

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

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

Кафедра харчової біотехнології і хімії
(повна назва кафедри)

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня

магістр

(назва освітнього ступеня)

на тему: Виділення функціональних білкових інгредієнтів з молока

(на замовлення ПрАТ «Тернопільський молокозавод»).

Виконав студент VI курсу, групи МЛІмд-61

спеціальності 181 «Харчові технології»

(шифр і назва спеціальності)

	Забудний В.Я.
	(підпис)
Керівник	Юкало В.Г.
	(підпис)
Нормоконтроль	Кухтин М.Д.
	(підпис)
Завідувач кафедри	Кухтин М.Д.
	(підпис)
Рецензент	Ткачук Р.А.
	(підпис)

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

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

Кафедра харчової біотехнології і хімії
 (повна назва кафедри)

ЗАТВЕРДЖУЮ
 Завідувач кафедри
 _____ Кухтин М.Д.
 (підпис) (прізвище та ініціали)

«_____» _____ 20__ р.

ЗАВДАННЯ НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ

на здобуття освітнього ступеня _____ **магістр**
 (назва освітнього ступеня)

За спеціальністю _____ **181 «Харчові технології»**
 (шифр і назва спеціальності)

студенту _____ **Забудному Віталію Ярославовичу**
 (прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи **Виділення функціональних білкових інгредієнтів з молока**
 (на замовлення ПрАТ «Тернопільський молокозавод»).

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

Затверджені наказом ректора від 29 листопада 2024 року №4/7-1137

2. Термін подання студентом завершеної роботи _____

3. Вихідні дані до роботи:

- 1) Молоко знежирене
- 2) Електрофоретична система для диск-електрофорезу
- 3) Електрофоретична система для електрофорезу з сечовиною
- 4) Електрофоретична система для електрофорезу з ДСН
- 5) Фракції білків сировини молока.

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

Анотація. Вступ. Науково-дослідна частина.

Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях.

Висновки. Перелік посилань.

5. Перелік графічного матеріалу.

Схема виділення сироватки молока. Графіки і електрофореграми отримані за результатами досліджень.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	к.т.н., зав.кафедри МГ Окіпний І.Б.		
Безпека в надзвичайних ситуаціях			

Дата видачі завдання 2 вересня 2024року з уточненням 29 листопада 2024р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1	Підбір і опрацювання літератури	2.09-15.10.24р.	
2	Виділення сироватки молока	26.10-19.10.24р.	
3	Підготовка реактивів для електрофорезу	20.10-31.10.24р.	
4	Аналіз складу білків сироватки	1.11-27.11.24р.	
5	Підбір електрофоретичної системи	10.11-28.11.24р.	
6	Порівняння ефективності різних електрофоретичних систем	29.11-15.12.24р.	
7	Написання розділу Охорона праці і безпеки у надзвичайних ситуаціях	16.12-19.12.24р.	
8	Оформлення роботи і подача до захисту	20.11-20.12.24р.	

Студент

_____ Забудний Віталій Ярославович
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ Юкало Володимир Глібович
(підпис) (прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

Анотація.....	5
Annotation	6
Вступ.....	7
1. Огляд літератури.....	10
1.1 Склад і властивості молочної сироватки.....	10
1.2 Білки сироватки молока.....	14
1.3 Способи виділення білків із молочної сироватки.....	19
1.4 Біоактивні пептиди білків сироватки молока.....	22
1.4.1 Види гідролізу.....	22
1.4.2 Протеолітичні ферменти та їх характеристика.....	23
1.4.3 Біологічно активні пептиди та їх властивості.....	25
1.5 Технологія ферментативного гідролізу.....	31
1.5.1 Одностадійний гідроліз.....	31
1.5.2 Багатостадійний гідроліз.....	34
2. Матеріали і методи досліджень.....	37
3. Результати досліджень та їх обговорення.....	46
3.1 Виділення молочної сироватки.....	46
3.2 Підбір електрофоретичної системи для виділення білків сироватки молока.....	48
3.3 Препаративний електрофорез для розділення білків сироватки.....	61
4 Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях.....	67
4.1 Охорона праці.....	67
4.1.1 Система державного управління охороною праці на виробництві.....	67
4.1.2 Шкідливі речовини та їх класифікація залежно від дії на організм людини.....	70
4.2 Безпека в надзвичайних ситуаціях.....	74
4.2.1 Захист продуктів харчування та промислового обладнання від радіоактивного, хімічного і бактеріального забруднення.....	74
Висновки.....	79

Перелік посилань	80
Додатки	84

Анотація

У магістерській роботі розглянута будова і властивості білків сироватки молока, способи їх виділення та використання. Також показано, що білки сироватки містять ряд фракцій, які є попередниками багатьох біоактивних пептидів з різною біологічною дією. У зв'язку з цим основне завдання роботи полягає у виділення окремих білків попередників.

Науці відомо ряд методів за допомогою яких можна виділяти білки сироватки молока. Але ці методи часто включають дію екстремальних значень рН, температури, високих концентрацій кислот, органічних розчинників і не завжди дають можливість отримати чисті білкові фракції. У зв'язку з цим у даній роботі пропонується метод для препаративного виділення чистих білків сироватки молока в нативних умовах. Цей метод не є довготривалим і дозволяє в одну стадію виділити сироваткові білки. Для роботи була використана модифікація апарату для вертикального електрофорезу на пластинах неперервного ПААГ. Цей прилад був виготовлений у науково-дослідній лабораторії кафедри харчової біотехнології і хімії. За основу взято анодну систему для кислих і нейтральних білків в нативних умовах за Девісом. Для отримання очищених фракцій електрофоретична камера легко і швидко демонтується. За допомогою запропонованого методу, в результаті роботи, ми отримали чисті білкові фракції.

Ключові слова: електрофорез, білки сироватки молока, білкові фракції, β -лактоглобулін, α -лактоальбумін.

Annotation

The structure and properties of milk whey proteins, methods of their isolation and use are considered in the master's work. It is also shown that serum proteins contain a number of fractions that are the precursors of many bioactive peptides with different biological effects. In this regard, the main task of the work is to isolate individual precursor proteins.

Science knows a number of methods that can be used to isolate milk whey proteins. But these methods often include the effect of extreme pH values, temperature, high concentrations of acids, organic solvents and do not always provide an opportunity to obtain pure protein fractions. In this regard, this paper proposes a method for the preparative isolation of pure milk whey proteins under native conditions. This method is not long-term and allows you to isolate whey proteins in one step. A modification of the apparatus for vertical electrophoresis on continuous PAAG plates was used for the work. This device was manufactured in the research laboratory of the Department of Food Biotechnology and Chemistry. The anodic system for acidic and neutral proteins in native conditions according to Davis is taken as a basis. To obtain purified fractions, the electrophoretic chamber is easily and quickly dismantled. Using the proposed method, as a result of the work, we obtained pure protein fractions.

Key words: electrophoresis, milk serum proteins, protein fractions, β -lactoglobulin, α -lactoalbumin.

Вступ

Білки – важлива складова частина харчових продуктів. Було встановлено, що добова потреба дорослої людини становить 80-90 г, а із них близько 55% повинні складати білки тваринного походження, які засвоюються організмом на 95%, в той час, як білки рослинного походження засвоюються лише на 70-80%.

Виявилось, що білки молока і молочних продуктів являються найважливішими харчовими білками. За вмістом незамінних амінокислот уступають лише білкам жіночого молока і яєць. Особливо багаті незамінними амінокислотами білки сироватки молока. Вони містять багато таких незамінних амінокислот, як лізин, триптофан, метіонін і треонін. Тому є досить важливим підвищення кількості білків в молоці і підвищення виробництва білкових молочних продуктів. Крім цього, використання білків сироватки молока в якості харчових добавок при виробництві різних харчових продуктів (хлібобулочних, кондитерських, м'ясних, продуктів дитячого харчування) сприяє підвищенню їх біологічної цінності.

Оцінка харчового білка, як правило, в різних варіантах включає наступні критерії:

- 1) амінокислотний склад і його відповідність гіпотетичному «ідеальному» білку;
- 2) доступність білка до дії травних ферментів (швидкість і повнота розщеплення);
- 3) засвоєння харчового білка в організмі людини.

Такий підхід до оцінки харчових білків, не дивлячись на його громіздкість і трудомісткість, передбачає врахування в основному їх пластичних функцій.

Нагромадження даних про харчові білки дозволить говорити не лише про амінокислотний склад, але і про їх пептидний склад. Пептидний склад харчових білків може означати наступне:

- 1) наявність біоактивних пептидів у первинній структурі харчового білка;
- 2) можливість утворення біоактивних пептидів під час нормального травлення у шлунково-кишковому тракті та проявлення біологічної дії в організмі людини.
- 3) утворення біоактивних пептидів під дією технологічних протеаз при виробництві харчових продуктів.

Така класифікація зможе більш адекватно відображати цінність харчових білків, їх біологічну дію на організм людини. Вона може бути використана при розробці харчових продуктів функціонального і дієтичного призначення. При виробництві тих чи інших продуктів харчування з наперед заданими властивостями необхідно виділити окремі фракції білків. Відомі методи отримання окремих білків сироватки молока часто включають дію екстремальних значень рН, температури, високих концентрацій кислот, органічних розчинників. Але разом з тим, ці методи не завжди дають можливість повністю розділяти білки сироватки молока і отримувати чисті їх фракції. У даній роботі використовується метод електрофоретичного розділення білків сироватки молока, який на відміну від попередніх методів дозволяє у нативних умовах отримати чисті білкові фракції за короткий період часу.

Метою роботи є розробка методу виділення основних білків сироватки молока з використанням препаративного електрофореzu.

Для досягнення цієї мети необхідно вирішити наступні завдання:

- виділити молочну сироватку шляхом ізоелектричного осадження казеїнів;
- дослідити методи електрофоретичного розділення білків сироватки молока, встановити переваги та недоліки кожного із них;
- вибрати найбільш ефективний метод розділення білків;
- використати цей метод для препаративного виділення електрофоретично чистих білків сироватки молока в нативних умовах.

Об'єкт дослідження – виділення гомогенних білків сироватки молока.

Предмет дослідження – препаративний електрофорез білків сироватки молока у пластинах гелю у нативних умовах без використання денатуруючих агентів.

У роботі використані методи дослідження кислотності сироватки молока, спектрофотометричні методи визначення концентрацій білків в ультрафіолетовій області спектру, різні види електрофоретичних методів у стовпчиках і пластинках гелю.

За отриманими результатами обґрунтовано вибір ефективної електрофоретичної системи для препаративного виділення гомогенних білків сироватки молока в умовах, які виключають дію денатуруючих агентів. Це система диск-електрофореzu для нейтральних білків в апараті з пластинками гелю. Робота складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, охорони праці та безпеки у надзвичайних ситуаціях, висновків, переліку посилань і додатків.

Робота викладена на 82сторінках, містить 8таблиць, 17рисунків, 48 найменувань у переліку посилань.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Склад і властивості молочної сироватки

Молочна сироватка – це продукт переробки молока, який отримують під час виробництва твердих сирів, сиру кисломолочного, казеїну. Її використовують для приготування різних продуктів, при випіканні хліба та як корм тваринам [12]. Сироватка майже на 94% складається з води, а ті шість відсотків включають в себе багато корисних речовин; це амінокислоти, молочний цукор, молочний жир, що підсилює дію ферментів. У молочній сироватці є кальцій, магній, вітаміни групи С, В, А. При такому складі молочна сироватка допомагає заповнити недолік вітамінів, в зимовий час в деякій мірі може замінити відсутність деяких свіжих овочів і фруктів. Для зміцнення імунітету дієтологи радять щоранку випивати по склянці сироватки[33].

Молочна сироватка виводить з організму холестерин, зайву рідину, шлаки і токсини. Вона містить антиоксиданти, які уповільнюють процес старіння, перешкоджає виробленню гормонів стресу і збільшує вироблення серотоніну - гормону радості. Вітамін В, що входить до складу сироватки, допомагає активізувати вуглеводний і жировий обмін, тому сироватка використовується при лікуванні ожиріння. Лактоза (молочний цукор) приводить в порядок мікрофлору кишечника, зменшує газоутворення. Сироватка рекомендується людям похилого віку та в реабілітаційний період після важких захворювань. На основі сироватки готують дитяче харчування, за своїм білковим складом вона нагадує материнське молоко [31].

Молочна сироватка є хорошим середовищем для розвитку різних мікроорганізмів, том в процесі зберігання молочної сироватки до переробки приймають комплекс заходів, що попереджують її обнасінення сторонньою мікрофлорою, а також гальмують розвиток мікрофлори,що попала в сиворотку в процесі основного виробництва, в тому числі мікрофлори бактеріальних заквасок[3].

Склад і властивості молочної сироватки обумовлені видом основного продукту (сиру кисломолочного, сиру твердого, казеїну) і особливостями технології його одержання, а також апаратурним оформленням процесу. Відсоток переходу основних компонентів молока в молочну сироватку (табл.1.1) залежить від розмірів цих компонентів.

Таблиця 1.1 – Відсоток переходу компонентів молока в молочну сироватку [11]

Компонент молока	Розміри частин, нм	Відсоток переходу компонентів в молочну сироватку, %	
		традиційні способи	нетрадиційні способи
Молочний жир	2000 – 5000	7,7	0,0
Білки:			
казеїн	100 – 200	22,5	0
сироваткові	15 – 20	95,0	98,0
Лактоза	1,0 – 1,5	96,2	96,5
Мінеральні солі	0,2 – 2,0	81,1	60,6
Сухі речовини	-	49,4	45,1

Основний об'єм сухих речовин молочної сироватки займає лактоза (близько 70%). На долю інших компонентів (нецукрів) припадає 30% (табл. 1.2).

При виробництві деяких видів сирів частину сироватки (близько 30%) отримують солону. Вміст солі в соленій сироватці становить 0,5 – 1,5%, а деколи і до 4%, що відображається на його складі. В молочній сироватці в середньому міститься 0,134мг/100 мл. азотистих сполук, із яких біля 65% становлять білкові азотисті сполуки, а 35% - небілкові. Кількість білкових азотистих сполук в молочній сироватці отримані шляхом розчинення, складають 0,7 – 1,1%. Слід врахувати що ця кількість умовна, так як на білок перераховується весь азот.

Істинний вміст білкових азотистих сполук становить 0,5 – 0,8% і залежить від способу осадження білків молока.

Таблиця 1.2 – Основні показники молочної сироватки[12]

Показники	Молочна сироватка		
	підсирна	кисломолочна	казеїнова
Вміст сухих речовин, %	4,5 – 4,9	4,2 – 7,4	4,5 – 7,5
В тому числі:			
лактози	3,9 – 4,9	3,2 – 5,1	3,5 – 5,2
мінеральних речовин			
молочного жиру	0,3 – 0,8	0,5 – 0,8	0,3 – 0,9
	0,2 – 0,5	0,05 – 0,4	0,02 – 0,1
Кислотність, °Т	15 - 20	50 - 85	50 – 120
Густина кг/м ³	1018 - 1027	1019 - 1026	1020 – 1025

У склад амінокислот молочної сироватки входять амінокислоти білкових речовин і вільні амінокислоти. Амінокислотний склад казеїну і сироваткових білків дещо відрізняється. В альбуміні вміст триптофану у 4 рази вищий, ніж у казеїні, вміст незамінної амінокислоти цистину в глобуліні – майже в 7 раз, а в альбуміні – в 19 раз вищий ніж у казеїні. В альбуміні та глобуліні також більше незамінної амінокислоти лізину, яка відіграє важливу роль в захисних реакціях організму. Такий вміст амінокислот важливий для біологічних процесів, що проходять в організмі[2].

В молочній сироватці містяться всі незамінні амінокислоти (табл. 1.3).

Таблиця 1.3 - Загальний вміст амінокислот в молочній сироватці, мг/л [12].

Сироватка	Амінокислоти			
	Вільні		У білках	
	Всього	в тому числі незамінних	всього	в тому числі незамінних
Підсирна	132,7	51,0	6490	3326
Кисломолочна	450,0	356,0	5590	2849

Загальний вміст амінокислот в підсирній і кисломолочній сироватці приблизно однаковий, але в кисломолочній сироватці міститься в 3,5 рази більше амінокислот і в 7 раз більше незамінних амінокислот, ніж в підсирній. Це можна пояснити тим, що при виробництві кисломолочного сиру проходить більш інтенсивний гідроліз білків ніж при виробництві твердого сиру. Вміст вільних амінокислот в підсирній сироватці у 4 рази вищий, ніж у вихідному молоці, а в кисломолочній в 10 раз.

Встановлено, що в процесі ультрафільтрації молока в фільтрат переходить 88 – 90% водорозчинних пептидів і 90 – 93% вільних амінокислот. В молочній сироватці міститься 0,05 – 0,45% жиру, що обумовлено його вмістом у вихідній сировині і технології виробництва основного продукту; в сепарованій сироватці – 0,05 – 0,1%. Мінеральний склад молочної сироватки дуже різноманітний. В сироватку переходять практично всі солі і мікроелементи молока, а також солі, що вносяться при виробництві основного продукту, і сполуки з поверхні обладнання[3].

В підсирній сироватці водорозчинних вітамінів значно більше ніж у кисломолочній. Вміст вітамінів у підсирній і кисломолочній сироватці наведено у таблиці 1.4

Таблиця 1.4 - Вміст вітамінів у молочній сироватці, мкг/кг [12]

Сироватка	Вітаміни								
	каротин	А	Е	В ₁	В ₂	В ₆	холін	РР	С
Підсирна	13	22	227	315	1389	524	160000	140	500
Кисло-молочна	75	110	315	263	1107	478	140000	140	500

Поверхневий натяг молочної сироватки приблизно рівний поверхневому натягу цільного і знежиреного молока і становить при 20 - 45°C $(40 - 45) \cdot 10^{-3}$ нм, що на 30% нижче поверхневого натягу води і обумовлено присутністю поверхнево-активних речовин (ПАР).

1.2 Білки сироватки молока

В залежності від конкретних потреб часто виникає необхідність виділяти і використовувати будь-який компонент або групу компонентів молочної сироватки. Цей принцип використовується при виробництві на основі молочної сироватки білкових, альбуміноказеїнових продуктів, а також молочного цукру. Ці продукти відрізняються більш тривалим терміном зберігання в порівнянні з молочною сироваткою, володіють біологічними і харчовими перевагами, можливістю цілеспрямованого покращення споживчих властивостей інших харчових продуктів, а також дитячих, лікувальних і спеціального призначення [3].

Біологічна обробка молочної сироватки дозволяє підвищити її харчові чи кормові цінності за рахунок додаткового збагачення корисними речовинами.

В наш час проблема ефективного використання білкових речовин молочної сироватки виступає однією з найбільш важливих. Це виявляється дефіцитом повноцінних харчових білків. Для побудови білків в організмі людини необхідно 20 амінокислот [2, 10]. При чому ці амінокислоти повинні бути присутні у відповідних співвідношеннях. Для нормального існування людини їжа повинна містити у відповідних співвідношеннях вісім незамінних амінокислот, тобто організм сам по собі не може синтезувати і повинен отримувати їх ззовні разом з їжею. Це триптофан, лейцин, ізолейцин, валін, треонін, лізин, метіонін і фенілаланін. Харчові білки, що присутні у природі, відрізняються один від одного вмістом амінокислот. Білки молока являються найбільш повноцінними харчовими білками. Енергетична цінність сироватки значно нижче, ніж у молока, а біологічна цінність приблизно однакова, що обумовлює можливість її використання в раціоні, тим більше що сироваткові білки містять у своєму складі більше незамінних амінокислот, ніж казеїн молока [18, 26, 31, 32].

Амінокислотний склад білків сироватки відповідає потребам людського організму. Вони засвоюються організмом практично повністю, вміст амінокислот у них добре збалансований. За даними окремих досліджень, вона

вища, ніж у білків курячого яйця, тому проблема отримання і раціонального використання цих високоцінних речовин у харчуванні людини вирішується у цілому світі. Створення нових, більш ефективних способів переробки молочної сироватки, направлене на більш повне вилучення і використання її білків. Вишукуються шляхи їх використання в різних галузях харчової промисловості, що дозволяє покращити біологічні і смакові переваги продуктів, а також економити дефіцитну харчову сировину[7].

