він входить до колоїдної системи молока, його називають колоїдним фосфатом кальцію (КФК). Комплекс казеїнату кальцію з колоїдним фосфатом кальцію називають казеїнаткальційфосфатним комплексом (ККФК).

Яким чином колоїдний фосфат кальцію приєднується до поліпептидних ланцюгів фракцій казеїну до цього часу не визначено. Більшість вчених вважає, що мають місце хімічні зв'язки між казеїном і фосфатом кальцію, крім того припускають адсорбцію фосфату кальцію казеїнатом кальцію.

Таким чином, є дані щодо складу міцел казеїну, але структура міцел до цього часу остаточно не розшифрована.

1.3 Протеїни сироватки молока

1.3.1 Сироваткові білки

Це група, власне, азотистих сполук молока, відповідно, які залишаються у плазмі після, відповідно, осадження казеїну при рН, вочевидь, 4,6...4,7. Вміст їх, як відомо, складає 0,5...0,8 %. Біля, може бути, 20 % цих, власне, неказеїнових азотистих сполук, втім, не є білками, а представляють собою пептиди, загально прийнято, (до них відносять протеозо-пептони - продукти протеолізу β -казеїну) та небілкові азотисті сполуки (амінокислоти, сечовина, креатин, креатинін, аміак, оротова, сечова, гіпурова кислоти) [35].

Порівняно з казеїном сироваткові, власне, білки володіють меншою чутливістю, проте, до йонів кальцію, на нашу думку, але до температури проявляють, загалом прийнято, чутливість. Нагрівання молока і сироватки призводить у загальному випадку до денатурації зазвичай сироваткових білків (розгортання поліпептидних ланцюгів), в подальшому відбувається їх агрегування з утворенням димерів і полімерів. Низьку термостійкість власне, сироваткових білків співвідносять з високою концентрацією цистеїну і вторинною структурою визначеного порядку.

Амінокислотний склад. Сироваткові білки містять ті самі амінокислоти, що і казеїн, але відрізняються їх вмістом і поєднанням. Сироваткові білки містять усі, втім, незамінні амінокислоти, причому, власне кажучи, вміст деяких дефіцитних, між іншим, (лізину, триптофану) вищий, ніж у казеїні, тому, на нашу думку, у біологічному відношенні їх, на нашу думку, вважають більш повноцінними.

В табл. 1.9 наведені дані щодо амінокислотного, якраз, складу сироваткових, вочевидь, білків.

Основні представники сироваткових білків, власне кажучи, характеризуються високим вмістом цистеїну, вочевидь, у, а також, втім, моноамінодикарбонових амінокислот і, зазвичай, їх амідів,, загалом прийнято, вміст проліну і серину нижчий порівняно з казеїновими фракціями.

Характеристика окремих представників

В-Лактоглобулін є найбільш важливим у кількісному відношенні із сироваткових білків, вміст його складає 0,2...0,4 %. Він синтезується у клітинах молочної залози. Поліпептидний ланцюг складається із 162 амінокислотних залишків, його молекулярна маса 18300. У молоці знаходиться у вигляді димеру, утворення якого відбувається за рахунок електростатичних зв'язків від'ємно заряджених груп залишків аспарагінової

та глютамінової кислот (в положеннях 130 і 134) одного мономеру і додатно заряджених залишків лізину другого мономеру.

Таблиця 1.9. — Амінокислотний склад основних представників сироваткових білків.

Амінокислота (скорочене позначення)	α-Лактальбумін		β-Лактоглобулін	
	число	% вмісту	число	% вмісту
Аспарагінова (Асп)	9	7,32	10	6,17
Аспарагін (Асп)	12	9,76	5	3,09
Глутамінова (Глу)	8	6,50	16	9,88
Глутамін (Глу)	5	4,06	9	5,56
Гліцин (Глі)	6	4,88	4	2,47
Аланін (Ала)	3	2,44	15	9,26
Валін (Вал)	6	4,88	9	5,55
Лейцин(Лей)	13	10,57	22	13,58
Ізолейцин (Іле)	8	6,50	10	6,17
Серин (Сер)	7	5,69	7	4,32
Треонін (Тре)	7	5,69	8	4,94
Цистеїн (Цис)	8	6,50	5	3,09
Метіонін (Мет)	1	0,81	4	2,47
Лізін (Ліз)	12	9,76	15	9,26
Гістидин (Гіс)	3	2,45	2	1,23
Аргінін (Арг)	1	0,81	3	1,85
Тирозин (Тир)	4	3,25	4	2,47
Фенілаланін (Фен)	4	3,25	4	2,47
Пролін (Про)	2	1,63	8	4,94
Триптофан (Три)	4	3,25	2	1,23
Усього	123	100	162	100

Розмір частинок складає 25...50нм. Білок має два дисульфідних зв'язки, які поєднують залишки цистеїну в положеннях 66 і 160 та 106 і 119 та одну вільну сульфгідрільну групу у положенні 121 (або 119), яка у нативному стані розташовується всередині ланцюга. В процесі теплового оброблення відбувається денатурація β -лактоглобуліну і за рахунок визволення цієї групи відбувається самоасоціація з утворенням полімерів. Крім того, денатурований β -лактоглобулін взаємодіє з κ -казеїном казеїнових міцел і бере участь в утворенні згустку при кислотній і кислотно-сичужній коагуляції. Утворення комплексу β -лактоглобулін- κ -казеїн посилює гідрофільні властивості казеїну, що сприяє отриманню міцного згустку, який утримує вологу, а крім того знижує термостійкість міцел казеїну і погіршує процес сичужного згортання.

α -Лактальбумін. За масовою часткою α -лактальбумін займає друге місце серед сироваткових білків, вміст його коливається в межах 0,06...0,17 %. Як і β -лактоглобулін він синтезується у клітинах молочної залози. Це компактний глобулярний білок, тонко диспергований (розмір частинок 15...20 нм). α -Лактальбумін має два генетичні варіанти: А та В. Ланцюг має 123 амінокислотні залишки, високий вміст проліну, лейцину, треоніну, триптофану і цистеїну, 4 дисульфідні зв'язки. Вторинна структура має 26 % α -спіралі і 14 % - паралельної β -структури. Вміст неупорядкованої структури складає 60 %.

Японськими дослідниками встановлено, що α -лактальбумін є металпротеїдом, тому що має здатність зв'язувати іони кальцію. Припускають, що приєднаний кальцій бере участь у стабілізації третинної структури білка.

Визначена важлива властивість α -лактальбуміну - здатність до ренатурації. При нагріванні до 62...65 °С відбувається його денатурація, але вона зворотня. Після охолодження молока відновлюється 80...90% нативної

структури білка. Для ренатурації необхідне приєднання до білкової молекули кальцію. З ренатурацією пов'язують більшу термостійкість α -лактальбуміну порівняно з іншими сироватковими білками.

Альбумін сироватки крові. Це білок, який не синтезується у клітинах молочної залози, а переходить у молоко із крові. Вміст його складає 0,04 % (8 % від вмісту сироваткових білків). Це достатньо великий білок з молекулярною масою 66000. Поліпептидний ланцюг власне складається із амінокислот кількістю 582, має у своєму складі 17 внутрішньомолекулярних зв'язків і тільки одну вільну сульфгідрильну групу. Альбумін сироватки крові - термолабільний білок, при температурі 40...50 °С відбувається його часткова денатурація, звільнюються гідрофобні ділянки, що призводить до агрегації і осадження.

Імуноглобуліни. Вміст імуноглобулінів у молоці 0,1 %, (16% від сироваткових білків). У молозиві вони складають 90 % сироваткових білків. В основному, імуноглобуліни переходять із крові у молоко, за винятком секреторного імуноглобуліну А, який синтезується у клітинах молочної залози.

Із п'яти відомих класів імуноглобулінів людини у молоці знайдено чотири - IgG, IgA, IgV, IgE.

У молоці імуноглобуліни знаходяться у вигляді мономерів або полімерів, які побудовані із однакових структурних одиниць або субодиниць. Кожна субодиниця складається із двох легких і двох важких поліпептидних ланцюгів, зв'язаних дисульфідними зв'язками. Молекулярна маса легких ланцюгів складає 20000...25000, важких - 50000...70000. Імуноглобуліни - це глікопротеїди, залишки гексоз (манози, галактози, фукози), гексозамінів та сіалової кислоти приєднуються до важких ланцюгів субодиниць.

Мінорні білки. До них відносять лактоферін, церулоплазмін, (β 2-мікроглобулін і протеозо-пептони. Вони містяться у незначних кількостях, але виконують важливі функції. Властивості деяких мінорних білків ще не

зовсім вивчені, тому їх порівнюють з аналогічними білками сироватки крові людини.

Лактоферін. Вміст у молоці складає від 0,002 до 0,010 % (біля 0,5 % сироваткових білків). У молозиві його в 10... 15, в стародойному - в 100 разів більше. Вміст також підвищується (до 0,19 %) при Захворюванні на мастит. Лактоферін є глікопротеєм, який зв'язує залізо. Молекулярна маса його 76500. Розшифрована первинна структура лактоферину. Це одноланцюговий білок, який включає 689 амінокислот, має 17 дисульфідних зв'язків. За структурою і функціями він схожий до трансферту крові, але відрізняється від нього послідовністю амінокислот у ланцюзі і молекулярною масою. Виконує важливі біологічні функції. Транспортує залізо, регулює його надходження до організму дитинчати. Крім того має антимікробну та антивірусну активність.

Лактоферін синтезується у клітинах молочної залози.

β 2-Мікроглобулін у поліпептидному ланцюзі має 98 амінокислотних залишків, його молекулярна маса 11636. Вміст у молоці складає 0,4 мг/100 г, у молозиві - 0,6 мг/100 г.

Церулоплазмін - це білок, який містить мідь. Його молекулярна маса біля 15000.

Протеозо-пептони неоднорідна за складом фракція, яка включає чотири компоненти - 3, 5, 8 «повільний» і 8 «швидкий». Компоненти 5 і 8 є фрагментами β -казеїну, а компонент 3 представляє собою глікопротеїд, має молекулярну масу 41000, переходить у сироватку із оболонки жирових кульок, де виконує функцію інгібітора протеїдліпази.