Масова частка сироваткових білків становить близько 20% білкової фракції молока. Сироваткові білки є легко розчинними. Вони складаються з β -лактоглобуліну, α -лактальбуміну, імуноглобулінів, альбуміну сироватки крові, лактоферину, протеозно-пентонної фракції та інші білки[22].

β -лактоглобулін, α -лактальбумін і імуноглобуліни виконують важливі біологічні функції і мають велике промислове значення, внаслідок високого вмісту незамінних і сірковмісних амінокислот[30].

β -лактоглобулін становить 50-54% білків сироватки, (або 7-12% всіх білків молока). Він має ізоелектричну точку при $pH=5,1$. У сирому молоці перебуває у вигляді димера. При нагріванні молока до температури $30^{\circ}C$, β -лактоглобулін розпадається на мономери, які при подальшому нагріванні агрегують з утворенням S-S-зв'язків (рис.1.1).

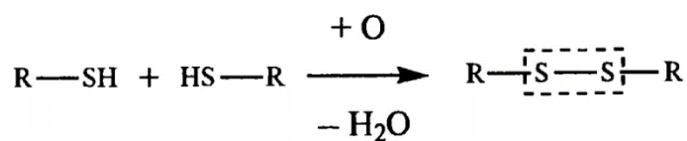


Рисунок 1.1 - Утворення S-S-зв'язків при розпаді β -лактоглобуліну

Теплова денатурація β -лактоглобуліну приводить до коагуляції агрегованого білка (він коагулює майже повністю при $85-100^{\circ}C$). При пастеризації молока денатурований β -лактоглобулін разом із $Ca_3(PO_4)_2$ випадає в осад у складі молочного каменю і утворює комплекси з χ -казеїном казеїнових міцелл (осаджуючись разом з ними при коагуляції казеїну). Утворені в результаті

теплової обробки молока комплекси β -лактоглобулін – χ -казеїн значно погіршує атаку χ -казеїну сичужним ферментом і впливає на термостійкість казеїнових

міцел. β -лактоглобулін не згортається сичужним ферментом і не коагулює в ізоелектричній точці в силу своєї великої гідратованості[1, 11].

Біологічна роль β -лактоглобуліну повністю не з'ясована. Припускають, що він бере участь у транспортуванні ряду речовин, наприклад, вітаміну А, а також є інгібітором плазміну. Первинна структура β -лактоглобуліну подана на рисунку 1.2.

1	10	20
		<---helical---> <---- β -A -----
H-Leu-Ile-Val-Thr-Gln-Thr-Met-Lys-Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys-Val-Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr-		
21	30	40
----- β -A ----> <-helical->		
Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg-		
41	50	60
<----- β -B -----> <--- β -C -----		
Val-Tyr-Val-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu-Ile-Leu-Leu-Gln-Lys-		
61	70	80
β -C--> <--- β -D ----- -->		
Trp-Glu-Asn-Gly-Glu-Cys-Ala-Gln-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Glu-Lys-Thr-Lys-Ile-Pro-Ala-		
81	90	100
<--- β -E --- --> <----- β -F ----- -->		
Val-Phe-Lys-Ile-Asp-Ala-Leu-Asn-Glu-Asn-Lys-Val-Leu-Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys-		
101	110	120
<----- β -G ----- --> <-helical-> <----- β -H --		
Lys-Tyr-Leu-Leu-Phe-Cys-Met-Glu-Asn-Ser-Ala-Glu-Pro-Glu-Gln-Ser-Leu-Ala-Cys-Gln-		
121	130	140
--- β -H --> <----- α -helix ----- -->		
Cys-Leu-Val-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu-Ala-Leu-Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-Ala-Leu-		
141	150	160
<----- β -I -----> <---helical--->		
Lys-Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg-Leu-Ser-Phe-Asn-Pro-Thr-Gln-Leu-Glu-Glu-Gln-Cys-		
162		
His-Ile-OH		

Рисунок 1.2 – Первинна структура β -лактоглобуліну [32]

У сироваткових білках α -лактоальбумін посідає друге місце після β -лактоглобуліну (його вміст становить 20-25% сироваткових білків, або 2-5% загальної кількості білків). α -лактоальбумін має молекулярну масу близько 14000. Він не коагулює в ізoeлектричній точці через високу гідратованість[18].

Для порівняння, молекула β -лактоглобуліну містить два дисульфідних зв'язки і одну вільну сульфгідрильну групу (SH-групу), яка сприяє його швидкому агрегуванню після денатурації (рис. 1.3, 1.4).



Рисунок 1.3 - Схема денатурації і ренатурації білка

α -лактальбумін стійкий до нагрівання. Вища стійкість α -лактальбуміну до нагрівання обумовлюється оборотністю денатурації білка. В мономерній формі α -лактоальбумін міцно зв'язує іони цинку і кальцію, що обумовлює бактерицидну і протипухлинну функцію даного білка[31].

1	10	20
H-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Arg-Glu-Leu-Lys-Asp-Leu-Lys-Gly-Tyr-Gly-Gly-		
21	30	40
Val-Ser-Leu-Pro-Glu-Trp-Val-Cys-Thr-Thr-Phe-His-Thr-Ser-Gly-Tyr-Asp-Thr-Gln-Ala-		
41	50	60
Ile-Val-Gln-Asn-Asn-Asp-Ser-Thr-Glu-Tyr-Gly-Leu-Phe-Gln-Ile-Asn-Asn-Lys-Ile-Trp-		
61	70	80
Cys-Lys-Asp-Asp-Gln-Asn-Pro-His-Ser-Ser-Asn-Ile-Cys-Asn-Ile-Ser-Cys-Asp-Lys-Phe-		
81	90	100
Leu-Asp-Asp-Asp-Leu-Thr-Asp-Asp-Ile-Met-Cys-Val-Lys-Lys-Ile-Leu-Asp-Lys-Val-Gly-		
101	110	120
Ile-Asn-Tyr-Trp-Leu-Ala-His-Lys-Ala-Leu-Cys-Ser-Glu-Lys-Leu-Asp-Gln-Trp-Leu-Cys-		
123		
Glu-Lys-Leu-OH		

Рисунок 1.4 – Первинна структура α -лактоальбуміну [32]

Імуноглобуліни поєднують групу високомолекулярних білків, що володіють властивостями антитіл. За характером впливу на антиген розрізняють: аглютиніни — антитіла, що викликають аглютинацію мікроорганізмів; лізини та опсоніни — антитіла, що сприяють їх руйнуванню; преципітини — антитіла, що осаджують білкові речовини у розчинах; антитоксини та інші.

Із молока виділено чотири групи імуноглобулінів: Г, А, М і Е. Основна частина імуноглобулінів коров'ячого молока відноситься до групи Г.

Сироватковий альбумін, основний білок, що міститься в сироватці крові. Головну його роль в транспорті, обмін, розподілі лігандів, він впливає на осмотичний тиск крові. Сироватковий альбумін, який знайдений у молоці ідентичний альбуміну крові. Альбумін сироватки молока становить 1,5% від загального молочного білка і близько 8% загального білка сироватки. Альбумін сироватки складається із 582 амінокислот і має молекулярну масу 66 267[32].

Лактоферин, незважаючи на малий вміст, виконує важливі біологічні функції і необхідний для організму немовляти. Лактоферин є глікопротеїдом, молекулярною масою близько 76000, містить залізо. Цей білок виконує транспортну функцію – зв'язує і переносить в організм немовляти залізо; крім того, має захисні властивості – зв'язуючи залізо, затримує розвиток небажаної кишкової мікрофлори (*E. coli* і ін.), що особливо має потребу в ньому. Лактоферин широко представлений у різноманітних секреторних рідинах, таких як молоко, слина, слюзи, секрети носових залоз. У молоці знаходиться в малих кількостях (менше 0,3 мг/мл), у молозиві його в 10-15 раз більше. Доведено, що лактоферин володіє антивірусною активністю проти широкого спектру вірусів людини і тварин з ДНК і РНК геномами. Він зв'язує різні антигени вірусної природи переважно в умовах *in vitro*. Саме тому так часто практикується у вітчизняних лікарнях припинення грудного вигодовування при ротавірусних інфекціях є дуже грубою помилкою терапії. Лактоферин володіє також і протигрибкову активність. Згідно даних рентгеноструктурного аналізу білок

представлений одним поліпептидним ланцюгом який містить 692 амінокислотних залишки і утворює два гомологічних глобулярних доменна кінці яких з'єднанні короткою α -спіраллю Лактоферин відноситься до кислотних білків ізoeлектрична точка якого становить 8,7[18, 32].

Крім перерахованих білків сироватка містить раніше названі компоненти протеозопептонної фракції, що представляють собою фрагменти β -казеїну та інші білки, що володіють ферментативними і гормональними властивостями [37]. До інших білків молока ми відносимо білки, що входять до складу оболонок жирових кульок, їх значення є досить важливе [11]. До білків оболонок жирових кульок відносяться ті, що є структурними елементами оболонок жирових кульок і сприяють їхній стабільності під час технологічної обробки. Вони можуть бути міцно вбудованими у внутрішній ліпідний шар оболонки, пронизувати її або розташовуватися на зовнішній поверхні. Це, як правило, глікопротеїди, молекулярною масою від 15000 до 240000, що містять 15-50% вуглеводів, що характеризуються різною розчинністю у воді. Деякі з них мають властивості ферментів. Важливий білковий компонент оболонки – нерозчинний у воді (гідрофобний) глікопротеїд з молекулярною масою понад 60000. Він міцно вбудований у внутрішній шар оболонки і зберігається на поверхні жирових кульок під час теплової та механічної обробки молока (вершків) [18].

1.3 Способи виділення білків із молочної сироватки

Відомі шляхи виділення сироваткових білків засновані на їх фізико-хімічних властивостях. В промисловості у наш час широко розповсюджені два способи виділення білків з молочної сироватки : кислотно-тепловий спосіб коагуляції при значеннях рН, близьких до ізoeлектричної точки, і мембранні методи. В той же час ведуться пошуки інших, більш простих, надійних і технологічних способів [7, 17, 47].

Стійкість глобул білків молочної сироватки обумовлена конформацією частин, певним зарядом і присутністю гідратної оболонки. При зміні нативного складу білка перш за все порушується його структура, тобто проходить денатурація. Введення в розчини деяких білкових речовин сприяє тепловій денатурації. Наприклад, при додаванні кислот і лугів реакція середовища доходить до ізоелектричної точки білків, порушуються зв'язки їх частин. Міра теплової денатурації залежить від температури і тривалості нагрівання [18].

З врахуванням цілеспрямованого виділення і використання білків, коагуляцію білків сироватки необхідно закріпити для збереження зворотнього процесу, а також з ціллю максимально можливого зниження розпаду агрегатів що утворилися. В підсирній сироватці при температурі денатурації термолабільних фракцій (90°C) в результаті порушення агрегатної стійкості глобул білка проходить їх часткове виділення. При температурі, що перевищує 100°C, степінь виділення білків несуттєво збільшується. Для підвищення теплової денатурації підсирну сироватку потрібно вводити реакенти-коагулятори, які зміщують реакцію середовища в кислу сторону. Оптимальна реакція середовища при підкисленні сироватки становить рН 4,4-4,6, що співпадає з ізоелектричною точкою лактоальбомунової фракції білків молочної сироватки [33]. Степінь виділення білків в даному випадку становить близько 40%, що на 10-15% вище, ніж без підкислення сироватки. Далі шляхом підвищення рН середовища (більше 6) можна додатково виділити деяку кількість білка. Таким чином, для максимального виділення білків з підсирної сироватки потрібно застосувати теплову денатурацію білків в сукупності з кислотно-лужною коагуляцією [31].

Потрібно також враховувати, що харчова цінність білкових продуктів отриманих при спільній коагуляції білків дещо вища, ніж концентратів казеїну і

сироваткових білків окремо, за рахунок взаємного збагачення і більш збалансованого амінокислотного складу білкових продуктів спільного осадження. Якщо прийняти біологічну цінність білка яйця за 100, то для казеїну це показник буде становити 73, для концентрату сироваткових білків – 110, для комплексу молочних білків – 92. Особливе значення має підвищення вмісту в

сироваткових білках лізину і триптофану. Для порівняння в таблиці 1.5 приведений амінокислотний склад білків молочної сироватки, казеїну, яйця і сої. Молочний білок може суттєво доповнити недостачу лізину в білку злакових рослин [18]. Так, біологічна цінність суміші, що складається з 76% молочного білка і 24% білка пшениці, що дорівнює 105-112, і перевищує біологічну цінність самого молочного білка(92) і білка пшениці(56).

Таблиця 1.5 - Амінокислотний склад сироваткових білків[12].

Амінокислота	Вміст амінокислот,г на 100 г білка
Ізолейцин	6,55
Лейцин	14,00
Лізін	10,90
Метіонін	2,35
Цистин	3,15
Фенілаланін	4,05
Тирозин	4,80
Триптофан	6,70
Треонін	3,20
Валін	6,85
Сума амінокислот	62,55

У промислових масштабах сироваткові білки виділяють мембранною технологією.

1.4 Біоактивні пептиди білків сироватки молока

1.4.1 Види гідролізу

Білки сироватки молока в результаті протеолітичних процесів за дії травних ферментів, ферментів молокозгортальних препаратів, протеолітичних систем молочнокислих бактерій можуть звільняти пептиди, які володіють різними видами біологічної активності [13-16, 27].

Розрізняють кислотний, лужний та ферментативний гідроліз. Кислотний гідроліз протікає при температурі 100-120°C в присутності сильних неорганічних

кислот (в основному використовується соляна кислота). Однак кислотний гідроліз як технологічний процес має ряд недоліків. В результаті обробки кислотою проходить повний розклад триптофану, ряд інших амінокислот пошкоджується частково. Також кислота, яка використовується для гідролізу по закінченні процесу повинна бути повністю нейтралізована лугом. В результаті цього кислотний гідроліз на даний час практично не використовується [7, 23]. При лужному гідролізі білка проходить рацемізація амінокислот. В харчовому виробництві лужний гідроліз білка не застосовується.

Ферментативний гідроліз має ряд переваг у порівнянні з кислотним та лужним [19, 24, 25]. Це пояснюється тим, що цей процес протікає з високою швидкістю при відносно простих умовах: атмосферний тиск і температура не вище 70°C. Через це практично не спостерігається пошкодження амінокислот і зниження біологічної цінності. Особливістю дії протеолітичних ферментів являється їх специфічність по відношенню до типу пептидного зв'язку. Через це навіть в умовах застосування при гідролізі промислових ферментних препаратів, що представляють собою, як правило, складні комплекси ферментів з різноманітною специфічністю, в процесі ніколи не утворюються суміш вільних амінокислот. Основним продуктом ферментативного гідролізу завжди являються пептиди, а фракція вільних амінокислот є невелика [43,44].

1.4.2 Протеолітичні ферменти та їх характеристика

Особливістю протеолітичних ферментів як каталізаторів виступає їх нестабільність у водному розчині. Будучи білком, фермент може гідролізувати сам себе (автоліз) внаслідок чого каталітична активність поступово знижується. Крім цього, короткі пептиди, що виступають продуктами ферментативних реакцій, можуть виступати в ролі інгібіторів ферменту. Розглянемо класифікацію протеолітичних ферментів [8].

а) За своєю специфічністю:

- екзопептидази – гідролізують пептидні зв'язки на кінцях білкової молекули, вони поділяються на карбоксипептидази і амінопептидази;
- дипептидази – розщеплюють пептидні зв'язки в дипептидах;
- ендопептидази – гідролізують пептидні зв'язки всередині поліпептидної послідовності.

б) по рН-оптимуму дії:

- лужні;
- нейтральні;
- кислі.

в) за структурою каталітичного активного центру:

- серинові (містять в складі активного центра серин і гістидин, а також в ряді випадків аспарагінову чи глютамінову кислоту);
- карбоксильні (в склад активного центра входять 2 залишки аспарагінової чи глютамінової кислоти);
- тиолові (в склад активного центра входить цистеїн, а також гістидин);
- металозалежні (містять в активному центрі іони двохвалентного металу, як правило, калію чи цинку, зв'язаного карбоксильними групами залишків аспарагінової чи глютамінової кислоти).

При виробництві білкових гідролізатів найчастіше використовуються наступні ферментні препарати [44]:

1. Трипсин - фермент, який виступає лужною сериною протеазою. Фермент синтезується у підшлунковій залозі у формі неактивного попередника (протофермента) трипсиногену. Фермент легко піддається саморозчепленню (автолізу). Молекулярна маса 23-24 кД, оптимальна каталітична активність при рН 7,8-8,0.

2. Хімотрипсин – сімейство лужних серинових протеїназ, що утворюються із спільного попередника, який виробляється підшлунковою залозою. Має більш широку специфічність ніж трипсин, діючи на пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами тирозину, фенілаланіну і триптофану чи в меншій степені – лейцину, метіоніну, аспарагінової чи глютамінової кислот.

3. Еластаза – фермент класу гідролаз, секретується підшлунковою залозою, що каталізує розщеплення пептидів і деяких білків (наприклад, еластину) переважно по зв'язкам, що прилягають до залишків нейтральних амінокислот.

4. Карбоксипептидази – джерелом являється підшлункова залоза тварин. За механізмом дії виступають метало ферментами, містять в активному центрі цинк.

5. Колагеназа – єдина із протеаз підшлункової залози, що володіє здатністю гідролізувати зв'язки, утворені проліном.

Всі вищеперераховані ферменти входять в склад використовуваного при виробництві гідролізатів промислового ферментного препарату панкреатину, отриманого із тканин підшлункової залози великої рогатої худоби.

6. Пепсин. Протеаза травної системи хребетних, що виділяється клітинами шлунку з метою розчинення білків їжі на пептиди. Молекулярна маса ферменту 42 кД. Володіє оптимальною каталітичною активністю при рН 1-2. Цей фермент розчеплює центральні пептидні зв'язки в молекулах білків і пептидів з утворенням більш простих пептидів і вільних амінокислот. З найбільшою швидкістю пепсин гідролізує пептидні зв'язки утворені ароматичними амінокислотами – тирозином і фенілаланіном, однак, на відміну від інших протеолітичних ферментів не володіє строгою специфічністю.

7. Папаїн. Фермент рослинного походження. Відноситься до нейтральних протеїназ. У порівнянні з панкреатинними протеазами папаїн є більш термостабільний, зберігає активність до температури 70°C. Фермент володіє широкою субстратною специфічністю, діючи на різноманітні типи пептидних зв'язків. Використання папаїну при отриманні ферментативних гідролізатів дозволяють досягнути більш високого (в порівнянні з панкреатином) ступеня гідролізу.

8. Протеази грибів. Із нижчих грибів (представників родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*) виділено велику кількість протеолітичних ферментів, деякі з них останнім часом починають використовуватись в промислових ферментних препаратах. рН оптимум дії більшості бактеріальних протеаз лежить в лужному середовищі (рН 8-11), температурний оптимум дії 50°C.

9. Протеази бактеріального походження. При виробництві високоактивних промислових ферментних препаратів широко використовуються протеази бактеріального походження. Найбільш часто в якості продуцентів використовують *Bacillus subtilis*, *B. Thermoproteolyticus*.

1.4.3 Біологічно активні пептиди та їх властивості

Дослідження біологічної дії продуктів протеолізу білків сироватки молока призвело до відкриття ряду пептидів, які можуть впливати на фізіологічні функції організму [18, 39, 41]. Узагальнені дані про відомі білкові пептиди з білків сироватки молока наведені в табл. 1.6. Виявлено антигіпертензивні, опіоїдні, імуномодуляторні та антимікробні пептиди. Найбільш численною групою біологічно активних пептидів, які утворюються з білків сироватки молока є інгібітори АПФ [34,38]. Цей фермент є компонентом ренін-ангіотензинальдостеронової системи організму і відіграє важливу роль у регуляції кров'яного тиску та водно-електролітичного гомеостазу[2].

У ренін-ангіотензиновій системі організму АПФ впливає на октапептид ангіотензин-I, відщеплюючи дипептид His-Leu із С-кінця молекули, і продукує ангіотензин-II, який проявляє сильну вазоконстрикторну дію, а в кінін-калікрейновій системі він інактивує вазодилататор брадикікін. У звичайних умовах, ангіотензин II має такий вплив на організм:

1. Діє як вазоконстриктор (звужує кровоносні судини). Внаслідок такої дії відбувається підвищення артеріального тиску та з'являється артеріальна гіпертензія. Крім того, звуження еферентних артеріол нирок призводить до підвищення перфузійного тиску в клубочках цих органів;

2. Призводить до ремоделювання (зміни розмірів) та гіпертрофії шлуночків серця;

Таблиця 1.6 – Біологічно - активні пептиди білків сироватки молока [36]

№ п/п	Білок попередник	Фрагмент	Первинна структура пептиду	Біологічна активність
1	2	3	4	5
1	α-лактоальбумін	1-5	EQLTK	бактерицидна
		17-31+109-104	GYGGVSL	бактерицидна
		18-20	YGG	імуномодуляторна
		(50-51) (18-19)	YG	імуномодуляторна
		50-51	YG	АПФ-інгібіторна
		50-52	YG	АПФ-інгібіторна
		50-53	YGLF	АПФ-інгібіторна, опіодний агоніст
		51-53	GLF	імуномодуляторна
		52-53	LF	АПФ-інгібіторна
		61-68+75-80	LF	імуномодуляторна
		99-108	CKDDQNP HISCDFK	АПФ-інгібіторна
		102-105	NYWL	АПФ-інгібіторна
		105-110	LANKAL	АПФ-інгібіторна
		142-148	ALPMHIR	АПФ-інгібіторна

Продовження таблиці 1.6

1	2	3	4	5
		146-149 9-14	HIRL	Стискування клубкової кишки
2	β -лактоглобулін	9-14	GLDIQK	АПФ-інгібіторна
		15-19	VAGLW	АПФ-інгібіторна
		15-20	VAGLWY	АПФ-інгібіторна
		22-25	LAMA	бактерицидна, АПФ-інгібіторна
		25-40	AASDISLLDAQSAP LR	бактерицидна
		32-40	LDAQSAPLR	АПФ-інгібіторна
		71-75	IAEK	Гіпохолостериміч- на
		78-80	IPA	АПФ-інгібіторна
		78-83	IPAVFK	бактерицидна
		81-83	VFK	АПФ-інгібіторна
		92-100	VLVLDTYK	бактерицидна
		94-100	VLDTDYK	АПФ-інгібіторна
		102-103	YL	АПФ-інгібіторна
		102-105	YLLF	опоїдна, стискання мускула, АПФ-інгібіторна
		104-105	LF	АПФ-інгібіторна
		106-111	CMENSA	АПФ-інгібіторна
		142-146	ALPMH	АПФ-інгібіторна
		142-148	ALPMHIR	АПФ-інгібіторна
		146-148	HIR	АПФ-інгібіторна
		146-149	HIRL	стискання мускула
		147-148	IR	АПФ-інгібіторна
		148-149	RL	АПФ-інгібіторна
3	Лактоферин	17-41	FKCRRWQWRMKK LGAPSITCVRRAF	бактерицидна, імуномодуляторна
		17-42	FKCRRWQWRMKK LGAPSITCVRRFAFA	бактерицидна
		318-323	YLGSGY*OCH ₃	опоїдний антагоніст
		319-324		

Продовження таблиці 1.6

1	2	3	4	5
4	Сироватковий альбумін	208-216	RALKAWSVA	стискування клубкової кишки, АПФ-інгібіторна
		399-404	YGFQNA	опоїдна
5	Лактотранс-ферин	39-42	KRDS	антитромботична

3. Призводить до активації процесів вивільнення корою надниркових залоз - альдостерону, гормону, який діє у ниркових канальцях і призводить до утримання натрію і іонів хлориду та в організмі та підвищує екскрецію калію. Натрій утримує воду, що призводить до збільшення об'єму крові, а, відповідно і підвищення артеріального тиску.

4. Стимулює задню частку гіпофіза призводить до вивільнення вазопресину та призводить до утримання води через вплив на нирки.

5. Знижує рівень ниркової протеїнази.

Інгібітори АПФ (ІАПФ) володіють антигіпертензивним ефектом і попереджують розвиток ряду захворювань серцево-судинної системи [15]. Такі пептиди виявлено в різних харчових продуктах, в тому числі і у молоці.

Для пептидних ІАПФ, отриманих із білків сироватки молока, у 1999 році запропоновано назву «лактокініни» [18], тоді як раніше, у 1993 році, для пептидів казеїнового походження з аналогічним ефектом було введено термін «казокініни» завдяки їх брадикініноподібній дії. Для виділення та ідентифікації таких пептидів застосовують два методичні підходи:

1) виділення інгібіторних пептидів після протеолітичного розщеплення білкового попередника ;

2) хімічний синтез пептидів, амінокислотна послідовність яких подібна до вже відомих ІАПФ, і пошук такої послідовності амінокислот у білках із встановленню первинною структурою.

Молекулярна будова лактокінінів показує, що фрагмент β -лактоглобуліну 9-14 містить С-термінальний лізин, фрагменти α -лактоальбуміну 105-110 і β -лактоглобуліну 15-20 – гідрофобні амінокислоти в С-кінці молекули. Крім цього в опіоїдних пептидів β - і α -лакторфіну, виділених з α -лактоальбуміну і β -лактоглобуліну, теж виявлено АПФ-інгібіторну активність, а в С-кінцях їх молекул – гідрофобні амінокислотні залишки (лейцин).

Деякі лактокініни проявляють ще й інші фізіологічні ефекти. Зокрема, альбутензин А (фрагмент 208-216 альбуміну сироватки коров'ячого молока) посилює моторику клубової кишки [18], а вже згадані β - і α -лакторфіни поєднують опіоїдну та АПФ-інгібіторну функції. Лактокініни не володіють такою високою активністю, як синтетичний ІАПФ каптоприл. Проте враховуючи їх натуральне походження, ці пептиди не повинні проявляти сторонніх ефектів, помічених у синтетичних ІАПФ, таких як кашель, зміни ліпідного обміну тощо.

Іншою важливою групою біологічно активних пептидів білків молочної сироватки є група бактерицидних пептидів. Один з найбільш сильних антимікробних пептидів описаних на даний час [36], відповідає фрагменту сироваткового білка лактоферину, що називається лактоферицин (див. табл.1.6). Структурна активність лактоферицину вивчалась протягом багатьох років. Було встановлено, що лактоферицину притаманні антимікробні, антигрибкові, антипухлинні та противірусні властивості. Ці властивості можуть пояснюватись наявністю у цьому пептиді таких амінокислот як триптофану та аргініну. Літературні джерела вказують, що лактоферицин В був активним проти штамів *E.coli* 0157H:7 в концентраціях значно нижчих ніж будь-який гідролізат лактоферину, або сам лактоферин [36].

Опіоїдні пептиди – це опіоїдні рецептори лігандів з агоністичною та антагоністичною дією і характеризуються N-термінальною послідовністю та носять назву атипових опіоїдних пептидів [42]. Було встановлено, що α -лакторфін (α -лактоглобулін f 50-53 Tyr-Gly-Leu-Phe) та β -лакторфін (β -лактоглобулін f 102-105 Tyr-Leu-Leu-Phe), які виділені із сироватки молока

володіють подібною опіюючою активністю. Лактофероксини – це антагоністи, що утворюються із людського лактоферину. З використанням високоефективної рідинної хроматографії було очищено три окремих активних фракції, що були позначені лактофероксин А, В та С відповідно.

Молоко містить також пептиди, що проявляють антигрибкові властивості [33]. Антигрибкова діяльність лактоферину або його пептидів (а особливо лактоферицину В) в поєднанні з антигрибковими агентами, була продемонстрована з *Candida albicans*. Деякі волокнисті грибки разом із збудників шкірних інфекцій (дерматофітів) виявились сприйнятливими до цієї суміші. Пептид, що складається з N-терміналу від 17 до 26 амінокислоти лактоферину, має сильнішу активність проти *Candida* чим пептид повної довжини. Цей пептид також продовжує виживання мишей інфікованих летальною дозою *Candida albicans*, можливо завдяки підвищенню *Candida*-вбивчої діяльності нейрофілів. Недавні дані показали, що зв'язані лактоферином суміші, об'єднані з триазолями, гальмують приріст стійких до азолу *C. Albicans*. Лактоферицин володіє сильнішою активністю проти *Candida albicans* чим неушкоджений лактоферин. Через деякий час такі сироваткові білки такі як α -лактоальбуміну та β -лактоглобуліну також розглядалися, як могутні попередники протибактерицидних фрагментів. Пептидні фрагменти f 1-5 та f 17-31 S-S109-114 отримані трипсиновим гідролізом α -лактоальбуміну, в той час як пептиди f 61-68 S-S75-80 є звільненими хімотрипсиновим гідролізом. Ці пептиди виявили активність проти широкого діапазону грам-позитивних та грам-негативних патогенних організмів, наприклад, *Escherichia*, *Helikobacter*, *Listeria*, *Salmonella* та *Staphylococcus*, дріжджів, волокнистих грибків. Пептидні фрагменти f 15-20, f 25-40, f 78-83, та f 92-100 отримані шляхом трипсинового травлення

β -лактоглобуліну і є також активними проти грам-позитивних бактерій.

1.5 Технологія ферментативного гідролізу

Коротко розглянувши гідроліз та його види, а також різноманітні протеолітичні ферменти необхідно перейти до обговорення відомих уже в патентній літературі методів отримання ферментативних гідролізатів білків [43]. Розрізняють одно стадійний та багатостадійний гідролізи. Також важливе значення відіграє метод, що застосовується для видалення із отриманих ферментативних гідролізатів залишків негідролізованого білка і ферментних препаратів. В основному для цього використовується мембранна ультрафільтрація, а останнім часом – нанофільтрація.

1.5.1 Одностадійний гідроліз

В патенті [40] проводиться одностадійний гідроліз молочного білка під дією ферментного препарату з одного із 4-ох грибів-продуцентів: *Aspergillus flavus*, *A. Japonicas*, *A. Niger*, чи *A. Awamori*. Процес ведуть в 10 % розчині білка при рН 7,6-8, температурі 40°C. Експеримент триває 1,5-2 години. Фермент в подальшому термічно інактивують. Після цього гідролізат піддають центрифугуванню в результаті чого відбувається освітлення, а потім висушують. В результаті досліджень степінь гідролізу продукту може становити 45-50%.

В патенті [41] гідролізу сумішшю трипсин-хімотрипсин піддають сироваткові білки молока. Температура гідролізу становить 40-60°C, рН 8,5-9. Степінь гідролізу зразка становить не більше 5%. Особливістю даного методу, на думку автора, є селективна інактивація β -лактоглобуліну, в той час, як інші білки сироватки залишаються в значній мірі негідролізованими. Мета винаходу – отримання часткового гідролізату – компонента «гіпоалергенного» продукту для хворих, що не переносять β -лактоглобулін.

Ферментативний гідроліз білків молочної сироватки викладений в наступному патенті. Концентрація білка у водному розчині становить 12,5%. Застосовується декілька схем гідролізу. В першому варіанті гідроліз ведуть

трипсином при фермент-субстратному відношенні 0,4%, при температурі 55°C, рН 7,4 упродовж 4 годин. Інактивацію ферменту проводять при 80°C. Степінь гідролізу становить близько 14%, субстанції з молекулярною масою вище 5 кД складають до 29%. У другому варіанті субстрат у тій же концентрації гідролізують трипсином у співвідношенні 0,8% при температурі 55°C, рН 7,4, яке підтримують додаванням $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NaOH і KOH . Решта умови аналогічні попереднім. Після закінчення гідролізу фермент інактивують нагріванням до температури 80°C, після чого повторно додають трипсин в цьому ж співвідношенні і гідролізують ще 1 годину. Після закінчення фермент знову інактивують при температурі 80°C. Степінь гідролізу досягається 17,5% (вищий ніж у попередньому прикладі).

В іншому патенті гідроліз лактоальбуміну здійснюється під дією суміші протеази із грибка *A. Orhysae* і «панкреатину», додавання до субстрату в співвідношенні 2,45% і 0,65% відповідно. Концентрація субстрату становить 10%, температура 50°C, рН 7-7,5 (встановлювали додаванням NaOH). Ферментоліз проводять тривалий час (до 24 годин), при цьому, як повідомляється, продукт набрав поганого смаку. Реакцію зупиняли нагріванням до 90°C. Особливістю процесу, на думку автора, є використання ефекту панкреатинної ліпази (в деяких варіантах процесу її вносили спеціально замість панкреатину).

Одностадійна схема ферментативного гідролізу білка може розглядатись як найпростіша модель, на прикладі якої можна виділити всі основні проблеми технологічного процесу протеолізу. Коротко ці положення можуть бути сформульовані наступним чином:

1. Попередня підготовка білкового субстрату. Вона може заключатись в його розчиненні чи диспергуванням у воді з отриманням розчину зазначеної концентрації і наступній термічній обробці до 70-80°C.

2. Умови гідролізу. З них найважливіші:

- а) фермент-субстратне співвідношення. При великій масовій частці ферментного препарату можливе досягнення більшої глибини гідролізу, однак

небажаним наслідком являється підсилення контамінації продукту залишковою кількістю ферментного препарату.

б) температура процесу. Для більшості ферментних препаратів включаючи панкреатин, протеази бактеріального і грибового походження, температурний оптимум становить приблизно 50°C. При вищій температурці різко пришвидшуються процеси автолізу і термічної інактивації ферментів, при меншій – процес в цілому протікає дуже повільно. Виключення становить папаїн, який може працювати при значно вищих температурах, а також протеази гідробіонтів.

в) оптимум рН. В залежності від вибору ферментного препарату, який містить кислі, лужні чи нейтральні протеази, невелика швидкість процесу може бути досягнута при наявності в реакційній суміші певного значення рН. При цьому слід врахувати, що величин рН реакційної суміші не є величиною постійною. При проведенні протеолізу в лужному середовищі протікає постійне закислення розчину, у вигляді виділення вільних карбоксильних груп пептидів і амінокислот. В більшості випадків цю проблему вирішують шляхом додавання в систему лугу. У випадку використання кислих чи нейтральних протеаз, а також протеолітичних препаратів із грибів, будучи активними в широкому діапазоні рН, додавати луг непотрібно.

г) специфічність ферменту. При однакових умовах найбільшої глибини гідролізу вдається досягти при використанні ферментних препаратів, що представляють собою комплекси різноманітних протеаз. Прикладом такого препарату виступає панкреатин, який містить як набір екзопептидаз, так і протеаз, що володіють специфічністю по відношенню до пептидних зв'язків різноманітних типів.

3. Завершення процесу. В більшості із запропонованих випадків протеоліз не йде до кінця в тому розумінні, що в складі продукту зберігаються залишкова кількість активного ферментного препарату, і нерозщепленого білкового субстрату. Традиційний шлях елементації залишкової кількості матеріалу ферментного препарату і нерозщепленого білка із гідролізату полягає, знову ж

таки в жорсткій термічній обробці, коли макромолекулярні білки денатурують з втратою розчинності. Після цього вони можуть бути видалені з використанням таких традиційних підходів, як центрифугування, пропускання через фільтри з порами макроскопічних розмірів.

4. Розчинність. Для гідролізатів білків сироватки часто характерним являється утворення осаду чи гелів, що утруднюють їх застосування в наступних технологічних операціях. Ключову роль в утворенні осаду, на думку ,звільнення в ході протеолізу поверхні гідрофобних фрагментів пептидів, взаємодія яких, тягне за собою ефект агрегації і гелеутворення.

5.Оцінка якості продукту.

При оцінці якості гідролізатів, призначених для використання в гіпоалергенних спеціалізованих продуктах, вирішальне значення має імуннологічна та імуннохімічна оцінка. Однак при розробці нових продуктів важливою може бути і оцінка алергенних і імуногенних властивостей гідролізатів.

1.5.2 Багатостадійний гідроліз білка

Нижче будуть розглядатись технологічні процеси ферментативного гідролізу, важливою відмінністю яких є проведення ферментативного гідролізу не менше ніж у дві стадії.

В патенті [35] пропонується двохстадійний гідроліз білка молочної сироватки трипсином, сумішшю трипсин-хімотрипсин чи панкреатином. Першу стадію гідролізу проводять в 10-15% розчині білка. при рН 8, Фермент-субстратне співвідношення становить 5%, температура - 50%. Дослідження проводять упродовж 4 годин. рН суміші повинно бути 8,0. Отриманий «гідролізат 1» нагрівають до 80-100⁰С упродовж 5 хвилин під дією гострої пари, після чого охолоджують до 50⁰С і знову вносять порцію фермента в кількості 1,3% від субстрата. Гідроліз проводять упродовж 2 годин. Фермент інактивується нагріванням до 80-100⁰С. Отриманий «гідролізат 2»

позиціонується як вільний від основних алергенів молока і придатний для використання гіпоалергенних продуктів харчування.

В патенті [29] приведені способи отримання серії часткових ферментативних гідролізатів білків сироватки призначених для використання в дитячих сумішах профілактичного напрямку. В одному із варіантів здійснюють трьохстадійний ферментний гідроліз. 12,5% розчин сироваткового білка обробляють на першій стадії Алкалазу (4%) при рН 7,5 ,температурі 55⁰С упродовж 4 годин. Далше додають 4% нейтразу і продовжують гідроліз ще 4 години при 50⁰С. В кінці даної стадії проводять проміжну інактивацію ферментів при 90⁰С. На третій стадії рН доводять лугом до 7,33 і гідролізують панкреатином в кількості 1,6 % при температурі 55⁰С. Фермент остаточно інактивують при 90⁰С, гідролізат сушать до наступного використання в продуктах.

Таким чином, розглянуті методи отримання ферментних гідролізатів без наступної мембранної фільтрації дозволяють отримати продукти із низькою, середньою та відносно високою степінню гідролізу. У випадках використання одноферментних і одностадійних схем гідролізу, як правило, не вдається отримати степінь гідролізу більше 10-15%. Фермент субстратне співвідношення в використовуваних схемах дуже варіює, становлячи від 0,1% до 2-3%, при тому, що концентрація білка становить від 5 до 20%. У випадках використання панкреатинних протеаз гідроліз протікає 3-4 години

До не достатків даних методів слід віднести те, що гідролізат без попереднього мембранного фракціонування містить залишки термічно інактивованого ферментного препарату. Його присутність у складі кінцевого продукту, особливо призначеного для дитячого і дієтичного харчування є особливо небажаною.

Подолати цю проблему, покращуючи якість пептидного препарату і значно інтенсифікувати процеси його отримання можна з використанням різного типу мембранних технологій.

Метою роботи є розробка методу виділення основних білків сироватки молока з використанням препаративного електрофорезу.

Для досягнення цієї мети необхідно вирішити наступні завдання:

- виділити молочну сироватку шляхом ізоелектричного осадження казеїнів;
- дослідити методи електрофоретичного розділення білків сироватки молока, встановити переваги та недоліки кожного із них;
- вибрати найбільш ефективний метод розділення білків;
- використати цей метод для препаративного виділення електрофоретично чистих білків сироватки молока в нативних умовах.