2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали і методи дослідження

Для електорофоретичних досліджень за основу було взято методику електрофорезу в присутності сечовини в однорідному гелі. Для отримання ПААГ готували розчини наступного складу:

Компоненти гелю ініціатора	Буфер для гелю (рН 7,9)	Розчин каталізатора і
АА-13,5 г	Тріс-0,609 г	ПСА–підбирали
МБА-0,75 г	ЕДТА-0,2 г	експериментально
	Веронал – 1,1 г	ТЕМЕД-0,05 г
	2-меркаптоетанол- 0,07 г	
	Сечовина – 54 г	
До 100 мл Н ₂ О 1 частина	До 100 мл Н ₂ О 2 частина	До 100 мл Н ₂ О 3 частина

Крім того готували електродний буфер і буфер для приготування зразків казеїнів:

Електродний буфер (рН 7,9)	Буфер для зразків (рН 7,9)
Тріс – 6,09 г	Тріс -30,5 г
ЕДТА – 2,0 г	ЕДТА -10,5 мг
Веронал – 11,0 г	Веронал – 55 мг
	2- меркаптоетанол- 7,0 мг
	Сечовина-13,5 г
До 1000 мл Н ₂ О	До 50 мл Н ₂ О

Зміни в даній електрофоретичній системі, порівняно з оригінальною методикою, в першу чергу стосується зменшення концентрації ПААГ. Раніше використовували 4,5 % ПААГ. Це дає можливість прискорити проведення електрофорезу за рахунок зменшення нагрівання гелю, а також, очевидно

запобігти розмиву протеїнових зон при можливій асоціації казеїнів. Останнє не виключено навіть при використанні дезагрегуючих факторів. Також до складу гелю і буферу був введений 2 – меркаптоетанол. Отримати ефективне розділення $k\text{-CN}$ і $\alpha\text{S2 – CN}$ без такого типу реагентів неможливо. Оскільки сечовина не мігрує в процесі електрофорезу, то її виключили зі складу електродних буферів. Це значно спрощує приготування буферу і в певній мірі проведення самого електрофорезу, а також зменшує витрату реагенту високої очистки. Крім того, дуже важливим для якісного електрофоретичного розділення є зменшення концентрації буферу для зразків (в 5 разів). Це дозволяє створити ділянку з високою напруженістю перед гелем і досягнути ефекту концентрування протеїнів зразку на старі, подібно до того, як це відбувається під час диск-електрофорезу.

Диск- електрофорез протеїнів казеїнового поєднання. Проводили в нативних початкових умовах анодної диск-ПААГ комплексної системи власне для кислих і відповідно нейтральних протеїнів. Раніше було описано різні варіанти цієї системи. У процесі виготовлення втім концентруючого і відповідно розділяючого гелів використовувались наступні розчини і співвідношення (об'ємні), яка мали у порівнянні з методикою Б.Девіса незначний вплив на склад гелю концентруючого характеру [36].

Складові частини розділяючого гелю (рН 8,9):

1 н HCl -25 мл амонію	Акриладім (АА) -15 г	Персульфат
Тріс – 18,3 г	Метиленбісакриламід (МБА)	(ПСА) – 0,065 г
ТЕМЕД – 0,115 мл	- 0,4 г	
До 50 мл H ₂ O 1 частина	до 50 мл H ₂ O 2 частина	До 50 мл H ₂ O 5 частина

Складові частини концентруючого гелю (рН 6,9):

1 н НСІ -24 мл	(AA) -15 г	Сахароза – 20 г	ПСА –
0,03 г			
Тріс – 2,99г	МБА-1,25 г		
ТЕМЕД – 0,29 мл			
До 50 мл Н ₂ О	до 50 мл Н ₂ О	до 50 мл Н ₂ О	до 20 мл
Н ₂ О			
1 частина	2 частина	4 частина	1 частина

Електродний буфер (рН 8,3) включав:

Тріс – 6 г
Гліцин – 28,9 г
До 100 мл Н₂О

Електрофоретичне розділення було проведено засобами досліджень з використанням трубочок приладу фірми «Reanal» (Угорщина).

Також у роботі використовували препарати загального казеїну, який виділяли із свіжого знежиреного молока ізоелектричним осадженням з подальшою інактивацією природних протеїназ. Індивідуальні фракції казеїну виділяли методом репаративного електрофорезу.

Концентрацію протеїнів визначали на спектрофотометрі СФ- 46 ($\lambda=280$ нм).

Побудова калібрувального графіка. Із стандартного розчину білка (2 мг/мл) готували робочі розчини різних концентрацій як показано у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Склад розчину білку для побудови калібрувального графіку

№ пробірки	Стандартний розчин білка, мл	Дистильована вода, мл	Концентрація білка, мг/мл
1	0,1	3,9	0,05
2	0,2	3,8	0,10
3	0,3	3,7	0,15
4	0,4	3,6	0,20
5	0,5	3,5	0,25
6	0,8	3,2	0,40
7	0,9	3,1	0,50

З кожного розчину відбирали по 0,06 мл і додавали реактиви у вказаних вище кількостях і послідовностях, а потім колориметрували при довжині хвилі 750 нм проти контролю. Виходячи з одержаних даних будували калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис, вочевидь, відомі концентрації розчину білка (мг/мл), а на осі ординат відповідні значення оптичної густини.

Для встановлення концентрації за калібрувальним графіком необхідно з'єднати горизонтальною лінією отримане для даного білка значення оптичної густини на осі ординат з калібрувальною кривою і з точки перетину останньої на вісь абсцис опускали перпендикуляр. Точка перетину цього перпендикуляру з віссю абсцис вказує вміст білка в (мг/мл) у досліджуваному розчині.

Спектрофотометричне визначення концентрацій білків проводили на спектрофотометрі СФ-46 при 280нм. Для цього використовували

встановлений раніше коефіцієнт поглинання ($D_{1\text{см}}^{1\%}$) для загального казеїну – 8,2.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Виділення загального казеїну

Під поняттям “загальний казеїн” розуміють препарат, який складається з основних і мінорних фракцій α S1-CN, α S2-CN, β -CN, κ -CN, а також включає великі фрагменти β -CN – β -CN-1P(f 29-209), β -CN-1P(f 106-209) і β -CN-1P(f 108-209). У процесі виділення загального казеїну із молока його очищають від ліпідів, білків сироватки молока, низькомолекулярних пептидів протеозо-пептонної фракції, вуглеводів, низькомолекулярних органічних і неорганічних сполук. У даній роботі при виділенні загального казеїну необхідно було досягнути високого ступеню його очистки без використання екстремальних значень рН, іонної сили, температури та дезагрегуючих факторів, які можуть призвести до глибоких змін у структурі білків казеїнового комплексу. Крім того, необхідно передбачити стадію інактивації природних протеаз, які завжди присутні в загальному казеїні і важко відділяються від нього .

У науковій літературі описано цілий ряд способів виділення загального казеїну. Вони включають осадження казеїну хімозином, коагуляцію і осадження казеїну при високих температурах, а також з допомогою іонів кальцію . Всі ці методи призводять до значних незворотних змін складу і просторової структури, а в першому випадку – і первинної структури казеїнів. Тому ми взяли за основу найбільш близький до природного процес осадження казеїнів при рН 4,6, що має місце в шлунку телят .

В першу чергу проводили відділення від казеїну ліпідів. Процес включає дві стадії і проходить при двох різних температурах. Це дозволяє більш повно відділити ліпіди молока без втрати білків. Серед багатьох кислот, які використовували раніше для осадження казеїну (сірчана, молочна,

оцтова, соляна), була вибрана соляна, оскільки ця кислота використовується при нормальному травленні казеїну в шлунку. Розчиняли осад загального казеїну за допомогою NaOH, слідкуючи, щоб значення рН при цьому не перевищувало 7,5, оскільки при більш високих значення рН може відбуватись дефосфорилування казеїнів. Основні стадії виділення загального казеїну показані на схемі:

Свіже збірне молоко

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



Знежирене молоко I

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



Знежирене молоко II

(500 мл, рН 6,7)

Додаємо 100 мл дистильованої води.

По краплях додаємо 1 н HCl до рН 4,6

при перемішуванні (7°C).



Осад загального казеїну I

Промиваємо дистильованою водою (150.0 мл).

Диспергуємо у 50,0 мл дистильованої води.

Додаємо 1 н NaOH при перемішуванні ($\text{pH} \leq 7,5$).



Розчин загального казеїну I

Додаємо 1000 мл дистильованої води.

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



Осад загального казеїну II

3.2 Виділення казеїнових фракцій молока препаративним електрофорезом

На першому етапі нами було проведено порівняльне дослідження різних електрофоретичних анодних систем поліакриламідного гелю, які раніше використовували для аналізу загального казеїну або його фракцій. Для порівняння було вибрано два види диск-електрофорезу (в нативних

умовах, у присутності ДСН з градієнтним та однорідним розділяючими гелями) і електрофорез з однорідним ПААГ в присутності сечовини. Диск-електрофорез у нативних умовах для кислих і нейтральних протеїнів, а також диск-електрофорез у присутності ДСН проводили у стовпчиках ПААГ на апараті фірми «Renal» (Угорщина). Диск-електрофорез в градієнті ПААГ і електрофорез в однорідному гелі у присутності сечовини проводили у пластинках ПААГ на апараті типу Стадієра, виготовленому в нашій лабораторії. У всіх випадках для ідентифікації казеїнових фракцій використовували гомогенні казеїни, очищені з цих же взірців молока, з яких виділяли загальний казеїн для електрофорезу.

Результати диск-електрофорезу з додецилсульфатом натрію, а також диск-електрофорезу в градієнті ПААГ показали, що ці системи є неефективними для розділення загального казеїну. В обох випадках основні фракції казеїнів (α S1-CN, β -CN) знаходяться дуже близько і практично зливаються на електрофореграмах. Це ускладнює їх ідентифікацію і розділення. Причиною цього є, очевидно, близькі значення молекулярних мас (α S1-CN - 23614 і β -CN - 23974), а також аномально високе зв'язування казеїнами ДСН (більше 1,4 мг ДСН на 1мг протеїну). Причому кількість зв'язаного ДСН у α S1 CN і κ -CN зростає при підвищенні температури, а у ρ -CN зменшується. Типові електрофореграми з найбільш ефективним розділенням казеїнів. Отримані результати свідчать, що система диск-електрофорезу в нативних умовах дозволяє відділити та ідентифікувати основні фракції казеїнів (α S1 і β -CN). Ідентифікація α S2-CN і κ 1-CN ускладнена у зв'язку з утворенням ними надмолекулярних структур у таких умовах. З цієї ж причини можливі втрати частини фракцій α S1-CN і β -CN. Численні мінорні фракції при цьому на електрофореграмі ідентифікувати однозначно не вдалося.

Найбільш підходящою для ідентифікації і розділення казеїнів є анодна система однорідного ПААГ у присутності сечовини. На електрофореграмі

видно всі казеїнові фракції, у відповідності до діючої міжнародної класифікації, розташовані у порядку зменшення їх електрофоретичної рухливості. Ця електрофоретична система була вибрана нами за основу для розробки методики препаративного електрофорезу казеїну.

Для досягнення мети необхідно було максимально спростити електрофоретичну систему, зменшити тривалість електрофорезу і, головне, збільшити кількість казеїну, яка може бути розділена на фракції. У зв'язку з цим, нами було виключено β -меркантоетанол і зменшено концентрацію сечовини, що суттєво не вплинуло на якість розділення основних фракцій казеїну. Скорочення тривалості електрофорезу вдалось досягнути за рахунок зменшення концентрації ПААГ і неповного завершення процесу відносно лідерного барвника. Для збільшення кількості казеїну у зразку було зроблено модифікацію камер і формерів для ПААГ, а також збільшено концентрацію протеїну. В результаті тривалість електрофорезу вдалось зменшити в 1,5 рази і довести до 50 хвилин і майже у 100 разів збільшити кількість протеїну у зразку без помітного погіршення ефективності розділення основних фракцій казеїну. Результати препаративного електрофорезу казеїну показані на рис. 3.1.

3.3 Виділення і очищення α 1-казеїну

Для виділення основного компоненту білків казеїнового комплексу α 1- казеїну використовували загальний казеїн, отриманий методом, описаним у розділі 3.2.1. Головним завданням при цьому було відділення α 1-казеїну від β - казеїну і його фрагментів, κ -казеїну і α 1-казеїну α 2-казеїну. В основу фракціонування казеїнів покладені різниці в стійкості їхніх розчинів у присутності сечовини, іонів кальцію, органічних розчинників залежно від рН і температури середовища. Слід підкреслити, що згідно з літературними даними ні один з цих факторів, взятий окремо, не може

забезпечити ефективне відділення гомогенного α_1 -казеїну. Тому використовують комплекс методів при виділенні α_1 -казеїну та очистці його від інших казеїнових фракцій. При цьому не використовувались методи, в яких мали місце екстремальні значення рН і температури, які можуть викликати зміни в структурі α_1 -казеїну [43].

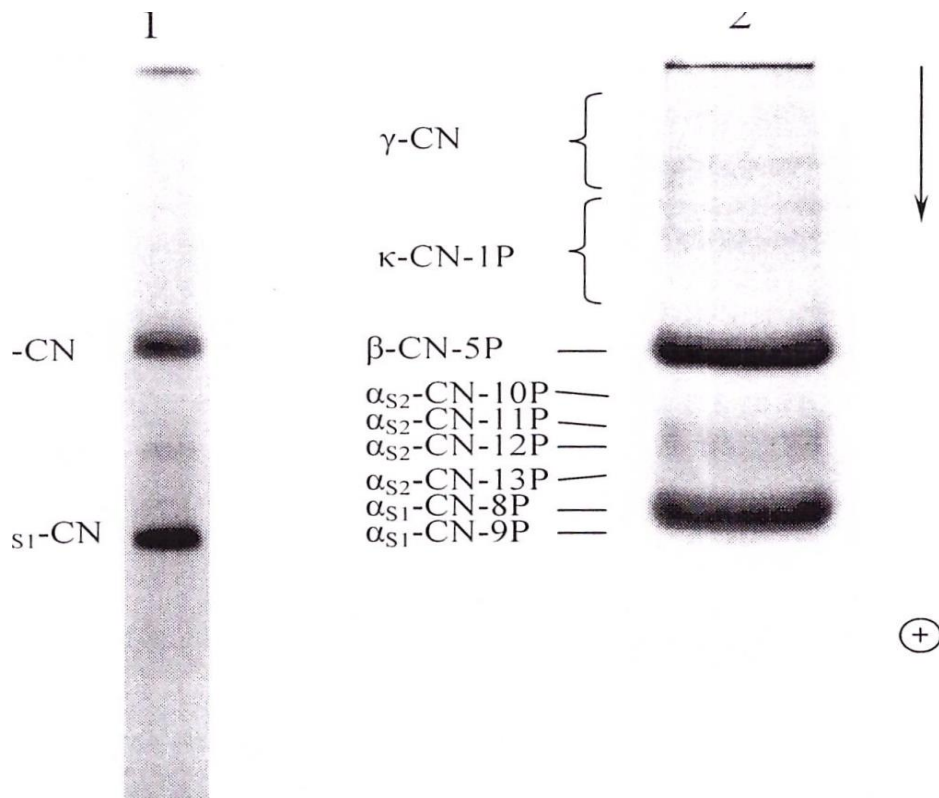
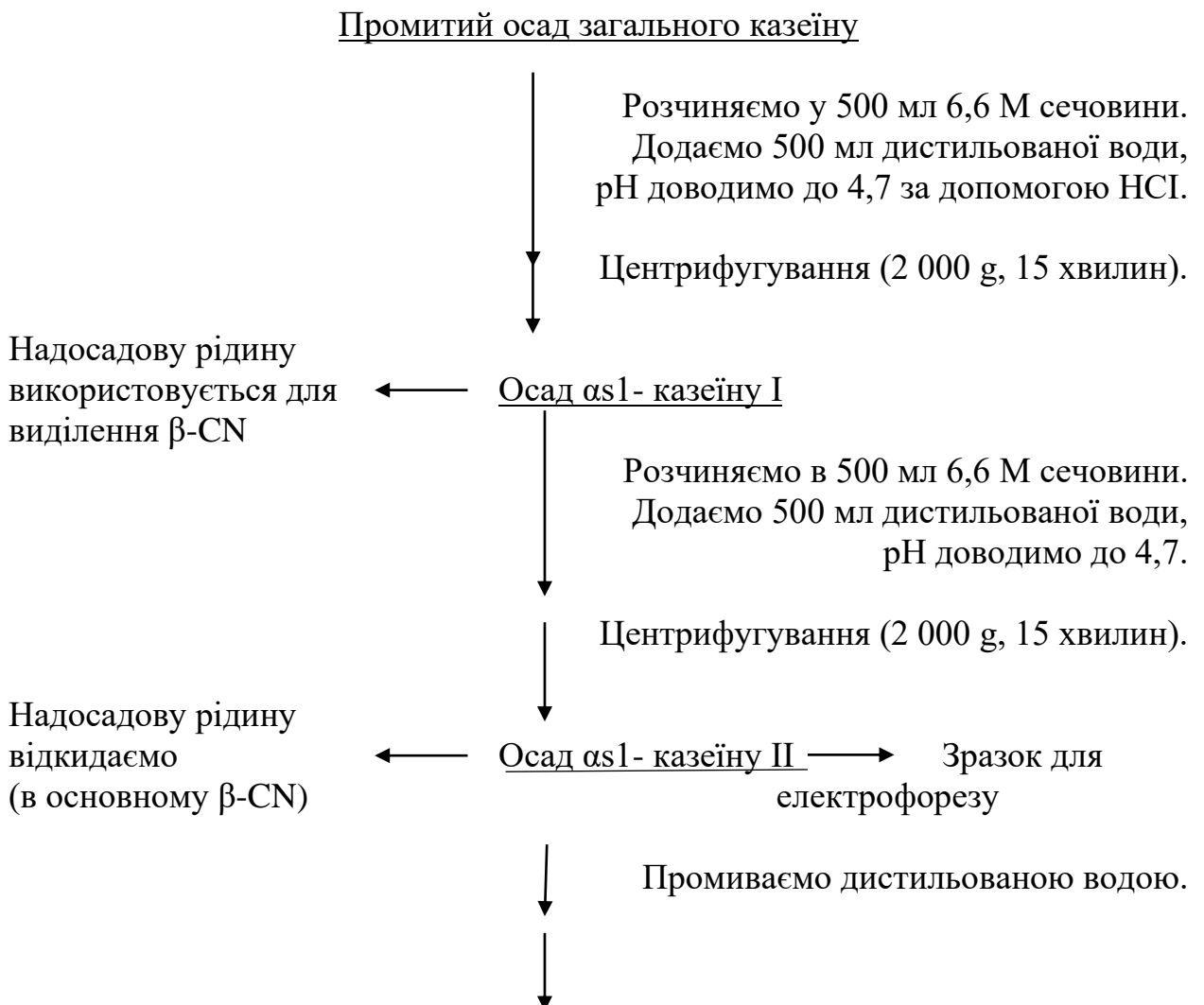


Рис. 3.1 Електрофореграми загального казеїну, отримані з використанням диск-електрофорезу в нативних умовах (1) і електрофорезу в однорідному ПААГ в присутності сечовини (2)

Використана нами схема виділення α_1 -CN може бути умовно розділена на два етапи. Під час першого етапу α_1 -CN очищається в основному від β -CN (і його фрагментів) та κ -CN. На другому етапі в основному відділяється чотири фракції α_2 -казеїнів. Для відділення β -казеїну на першому етапі виходили з даних про його високу розчинність у

присутності 3,3 М сечовини при значеннях рН близьких до ізоелектричної точки $\alpha 1$ -CN (4,5-4,7). Інші казеїни ($\alpha 1$ -CN, $\alpha 2$ -CN і κ -CN) в таких умовах випадають в осад. Для розчинення $\alpha 1$ -казеїну концентрація сечовини в розчині повинна становити 6,6 М. При застосуванні розробленого нами методу виділення $\alpha 1$ -казеїну достатньо двох переосаджень для очистки його від β -казеїну (рис. 3.4 (3)). Одержаний при цьому супернатант може бути використаний для виділення β -казеїну.

Для відділення κ -CN проводиться осадження $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -казеїнів у присутності | високих концентрацій іонів кальцію. Відомо, що κ -CN при нейтральних значеннях рН проявляє високу стійкість до іонів кальцію і залишається в розчині. Повністю всі стадії першого етапу виділення $\alpha 1$ -казеїну показані на схемі:



Розчиняємо в 200 мл дистильованої
води при рН 7,2.

Охолоджуємо до 2-4°C.
При перемішуванні додаємо розчин
CaCl₂ до концентрації 0,4 М.

Підігріваємо до 20°C і перемішуємо 30 хв.
Центрифугування (2 000 g, 15 хвилин).

Надосадову рідину
відкидаємо
(в основному κ-CN)

← Осад α_{s1}-казеїну III

Розчиняємо в 50 мл 5 М сечовини
Розводимо до 1 М сечовини водою,
рН доводимо до 4,6 за допомогою HCl.

Осад α_{s1}-казеїну IV

Диспергуємо в 200 мл води,
рН доводимо до 7,5.

Осаджуємо при додаванні HCl
до рН 4,6.