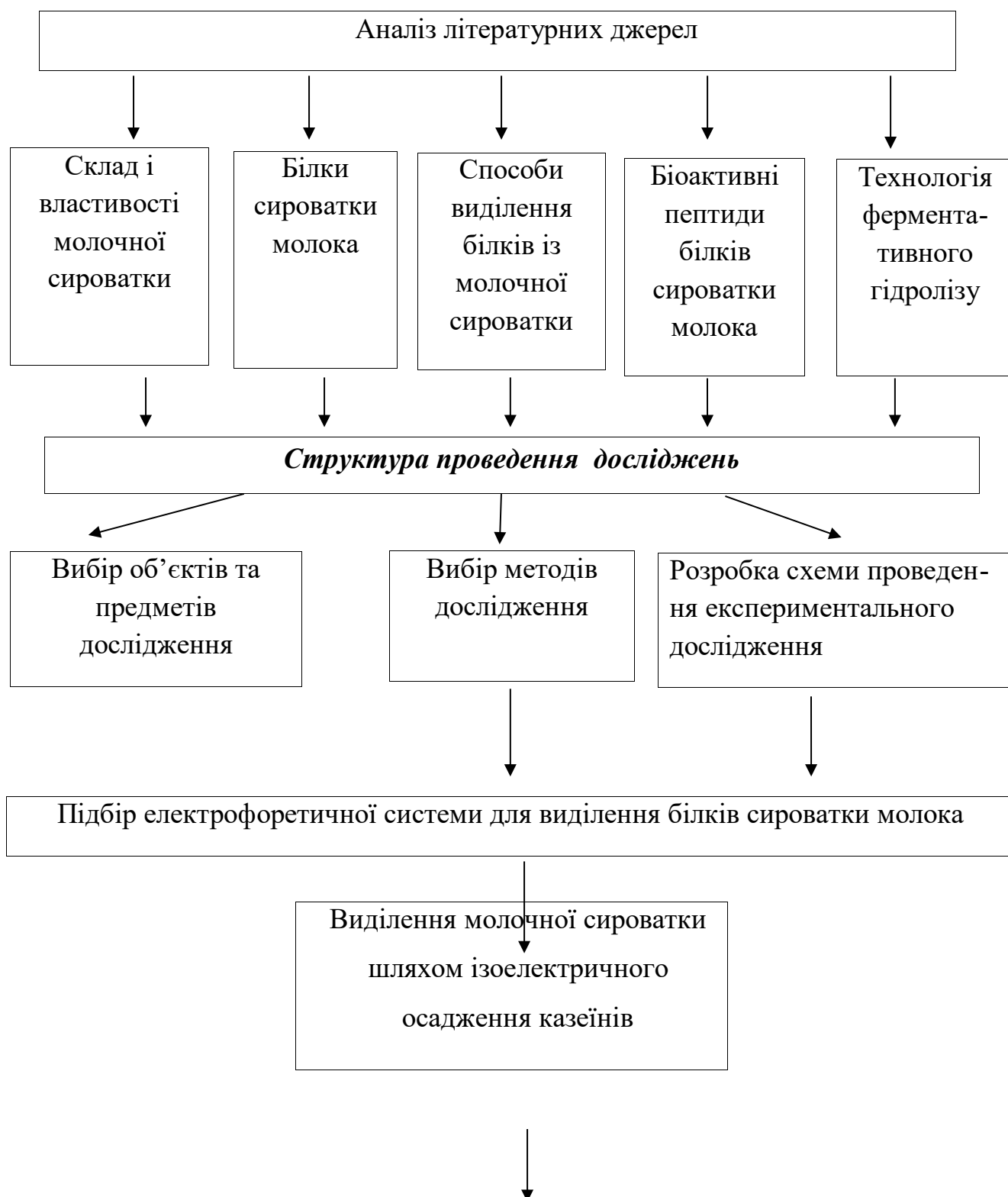
Об'єкт дослідження – виділення гомогенних білків сироватки молока.

Предмет дослідження – препаративний електрофорез білків сироватки молока у пластинах гелю у нативних умовах без використання денатуруючих агентів.

2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводились в науково-дослідній лабораторії кафедри харчової біотехнології і хімії.

Схема досліджень представлена на рисунку 2.1.



Продовження схеми досліджень



Рис. 2.1 - Схема проведення експерименту

Для проведення досліджень використовуємо свіжовидоєне коров'яче молоко. Аналіз молока проводять із середнього зразка, правила відбору якого , а також методи оцінювання якості молока викладено у ДСТУ ISO 707-2002, ГОСТ 27930-88, ДСТУ ISO 5538:2004, ДСТУ ISO 8197:2004 [11, 22].

Хімічні властивості молока зумовлені загальною (титрованою) й активною (істинною) кислотністю молока. Загальну кислотність встановлюють титруванням молока лугом у присутності індикатора. Градус кислотності за Тернером (1°T) відповідає 1 мл 1 н.розчину лугу, який використаний на нейтралізацію кислот і їх солей, що містяться у 10 мл молока. Свіжовидоєне молоко має кислотність $16 - 18^{\circ}\text{T}$

1.Визначення титрованої кислотності [11].

Техніка визначення: до 10 мл добре перемішаного молока додають 20 мл дистильованої води, 3 краплини 1%-ного спиртового розчину фенолфталеїну і все перемішують. Титрують із бюретки 0,1н. розчином їдкого натру до блідо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 1 хв. Проводять паралельні визначення, розбіжності між їх результатами не повинні перевищувати 1⁰Т.

$$K=10 \times Y, \text{ де}$$

K – титрована кислотність молока,

Y – кількість лугу, що витрачено на титрування,

10 – коефіцієнт переведення 0,1н. концентрації лугу в 1 н. розчин.

Під час визначення якості молока часто користуються методом визначення граничної кислотності. Для цього користуються розчином лугу приготовленим на певний градус кислотності. Достатньо знати про кислотність молока – вища чи нижча вона за певну норму.

2.Визначення активної кислотності (pH) [11].

Під активною кислотністю рН розуміють концентрацію водневих іонів, тобто число грам-іонів водню в 1 л розчину. Величина рН свіжого молока 6,0 – 6,3 зумовлюється переважно фосфоро- і цитратоказеїнатами молока. При рН нижче 6,0 молоко некондиційне (кисле). Для визначення активної кислотності застосовують електрометричний метод (рН-метром). Шкала приладу градуйована в одиницях рН і дозволяє працювати в діапазоні рН 1 – 14. Прилад готовий до роботи через 30 хв після включення в мережу. Він складається з двох напівмікроелементів або електродів. Одним напівелементом або індикаторним електродом є досліджуваний розчин з зануреним в нього електродом із платини або золота, другим - напівелемент або електрод порівняння з визначеним і стійким потенціалом. Приступаючи до роботи, необхідно ретельно промити електроди дистильованою водою, переконатися у тому, що електроди надійно закріплені і занурені у розчини.

3.Визначення концентрації білків за методом Лоурі [22].

Техніка визначення: До 0,6 мл розчину, що містить білок, додають 3 мл робочого розчину, перемішують і залишають при кімнатній температурі на 10 хв. Після цього додають 3 мл реактиву Фоліна –Чекальтеу, перемішують і через 30 хвилин колириметрують при довжині хвилі 750 нм на фотометрі КФК-3. Вміст білка в досліджуваному зразку визначають по калібрувальному графіку.

4)Електрофорез білків сироватки молока [45].

Для розділення білків сироватки молока ми використовували наступну методику, яка рекомендована фірмою «Реанал»:

1.Наперед приготувані реактиви, які зберігаються в холодильнику перад роботою витримують деякий час для нагрівання їх до лабораторної температури (20⁰С)

2.Для полімеризації гелю і використовують скляні трубочки з відшліфованими кінцями з внутрішнім діаметром 6мм і довжиною 100мм. На дно трубочок надівають резинове кільце-прокладку, з з протилежного кінця надівають конусне кільце і, на кінець, затискуючи кільце. Таким чином зібрані колонки закріплюють в заглибинах підставки для полімеризації гелю. Коли прилад є правильно зібраний, резинове кільце прокладка щільно затискається між поверхнями підставки і конусного кільця, виключаючи при цьому протікання розчину, який не вступив ще в полімеризацію.

3.Приготовляють розчин дрібнопористого гелю заданої пористості і рН буферної системи. Розчинене повітря видаляють відсосом із склянки. Таким чином уникають повітряних пухирців в процесі полімеризації, що в значній мірі перешкоджало б розділенню.

4.В скляні трубочки вносять піпеткою по 2 мл розчину дрібнопористого гелю, після цього на поверхню даного розчину нашаровують 0,2 – 0,3 мл ДМ води чи розчину А, розбавленого в 7 – 8 раз. Нашарування розчину чи води – одна з критичних операцій при підготовці гелю, що забезпечує утворенню рівної поверхні гелю і виключає доступ кисню, що перешкоджає полімеризації гелю.

Недотримання вимог при проведенні нашарування призводить до змішування розчину що нашаровується з розчином гелю. Після закінчення 30 – 40 хвилин кінець полімеризації можна замітити по слабкому нагріванню скляних трубочок, а також по утворенню добре видимої границі розподілу між гелем і нашарованим розчином.

5.Після утворення гелю відпадає необхідність в резинових кільцях-прокладках і в конусних кільцях. В подальшому скляні трубочки для полімеризації утримують тільки різьбові кільця-затискачі. За рахунок того, що внутрішній діаметр кілець-затискачів на 1 – 1,5 мм більший від розміру внутрішнього діаметра скляної трубочки, останні можна легко виймати і вкладати при проведенні наступних операцій.

6.Швидким рухом руки обережно струшують з гелю нашаровану рідину.

7.Готують розчин грубопористого гелю. Відсмоктувати повітря з розчину не обов'язково, однак рекомендується оберегти розчин від дії світла через присутність рибофлавіну, який має високу чутливість до світла. Складні трубочки ополіскують 0,1 – 0,2 мл розчину мономера. Після ополіскування в кожен колонку піпеткою вносять 0,2 мл розчину грубопористого мономера, а після цього, уже відомим способом нашаровують 0,1 – 0,2 мл ДМ води. Операція нашарування відіграє таку ж саму важливу роль як і у випадку дрібнопористого гелю.

8.Гелевий диск, об'ємом 0,2 мл, безпосередньо контактує з дрібнопористим гелем, в даному випадку грає роль «spacer» - гелю. Його полімеризація проходить за рахунок світло чутливого каталізатора рибофлавіну, тому зібрану установку розташовують біля ультрафіолетової лампи потужністю 250–500 Вт. Початок утворення гелю розрізняють по зміні забарвлення, а кінець – по різкому відділенню гелю від нашарованої рідини.

9. Після закінчення полімеризації нашаровану рідину зливають з гелю і ополіскують гелеві трубочки розчином грубо пористого мономера, наперед приготовленого для аналізу.

10. Розчини, які пройшли тестування, змішують з розчином грубо пористого мономера таким чином, щоб $2/3$ частини від їх загального об'єму займав грубо пористий мономер. Такий спосіб гарантує хорошу полімеризацію «sample»-гелю. Під час підготовки розчину «sample»-гелю необхідно взяти до уваги, що пристрій може сепарувати 200 – 250 мкг білка на кожну колонку. Тестовані розчини з більш високою концентрацією білків потрібно розводити перед змішуванням. Розведення можна проводити розчином грубо пористого гелю.

У зв'язку з нанесенням «sample»-гелю рекомендується наступна практична порада: якщо тестований розчин містить речовини, що пригнічують полімеризацію, то його внесення цілеспрямовано здійснюють при восьмикратному розведенні з сумішшю розчинів А і Б (1:1).

За вищеописаним методом приготувані розчини «sample»-гелю наносять на гелеві колонки піпеткою в об'ємі 0,2 мл. Ця частина гелевої колонки безпосередньо доторкається під час електрофорезу з електродним буфером, тому верхнє нашарування закінчують розчином електродного буфера, розведеного в 10 разів. Полімеризацію «sample»-гелю здійснюють при ультрафіолетовому освітленні.

11. Під час проведення полімеризації «sample»-гелю вуглецевий електрод закріплюють тримачем в каналі круглого профілю, зробленого в центрі нижнього буферного резервуару, в який наливають розведений в 10 раз розчин електродного буфера в об'ємі 1000мл.

12. Після 15 – 20 хвилинної полімеризації «sample»-гелю – кінець процесу можна побачити при появі різкої границі поділу гелю і шару буферного розчину – скляні трубочки з гелем поміщають в отвори, просвердлені в дні верхнього буферного резервуару.

Після закріплення скляних трубочок з гелем встановлюють електрод верхнього буферного резервуара. (За допомогою пристрою можна проводити електрофорез меншої кількості проб, ніж дванадцяти. В такому випадку у вільні

отвори верхнього буферного резервуара поміщають пусті скляні трубочки таким чином, щоб їх кінці були вище рівня буферного розчину.)

Зібрану верхню частину пристрою приєднують до нижнього буферного резервуара, який попередньо заповнюють буферним розчином, розведеним в 10 раз. Повітряні пухирці, які перешкоджають провідності струму, з кінців трубочок, які входять в розчин нижнього буферного резервуару, видаляють багатократним обмочуванням чи струшуванням. Верхній буферний резервуар закріплюють гвинтами на нижньому резервуарі. Обережно заповнюють і верхній резервуар десятикратно розведеним електродним буферним розчином, до якого попередньо додають барвник в об'ємі 1 мл.

13. Пристрій поміщають в холодильник. Електроди приєднують до відповідних полюсів струму. При підключенні необхідно прийняти до уваги ізоелектричну точку білкового розчину, що використовується. Під час використання буферної системи електрофорезу, білки з більш низькою ізоелектричною точкою ніж рН буферної системи будуть рухатися від катода до анода, а при більш високій ізоелектричній точці – від анода до катода.

В перші пів години електрофорезу сила струму не повинна перевищувати двох міліампер на кожен окрему трубочку. Нижче початкове значення сили струму призупинить рух дрібних частин зразка в розчин верхньої буферної ємності. Через пів години, після того як зразок перейде в «спасег» - гель, силу струму можна підвищити до п'яти міліампер на кожен трубочку.

14. Після проведення електрофорезу гелеві трубочки виймають з верхнього буферного резервуару. Гель із скляних трубочок можна легко видалити обведенням сталюї гоки під шаром ДМ води. Відділення проходить за рахунок тонкого водяного шару, який проникає між стінками трубочки і гелю.

15. Гель, знятий з трубочок, поміщають в забарвлюючий розчин-фіксатор. Після забарвлення гелі промивають водою і поміщають в розчин диференціатор. Багатократною зміною розчину вимивають барвник не зв'язаний з білками, а та частина гелю, яка не містить білків стає абсолютно прозорою. Отримана електрофореграма готова для оцінювання.

Електрофореграми можна зберігати упродовж 1 – 2 місяців в пробірках, наповнених розчином-диференціатором. Зберігати електрофореграми таким чином не більш тривалий термін не рекомендується, так як частина барвника білкових дисків розчиняється в диференціюю чому розчині. У випадку необхідності більш тривалого зберігання можна висушити ці гелі на пластмасовому листі, чи на скляній пластині. Гелі упродовж декількох днів всихаються і в такому вигляді їх зручно зберігати без будь-яких проблем упродовж декількох років. При повторному поміщенні у розчин оцтової кислоти гелі приймають свій початковий об'єм.

Розглянемо складові гелю і електродного буферу.

Електродний буфер включав:

0,77 М борна кислота

0,2 М тріс

pH 7,0

До складу гелю входять:

0,77 М борна кислота

0,2 М тріс

7,5 % Акриламід (АА)

0,188 % Метиленбісакриламід (МБА)

0,1 % додецисульфат натрію (ДСН)

Для полімеризації до 90 мл гелю додавали 10 мл 0,45 % персульфату амонію і 0,05 мл ТЕМЕД. Зразок білків для електрофоретичного аналізу мав наступний склад:

0,77 М борна кислота

0,2 М тріс

2 % ДСН

20 % сахароза

5 % β-меркаптоетанол

1 мг/мл білків

сліди бромфенолового синього

pH 7,0

4.Електрофорез білків сироватки молока у пластинах ПАГ у присутності сечовини проводили за методом описаним раніше [20].

5)Диск-електрофорез білків сироватки молока проводили за методом розробленим для кислих і нейтральних білків [46].

Для визначення вмісту фракцій білків сироватки молока після електрофоретичного розділення ми використовували функцію зчитування графічних зображень imread [21].

3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Виділення молочної сироватки

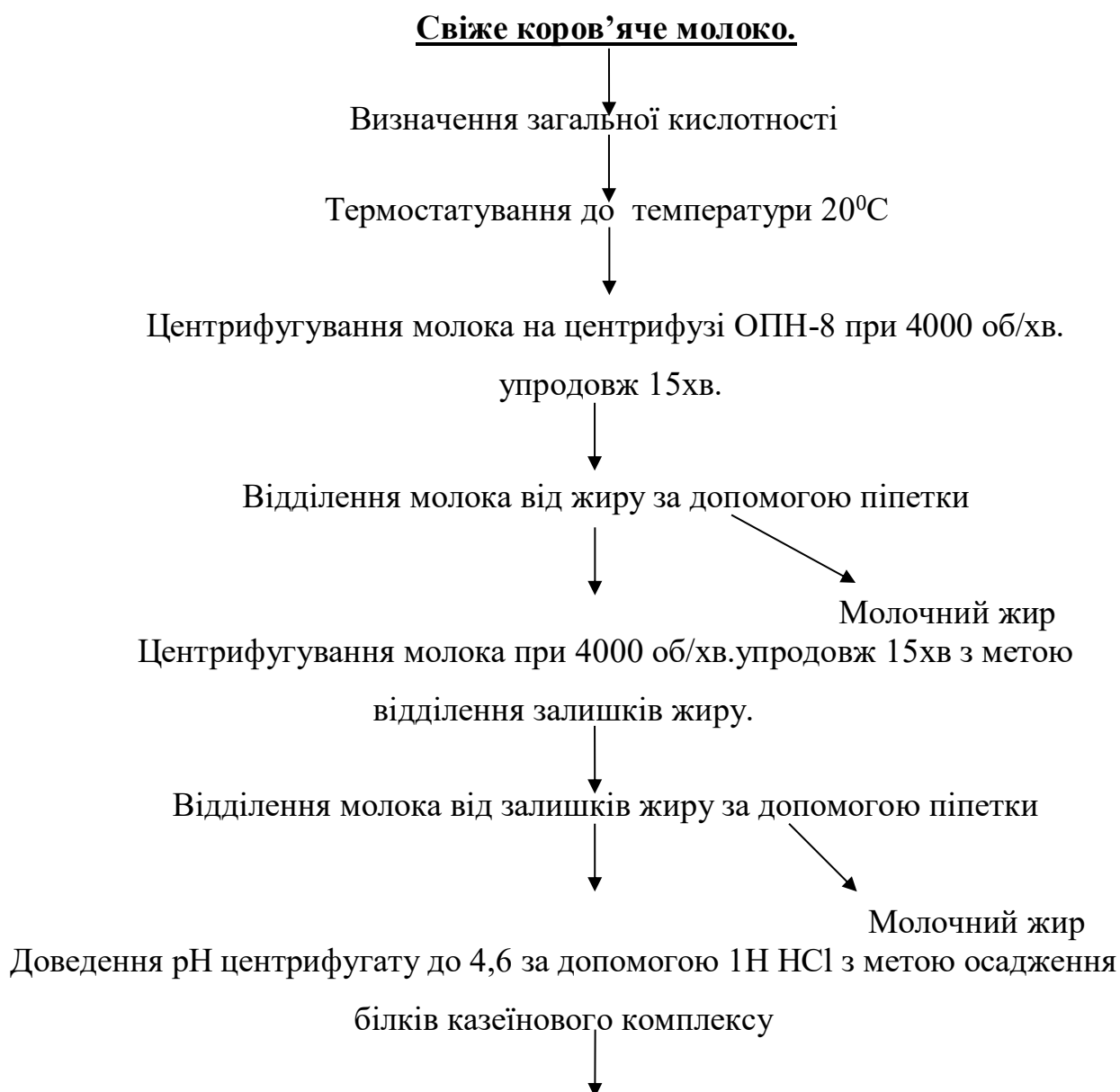
Перший етап нашої роботи полягає у виділенні сироватки із молока. Перед цим визначаємо титровану кислотність молока, значення якої рівне 18°T і активну кислотність pH , яка становить 6,2 [11]. За отриманими показниками можна зробити висновок, що молоко, яке береться для досліджень є свіжим. Після цього здійснюємо термостатування молока до температури 20°C і піддаємо його центрифугуванню з метою відділення жиру.

Для роботи нам потрібно чотири пробірки, які наповнюємо молоком. У перші дві пробірки наливаємо по 25 мл молока і зрівноважуємо їх на спеціальних вагах для зрівноважування. Коли маса пробірок разом із молоком є однаковою одну із них поміщаємо у центрифугу. Тоді беремо наступну (третю) пробірку і зрівноважуємо її з другою. Другу пробірку поміщаємо у центрифугу так щоб вона знаходилась напроти першої. Четверту пробірку зрівноважуємо з третьою і поміщаємо у центрифугу таким самим чином

Помістивши пробірки у гнізда закриваємо центрифугу кришкою і проводимо центрифугування при 4000 об/хв. упродовж 15 хв. Після цього, вийнявши пробірки із центрифуги можна побачити як пройшло розділення: зверху розміщений жир(тоненькою плівкою), а під ним знежирене молоко. Отриманий в результаті центрифугування розчин (центрифугат) відокремлюємо від жиру, за допомогою піпетки. Повітря з піпетки видуваємо, пробиваємо шар жиру і обережно всмоктуємо рідину в піпетку. Відібране центрифугат знову піддаємо центрифугуванню при цих самих параметрах, щоб остаточно відділити жир.