Очистка від іонів
Кальцію

Осад α_{s1}-казеїну V

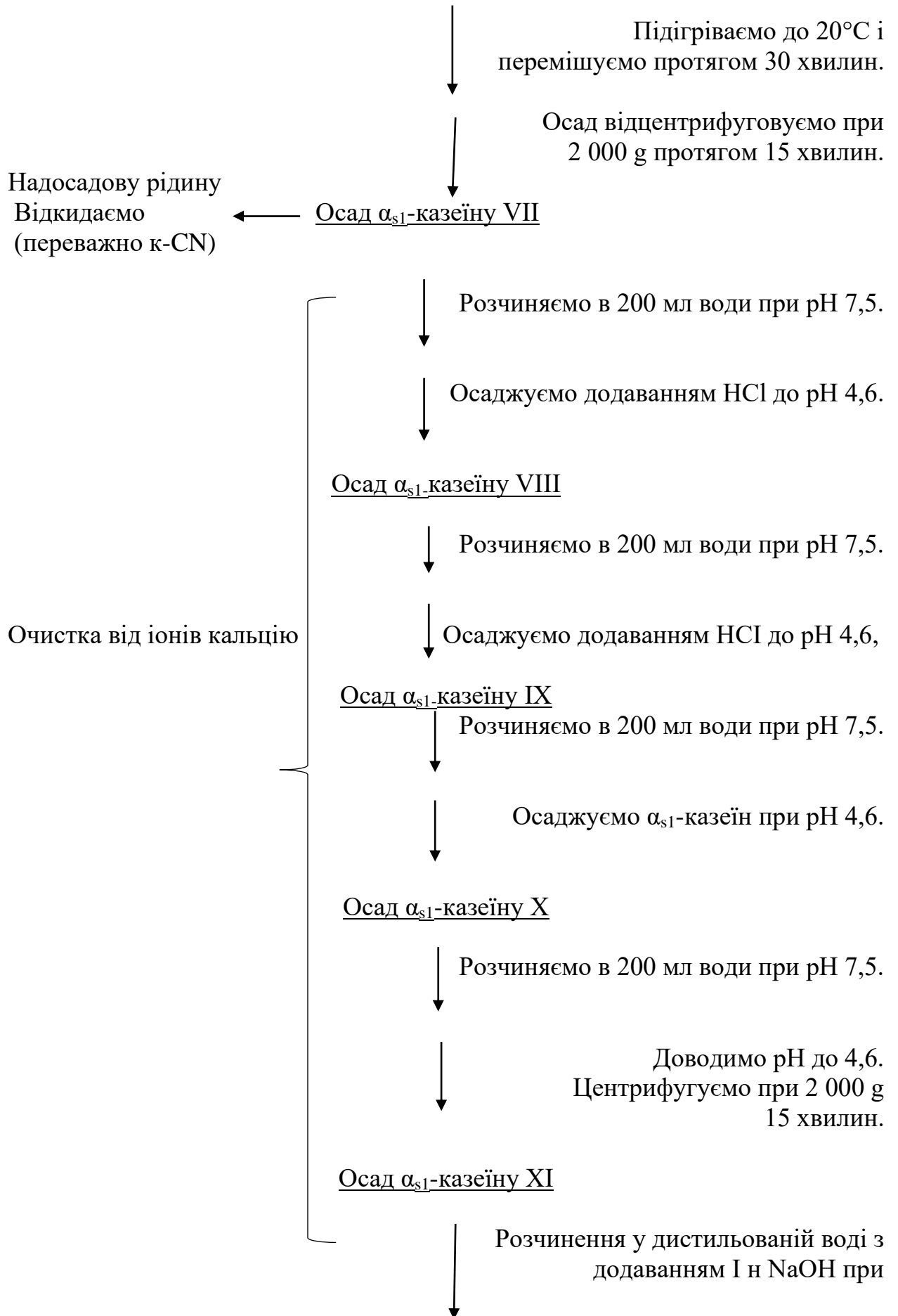
Розчиняємо в 200 мл води при рН 7,5.

Осаджуємо α_{s1}-CN після доведення
рН до 4,6.

Осад α_{s1}-казеїну VI Зразок для електрофорезу
(рис. 3.4 (3))

↓ Розчиняємо в 200 мл води при рН 7,2.

Охолоджуємо до 4°C.
Додаємо розчин CaCl₂ до 0,4 М
при перемішуванні.



мінімальному значенні рН.

Визначення

концентрації α_{s1} -CN ← Розчин α_{s1} -казеїну (100 мл, рН-7,0)



Ліофільне висушування

Препарат α_{s1} -казеїну →

При цьому, як було показано в роботах, осадження α_{s1} -казеїнів проходить краще при нагріванні середовища до 30°C у присутності іонів кальцію. Після кожного такого фракціонування, як показано на схемі, передбачена процедура відмивання іонів кальцію. Отримані нами результати свідчать про те, що подвійне переосадження α_{s1} -казеїнів забезпечує очистку їх від κ -казеїну [рис. 3.4 (3) і рис. 3.7 (2)]. У кінці першого етапу очистки α_{s1} -казеїн розчиняли при мінімальних значення рН і ліофільно висушували. Такий α_{s1} -казеїн стійкий при зберіганні, добре розчиняється при нейтральних значеннях рН. На окремих стадіях виділення α_{s1} -казеїну (як позначено на схемі) відбиратись зразки для електрофоретичного аналізу білків та визначення їх концентрації.

Результати електрофорезу показані на рис. 3.4 і 3.7. Кількість білка визначали спектрофотометрично відповідні коефіцієнти поглинання. за Д. Девісом і А. Лоу, використовуючи відповідні коефіцієнти поглинання.

Після першого етапу виділення α_{s1} -казеїну, як свідчить електрофоретичний аналіз, було отримано білок, що включає переважно α_{s1} -казеїн, а також деяку кількість α_{s2} -казеїнів (рис. 3.7 (2)]. В літературі описані способи відділення α_{s2} -казеїнів, у яких враховується його висока гідрофільність і, відповідно, його обмежена здатність розчинятися в органічних розчинниках. Крім того, α_{s2} -казеїни характеризуються підвищеною чутливістю до дії іонів кальцію. Проте використання цих властивостей не забезпечує ефективного відділення α_{s2} -казеїнів в результаті

отримують суміш $\alpha 1$ -CN і $\alpha 2$ -CN, в якій $\alpha 2$ -CN може становити до 10% (38).

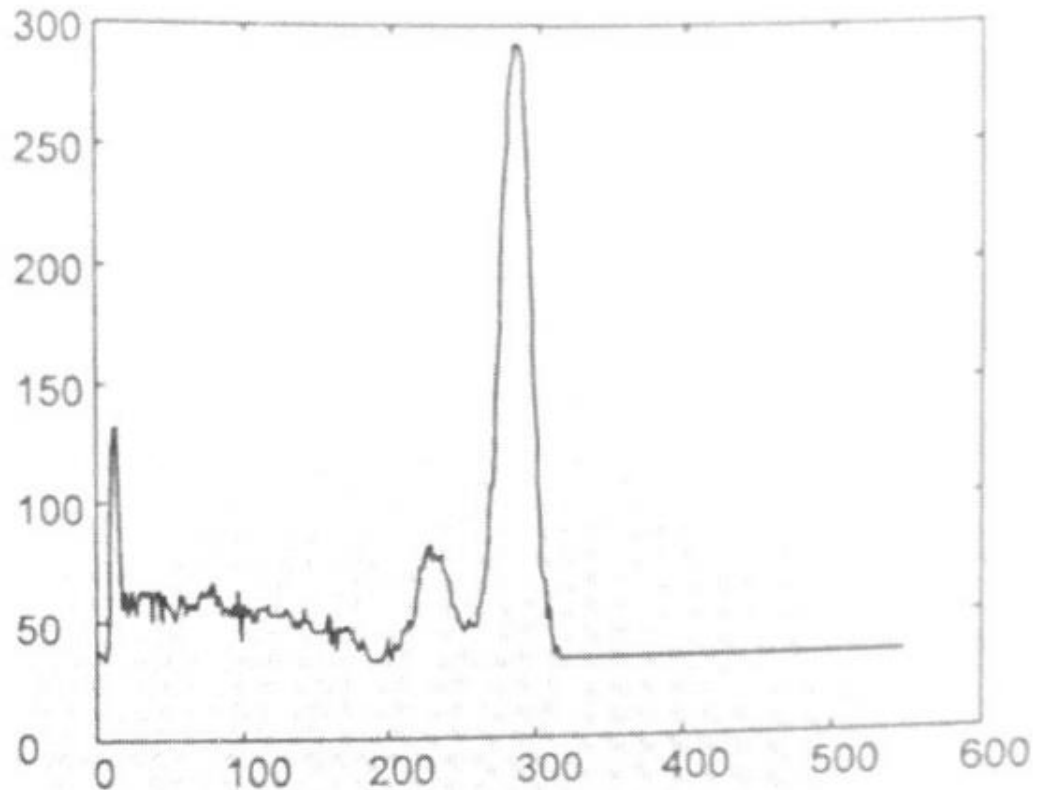


Рис. 3.2. – денситограма $\alpha 1$ -казеїну

Для відділення $\alpha 2$ -казеїнів більш ефективним є використання іонообмінної хроматографії [20, 33]. При цьому розділення відбувається за рахунок різниці в зарядах $\alpha 1$ -і $\alpha 2$ -казеїнів. Крім того, практика показує, що крім $\alpha 1$ -казеїну під час іонообмінної хроматографії ефективно відділяються залишки інших казеїнових фракцій (в т.ч. $\alpha s 0$ -CN). Тому на другому етапі очистки $\alpha 1$ -казеїну нами була використана іонообмінна хроматографія на колонках з ДЕАЕ целюлозою в градієнті концентрації NaCl. Хроматографію проводили в умовах, запропонованих М. Томпсоном і пізніше модифікованих. Хроматографічний буфер включав 0,01 м імідазол і 3,3 М сечовину. В окремих випадках замість імідазолу був використаний гістидин,

що не впливало на результати розділення. Хроматографічну колонку (2x25 см) з набору для рідинної хроматографії фірми "Reanal" (Угорщина) заповнювали ДЕАЕ-целюлозою (ДЕ-52 «Serva») після стандартної обробки. Препарат ліофілізованого α 1-казеїну (300 мг) розчиняли у 15 мл хроматографічного буферу і наносили на колонку з іонообмінником, зрівноваженим цим же буфером. Хроматографію проводили в градієнті концентрації NaCl (0-0,27 м) після пропускання 20 мл хроматографічного буферу без NaCl для видалення білків, що не зв'язались іонообмінником. Швидкість елюції становила 50 мл/год. На колекторі відбирали по 12 мл елюату. Основну частину білків, які виходять з колонки, включає пік, що відповідає за об'ємом виходу α 1-казеїну. Білки, які виходять з колонки при меншій іонній силі, ніж α 1-казеїн (фракції 39-51), включають сліди β -казеїну, а також α 1-казеїни. Мінорний α 0-CN елююється у вигляді правого плеча піку α 1-казеїну (фракції 64-67). Можна відзначити, що на отриманій нами хроматограмі проявляється значно менше β -і α 1-казеїнів, ніж це описано в літературі, а к-CN практично відсутній. Це може свідчити про ефективність схеми першого етапу очистки α 1-казеїну.

У більшості робіт при очистці казеїнових фракцій іонообмінну хроматографію проводили двічі або тричі. Тому фракції заштрихованої частини піка α 1-казеїну об'єднували і діалізували проти дистильованої води, висушували ліофільно і використовували для повторної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі.

Одержаний білок аналізували на гомогенність з допомогою естрофорезу в лужній системі ПААГ. Результати електрофорезу показані на В.7 (3). На електрофореграмі видно чітку смугу α 1-казеїну. Інші казеїни при р у відсутні.

Повторну хроматографію α 1-казеїну на ДЕАЕ-целюлозі здійснювали за погічних умов. З наведених на рис. 5.6 даних видно, що на хроматограмі практично відсутні. Всі головні фракції казеїнів окрім α 1-казеїну.

ктрофоретичний аналіз показує, що ступінь гомогенності $\alpha 1$ -казеїну із прихованої частини після другої хроматографії не відрізняється від тогенності білку, отриманого під час першої хроматографічної очистки с. 3.7 (3). З цих даних випливає, що в дослідженнях можна використовувати одну стадію хроматографічної очистки $\alpha 1$ -казеїну.