Отримана фракція містить у своєму складі як білки сироватки, так і білки казеїнового комплексу, які необхідно відділити. Для цього у рідину по краплях вносимо 1N хлоридну кислоту, добре перемішуємо суміш скляною паличкою і за допомогою pH -метра вимірюємо кислотність. Цей показник доводимо до значення 4,6, тому що при такому значенні pH казеїн випадає в осад. Чим більші

буферні властивості молока, тим більше потрібно додати лугу для зміни значення рН. Кількість кислоти, яку необхідно додати до 100 см³ молока, щоб змінити його рН на одиницю, називають буферною ємністю молока. Коли казеїн випав в осад, піддаємо рідину центрифугуванню при частоті 3000об/хв упродовж 10 хв для агрегації частинок казеїну. Після цього відділяємо сироватку від білків казеїнового комплексу і повторно піддаємо центрифугуванню при 5000 об/хв упродовж 10 хв для повного відділення залишків казеїнів. Процентрифуговану сироватку фільтруємо через складчастий паперовий фільтр. Частину сироватки заморожуємо при – 18⁰С для зберігання, а іншу частину використовуємо в подальшому для отримання сироваткових білків. Схема виділення молочної сироватки показана на рисунку 3.1.



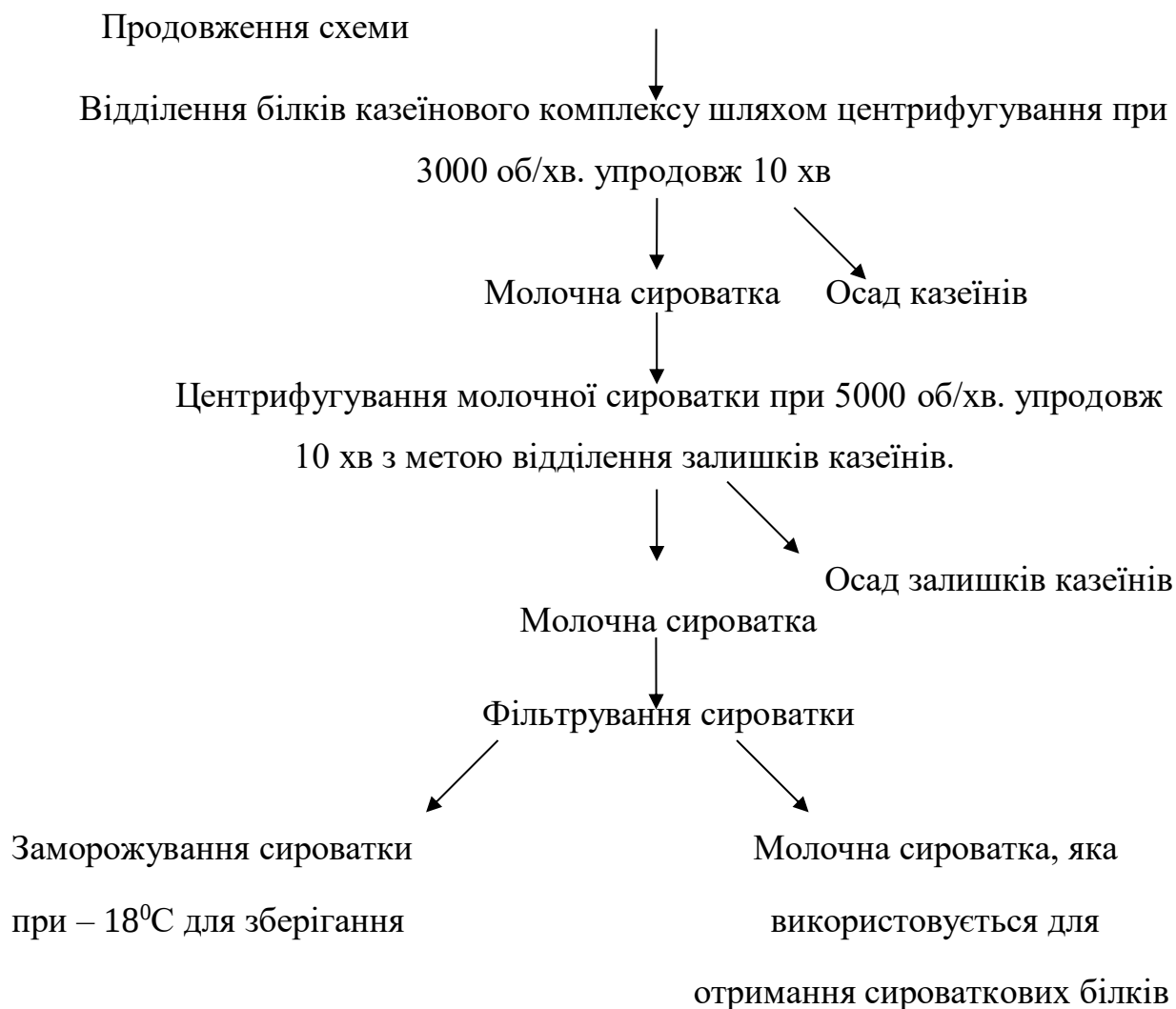


Рисунок 3.1 – Схема виділення молочної сироватки

3.2 Підбір електрофоретичної системи для виділення білків сироватки молока

На сьогоднішній час електрофорез займає центральне місце серед методів виділення білків. Цей метод дозволяє розділяти макромолекули, які відрізняються за розмірами (чи молекулярною масою), просторовою конфігурацією, електричним зарядом, причому ці параметри можуть виступати порізно або в сукупності [8].

Розглянемо типи електрофорезу, які використовуються при розділенні білків. Розрізняють фронтальний, зональний та безперервний електрофорез.

Фронтальний електрофорез це аналітичний метод , його використовують для визначення ізоелектричної точки таких полімерів, як білки і нуклеїнові кислоти. Для електрофоретичного розділення цей метод використовується лише в окремих випадках [22].

Неперервний електрофорез є не зовсім точним, оскільки неперервність порушується тим, що розчин, у який вносять досліджуваний матеріал, розводять водою. Це робиться для того, щоб сконцентрувати вихідну зону препарату білків. За умов неперервної системи здійснюється достатньо ефективне розділення білкових фракцій. Але у звичайному варіанті використовувати цій метод для конкретної характеристики білків неможливо. Справа у тому, що у простій системі електрофоретична рухливість молекул білка залежить одночасно від багатьох факторів: сумарного заряду молекули, молекулярної маси, конфігурації молекули, жорсткості пакування поліпептидного ланцюга. Внесок кожного чинника оцінити дуже важко.

Найбільш зручним і точним в даному випадку є зональний електрофорез.

Використання різних матеріалів в якості носія та відповідно різних процедур проведення розділення характеризує різні типи зонального електрофорезу, а саме:

1. Електрофорез на папері;
2. Електрофорез на ацетат целюлозі;
3. Тонкошаровий електрофорез;
4. Гель-електрофорез.

Електрофорез на папері найбільш простий і доступний метод розділення. На папір мікропіпеткою наносять зразок у вигляді плями або лінії. Корпус блоку закривають кришкою, подають на електроди напругу і проводять розділення. Після закінчення розділення попередньо вимикають подачу напруги напруги, папір виймають і висушують.

Більшість органічних молекул адсорбуються на волокнах паперу за рахунок гідроксильних груп целюлози. Адсорбція протидіє руху частинок і викликає витягування плям, що в значній мірі погіршує процес розділення

компонентів зразку. Цих негативних явищ можна позбутися, якщо використовувати мембрани з ацетат целюлози. Методично електрофорез на ацетат целюлозі проводять аналогічно як електрофорез на папері. Потрібно також відмітити, що висока розчинність ацетат целюлози в різних розчинниках і її прозорість дозволяють легко екстрагувати розділенні компоненти і визначати ці речовини спектрофотометрично [8].

При тонкошаровому електрофорезі носієм служить шар сорбенту товщиною 0,25 – 0,50мм. Найчастіше в якості носія використовують оксид кремнію та оксид алюмінію. Тонкошаровий електрофорез найчастіше використовують для розділення при високих напругах. Метод володіє високою роздільною здатністю та високою чутливістю.

Найкращий ефект розділення органічних макромолекул досягають за допомогою гель-електрофорезу. В якості носія використовують гелі з крохмалу, агарози, поліакриламід, агарози - акриламід. Високу роздільну здатність гелів пояснюють ефектом «молекулярного сита». Принцип дії молекулярного сита полягає в тому, що великі молекули будуть рухатись тим повільніше, чим менші пори в структурі гелю, розміри яких визначаються числом поперечних зв'язок між поперечними ланцюгами [20, 45].

Для розділення білків сироватки молока використовується поліакриламідний гель (ПААГ). Цей гель готують з водного розчину акриламід та *N,N'*-метилен-*bis*-акриламід (МБА). Перша сполука слугує мономером для лінійних полімерних молекул ПАА, друга – для „зшивки” цих молекул поперечними містками. Крім зазначених компонентів необхідні ініціатор та каталізатор процесу полімеризації. У якості ініціатора використовують персульфат амонію або рибофлавін. Персульфат є нестабільним у водному розчині, тому використовують тільки свіжовиготовлений розчин. Рибофлавін слугує ініціатором тільки за опромінення його розчинів видимим світлом. Він дуже слабо розчинюється у воді, добре – у слаболужних середовищах.

Кисень істотно заважає процесу полімеризації, тому вихідний розчин мономерів рекомендують деаерувати, а на поверхню розчину, якій залито у форму, рекомендують нашарувати ізопропанол, або ізобутанол. Це є необов'язковим при готуванні одношарового гелю. Найбільш якісний гель отримують, коли час полімеризації складає 30 – 40 хвилин.

За приготування розчинів необхідно використовувати реактиви, які призначені спеціально для електрофорезу. Необхідно пам'ятати, що акриламідні мономері є токсичними, тому з ними потрібно працювати дуже обережно, особливо уникати потрапляння їх на шкіру і у дихальні шляхи. Вихідний розчин мономерів слід зберігати у темряві та у холодильнику (+4 °C).

Прийнято зазначати загальну концентрацію усіх мономерів, тобто відсоткове відношення маси обох мономерів до об'єму їх розчину, як T ; через C – відсоткове відношення маси реагенту, що зшиває (метилен-біс-акриламід), до загальної маси обох мономерів [22].

В ході електрофорезу зони розчинних макромолекул залишаються невидимими. Для спостереження за процесом у вихідний препарат додають барвник, молекули якого несуть електричний заряд такого ж знаку, що й макромолекула яка фракціонує але не взаємодіє з ними. Барвник також переміщаються в електричному полі, але вже як забарвлена електрична зона. Його підбирають таким чином, щоб швидкість міграції найбільш рухомих макромолекул була дещо нижча ніж у молекул барвника. Коли забарвлена зона доходить до кінця трубки, електрофорез переривають. Зони біополімерів, що розділились, для уникнення їх дифузії швидко фіксують. Для цього гель витягують із скляної форми і вимочують у суміші кислоти зі спиртом так, що білки випадають в осад у тому місті, де закінчилась їх міграція під час електрофорезу. Після фіксації проводять забарвлення зон шляхом вимочування гелю у в розчині барвника міцно зв'язаного з білком. Залишок білка видаляють.

Під час електрофорезу досить важливою умовою є чистота поверхні скляних або пластмасових форм для гелю. Пластини або трубки, які застосовують у якості шаблонів для гелів, повинні бути знежиреними, дуже

добре обполісканими дистильованою водою. Під час миття не можна використовувати засоби (йоржики та інші жорсткі пристрої), які пошкоджують (дряпають) поверхню скла. За використання вертикально розташованих пластин відстань між товщиною гелю задається за допомогою спеціальних прокладок – „спейсерів”. Їх виготовляють з тефлону або плексигласу. Частіше за всього застосовують прокладки з товщиною 1 мм. Тефлонові прокладки можна не змазувати, але плексигласові обов’язково обробляють силіконовою змазкою або медичним вазеліном. При цьому необхідно наносити як можна тонший шар змазки, яка не повинна видавлюватися у простір між пластинами[].

Для вибору тієї чи іншої системи електрофорезу та визначення її головних параметрів важливою буде інформація про основні властивості білків сироватки молока (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1 - Деякі фізико-хімічні властивості білків сироватки молока

Білки	Ізоелектрична точка	Молекулярна маса
α -лактоальбумін	4,2 - 4,5	14000
β -лактоглобулін	5,1	18000
Альбумін сироватки крові	4,7	69000
Імуноглобуліни:	5,5 – 6,8	
Ig G		150000-163000
Ig A		400000
Ig M		1000000
Лактоферин	8,7	76000
Протеозо-пептони	3,3 – 3,7	4000-41000

Розглянемо різні принципові варіанти електрофоретичного методу розділення білків сироватки. Одним із досить відомих є *електрофорез у присутності детергентів*. Введення того чи іншого детергенту у електрофоретичну систему дозволяє значно змінити характер розділення сироваткових білків. Найчастіше при електрофорезі цих білків використовують такі сполуки, як сечовина, тритон X-100 та додецилсульфат натрію (ДДС-*Na*; *SDS*).

Сечовина і тритон X-100 – це неіонні детергенти. Їх використовують в першу чергу для розчинення гідрофобних білків (наприклад лактоглобуліни), які важко розчиняються у водному середовищі, а також для запобігання агрегації молекул у ході електрофорезу і формування осаду. Сечовина може значно змінити конфігурацію білкової молекули і, як наслідок цього, вплинути на її рухливість за електрофорезу.

На відміну від сечовини Тритон X-100 не тягне за собою денатурацію білків, в його розчинах зберігається вторинна та третинна структури молекул і часто їх біологічна активність. Крім того, Тритон X-100 утворює комплекси з гідрофобними ділянками молекули білка. Чим більша довжина цих ділянок, тим більше зв'яжеться з молекулою білка молекул детергенту, тим більшою буде ефективна молекулярна маса білка (молекулярна маса Тритону X-100 достатньо велика – 632 Д). Виникнення таких комплексів може збільшити масу молекул певного білка на тисячу і навіть десятки тисяч дальтон, що можна виявити за електрофорезу. Таким чином, формування комплексів з Тритоном X-100

можна використати для фракціонування білків.

Сечовину і Тритон X-100 можна застосовувати як у лужному, так і у кислому середовищах.

Використання ДДС-*Na* дозволяє виключити багато факторів, які впливають на електрофоретичну рухливість білків, та фракціонувати їх у залежності тільки від одного чинника – молекулярної маси молекул. Саме тому електрофорез у присутності ДДС-*Na* застосовують для визначення молекулярних мас білків.

Додецилсульфат натрію здатен приблизно однаково зв'язуватися з різними поліпептидними ланцюгами. За концентрації ДДС-*Na* вище 0,8 мМ кількість детергенту, зв'язаного з одиницею маси білків, є константною і складає 1,4 г ДДС-*Na* на 1 г білка. Цей зв'язок здійснюється за рахунок гідрофобних взаємодій, в результаті чого дисоційовані залишки сульфокислоти детергенту привносять негативний заряд у молекулу білка, значення якого пропорційно довжині поліпептидного ланцюга. Власний заряд білкової молекули за даних умов є несуттєвим. Сталість співвідношення „детергент/білок” веде до того, що стає практично константним співвідношення „негативний заряд молекули білка/маса молекули білка”. Крім того, електростатичне відштовхування заряджених залишків сульфокислоти детергенту спрямляє молекулу білка, завдяки чому молекула здобуває форму жорсткого еліпсоїду з діаметром 1,6 нм. Розміри довгої осі залежать від кількості залишків амінокислот у білку, тобто його молекулярній маси. У результаті електрофоретична рухливість комплексу детергент – білок пов'язана з молекулярною масою білка простою логарифмічною залежністю. Молекулярну масу невідомого білка знаходять з прямої графіку залежності відносної електрофоретичної рухомості білкових стандартів (для яких відома молекулярна маса) від логарифму значення молекулярної маси цих стандартів[28].

Для електрофорезу білків сироватки молока у присутності додецилсульфат натрію ми використовували прилад фірми «Реанал».

Результати електрофорезу білків сироватки молока у присутності додецилсульфату натрію зображені на рисунку 3.2.

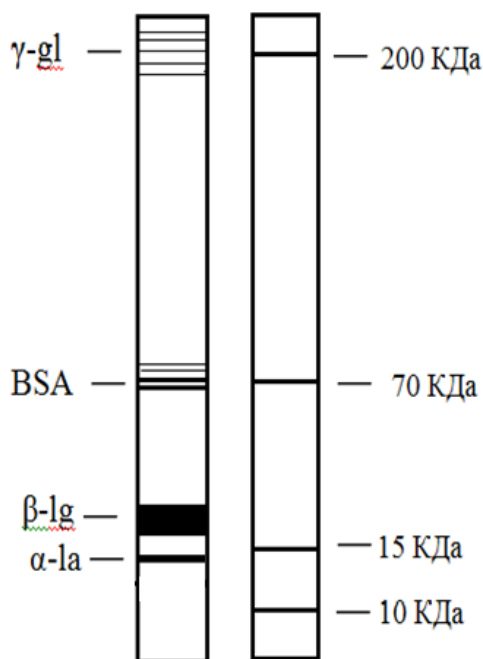


Рисунок 3.2 – електрофорез білків сироватки молока у присутності додецилсульфату натрію

Розділювання білків сироватки молока на фракції здійснювалось за молекулярною масою. Для ідентифікації білків сироватки у трубочку опускались суміш білків-свідків. Знаючи молекулярну масу кожної із фракцій, можна розпізнати в якому саме місті знаходиться той чи інший білок.

Але цей метод має і свої недоліки. Для розділення використовувався додецилсульфат натрію, який є детергентом і викликає денатурацію білків сироватки молока [28].

Електрофорез білків сироватки молока на пластинах ПААГ.

Для електрофореzu білків сироватки молока використовуються пластини шириною 8 – 14 см і довжиною 8 – 28 см. Полімеризацію акриламідy, а разом з тим і сам електрофорез проводять у формі, утвореній двома пластинами скла товщиною 5 – 6 мм. Відстань між пластинами задається товщиною прокладок і виявляє товщину гелю. Прокладки шириною 10 – 15 мм встановлюють вглиб бокових країв скла (рис. 3.3).

Зібрану і ущільнену форму встановлюють вертикально і заливають у неї розчин мономерів ПААГ. В загальному, ПААГ товщиною 0,4 мм можна заливати в нахиленому, а полімеризувати - в горизонтальному положенні пластин. Це значно спрощує задачу герметизації форми: достатньо заклеїти її на торцях пластин водостійкою липкою стрічкою[28].

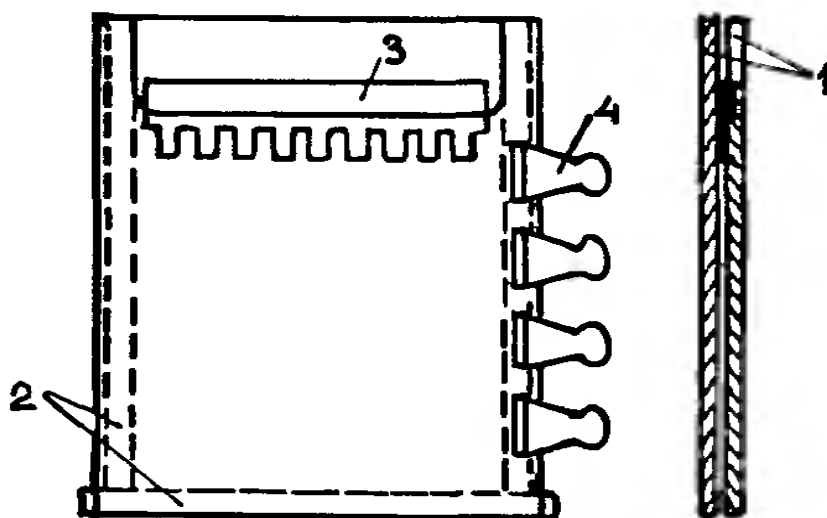


Рисунок 3.3 – Форма для полімеризації вертикальної пластини гелю:

1 – скляні пластини; 2 – прокладки; 3 – формер; 4 – затискач.