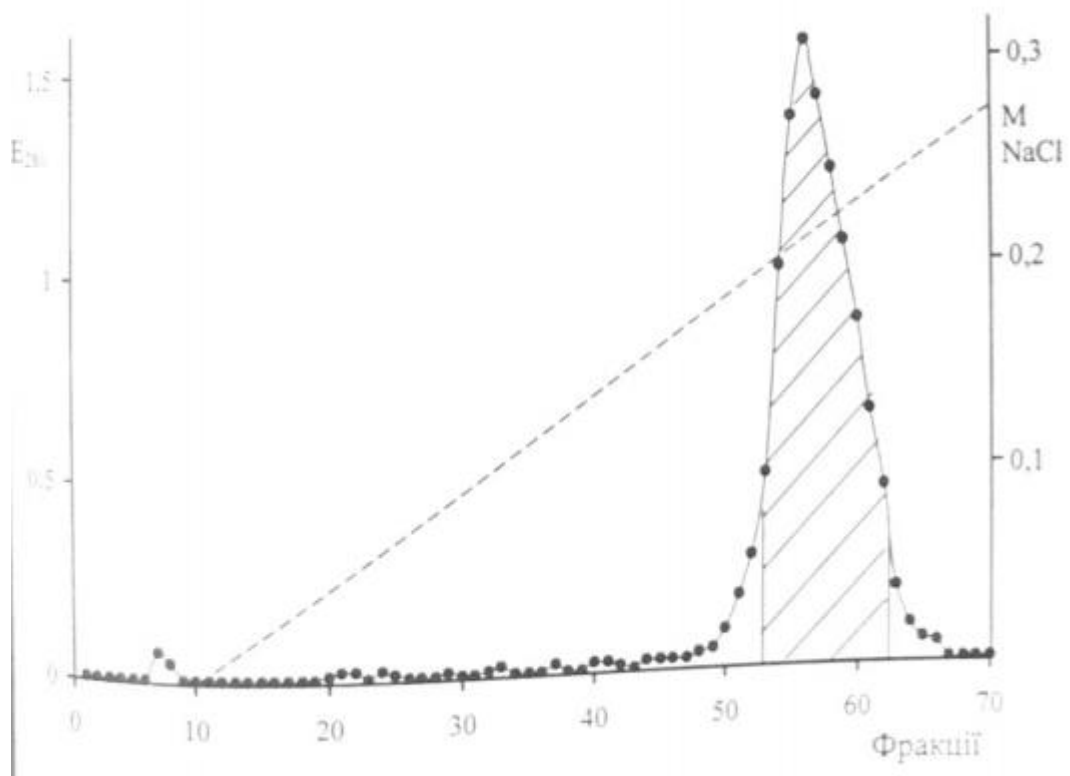


Рис. 3.3. Хроматограма $\alpha 1$ -казеїну, отримана під час повторного розділення на колонці з ДЕАЕ-целюлозою.

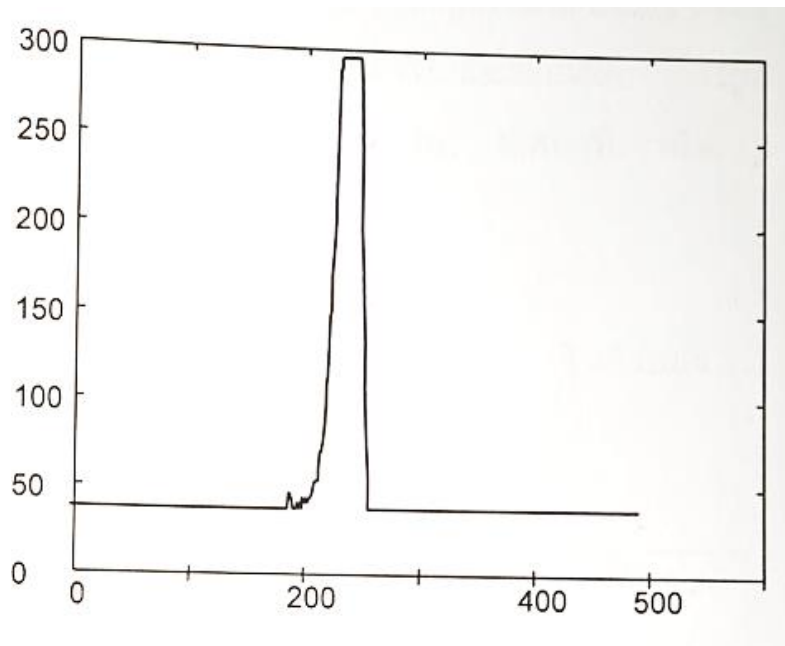


Рис. 3.4. Денситограма $\alpha 1$ -казеїну після очистки на колонці з ДЕАЕ целюлозою

Кількісну сторону типового виділення $\alpha 1$ -казеїну ілюструють дані, наведені в табл. 3.1. Вихід $\alpha 1$ -казеїну на різних стадіях диференційного осадження розраховували відносно початкової кількості використаного загального казеїну 11,9 г. При оцінці цих даних слід мати на увазі, що за даними літератури кількість $\alpha 1$ казеїну становить 37-38% від загальної кількості казеїну. При повторній хроматографії використовували 300 мг $\alpha 1$ -казеїну, який було отримано після двох фракціонувань переосадженого на ДЕАЕ-целюлозі. При хроматографічній очистці $\alpha 1$ -казеїну його вихід був дещо вищий, ніж у дослідженнях інших авторів – 50-60%.

3.4 Ідентифікація протеїнових фракцій казеїнового комплексу

За основу для методики швидкої ідентифікації протеїнів казеїнового комплексу було взято описану раніше анодну систему електрофорезу в ПААГ за присутності сечовини [51]. Така система добре себе зарекомендувала при аналізі складу протеїнів молока, дослідженні шляхів

утворення біоактивних пептидів з казеїнів молока, моделюванні процесів ензиматичної коагуляції казеїнів під час молочного живлення. Анодну систему однорідного ПААГ для аналізу казеїнів також рекомендує міжнародний комітет з номенклатури і класифікації протеїнів молока [50]. Результати електрофорезу виділеного для аналізу загального казеїну молока у такій системі показані на рис. 3.2

На електрофореграмі можна бачити характерний розподіл усіх відомих фракцій казеїну в відповідності з міжнародною класифікацією. Всього на електрофореграмі є можливість ідентифікувати понад 13 фракцій. Їх кількість при використанні молока з різних тварини варіює від 13 до 15 в залежності від кількості κ -казеїнів, які відрізняються вмістом негативно заряджених олігосахаридних груп.

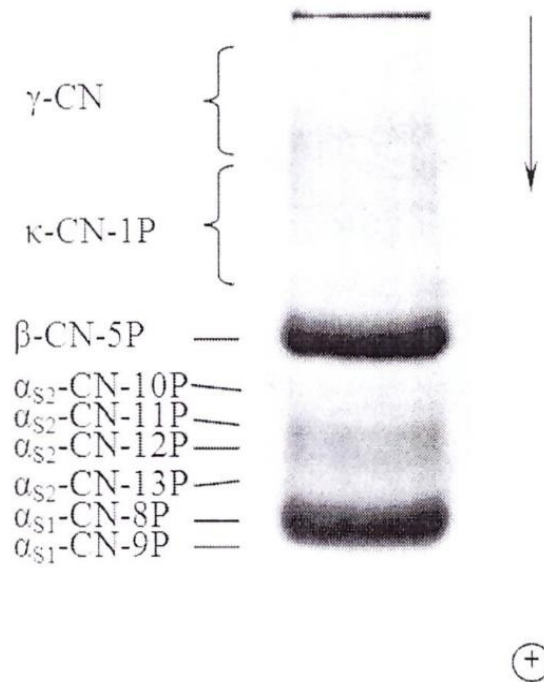


Рис. 3.5. Електрофореграма препарату загального казеїну молока

Для ідентифікації казеїнів в якості маркерів використовували попередньо виділені електрофоретично гомогенні α_{S1} -, β , κ -казеїни. Виділення проводили методом препаративного електрофорезу. Забарвлена пластинка ПААГ препаративного електрофорезу має наступний вигляд (рис. 3.6).

Отримані таким чином препарати загального казеїну і його основних фракцій були використані у подальшій роботі. Для відпрацювання методики швидкої ідентифікації казеїнів в лабораторії біохімії білків молока ТНТУ було виготовлено прилад типу Страд'єра для електрофорезу на вертикальних пластинках ПААГ. Конструкція приладу дозволяє змінювати геометричні розміри камери і кількість взірців для одночасного аналізу. Вдосконалена конструкція формера забезпечує також тримання якісних електрофореграм.

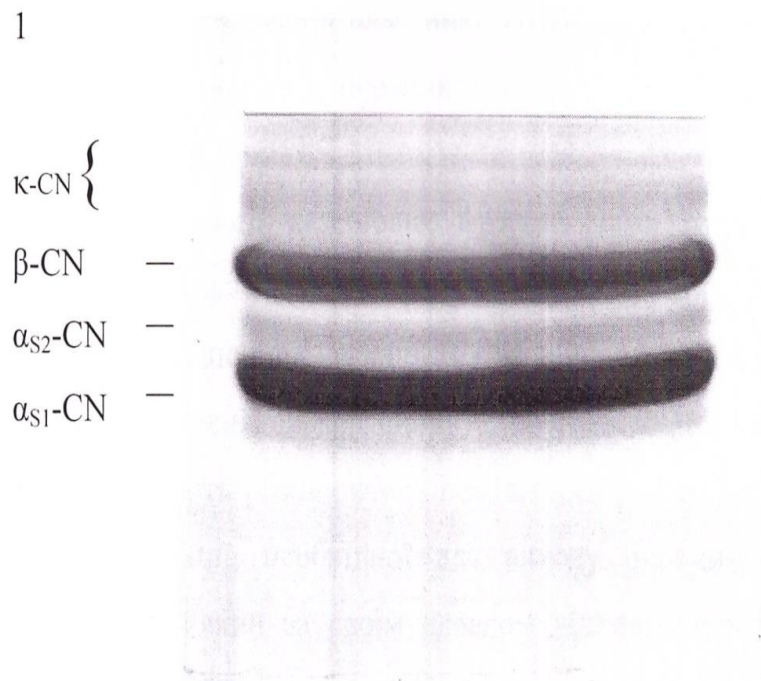


Рис. 3.6. Пластинка ПААГ після препаративного електрофорезу білків казеїнового комплексу молока

Для зменшення тривалості аналізу і спрощення електрофоретичної системи були внесені наступні зміни у порівнянні з аналітичним варіантом [51]: збільшено значення рН буферів для гелю, для досліджуваних зразків і електродного буферу до 8,3; знижена концентрацію ПААГ до 3,3%; вилучено зі складу буферу для гелю і для окремих зразків β -меркаптоетанол; зменшено розміри електрофоретичної камери. Відсутність β -меркаптоетанолу не впливає на якість розділення, оскільки мінорні фракції, які містять залишки цистеїну (к-і α S1-казеїни), рухаються однією смугою. Критерієм для встановлення тривалості електрофорезу (30 хв.) було мінімальне розділення α S1-, β -, α S1- і к-груп фракцій казеїнів, яке контролювали шляхом побудови денситограм. Забарвлення при інтенсивному струшуванні достатньо проводити протягом 1,5 хв. При звичайному відмиванні гелю вже через 10-15 хв можна ідентифікувати основні фракції казеїну. Якісні електрофореграми для кількісного аналізу можна отримати через 90 хв. При необхідності можна використати електрофоретичне знебарвлення, що суттєво скоротить тривалість аналізу. Оптимальний варіант швидкої електрофоретичної ідентифікації загального казеїну та його фракцій показано на рис. 3.4(а).