Гель заливають між пластин з таким розрахунком, щоб при зануренні формера до упору рідкий гель заповнив проміжки між його зубами. Формер починають встановлювати з деяким нахилом, щоб під його зубцями не затримувалось повітря. Коли гель готовий, виймають нижню прокладку чи знімають липку стрічку і обережно виймають формер. При роботі з концентрованим ПААГ гель може прилипати до зубців формера і нижні полоски карманів можуть виявитись нерівними. Це погіршує умови формування вихідних полос в гелі (рис. 3.4).

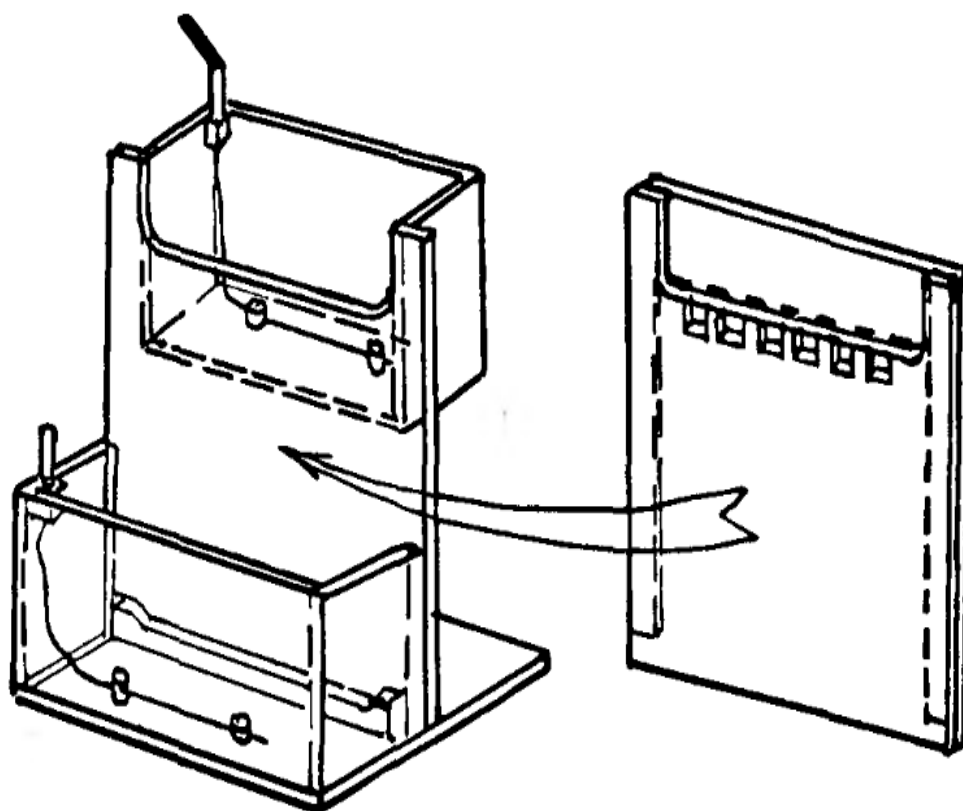


Рисунок 3.4 – Прилад для проведення електрофорезу на пластинах ПААГ

Розглянемо прилад для проведення електрофорезу. Дана установка є простою за конструкцією і реалізована в лабораторних умовах кафедри харчової харчової біотехнології і хімії. Верхні і нижні електродні резервуари прямокутної форми з'єднанні вертикальною стінкою, в якій є виріз, що веде в порожнину резервуара. Такий самий виріз має одна із двох вертикальних пластин, між якими полімеризується гель. Пластини прижимають пружинними зажимами до вертикальної стінки так, щоб обидва вирізи співпадали. Буфер у верхній резервуар зливають до такого рівня, щоб він через виріз покривав верхній торець гелю. При цьому друга скляна пластина виступає в ролі передньої стінки резервуара. В місті співпадання двох вирізів, між скляною пластинкою і стінкою повинно бути ущільнення, яке буде попереджати витікання верхнього буфера[28].

В обидва резервуари вмонтовані електроди із платинового дроту. При встановленні в прибор, форму з гелем часто завантажують в буфер нижнього резервуара, так що вона опирається там на рознесенні по сторонам виступи і її нижній торець повинен бути припіднятим над дном резервуара. Після завантаження потрібно уважно перевірити, чи не залишилось між пластинами і на торці гелю повітря. Робочу камеру з гелем вставляють в нижню буферну камеру. В буферні камери і верхню частину робочої камери заливають електродний буфер.

Пробу вносять в стартові комірки в кількості 0,015мл за допомогою мірного капіляру під буфер. Проба повинна рівномірно осісти на дно комірки, від цього залежить якість розділення. Після нанесення проби з'єднують буферні розчини в робочій і верхній електродній камерах смужкою фільтрувального паперу і підключають електроди до джерела живлення. Електрофорез проводять при постійній силі струму – 50 мА. Коли сигнальний барвник досягне нижньої лінії гелю - відключають струм і дістають пластинку гелю для фіксації і забарвлення.

Після закінчення електрофорезу камеру розклеюють при нагріванні, дістають пластинку гелю, розміщують її в кристалізаторі, заливають 1% розчин барвника в 7% оцтовій кислоті і витримують 40 хв. В результаті білки фіксуються в гелі і забарвлюються. Барвник, який не зв'язався з білками, відмивають сумішшю 7% оцтової кислоти і 20%етанолу, періодично змінюючи розчин до того часу, коли фон не стане повністю прозорим [21] .

В результаті проведення електрофорезу ми отримали наступні результати (рис.3.5):

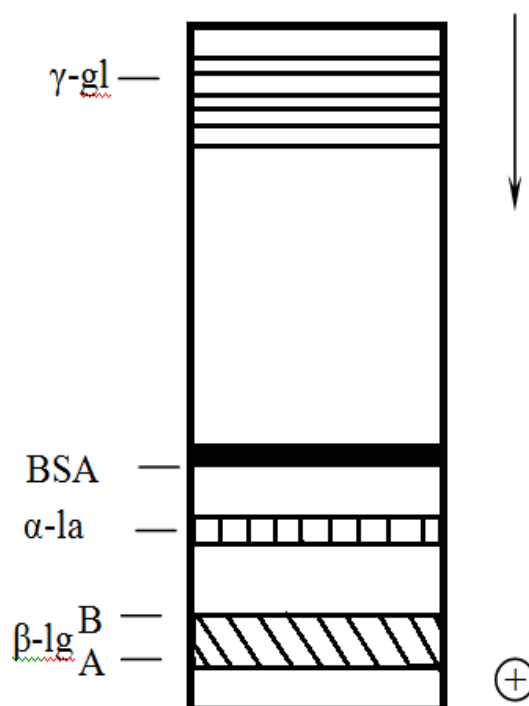


Рисунок 3.5 – Електрофорез білків сироватки молока на пластинах ПААГ

Недоліком такого розділення є те, що нам не вдалось повністю розділити фракції А та В β-лактоглобуліну.

Електрофорез у переривчастій системі (диск - електрофорез). Диск електрофорез - це метод електрофорезу, який був розроблений для високоякісного розділення фракцій білкових препаратів [45]. Особливість методу полягає у наступному:

1. В електрофоретичній колонці використовують гелі з різними розмірами пор. Верхній шар гелю є грубо пористим. У нижній колонці розміщений дрібнопористий гель, який виступає робочим гелем. Такий градієнт розмірів пор дає можливість ефективно використовувати в процесі розділення явище молекулярного сита.

2. Для подачі напруги у верхній буферній системі розміщують катод, а в нижній – анод. Електрофорез проводять при постійній величині електричного струму в межах 10мА.

3. У верхній та нижній буферних камерах використовують буферні системи з різним значенням рН. Це приводить до виникнення градієнту рН вздовж електричної колонки і супроводжується різним ступенем іонізації білкових молекул в концентраційному та робочому гелі.

Електрофоретичну колонку заповнюють робочим і концентраційними гелями. На поверхню гелю наносять мікропіпеткою зразок і наповнюють буферною системою верхню камеру. Прилад закривають кришкою і подають напругу на електроди. Проходячи зону робочого гелю, мікрочастинки зразка попадають в дещо інше електрофоретичне середовище. По-перше, дрібнопористий гель діє по принципу молекулярного сита і макроіони з більшою молекулярною масою рухаються повільніше. По-друге, більш високе значення рН буферу викликає додаткову іонізацію білкових мікроіонів. Більш іонізовані білкові аніони будуть мати більшу швидкість руху. Отже, електрофоретична рухливість білкових молекул в робочому гелі буде пропорційна відношенню їх заряду до маси. Саме цей фактор визначає високу роздільну здатність диск-електрофорезу. Диск-електрофорез білків сироватки молока в трубочках ми проводили на приладі фірми «Реанал» (Угорщина). Результати електрофорезу подані на рисунку 3.6.

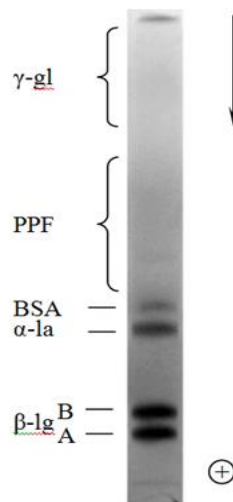


Рисунок 3.6 – Електрофорез білків сироватки молока в трубочках

Хоча електрофорез в трубках є простим та зручним але він має і свої недоліки - розділення білків здійснюється у малих кількостях. Але крім цього, ми бачимо, що це є один із методів який дозволяє найбільш точно розділити білки сироватки молока і отримати чисті їх фракції. Тому електрофорез сироватки молока в трубках ми взяли за основу для препаративного розділення білків сироватки молока.

3.3 Препаративний електрофорез білків сироватки

Для проведення досліджень використовувався апарат для вертикального електрофорезу на пластинах ПААГ. У модифікації апарату за основу було взято анодну систему для кислих і нейтральних білків в нативних умовах . Формер, який використовується у даному апараті дозволяє отримати великий об'єм стартової ємкості і запобігти утворенню дефектів на електрофореграмах. Для отримання очищених фракцій електрофоретична камера легко і швидко демонтується [48].

Перед проведенням електрофоретичного розділення визначаємо концентрацію білків сироватки молока за методом Лоурі, яка становить 1,3 мг/мл.

Після цього проводимо підготовку проби: беремо 3 мл свіжої сироватки і доводимо її рН до 8,3 при постійному доливанні по краплях 1N розчину NaOH, тоді ще додаємо 70 мг сахарози і 5 крапель бромфенолового синього. Внівши всі компоненти, суміш ретельно перемішуємо і фільтруємо. Підготовлену пробу за допомогою мікропіпетки вносимо у стартові комірки у кількості 70 мкл, з'єднують буферні розчини в робочій і верхній електродній камерах смужкою фільтрувального паперу і підключають електроди до джерела живлення. Електрофорез проводимо при наступних умовах: струмі – 35 мА і напрузі 500 В упродовж 2 годин. Коли сигнальний барвник досягне нижньої лінії гелю - відключаємо струм і дістаємо пластинку гелю для фіксації і забарвлення. Забарвлення здійснюємо амідосварцом упродовж 9 хв. В результаті отримуємо електрофореграму (рис. 3.7) і денситограму наступного вигляду:

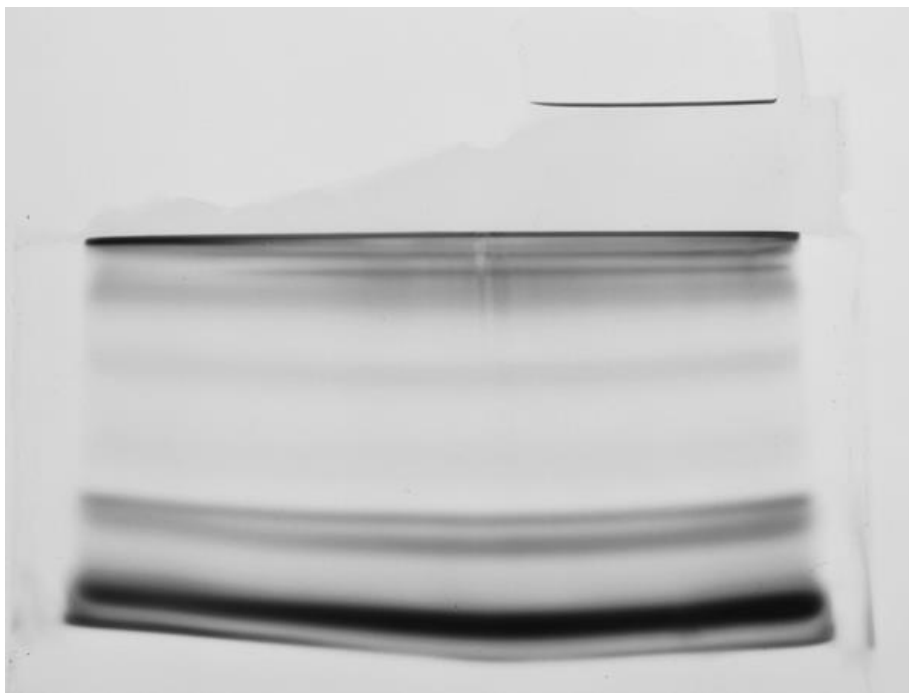


Рисунок 3.7 - Электрофореграма білків сироватки молока

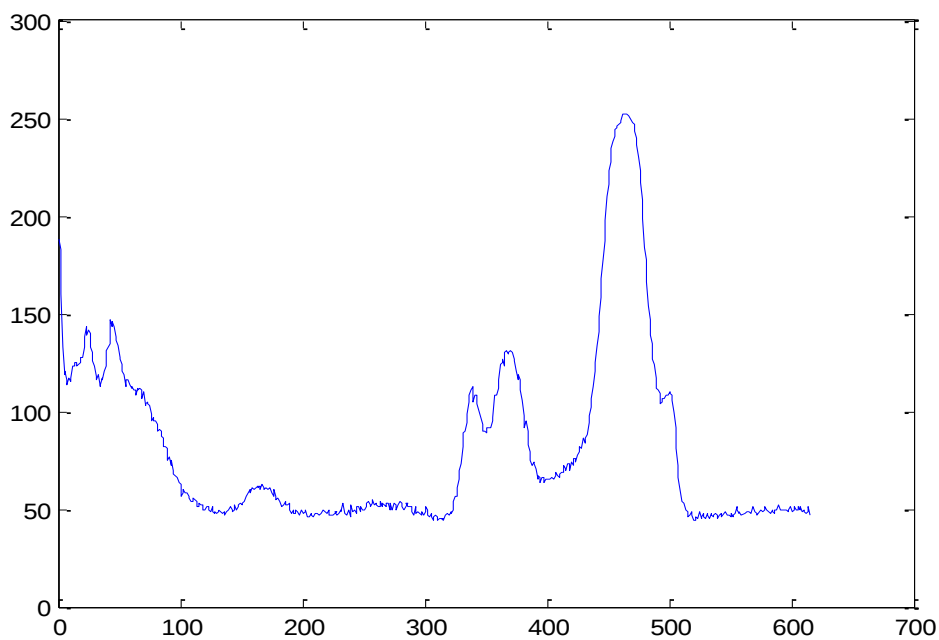


Рисунок 3.8 - Денситограма білків сироватки молока

На отриманій електрофореграмі чітко видно фракції білків сироватки. Для того щоб їх розділити, вирізаємо кожну із фракцій окремо, поміщаємо їх у пробірки, заливаємо буфером і екстрагуємо. Співвідношення гель:буфер становить 1:5. Екстрагування проводим 30 хв, а після цього, щоб відділити білок від рідини суміш у пробірці центрифугуємо. Процентрифугувавши, зливаємо буфер у стакан, а білок знову заливаємо буфером і центрифугуємо. Таку процедуру проводимо ще раз. Після кожного центрифугування спектрофотометрично при довжині хвилі 280 нм визначаємо концентрацію білка у буфері. Провівши центрифугування третій раз, і визначивши концентрацію білка, ми бачимо що вона не змінюється у порівнянні з другим показником. Тому, ми можемо зробити висновок що екстрагувати розчин третій раз непотрібно, тому що гель уже не переходить в розчин. Отримані білки ліофілізуємо і зберігаємо.

Обчислюємо кількість білків, яка містилась у пробі:

У 100 мл сироватки – 1,3 г білка

у 0,7 мл сироватки – x

$$x=9,1 \text{ мг}$$

У пробі містилось 9,1 мг білка. Знаючи, що β -лактоглобулін становить 54% від маси усіх білків сироватки, його теоретичний вихід становить 4,9 мг. Практичний вихід цього білка за показами денситограми становить 4,1мг. Якщо взяти білок α -лактоглобулін то його теоретичний вихід становить 2,3 мг, а практичний – 1,9мг. Тобто, як ми бачимо, спостерігаються втрати.

На денситограмі, яку ми отримали, бачимо, що білкові фракції є маленькими. Для того щоб знайти оптимальний варіант, проводимо дослідження ще раз збільшуючи пробу до 2 мл (рис. 3.9).

Обчислюємо кількість білків, яка містилась у другій пробі:

У 100 мл сироватки – 1,3 г білка

у 2 мл сироватки – x

$$x=26 \text{ мг}$$

У пробі містилось 26 мг білка. Теоретичний вихід β -лактоглобуліну становить 14 мг, а практичний – 11,9 мг. А α -лактоглобуліну ми віділили 5,4мл з теоретично можливих – 6,5.

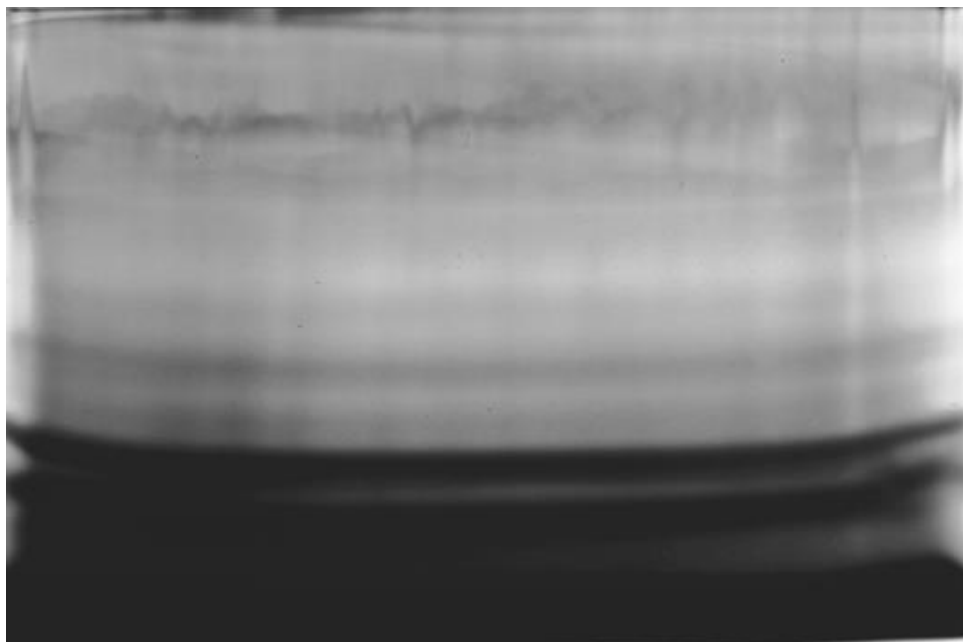


Рисунок 3.9 - Електрофореграма білків сироватки молока

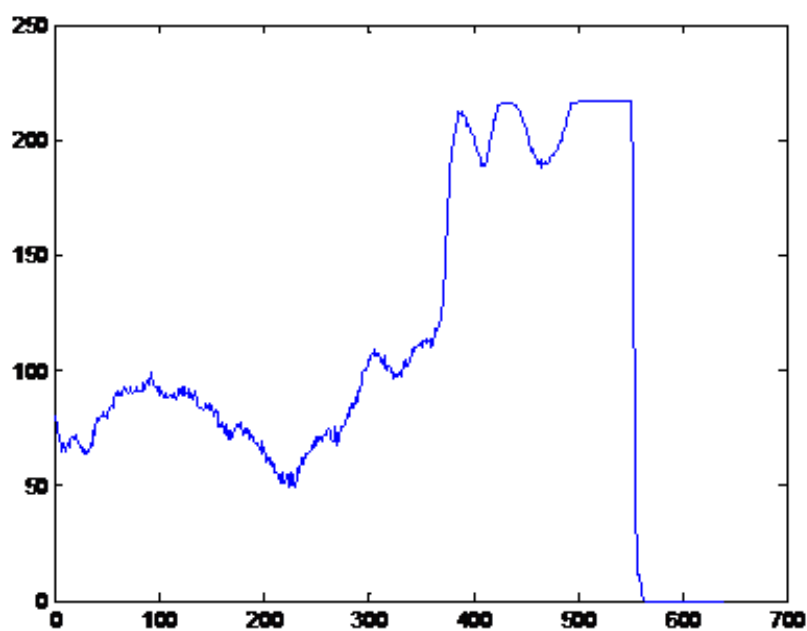
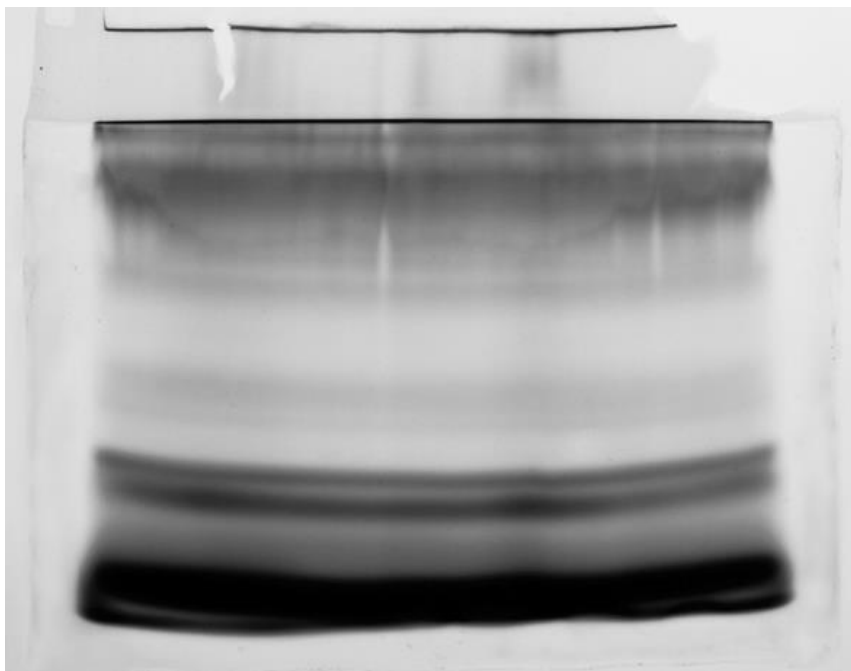


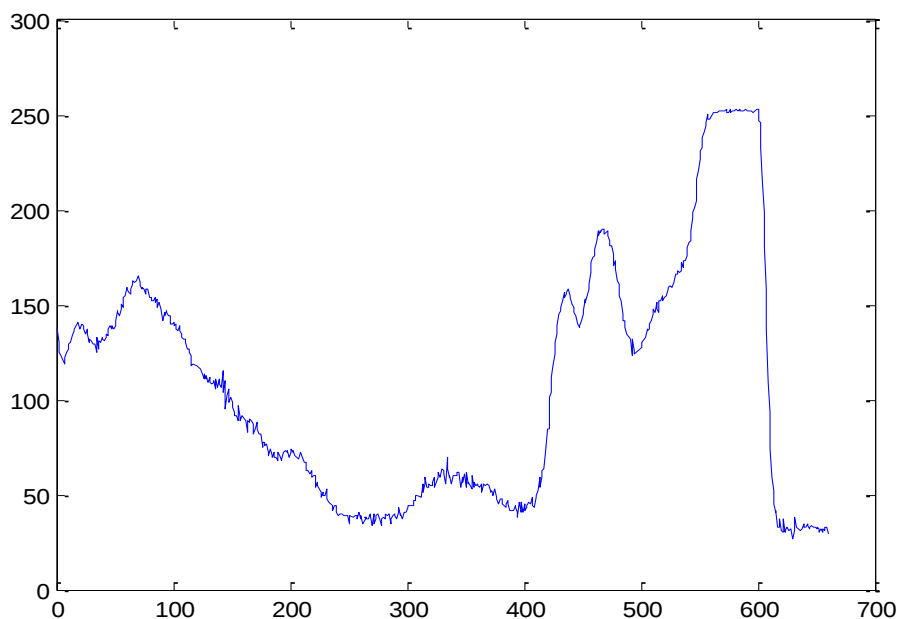
Рисунок 3.10 - Денситограма білків сироватки молока

З отриманої денситограми можна зробити висновок, що проба була максимально можливою, подальше збільшення проби недопустиме, тому що фракції будуть накладатись одна на одну (рис. 3.10).

Нами було проведено ще одне електрофоретичне дослідження і встановлено оптимальну величину проби (рис. 3.11, 3.12).



**Рисунок 3.11 - Електрофореграма білків сироватки молока.
Оптимальний варіант**



**Рисунок 3.12 - Денситограма білків сироватки молока.
Оптимальний ватіант**

У третьому варіанті ми вносили пробу розміром 1 мл. Вміст білка в пробі становить 13 мг. Теоретичний вихід β -лактоглобуліну становить 7 мг, а ми отримали цей білок масою 5,9 мг. Якщо взяти α -лактоальбумін, то його теоретичний вихід становить 3,2 мг, а практичний – 2,7 мг.

4 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ

4.1 Охорона праці

4.1.1 Система державного управління охороною праці на виробництві

Відповідно до ст. 37 Закону України «Про охорону праці» державне управління охороною праці в Україні здійснюють:

- Кабінет Міністрів України;
- Служба по нагляду за охороною праці Міністерства праці та соціальної політики України;
- міністерства та інші центральні органи державної виконавчої влади;
- місцева державна адміністрація, місцеві ради народних депутатів;
- асоціації, концерни, корпорації, та інші об'єднання підприємств.

Закон містить норми прямої дії, що визначають обов'язки, права та повноваження кожного з цих органів[5].

Система управління охороною праці (СУОП) – це сукупність органів управління підприємством, які на підставі комплексу нормативної документації, проводять цілеспрямовану, планомірну діяльність щодо здійснення завдань і функцій управління з метою забезпечення здорових і високопродуктивних умов праці.

В спрощеному вигляді СУОП представляє собою сукупність органа та об'єкта управління, що зв'язані між собою. Суб'єктом управління в СУОП на підприємстві в цілому є керівник (головний інженер), а в цехах, на виробничих дільницях і службах – керівники відповідних структурних підрозділів і служб. Організаційно-методичну роботу по управлінню охороною праці, підготовку управлінських рішень і контроль за їх своєчасною реалізацією здійснює служба охорони праці підприємства, що підпорядкована безпосередньо керівнику підприємства. Суб'єкт управління аналізує інформацію про стан охорони праці

структурних підрозділів підприємства та приймає рішення спрямованих на приведення фактичних показників охорони праці у відповідність з нормативними. Об'єктом управління в СУОП є діяльність структурних підрозділів та служб підприємства по забезпеченню безпечних та здорових умов праці на робочих місцях, виробничих дільницях, цехах та підприємствах в цілому.

До основних функцій управління охороною праці належать:

- прогнозування та планування робіт, їх фінансування;
- організація та координація робіт;
- облік показників стану умов і безпеки праці;
- аналіз і оцінка стану умов і безпеки праці;
- контроль за функціонуванням СУОП;
- стимулювання роботи по вдосконаленню охорона праці.

Основні завдання управління охороною праці:

- навчання працівників безпечним методам праці та пропаганда питань охорони праці;
- забезпечення безпечності технологічних процесів, виробничого устаткування, будівель та споруд;
- нормалізація санітарно-гігієнічних умов праці;
- забезпечення працівників засобами індивідуального захисту;
- забезпечення оптимальних режимів праці та відпочинку;
- організація лікувально-профілактичного обслуговування;
- професійний добір працівників з окремих професій;
- удосконалення нормативної бази з питань охорони праці.

Функція планування, в основі якої лежить прогностичний аналіз, має вирішальне значення в системі управління охороною праці. Планування роботи з охорони праці поділяється на перспективне, поточне та оперативне.

Перспективне планування вирішує найбільш важливі, трудомісткі і довгострокові за терміном виконання заходи з охорони праці, виконання яких,

як правило, вимагає сумісної роботи кількох підрозділів підприємства. Основною формою перспективного планування роботи з охорони праці є розроблення комплексного плану підприємства щодо покращення стану охорони праці.

Поточне планування здійснюється в межах календарного року через розроблення відповідних заходів у розділі «Охорона праці» колективного договору.

Оперативне планування роботи з охорони праці здійснюється за підсумками контролю стану охорони праці в структурних підрозділах і на підприємстві в цілому. Оперативні заходи щодо усунення виявлених недоліків зазначаються безпосередньо у наказі власника підприємства, який видається за підсумками контролю, або у плані заходів, як додатку до наказу.

Функція СУОП щодо організації та координації робіт передбачає формування органів управління охороною праці на всіх рівнях управління і всіх стадіях виробничого процесу.

Ділове управління охороною праці може здійснювати тільки при наявності повної, своєчасної і вірогідної інформації про стан охорони праці. Одержати таку інформацію, виявити можливі відхилення від норм безпеки, а також перевірити виконання планів та управлінських рішень можна тільки на підставі регулярного та об'єктивного контролю. Тому контроль стану охорони праці є найбільш відповідальна та трудомістка функція процесу управління.

До основних форм контролю за станом охорони праці належать: оперативний контроль, контроль, що проводиться службою охорони праці підприємства, громадський контроль, адміністративно-громадський трьохступеневий контроль, відомчий контроль вищих органів. Необхідно зазначити, що крім контролю, здійснюється нагляд за охороною праці з боку державних та профспілкових інспекцій

Облік, аналіз та оцінка показників охорони праці та функціонування СУОП направленні на розробку та прийняття управлінських рішень керівниками усіх рівнів управління. Суть даної функції полягає у системному обліку

показників стану охорони праці, в аналізі одержаних даних та узагальненні причин недотримання вимог законодавчих та нормативних документів, а також причин невиконання планів з охорони праці з розробкою заходів, направлених на усунення виявлених недоліків.

Стимулювання діяльності з охорони праці направлено на створення зацікавленості працівників у забезпеченості здорових та безпечних умов праці. Стимулювання передбачає моральні та матеріальні заохочення. До числах останніх належать: премії, винагороди за виконану конкретну роботу, винахідництво та раціоналізаторські пропозиції з питань охорони праці. Джерелом стимулювання діяльності з охорони праці є фонди охорони праці[4].

4.1.2 Шкідливі речовини та їх класифікація залежно від дії на організм людини

Шкідлива речовина - це речовина, яка у випадку порушення вимог безпеки може при контакті з організмом людини зумовити виробничі травми, професійні захворювання або відхилення в стані здоров'я, що негативно позначається в цілому на здоров'ї нації[5].

Шкідливі хімічні речовини використовуються як сировина (хлор для виготовлення хлорного вапна) чи допоміжний матеріал (бензол, який застосовується як розчинник). У деяких випадках вони є побічними продуктами, що створюються у технологічних процесах (наприклад, окис цинку в литті латуні).

За фізіологічним впливом на організм людини всі шкідливі речовини поділяються на такі групи: подразнюючі, що вражають шляхи дихання, очі, шкіру, слизові оболонки (аміак, кислоти, сірчасті сполуки тощо); задушливі, які викликають токсичний набряк легень (сірководень, вуглекислий газ, метан, інертні гази, азот і т. д.); наркотичні, що спричиняють наркотичний вплив і впливають на центральну нервову систему (ацетон, бензин, леткі вуглеводні тощо); сомотичні (миш'як, ртуть, свинець й ін.); канцерогенні речовини, що

впливають, як правило, на злоякісні новоутворення — пухлини (циклічні аміни, азбест, нікель, хром тощо).

За ступенем впливу на організм людини шкідливі речовини поділяються на чотири класи небезпеки:

- I — надзвичайно шкідливі;
- II — високошкідливі;
- III — помірно шкідливі;
- IV — малошкідливі.

Чинними в Україні є значення гранично допустимих концентрацій шкідливих речовин у повітрі робочої зони, що містяться в переліку «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны» № 4617-88, доповненнях № 1—7 до нього, а також ГДК та орієнтовані безпечні рівні впливу, затверджені Головним державним санітарним лікарем України після 1 січня 1997 р.

Шкідливі речовини щодо токсичної дії на зазначені органи або системи людини поділяються на такі, що:

- 1) діють на нервову систему, викликаючи підвищену збудливість, порушення з боку внутрішніх органів, стомлюваність і сонливість. Це метанол, етиловані бензини;
- 2) призводять до структурних змін в тканинах печінки - жирового переродження; появи вогнищ омертвіння (некроз) і заростання частини печінки жировою тканиною (цироз). Це діхлоретан, чотирехлористий вуглець;
- 3) порушують роботу кровотворних органів, які реагують з гемоглобіном крові, що руйнує червоні кров'яні тіลця, порушують кровотворення кісткового мозку. Це окис вуглецю, бензол, толуол, свинець, тетраетилсвинець;
- 4) зв'язують біологічні каталізатори організму - ферменти, відсутність яких призводить до розладу роботи більшості життєво важливих систем організму. Це ртуть і фосфорорганічні сполуки;
- 5) подразнюють верхні дихальні шляхи. Це пари кислот, ароматичні вуглеводні;

6) припікають і подразнюють шкіру і слизові оболонки. Це сірчана, азотна, соляна кислоти, їдкий калій і натр, кальцинована сода;

7) викликають утворення злоякісних пухлин - канцерогени - 3, 4-бензпірен.

Шкідливі речовини можуть проникати до організму через органи дихання, шлунково-кишковий тракт, шкіряні покрови і слизові оболонки.

Ступінь токсичності хімічних речовин та характер викликаних ними патологічних зрушень залежать від низки факторів:

— хімічної структури речовини (чим вища дисперсність, тим глибше і швидше вони проникають у дихальні шляхи);

— розчинності в організмі працівника (чим вища розчинність, тим більша токсичність хімічної речовини);

— концентрації у повітрі (чим вища концентрація хімічних речовин, тим швидше настає отруєння);

— тривалості дії хімічних речовин.

Умови зовнішнього середовища (наприклад, температура, вологість тощо) можуть посилювати чи послаблювати дію токсичних речовин. Так, висока вологість повітря посилює токсичні дії на організм соляної кислоти, фтористого водню.

Певний токсичний ефект хімічних речовин залежить від індивідуальних особливостей організму. Перенесені або існуючі хвороби, загальне ослаблення організму знижують його опірність дії хімічних речовин. У таких людей токсикація протікає довше й у важчій формі.

Виділяють гострі та хронічні отруєння. Гострі отруєння виникають у тих випадках, коли в організм надходить велика концентрація хімічних речовин (унаслідок аварії чи нещасного випадку). Хронічні отруєння виникають у результаті багаторазового проникнення незначних концентрацій хімічних речовин, які мають властивість накопичуватися в організмі (свинець, ртуть). У таких випадках симптоми початкових стадій отруєння виявляються найчастіше при проведенні періодичних медичних оглядів.

Дія хімічних речовин може бути місцевою та загальною. Місцева дія зумовлюється опосередковано впливом дратівних речовин на тканини організму. Наприклад, мінеральні кислоти (соляна, азотна) та луги подразнюють шкіру.

Загальна дія виявляється після потрапляння хімічних речовин у кров, причому деякі речовини діють на окремі органи, інші — викликають загальне отруєння організму.

Захист працівників від несприятливого впливу хімічних речовин здійснюється за допомогою таких заходів:

- удосконалення і розробки нових технологічних процесів, які виключають використання шкідливих хімічних речовин;
- застосування безперервних технологічних процесів, автоматичного контролю за технологічним процесом;
- заміни шкідливих речовин менш шкідливими (заміни метилового спирту бутиловим, жовтого фосфору — червоним при виробництві сірників, заборони використання ртуті при виробництві капелюхів тощо);
- установлення концентрації хімічних речовин у сумішах (бензол як розчинник у лаках має становити 10 % рідкої частини лаку, кількість миш'яку в кислотах для травлення металу не повинна перевищувати 0,2 %);
- комплексної механізації та автоматизації процесів, що супроводжуються шкідливими виділеннями;
- дистанційного управління технологічними процесами;
- раціонального планування цехів і обладнання (ізоляції шкідливих речовин);
- удосконалення конструкції обладнання (герметизації тощо);
- влаштування місцевої вентиляції для відсмоктування шкідливих речовин безпосередньо від місця їх утворення;
- використання індивідуальних засобів (спецодягу, окулярів, шоломів, масок, протигазів та респіраторів, антисептичних паст і т. д.);
- контролю за станом повітряного середовища на робочих місцях;
- токсикологічної експертизи і гігієнічної стандартизації всіх хімічних речовин [6].

4.2 Безпека в надзвичайних ситуаціях

4.2.1 Захист продуктів харчування та промислового обладнання від радіоактивного, хімічного і бактеріологічного забруднення

Їжа, вода а також незаражене повітря є основними факторами життєзабезпечення населення. Захист продуктів харчування від радіоактивних і отруйних речовин, бактеріологічних (біологічних) засобів при зберіганні, в процесі їх технологічної переробки, транспортування і реалізації є однією з важливих задач цивільної оборони в усіх ланках, де розв'язуються ці питання. Це обумовлюється тим, що з зараженими продуктами і водою радіоактивні отруйні речовини і бактеріальні засоби можуть потрапити в організм людини і викликати небезпечні захворювання і ураження.

Радіоактивні продукти і радіоактивні речовини (РР), що утворилися в момент аварії на АЕС і ядерного вибуху, випадають із радіоактивної хмари на місцевість у вигляді опадів і заражують усе, що знаходиться на ній. Якщо запаси продовольства виявляться неукритими або буде порушена цілісність тари і упаковки, то радіоактивні речовини безпосередньо заразять продукти харчування або будуть занесені в їжу з заражених поверхонь тари, кухонного інвентарю і обладнання, одягу і рук при обробці продуктів.

Для забезпечення захисту харчової сировини і продовольства проводиться додаткова герметизація складів, сховищ і холодильників, а також широке застосування пакувальних матеріалів і різних видів тари, що відповідають певним санітарно-гігієнічним вимогам та мають захисні властивості від радіоактивних і хімічних речовин та бактеріальних засобів і достатню механічну міцність.

Радіоактивні речовини, що потрапили на поверхню не запакованих продуктів або через щілини і нещільності тари, проникають всередину: у хліб і сухарі на глибину пор; сипучі продукти (муку, крупу, цукорпісок, кухонну сіль) у поверхневі (10-15 мм) і нижче лежачі шари в залежності від щільності продукту. М'ясо, риба, овочі і фрукти забруднюються радіоактивним пилом з

поверхні, тому на початку технологічного процесу ці продукти харчування необхідно ретельно мити[9].

Бойові і сильнодіючі отруйні речовини (ОР) являють собою небезпеку для зараження незахищеного продовольства, води, фуражу в усіх варіантах їх застосування – краплиннорідкому, твердому (у вигляді аерозолів туману, диму) і у газоподібному (пароподібному) стані. Розчиняючись і всмоктуючись вони заражують незахищені продукти. Глибина проникнення ОР у продукти харчування, особливо сипкі, у декілька разів більше, ніж у таропакувальні матеріали, при цьому в твердих жирах, маслі вершковому, комбіжирі, маргарині вона поступово збільшується. У рослинних оліях краплини отруйних речовин і аерозолі розчиняються і можуть поширитися на всю масу.

Таким чином, щоб зберегти від зараження радіоактивними, отруйними речовинами і бактеріальними засобами продукти харчування, фураж і воду, необхідно перш за все максимально ізолювати їх від зовнішнього середовища. У домашніх умовах основним засобом захисту продуктів харчування і запасів води від зараження є: герметизація квартир, будинків, комор, зберігання продуктів у герметичній тарі або упаковці із захисних матеріалів.