Важливим є також те, що протеїни сироватки молока і протеїни бобів сої, які часто використовують для заміни казеїнів, у запропонованій нами системі електрофорезу відрізняються за електрофоретичною рухливістю. Електрофореграма загального казеїну, протеїнів сироватки молока та бобів сої показана на рис. 3.4(б).

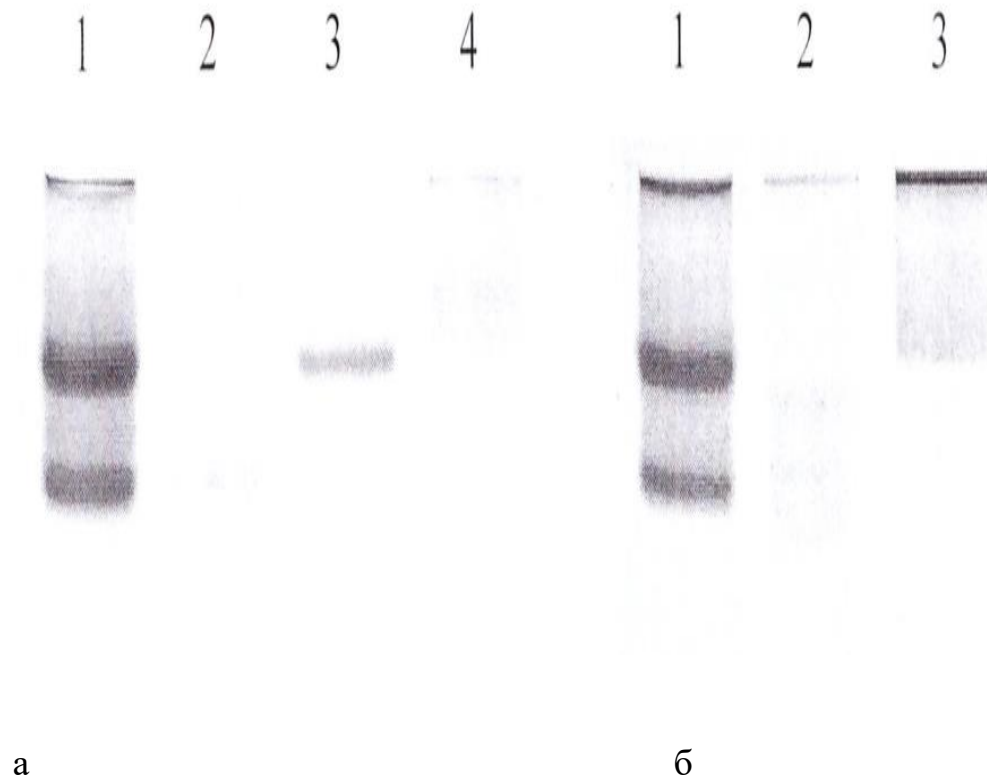


Рис. 3.7. а) електрофореграма загального казеїну (1), та його фракцій: α S1 -CN(2), B-CN (3) і k-CN (4). б) електрофореграма загального казеїну (1), протеїнів сироватки молока (2) і протеїнів бобів сої (3).

Отже запропонований варіант анодної електрофоретичної системи в однорідному ПААГ в присутності сечовини може бути використаний для експрес-аналізу і ідентифікації протеїнів казеїнового комплексу молока, зокрема при їх виділенні та очищенні. Дана методика також може бути корисною для аналізу натуральності молочних протеїнових продуктів.

4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ

4.1 Охорона праці

4.1.1 Засоби захисту людини від шкідливих речовин.

Основними засобами захисту людини від впливу шкідливих речовин є: гігієнічне нормування їх вмісту у виробничій зоні і на робочому місці, а також різні методи очищення газових викидів (адсорбція, хімічне перетворення) та стоків (первинне, вторинне та третинне очищення). Потрібно, щоб на належному рівні була забезпечена робота колективних та індивідуальних засобів захисту людей [3].

Адсорбція – процес поглинання газів поверхнею твердих речовин (наприклад, адсорбція газів активованим вугіллям).

Нейтралізація – це перетворення токсичних речовин у нетоксичні чи малотоксичні речовини за допомогою хімічних реакцій. Наприклад, для нейтралізації сірчаної кислоти застосовують карбонат натрію:



Для перетворення токсичних сумішей газів у нетоксичні чи малотоксичні застосовується дожиг.

Пилоочистка здійснюється за допомогою спеціальних очисних пристроїв і споруд: фільтрів, пилоосаджувальних камер, пилососів, скрубєрів, електроприладів тощо [27].

Найбільш ефективним і дешевим способом зменшення кількості пилу є вологе прибирання у приміщенні та вентиляція приміщень.

Контроль за станом робочої зони при забрудненні повітря здійснюється за допомогою спеціальних приладів: загазованість – газоаналізаторами (ВПХР, УГ-2 та ін.); запиленість – фотометрією, мікроскопією тощо.

До загальних заходів попередження дії шкідливих речовин на працюючих належать:

- заміна шкідливих речовин менш шкідливими;
- удосконалення технологічних процесів та устаткування;
- автоматизація і дистанційне керування технологічним процесом;
- герметизація виробничого устаткування, локалізація шкідливих викидів;
- попередні та періодичні медичні огляди робітників, які працюють у шкідливих умовах, профілактичне харчування;
- використання засобів індивідуального захисту [30].

4.1.2 Надання долікарської допомоги при опіках та відмороженні

Опіки шкіри. Опіки виникають внаслідок впливу високої температури (термічні опіки), міцних кислот і лугів (хімічні опіки), а також під дією ультрафіолетового й інших видів опромінення (променеві опіки). У мирний час найбільш поширені термічні опіки, які отримуються в результаті побутової необережності (парою, окропом тощо), пожеж; рідко - внаслідок виробничих травм через недотримання вимог безпеки. Найбільш типовими променевими опіками є сонячні. Опіки, як бойові травми, можуть бути обумовлені застосуванням запалювальних сумішей, а також ядерної зброї, світлове випромінювання якої викликає опіки шкіри і ураження органів зору [4]

Термічні опіки шкіри. Під впливом високих температур відбувається коагуляція білків шкіри. Клітини шкіри гинуть і піддаються некрозу. Чим вища температура травмуючого чинника і триваліша його дія, тим глибше ураження шкіри. Розрізняють чотири ступені опіків. I ступінь - стійка гіперемія, II ступінь - відшаровування епідермісу й утворення пухирів, III ступінь - вигорання власне шкіри (дерми). Їх поділяють на поверхневі - Ша

ступеня і глибокі - ШБ ступеня; IV ступінь - вигорання шкіри, підшкірної клітковини і структур, які знаходяться глибше. Опіки I-II ступеня належать до поверхневих і заживають без утворення рубців. Опіки III ступеня є глибокими, супроводжуються рубцюванням. Для їхнього загоєння нерідко доводиться застосовувати вільну пластику шкіри. При опіках IV ступеня може настати некроз кінцівки, що вимагає ампутації [28].

Симптоми термічних опіків. Для опіків I ступеня характерна стійка гіперемія обпаленої шкіри, сильний біль; при опіках II ступеня на тлі гіперемірованої шкіри розрізняють різної величини пухирі, наповнені прозорою рідиною; при опіках III ступеня на тлі ділянок гіперемії, розкритих пухирів видно ділянки білої ("свинячої") шкіри з обривками епідермісу опік IV ступеня — обвуглення шкіри. Великі опіки (поверхневі — більш 30% площі шкірних покривів, глибокі — більш 10%) ускладнюються опіковим шоком, що відрізняється тривалою еректильною фазою з психомоторним порушенням, помірно підвищеним артеріальним тиском. Потерпілі сильно страждають від болю, намагаються втікати, погано орієнтуються у місці й обстановці [33]. Порушення змінюється протрацією з падінням артеріального тиску. Для опікового шоку характерне згущення крові внаслідок великих плазматрат. Сечі мало, вона значно концентрована, а при важких опіках - темного кольору за рахунок домішок гемолізованої крові.

При вдиханні гарячого диму можуть бути опіки дихальних шляхів з розвитком гострої дихальної недостатності, отруєння чадним газом, якщо потерпілий довгостроково знаходиться в закритому приміщенні.

Невідкладна допомога. Потерпілого насамперед треба швидко винести із небезпечної зони, погасити на ньому одяг вогнегасником, водою чи цупкою тканиною-чохлам, брезентом, ковдрою, пальтом тощо. Полум'я з одягу можна збити, притискаючи потерпілого до землі, дорожнього покриття. Одяг, що тліє, треба обережно зняти, попередньо розрізавши або розірвавши. Частини одягу, що прилипли до поверхні опіку, відривати не

слід, бо це може завдати потерпілому сильного болю і погіршити його стан. [29] При обмежених опіках I ступеня обпечену ділянку обтирають спиртом або одеколоном, а потім накладають на неї стерильну пов'язку.

При наявності різкого болю вводять усередину м'язів знеболювальні засоби (1 -2 мл 1 % розчину морфіну, 1 мл 2% розчину пантопону чи промедолу), а при збудженні - 2 мл седуксену. Усередину м'язів чи внутрішньовенно вводять антигістамінні препарати (димедрол, супрастин).

Опіки I ступеня обробляють 33% розчином спирту, II-III-IV ступеня — 33% розчином спирту і накладають стерильні пов'язки. Розкривати чи зрізати пухирі не потрібно. Невеликі поверхневі опіки кистей рук, ступнів площею не більш 1-2% можна лікувати амбулаторно. Після обробки обпеченої поверхні накладають стерильну пов'язку з 0,2% фурациліновою маззю і направляють потерпілого в поліклініку за місцем проживання. При затримці госпіталізації на опікові поверхні накладають пов'язки з 0,2% фурациліновою маззю, 5% стреп-тоцидовою маззю чи 1 % синтоміциновою емульсією. При великих опіках і опіковому шоку внутрішньовенно переливають кровозамінники, сольові розчини і глюкозу, розраховуючи обсяг рідин за формулою "подвійного нуля". У перші 8 годин після травми обсяг рідини, що вливається, визначають шляхом додавання двох нулів до площі опіку, причому половину обсягу складають 5% розчин глюкози і сольові розчини.

Госпіталізація. Потерпілі з глибокими опіками будь-якої локалізації повинні бути направлені в опікове відділення чи опіковий центр. Потерпілих у стані опікового шоку з площею поверхневих опіків більше 30%, чи глибоких — більше 10%, госпіталізують у реанімаційне відділення при опіковому центрі. Транспортування потерпілого у положенні сидячи чи напівсидячи здійснюється при опіках верхньої половини тулуба, обличчя, шиї, рук; лежачи на спині - при опіках передньої поверхні тулуба, ніг; лежачи на животі - при опіках задньої поверхні тулуба, ніг; при циркулярних опіках підкладають складений одяг, гумові подушки, щоб більша частина ноги чи

тулуба була у висячому положенні і не торкалася нош. Це дозволяє зменшити біль під час транспортування.

Хімічні опіки шкіри. Особливістю хімічних опіків є тривала дія на шкірні покриви хімічного агента, якщо вчасно не надана перша допомога. Тому опік може істотно заглибитися за 20-30 хв. Його поглибленню і поширенню сприяє просочений кислотою чи лугом одяг. При хімічних опіках рідко виникають пухирі, тому що, здебільшого, вони належать до опіків III чи IV ступенів. При опіках кислотами утворюється струп, а при опіках міцними лугами — колікваційний некроз.

Відмороження. Людина найчастіше відморожує обличчя, ніс, вуха, кисті рук і стопи. Розрізняють чотири ступені відмороження. При відмороженні I ступеня хворобливе відчуття холоду в потерпілого змінюється онімінням, а уражена ділянка тіла стає блідою, нечутливою. Після зігрівання тіла з'являється почервоніння і синюшність, набряклість шкіри. Відмороження II ступеня характеризується появою на уражених ділянках після зігрівання пухирів, наповнених прозорою рідиною, великою набряклістю. При відмороженнях III ступеня настає змертвіння епітелію шкіри; при відмороженнях IV ступеня — шкірних тканин, що лежать глибше.

Перша допомога передбачає зігрівання як відмороженої частини тіла, так і всього організму. Хворого треба перевести в тепле приміщення, дати теплого чаю, кави. Відморожену частину обережно розтирають чистими руками (руки потрібно добре вимити, протерти спиртом або одеколоном). Розтирати потерпілого снігом не рекомендується. Коли відновиться кровообіг, з'являється чутливість, почервоніння, відчуття тепла, уражену ділянку протирають спиртом чи одеколоном і накладають стерильну пов'язку. Відморожену ділянку, на якій є пухирі, змертвіння шкіри, розтирати не можна, слід тільки накласти стерильну пов'язку. Змащувати відморожені ділянки жиром, мазями не рекомендується.

4.2 Безпека в надзвичайних ситуаціях

4.2.1 Проведення інструктажу охорони праці у надзвичайних ситуаціях

Відповідно до Кодексу цивільного захисту України, підготовка персоналу на підприємствах незалежно від форм власності до дій у надзвичайних ситуаціях здійснюється за спеціально розробленою схемою заходів захисту населення та територій.

Для великих і малих підприємств система заходів захисту від надзвичайних ситуацій включає:

- планування та здійснення необхідних заходів для захисту своїх працівників, об'єктів господарювання;

- розроблення планів локалізації та ліквідації аварій з подальшим погодженням з Державною службою України з надзвичайних ситуацій;

- підтримання у готовності до застосування сил і засобів із запобігання виникненню та ліквідації наслідків надзвичайних ситуацій;

- створення та підтримання матеріальних резервів для попередження та ліквідації надзвичайних ситуацій;

- забезпечення своєчасного оповіщення своїх працівників про загрозу виникнення або при виникненні надзвичайної ситуації [25].

Наведені вище заходи мають загальний характер, вони не повністю враховують специфіку діяльності конкретного підприємства, чисельність працівників, обсяг і вид виробництва тощо.

Основною особливістю дій малих підприємств при загрозі або виникненні надзвичайних ситуацій є в першу чергу захист персоналу та відвідувачів.

Виходячи з цього, ст. 130 Кодексу цивільного захисту України передбачає, що на підприємствах з чисельністю персоналу 50 осіб і менше

розробляються та затверджуються інструкції щодо дій при загрозі або виникненні надзвичайних ситуацій.

Крім того, у сфері промислового виробництва до малих підприємств можуть бути віднесені і такі, де чисельність працівників перевищує 50 осіб. Інструкції для таких підприємств розробляються за рішенням відповідного територіального органу Держслужби України з надзвичайних ситуацій.

Розроблена інструкція не повинна суперечити положенням та вимогам Кодексу цивільного захисту України.

Інструкція розробляється та підписується посадовою особою підприємства з питань цивільного захисту, затверджується керівником підприємства та доводиться до всіх працівників під підпис.

Крім інструкції, на малому підприємстві розробляється план евакуації при пожежі або загрозі вибуху. Особливо це важливо для тих об'єктів, на території яких може знаходитись значна кількість відвідувачів.

Деякі конкретні заходи, не відображені в нормативних документах підприємства, потребують внесення до посадових інструкцій працівників. Крім того, на малому підприємстві необхідно розробляти й доводити до всіх працівників Порядок цілодобового оповіщення керівництва та працівників у випадку загрози або виникнення надзвичайної ситуації.

Всі працівники підприємства повинні бути навчені діям, чітко знати свої обов'язки та неухильно їх виконувати. Це також стосується адміністрації малого підприємства, яка в екстремальній обстановці не може приймати помилкові рішення або віддавати необґрунтовані розпорядження. [28]

4.2.2 Оцінка стійкості виробництва до надзвичайних ситуацій

Під стійкістю роботи промислового об'єкта розуміють його здатність в умовах надзвичайних ситуацій випускати продукцію в запланованому об'ємі і номенклатурі, а при отриманні слабких і середніх руйнувань, при пожежах, повенях, зараженні місцевості, а також, при порушенні зв'язків по кооперації і постачанню відновлювати виробництво в мінімально короткі терміни.

Стійкість роботи об'єктів, що не виробляють матеріальні цінності, визначається їх здатністю виконувати свої функції в умовах надзвичайних ситуацій. На стійкість роботи об'єктів промисловості в умовах надзвичайних ситуацій впливають наступні чинники:

надійність захисту робітників і службовців від небезпечних наслідків надзвичайних ситуацій - аварій, катастроф, стихійного лиха і різних засобів ураження;

здатність інженерно – технічного комплексу (будівель, споруд, технологічного обладнання, комунально-енергетичних і технологічних систем і мереж) протистояти руйнуючому впливу аварій, катастроф, стихійного лиха і сучасної зброї;

надійність забезпечення об'єкта усім необхідним для випуску продукції - сировиною і паливом, електроенергією, водою, комплектуючими матеріалами і інструментом;

стійкість, надійність, гнучкість і оперативність управління виробництвом і цивільною обороною;

готовність об'єкта до проведення рятувальних та інших невідкладних робіт і робіт по відновленню порушеного виробництва.

Дані чинники визначають і основні шляхи підвищення стійкості роботи промислових об'єктів в умовах надзвичайних ситуацій, це:

забезпечення надійного захисту робітників і службовців від вражаючих чинників в надзвичайних ситуаціях;

захист основних виробничих фондів від руйнуючого впливу аварій, катастроф, стихійного лиха і засобів ураження;

забезпечення стійкого постачання всього необхідного для випуску запланованої продукції;

підготовка до відновлення порушеного виробництва;

підвищення надійності і оперативності управління виробництвом і цивільною обороною;

Захист робітників і службовців, населення досягається проведенням цілого комплексу захисних заходів, застосуванням різних способів захисту з урахуванням конкретної обстановки. Захист засобів виробництва полягає в підвищенні опорності, міцності, будівель, споруд і конструкцій об'єкта до впливу можливих вражаючих чинників і захисту виробничого обладнання, засобів зв'язку та інших засобів, які складають матеріальну основу виробничого процесу. Забезпечення стійкого постачання досягається проведенням заходів щодо захисту комунально-енергетичних мереж, транспортних комунікацій і джерел постачання, а також створенням необхідних запасів палива, сировини, напівфабрикатів і комплектуючих виробів. Підготовка до відновлення порушеного виробництва здійснюється завчасно. Вона передбачає планування відновних робіт по різних варіантах, підготовку ремонтних бригад, створення необхідного запасу матеріалів, обладнання і направлена на поновлення випуску необхідної продукції в мінімальні терміни. Підвищення надійності і оперативності управління виробництвом досягається створенням на об'єкті стійкої системи зв'язку, високою професійною підготовкою керівного складу до виконання функціональних обов'язків по керівництву виробництвом і заходами ЦО в повсякденній діяльності і в умовах надзвичайних ситуацій, а також своєчасним прийняттям правильних рішень і постановкою задач підлеглим відповідно до обстановки. Таким чином, підвищення стійкості роботи об'єктів промисловості в умовах надзвичайних ситуацій досягається

завчасним проведенням комплексу інженерно-технічних, технологічних і організаційних заходів, направлених на максимальне зниження впливу вражаючих чинників і створення умов для ліквідації наслідків надзвичайних ситуацій. Інженерно-технічні заходи включають комплекс робіт, направлених на підвищення стійкості виробничих будівель, споруд, технологічного обладнання, комунально-енергетичних систем.

Технологічні заходи забезпечують підвищення стійкості роботи об'єкта шляхом зміни технологічних процесів, сприяють спрощенню виробництва продукції і виключають можливість виникнення аварій і катастроф. Організаційні заходи передбачають розробку і планування дій керівного складу, штабу, служб і формувань ЦО по захисту робітників і службовців, проведенню рятувальних і невідкладних робіт, відновленню виробництва, а також випуску продукції на обладнанні, що збереглося.

ОСНОВНІ ВИСНОВКИ ДИПЛОМНОЇ РОБОТИ

1. Для ідентифікації фракцій казеїнового комплексу було виділено препарат загального білка казеїнів. Білковий склад казеїнів підтверджено електрофорезом.

2. Виділено індивідуальні електрофоретично-гомогенні фракції основних протеїнів казеїнового комплексу а саме: α S1-, β , k-казеїни.

3. Підібрано систему для швидкого аналізу казеїнів на основі анодної системи поліакриламідного гелю.

4. Порівняння електрофореграм казеїну з протеїнами сироватки молока і білків сої. Підтвердили можливість використання запропонованої електрофоретичної системи для ідентифікації білків казеїнового комплексу в харчових продуктах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Боечко, Ф.Ф. Біологічна хімія [Текст]: Навч. посібник. - 2-ге вид., перероб. і допов. - К.: Вища школа, 1995. - 536 с. - ІБВІЧ 5-11-004374-4
2. Высоцкий В.Г., Зилова И.С. Роль соевых белков в питании человека // Вопросы питания. - 1995, — № 5.-С. 16 — 20.
3. Гандзюк М.П., Желібо Є.П., Халімовський М.О. Основи охорони праці: Підручник. 5-е вид. / За ред. М.П. Гандзюка. - К.: Каравела, 2011. - 384 с.
4. Ганонг В. Ф. Фізіологія людини: Пер. з англ. - Львів: БаК, 2002. - 784 с.
5. Горбатова, К.К. Химия и физика белков молока [Текст]. — М.: Колос, 1993. — 192 с.: ил. - (Учебники и учеб, пособия для студентов высш. учеб, заведений). - ІБВІМ 5-10-001839-9
6. Горбатова, К.К. Физико-химические и биохимические основы производства молочных продуктов [Текст]. - СПб.: ГИОРД, 2004. - 352 с.: ил. - ІБВК 5-901065-54-9
- 7 Горбатова, К.К. Химия и физика молока: учебник для вузов [Текст]. - СПб.: ГИОРД, 2003. - 288 с.: ил. - ІБВІТ 5-901065-48-4
8. Гусев, М.В. Микробиология [Текст]: Учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. - 3-е изд. - М. : Изд-во МГУ, 1992. - 448 с. : ил. - ІБВІ 5-211-01640-8
9. Деркач Т. М. Сучасні наукові напрями у харчуванні: навч. посіб. для студентів вищих навч. закладів / Т. М. Деркач, Н. В. Кондратюк. - Д.: Вид-во ДНУ, 2009. - 212 с.
10. Жидецкий В. Ц., В. С. Джигирей, О. В. Мельников — Вид. 2-е, стереотипне. — Львів: Афіша, 2000. — 348 с
11. Зайцева Е.В. Соя как пищевой и лечебный продукт // Пищ. пром-сть. - 2005-№2 - С. 70.
12. Капрельянц Л.В. Йоргачова К.Г. Функціональні продукти. - Одеса, Друк, 2003. -С. 14-16.