За своїми захисними властивостями тара поділяється на три категорії: вища, перша і друга. До вищої категорії належать тара, що захищає від радіоактивних, отруйних речовин і бактеріальних засобів. Це герметичне закрита металева, скляна тара і деякі види дерев'яної і полімерної тари: фляги з гумовою кільцевою прокладкою; діжки сталеві зварювальні і дерев'яні заливні; банки для консервів; банки із кришкою, що знімається, і прокладкою із фольги, яка прокатана; труби алюмінієві; банки скляні, закатані жерстяними кришками; пляшки з вузькою шийкою, герметичне закриті металевими капсулами або закупорені щільними корковими (поліетиленовими) пробками і алюмінієвими ковпачками; пакети із комбінованого матеріалу, паперу, фольги, поліетилену.

До тари першої категорії, що захищає продовольство від бактеріальних засобів і радіоактивних речовин належать: діжки дерев'яні; ящики дощаті з поліетиленовими вкладишами, банки і пакети із комбінованого матеріалу (для пакування концентратів круп, молока); пляшки з поліхлорвінілу для рослинної олії та ін. До другої категорії тари, що захищає продовольство тільки від радіоактивних речовин, належать: ящики; барабани дерев'яні без поліетиленових вкладишів, багатошарові паперові мішки тощо.

Найбільш перспективною як покривальний матеріал є відносно дешева плівка із поліетилену високого тиску (низької густини). Вона охороняє продукти від зараження радіоактивних речовин і частково від отруйних речовин і бактеріальних засобів. Зокрема, хліб, сухарі, кондитерські вироби можна загорнути у декілька шарів паперу, потім скласти у банки, каструлі або поліетиленові мішки (пакети). Сипкі продукти (мука, цукор, крупа, вермішель) доцільно тримати в пакетах із цупкого паперу, поліетиленових мішках, які скласти в коробки, ящики, викладені всередині картоном, клейонкою або іншими плівковими матеріалами. М'ясо, масло, ковбасу, рибу можна зберегти від зараження в холодильниках. Для більшої надійності їх укладають у поліетиленові пакети, а вершкове масло, маргарин, жири у скляні або металеві банки із кришками, що щільно закриваються. Овочі слід зберігати у дерев'яних або фанерних ящиках, викладених всередині папером, целофаном, поліетиленовою плівкою, пергаментом або клейонкою, а зовні вкрити брезентом або іншою цупкою тканиною.

Усі види продуктів, що знаходяться у металевих або скляних консервних банках, а також у посуді, що герметично закривається, зараженню, у тому числі отруйними речовинами і бактеріальними засобами, не піддаються. У випадку необхідності така тара швидко знезаражується.

При зберіганні продукції на відкритому повітрі необхідно прийняти заходи до її складування або упаковки незахищеної продукції і фуражу. Для упаковки використовують крафтпаперові мішки з підвищеною механічною міцністю.

Можливо використання бочок, щільних ящиків, контейнерів та інших ємкостей, що мають захисні властивості і здібні для зберігання харчової продукції і фуражу[9].

Досить важливу увагу слід приділяти захисту промислового обладнання. Для уникнення забруднень його періодично піддають миттю та дезінфекції. На промислових підприємствах, а особливо підприємствах що випускають продукти дитячого харчування перші дві зміни є робочі а третя – санітарна (якщо підприємство працює в три зміни), де все обладнання піддається миттю та дезінфекції.

Для миття і профілактичної дезінфекції застосовують такі хімікалії:

- миючі: мило господарське, тринатрійфосфат, натрій вуглекислий кристалічний (кальцинована сода), їдкий натрій, каспос, сінтамід-5 і синтетичні миючі засоби.
- мийно-дезінфекційні: їдкий натрій (каустична сода), каспос, ДемПУ, метасиликат натрію, композиції - дихлорізоціанурату натрію з сінтамідом-5, катапін-бактерициду з сінтамідом ~ 5, препарат типу Вімол-Тріас А, препарат ДМР-5;
- дезінфікуючі: хлорне вапно, гіпохлорит, хлорамін, тріхлорізоціанурова кислота (ТХЦК), дихлорізоціанурату натрію (ДХЦН), двутретьосновная сіль гіпохлориту кальцію (ДТСГК), їдкий натрій (каустична сода), каспос, формальдегід, негашене вапно, оксидіфенолят натрію, перекис водню, антисептол.

Дезінфекції повинна передувати механічне очищення обладнання та приміщень (підлог, стін, інвентарю тощо) від залишків сировини, із застосуванням теплої води, яку спускають у каналізацію тільки через жироловки. Після механічного очищення здійснюється миття і знежирення оброблюваних об'єктів.

Об'єкти які безпосередньо контактують з харчовим сировиною, знежирюють шляхом миття гарячими миючими розчинами з розрахунку 2 л на 1 м² поверхні; об'єкти що безпосередньо не контактують з сировиною, знежирюють з розрахунку 1л розчину на 1м². Дезінфекцію здійснюють дезінфікуючими розчинами з розрахунку 0,5 л робочого розчину на 1 м² поверхні.

При використанні мийно-дезінфекційних розчинів миття з знежиренням і дезінфекція об'єднуються в одну операцію. У цьому випадку санітарну обробку проводять за схемою: механічна очистка, обробка мийно-дезінфікуючим розчином, промивання водою. Витрата мийно-дезінфікуючого розчину 2 л на 1 м² поверхні. Дезінфекцію у виробничих цехах роблять тільки після повного видалення з них харчової сировини.

Кількість миючого або дезінфікуючого засобу (X) в кілограмах для приготування робочого розчину розраховують за формулою:

$$X = (A \cdot B) : C$$

де: А - процентний вміст активно діючих речовин у розчині;

В - кількість розчину, літр;

С - процентний вміст активно діючих речовин в миючому або дезінфікуючому засобі.

Прибиральний інвентар після закінчення прибирання миють гарячою водою та дезінфікувати зануренням на 30-40 хвилин в один з дезінфікуючих або мийно-дезінфекційних розчинів, після чого ретельно промивати водою та просушують [9].

Для забезпечення захисту продуктів харчування та промислового обладнання необхідно строго дотримуватись усіх правил та вимог.

ВИСНОВКИ

1. На основі аналізу наукової літератури було зроблено висновок про можливість застосування електрофоретичного методу для виділення гомогенних фракцій білків сироватки молока.
2. В роботі було досліджено електрофорез білків сироватки молока в присутності додецилсульфату натрію. Розділювання білків сироватки молока на фракції здійснювалось за молекулярною масою. Недоліки цього методу в тому, що у роботі ми використовуємо детергент, який викликає денатурацію білків сироватки, а також спостерігається неефективне розділення фракцій β -лактоглобуліну і α -лактоальбуміну.
3. Проводився електрофорез білків сироватки на пластинах ПААГ в присутності сечовини, який не дозволив нам розділити фракції А та В β -лактоглобуліну.
4. Диск-електрофорез білків сироватки молока в трубочках дав нам хороші результати, вдалось розділити всі білкові фракції. Єдиним недоліком є те, що при використанні трубочок для розділення використовується мала кількість білка.
5. Для препаративного виділення білків сироватки було вибрано диск-електрофорез і прилад для вертикальних пластин. Диск електрофорез білків сироватки на пластинах ПААГ дозволив повністю розділити білкові фракції. Була підібрана кількість проби (1 мл) при якій ми отримали оптимальний варіант розділення. Теоретичний вихід β -лактоглобуліну становить 7 мг, а ми отримали цей білок у кількості 5,9 мг. Щодо α -лактоальбумін, то його теоретичний вихід становить 3,2мг, а практичний – 2,7 мг.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Бородай С. В., Бондарчук З. В. Дія ензимних молокозсідальних препаратів на протеїновий комплекс молока. *Biotechnologia Acta*. 2010. Т. 3, № 4. С. 29–36.
2. Ганонг В. Ф. *Фізіологія людини: Пер. з англ.* Львів : БаК, 2002. 784 с.
3. Єресько Г. О., Шинкарик М. М., Ворощук В. Я. *Технологічне обладнання молочних виробництв.* Київ : Фірма «ІНКОС», Центр навчальної літератури, 2007. 344 с.
4. Жидецький В.Ц. *Основи охорони праці.* Львів: Афіша, 2005. 317с.
5. Запорожець О.І., Протоєрейський О.С., Франчук Г.М., Боровик І.М. *Основи охорони праці.* К.: Центр учбової літератури. 2009. 264с.
6. Керб Л.П. *Основи охорони праці.* Навч.посібник. К.: КНЕУ. 2003. 215с.
7. Машкін М.І., Париш Н.М. *Технологія виробництва молока і молочних продуктів: Начальне видання.* К.: Вища освіта, 2006. 351с.: іл.
8. Нельсон Д. Л., Кокс М. М. *Основи біохімії за Ленінджером: Навч. посібник / Переклад з англ.* Наук. ред. перекладу С. Комісаренко. Львів : БаК, 2015. 1280 с.
9. Пономарьов П.Х., Сириохман І.В. *Безпека харчових продуктів та продовольчої сировини.* Начальний посібник. К.: Лібра. 272с.
10. Столяр О. Б. *Біологічна хімія : навч. посібн.* Тернопіль : Посібники і підручники, 2014. 368 с.
11. Цісарик О. Й., Білик, О. Я., Мусій Л. Я., Сливка І. М. *Хімія і фізика молока: навч. посіб. [для студ. вищ. навч. закл.].* Львів, 2019. 200 с.
12. Чагаровський О. П., Ткаченко Н. А., Лисогор Т. А. *Хімія молочної сировини: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів.* Одеса : «Сімекс-прінт», 2013. 268 с.
13. Юкало А. В., Сторож Л. А, Юкало В. Г. Білки казеїнового комплексу молока корови (*Bos Taurus*) як попередники біологічно активних пептидів. *Біотехнологія*. 2012. Т. 5, № 4. С. 21–33.
14. Юкало А. В., Дацишин К. Є., Юкало В. Г. Біоактивні пептиди протеїнів сироватки молока корів (*Bos Taurus*). *Biotechnologia Acta*. 2013. Т. 6, № 5. С. 49–61.
15. Юкало В. Г., Луговий Б. Л. Утворення антигіпертензивних пептидів при модельному протеолізі β -казеїну. *Фізіологічний журнал*. 2000. Т. 46, № 3. С. 78–83.

16. Юкало В. Г. Вплив продуктів протеолізу α_{S1} -казеїну на активність ангіотензин-перетворюючого ферменту. *Український біохімічний журнал*. 2001. Т. 73, № 5. С. 28–32.
17. Юкало В. Г. Іоннообмінна хроматографія білків казеїнового комплексу в об'ємі. *Медична хімія*. 2001. Т.3, № 4. С. 87-90.
18. Юкало В. Г. Біологічна активність протеїнів і пептидів молока. *Монографія*. / Юкало В.Г. – Тернопіль: Видавництво ТНТУ, 2021. 372с.
19. Юкало В. Г. Інтенсифікація протеолізу α_{S1} -казеїну лактококами з метою одержання фізіологічно-активних пептидів. *Медична хімія*. 2002. Т. 4, № 1. С. 33–36.
20. Юкало В. Г. Електрофорез загального казеїну в анодній системі поліакриламідного гелю. *Ветеринарна біотехнологія*. 2007. №11. С. 246–251.
21. Юкало В. Г., Яворський Б. І., Сторож Л. А., Соловодзінська І. Є. Кількісний електрофоретичний аналіз білків казеїнового комплексу. *Біологія тварин*. 2007. Т.9, №1–2. С. 295–298.
22. Юкало В. Г. *Лабораторний практикум з хімії та фізики молока і молочних продуктів: навчальний посібник*. Тернопіль : Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, 2018. 176 с.
23. Юкало В. Г., Дацишин К. Є., Семенишин Г. М. Характеристика молекулярних мас продуктів протеолізу концентрату сироваткових білків отриманих за дії панкреатину. *Наукові праці НУХТ*. 2019. Т. 25, № 5. С. 233–239.
24. Юкало В. Г., Дацишин К. Є. Технологія соєво-молочного комбінованого продукту спеціального призначення з гідролізатом білків сироватки молока. *Наукові праці НУХТ*. 2019. Т. 25, № 6. С. 202–209.
25. Юкало В., Дацишин К. Технологія низькоалергенного молока з гідролізатом білків сироватки. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2019. Т. 21, № 92. С. 14–18.
26. Agregán R., Echegaray N., López-Pedrouso M., Kharabsheh R., Franco D., Lorenzo J. M. Proteomic Advances in Milk and Dairy Products. *Molecules*. 2021, Vol. 26. 3832.

27. Akahoshi A., Sato K., Nawa Y., Nakamura Y., Ohtsuki K. Novel approach for large-scale, biocompatible, and low-cost fractionation of peptides in proteolytic digest of food protein based on the amphoteric nature of peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. Vol. 48. P. 1955–1959.
28. Basch J. J., Douglas F. W., Procino L. G., Holsinger V., Farrell H. M. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure. *Journal of Dairy Science*. 1985. Vol. 68, № 1. P. 23–31.
29. Garsia-Rodenas C.L., Finot P.–A., Maire J.C., et al. Nutritional composition intended for specific gastro-intestinal maturation in premature mammals. – Патент СИИА №6733770 (2004).
30. Goulding D. A., Fox P. F., O'Mahony J. A. Milk protein: An overview. *Milk protein. From expression to food* / Eds. M. Boland, H. Singh. 3rd edn. London, United Kingdom : Academic Press, 2020. P. 21–98.
31. Deeth H. C., Bansal N. (eds.). *Whey protoein: From Milk to Medicine (1st edition)*. London, United Kingdom : Academic Press, 2019. 746 p.
32. Farrell H. M. Jr., Kumosinski T. F., Thompson M. P., Pulaski P. Calcium-induced associations of the caseins: a thermodynamic linkage approach to precipitation and resolubilization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1998. Vol. 265, №. 1. P. 146–158.
33. Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. *Dairy Chemistry and Biochemistry (Second Editon)*. New York : Springer, 2015. 585 p.
34. Hartmann R., Meisel H. Food derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007. Vol. 18, № 2. P. 163–169.
35. McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. (eds.) *Advanced Dairy Chemistry – Volume 1B: Proteins: Applied Aspects, 4th edn*. New York: Springer, 2016. P. 498.
36. Madureira A. R., Tavares T., Gomes A. M. P., Pintado M. E., Malcata F.X. Invited review: Phisiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 2010. V. 93, № 2. P. 437–455.
37. McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. (eds.) *Advanced Dairy Chemistry – Volume 1B: Proteins: Applied Aspects, 4th edn*. New York: Springer, 2016. P. 498.
38. Nakamura Y., Yamamoto M., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., Takano T. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*. 1995. Vol. 78. P. 777–783.

39. Nongonierma A. B., Gaudel C., Murray B. A., Flynn S., Kelly P. M., Newsholme P., FitzGerald R. J. Insulinotropic properties of whey protein hydrolysates and impact of peptide fractionation on insulinotropic response. *International Dairy Journal*. 2013. Vol. 32. P. 163–168.
40. Swamylingappa B., Joseph, Murlthy K.S. Process for preparation of protein-hydrolysate from milk protein. – Патент США №6589574 (2003).
41. Thibault P.A. Partial hydrolyzate of whey proteins free of lactoglobulin and enzymatic process to obtain it. – Европейський патент №0,390,633, B1 (1990).
42. Sienkiewicz-Szłapka E., Jarmołowska B., Krawczuk S., Kostyra E., Kostyra H., Bielikowicz K. Transport of bovine milk-derived opioid peptides across a Caco-2 monolayer. *International Dairy Journal*. 2009. Vol. 19, № 4. P. 252–257.
43. Sychevskyi M., Romanchuk I., Minorova A. Milk whey processing: prospects in Ukraine. *Food Science and Technology*. 2019. Vol. 13, № 4. P. 58–68.
44. Yang S., Mao X-Y., Li F-F., Zhang D., Leng X-J., Ren F-Z., Teng G-X. The improving effect of spray- drying encapsulation process on the bitter taste and stability of whey protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*. 2012. Vol. 235. P. 91–97.
45. Yukalo A., Yukalo V., Shynkaryk M. Electrophoretic separation of the milk protein. *Proceeding of the International Conference on Bio and Food Electrotechnologies*. Compiègne, France, 2009. P. 227–231.
46. Yukalo V. G., Storozh L. A., Datsyshyn K. Ye., Krupa O. M. Electrophoretic systems for the preparative fractionation of proteins-precursors of bioactive peptides from cow milk. *Food science and technology*. 2018. Vol. 12, № 2. P. 26–32.
47. Yukalo V.G., Datsyshyn K.Ye. Gel filtration of cow milk serum proteins. *Food science and technology*. 2018. Vol. 12, №4. P. 72–78.
48. Yukalo V., Tsisaryk O., Datsyshyn K. Isolation of protein fractions of serum of milk by preparative disc-electrophoresis. *Journal of Dairy Science*. 2018. Vol. 101, Suppl. 2. P. 51.

УДК 637.127

В.Я. Забудний, Т.Р. Шишка

(Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Україна)

БІОАКТИВНІ ПРОДУКТИ ПРОТЕОЛІЗУ З БІЛКІВ МОЛОКА

V.Zabudnyy, T.Shyshka

BIOACTIVE PRODUCTS OF PROTEOLYSIS OF MILK PROTEINS

Донедавна вважалось, що основною функцією протеїнів молока є забезпечення організму ссавців (людини і тварини) необхідною кількістю амінокислот для пластичного обміну. Насамперед це стосується незамінних або есенціальних амінокислот. Білки молока серед харчових білків займають особливе місце, оскільки вони є першими аліментарними білками, які забезпечують харчові потреби новонародженого організму ссавця, а також забезпечують регуляторний вплив на різні фізіологічні функції в організмі, як у постнатальному періоді, та і у дорослому віці [1]. Біоактивні пептиди можуть утворюватися при протеолізі білків молока (казеїни і білки сироватки) ензимами мікроорганізмів молока, молоко-згортальними препаратами, а також у травному тракті [2,3]. На теперішній час доведено, що біоактивні пептиди можуть проникати в кров'яне русло і з потоком крові досягати клітин-мішеней. Виділені за останні десятиліття пептиди з білків молока характеризуються багатьма видами біологічної дії. У таблиці 1 представлені основні види біологічної дії пептидів з білків молока.

Групи пептидів за біологічною дією	Білки-попередники біоактивних пептидів	Біологічна дія
Казокініни, лактокініни	α -, β -казеїни, β -Lg, α -La, Lf	Антигіпертензивна дія
Опіоїдні пептиди	α -, β -, k-казеїни, β -Lg	Опіоїдні агоністи і антагоністи
Казоплателіни	k-казеїн	Антитромботична дія
Імуномодулятори	α -, β -казеїни, α -La	Стимулювання імунної системи
Фосфопептиди	α -, β -, k-казеїни	Вплив на мінеральний обмін
Антимікробні пептиди	α s-, β -, k-казеїни, Lf, β -Lg, α -La	Бактерицидна і антивірусна дія
Антиканцерогени	α -казеїни, Lf	Подавляючи ріст ракових клітин

Таблиця 1. Біоактивні пептиди з білків молока

На сьогодні створена база даних, яка налічує понад 400 біоактивних пептидів з молочних білків. Активно досліджуються умови утворення таких пептидів, з'ясовуються механізми їх проникнення у внутрішнє середовище організму, досягнення клітин-мішеней, прояв біологічної дії, а також можливості їх використання у функціональних продуктах і продуктах спеціального призначення. Це може дозволити створити у майбутньому новий клас функціональних продуктів.

Література:

1. Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. Dairy Chemistry and Biochemistry (Second Editon). New York : Springer, 2015. 585 p.
2. Юкало В. Г., Сторож Л. А., Штокало М. О. Визначення умов отримання природних біоактивних казеїнових фосфопептидів. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2014. Т. 16, № 3 (60), Ч. 4. С. 192–200.
3. Юкало В. Г., Дацишин К. Є., Семенишин Г. М. Характеристика молекулярних мас продуктів протеолізу концентрату сироваткових білків отриманих за дії панкреатину. Наукові праці НУХТ. 2019. Т. 25, № 5. С. 233–239.