13. Капрельянц Л.В., Невмыванный С.Л., Петросьянц А.П. Особенности химического состава сортов семян сои, районированных на юге Украины // Наукові праці ОНАХТ. - 2000. - Виш. 17.— С. 134—138.
14. Капрельянц Л.В., Шпырко Т.В., Труфкати Л.В. - Соевые продукты: химия, технология, использование – ТЭС, 2014.-196 с, илл.17
15. Капрельянц Л.В. Шаповаленко О.І., Шерстобітов В.В., Дрига М.І. Високопоживна соя // Зерно і хліб. — 2000. — № 2. - С. 25.
16. Кириченко Е.В., Титова Л.В. Лектины семян сои как компонент комплексного биопрепарата // Прикл. биохимия и микробиология. — 2006. - т. 42, №2. - С. 219 — 223.
17. Ключкин В.В., Быкова С.Ф. Новые представления о структуре масляничных семян и ее влияние на технологические свойства // Изв. Вузов. Пищевая технология. - 2008. - № 2-3. - С. 8 - 12.
18. Ковальов В.М., Мартинов А.В., Красикова Т.О., Степанова С.І. Рослинні лектини як біологічно активні речовини для створення лшарських
19. Коршунова Г.Ф., Слащева А. В., Сабіров О.В. Технологічні основи безпеки продуктів харчування / Г.Ф. Коршунова, А. В. Слащева, О.В.Сабіров; Донец, нац. ун-т економіки і торгівлі Імені Михайла Туган-Барановського; каф. технології харчування. - Донецьк: ДонНУЕТ, 2009. - 524 с.
20. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. - Львов. - Выща школа, 1981.-С. 152.
21. Методи контролю якості харчової продукції : навчальний посібник/[О. І. Черевко, Л.М. Крайнюк, Л.О. Касіловатаін.]; за заг. ред. Л. М. Крайнюк ; Харківський державний університет харчування та торгівлі, СНАУ. - Суми: Університетська книга, 2012. - 512с.
22. Микросомная монооксигеназная система живых организмов в биомониторинге окружающей среды / Л.Ф. Гуляева, А.Ю. Гришанова, О. А.

Громова и др. // Аналитический обзор. - Серия: Экология. - Изд- во ГПНТБ СО РАН, 1994. -101 с.

23. Москальова. В.М.. Охорона праці. Інтерактивний комплекс навчально-методичного забезпечення. Рівне.НУВГП , 2009

25. Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище. Методические указания. — М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России. - 1999. — С. 63 — 64.

27.Охорона праці та промислова безпека: навч. посіб. / [К.Н. Ткачук, В.В. Зацарний, Р.В. Сабарно, С.Ф. Каштанов та ін.]; за ред. К.Н. Ткачука і В.В. Зацарного. - К., 2009. - 454 с.

28. Петренко В.В. Заходи пожежної безпеки в Україні. — К., 1995.

29.Пономарьов П. Загроза здоров'ю посилюється *И* Харчова і переробна промисловість.-2005.-№ 10. -С. 10-11.

30.Протоєрейський О.С. Охорона праці в галузі: навч. посіб./О.С. П.ротоєрейський, О.І. Запорожець - К.: Книжкове вид-во НАУ, 2005. - 268с.

3Пряник Г.М., Лехман С.Д., Бутко Д.А. і ін.. Охорона праці.— К.: Урожай, 1994. — 272 с.

32.Рогожин В.В. Біохімія молока та молочних продуктів / В.В. Рогожин. - Спб: ГПОРД, 2006.

33. Серіков Я. О.. Основи охорони праці: Навчальний посібник для студентів вищих закладів освіти. – Харків, ХНАМГ, 2007. - 227с.

35. Состав и свойства молока как сырья для молочной промышленности [Текст]: справочник / Н.Ю. Алексеева, В.П. Аристова, А.П. Патратий и др.; Под ред. канд. техн.наук Я.И. Костина. - М.; Агроп- ромиздат, 1986. - 239 с.; ил.

36. Скалка В.В., Савчук О.М., Остапченко Л.І. Визначення різних форм казеїну у (молоці методом диск-електрофорезу // Фізика живого - 2010. - 18, №3. - с. 36-38.

36. Степаненко, П.П. Микробиология молока и молочных продуктов [Текст]: учебник для ВУЗов. - Сергиев Посад: ООО «Все для Вас-Подмосковье», 1999. -415 с.-ИБВИ 5-901091-08-6.
37. Телитченко М.М. Введение в проблемы биохимической экологии / М.М. Телитченко, С.А. Остроумов. - М.: Наука, 1990. - 288 с.
38. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты: получение, состав, применение.// Аграрная наука.-2000.
39. Тепел, А. Химия и физика молока [Текст] / А. Тепел; Пер. с нем.; Под ред. Н.А. Гроностайской, А.П.Патратий. - М.: Пищевая пром., 1979. - 622 с.
40. Фруммин Г.Т. Экологическая химия и экологическая токсикология / Г.Т. Фруммин - СПб.: изд. РГГМУ, 2000. - 198 с.
41. Хімія жирів [Текст] : підручник / Б. Н. Тютюнников [та ін.] ; ред. Ф. Ф. Гладкий ; Над. техн. ун-т "ХПІ". - Харків : НТУ "ХПІ", 2002. - 452 с. : табл. - 1ISBN 966-593-289-6
42. Химический синтез пептидов / Гершкович А. А., Кибирев В. К.; Отв. ред. Серебряный С. Б.; АН Украины. Ин-т биоорган, химии и нефтехимии.-Киев : Наук, думка, 1992. - 360 с.
43. Цзян Ц., Канн Ц., Ван Д. Высокостабильный ингибитор трипсина типа Кунитца из семян *Spinacia oleracea* //Биохимия - 2009 - т. 74. - Вып. 1, С. 131-140.
45. Шугалей И. В. Химия белка : учебное пособие / И. В. Шугалей, А. В. Гарабаджиу, И. В. Целинский. - СПб. : Проспект Науки, 2011. - 200с.
46. Шидловская, В.П. Фермента молока [Текст]. - М.: Агропро- миздат, 1985. - 152с.
49. Юкало А.В. Протеїни казеїнового комплексу молока корів (*Bos taurus*) як попередники біологічно активних пептидів / А. В.Юкало, Л. А. Сторож, В.
50. Юкало А.В. Біоактивні пептиди протеїнів сироватки молока корів (*Bos taurus*) / А. В. Юкало, К. Є. Дацишин, В. Г. Юкало // *Biotechnologia Acta*. - 2013. - 6, № 5. - С. 49-61. - Бібліогр.: 77 назв. - укр.

51. Юкало В. Г. // Біотехнологія. - 2012. - 5, № 4. - С. 21-33. - Бібліогр.: 91 назв. - укр.Юкало В. Г. Електрофорез білків молока //Мед. хімія. - 2000. - № 4. - С. 79–82.
- 52.Юкало В. Г. Електрофорез білків казеїнового комплексу в анодній системі поліакриламідного гелю // Вет. біотехнол. - 2007. - № 11. - С. 246-251.
- 53.Ярошевська В.М., Чабан В.Й. Охорона праці в галузі. Навчальний посібник.
54. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем. - М.: Мир, 1985. - 456 с.
55. Anderson R. Affect of steaming on soybean proteins and trypsin inhibitors //J. Amer. Oil. Chem. - 1992.-V. 69,- P. 1170-1176.
56. Assing M., Bleeker H. Antigenicity of legume proteins // Food Agric. Immunol. - 1994.-V. 6.-P.315-320.
57. Birk Y. Parification and some properties of highly active inhibitor of trypsin and ct- chymotripsin inhibitor from soya beans //Biochem. Biophys. Actn. - 1961. - V.54. - P. 378-381
58. Bode W., Huber R. Biochim. Biophys. Actn. - 2000. - V. 147. -P. 241 -252.
59. Borman M., Snyder H. Lipoxxygenase destruction in whole beans by combination of heating and soaking in ethanol *Hi. Food. Sci.* — 1979. - 44. - P. 586.
- 60.Brooks J. R., Morr C.V. Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature // J. Am. O. L. Chem. Soc. — 1985. — V. 62. — P. 1347 — 1354.
61. Calderon B. Active soybean lectin in foods: isolation and quantitation //Food Chem. -1991.-39.-P. 321.
62. Cooper J.B., Chen J.A. Hydroxyproline-rich glycoproteins of plant cell walls //TIBS. - 1987. - V. 12. - P. 24 - 27.
63. Chabance B.,Marteau P.,Rambaud J.C.et al. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt//Biochimie, - 1998. - Vol.80, №2.- P.155-165.

64. Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision // *J Dairy Sci.* - 1984. - Vol.67, №8.- P.1599-1631.
65. Evans C., McConnell D., List G. Structure of unsaturated vegetable oil glycerides: direct calculation from fatty acid composition // *J. Am. Oil Chem.* - 1969. - V. 46. - P. 421.
66. Frazier P.J. Lipoxygenase action and lipid biriding in breadmaking // *Baker's Dig.* - 1979.-53 (6).-P.8-14.
67. Kunitz M. Crystallization of trypsin inhibitor from soybeaus // *Science.* - 1945. - V.101.-P.668-669.
68. Kim, M.R.; Kawamura Y.; Lee C.H. Isolation and identification of bitter peptides of tryptic hydrolysate of soybean IIS glycinin by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *JFood Sci*2003. — V. 68.-P.2416 — 2422.
- 69 .Liv K. Soybeans. Chemistry, Technology and Utilization. — Gaithersburg, USA. An Aspen Publication, 1999. — P. 37 - 47.
70. Lakemond, C.M.M.; Jongh J.L.H.Jd.; Hensing, M.; Gruppen H; Voragen A.G.J. Heat dénaturation of soy glycinin: influence of pH
71. Purification and characterization and immunological relationships of multipee low molecular weight protease inhibitors of soybeans // *Biochem. Biophys. Actn.* - 1974. - V. 495.-P. 369-382.
72. Tsumura K.; Saito T.; Kugimiya W.; Inouye K. Selective proteolysis of the glycinin and beta-conglycinin fractions in a soy protein isolate by pepsin and papain with controlled pH and temperature. *J.FoodSci*—2004. —V.69. — P. 363 — 367.
73. Voss R.-H., Ermler U., L.-O. Esson Crystal structure of the bifunctional soybean Bowman-Birk inhibitor at 0,28 nm resolution. Structural peculiarities on the folded protein conformation // *Eur. J. Biochem.* — 1996. — V. 242. — P. 122 — 131.

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ МАГІСТЕРСЬКОЇ РОБОТИ

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

Також було зроблено доповідь і опубліковано тези на IV Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» на тему: «Електрофоретичний аналіз продуктів протеолізу казеїну».