

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ КАЗЕЇНІВ З МОЛОЗИВА
ТА МЕТОДІВ ЇХ КОНТРОЛЮ

Допущена до захисту
« _ » _____ 2023 р

Кваліфікаційна робота
студентки кафедри
молекулярної біології та біотехнології
Валентини ФРОЛ

Завідувач кафедри
д.б.н, проф. Божков А.І

Науковий керівник:
доцент, к.б.н.
Анатолій Володимирович
ГОЛТВЯНСЬКИЙ

Оцінка « _____ »
« _ » _____ 2023 р.

Харків 2023

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота містить 33 сторінки, 1 таблицю, 38 літературних посилань, 1 додаток.

Тема роботи: розробка технології отримання казеїнів з молозива та методів їх контролю.

Мета роботи: характеристика казеїнів їх біологічних функцій та способів застосування, розгляд та аналіз методів виділення казеїнів.

Об'єкти дослідження: казеїни молока та молозива.

Результати: охарактеризовано властивості казеїнів та їх будову, розглянуто варіанти застосування казеїнів як біоактивних сполук. Проаналізовано методи визначення біологічної активності казеїнів, їх кількісного визначення та виділення.

Ключові слова: КАЗЕЇНИ, МІЦЕЛИ КАЗЕЇНУ, ВЛАСТИВОСТІ КАЗЕЇНУ, ЗАСТОСУВАННЯ КАЗЕЇНУ, АНАЛІЗ МОЛОКА, ВИДІЛЕННЯ КАЗЕЇНІВ.

ABSTRACT

The qualification work contains 33 pages, 1 table, 38 literary references, 1 appendix.

Work topic: development of technology for obtaining caseins from colostrum and methods of their control.

The purpose of the work: characterization of caseins, their biological functions and methods of application, review and analysis of casein isolation methods.

Research objects: caseins of milk and colostrum.

Results: the properties of caseins and their structure were characterized, options for the use of caseins as bioactive compounds were considered. The methods of determining the biological activity of caseins, their quantitative determination and isolation are analyzed.

Key words: CASEINS, CASEIN MICELLES, CASEIN CLADDING, CASEIN APPLICATION, MILK ANALYSIS, CASEIN ISOLATION.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1 Характеристика казеїну молока та молозива.....	6
1.1.1 Фізико-хімічні властивості казеїну.....	6
1.1.2 Загальна характеристика.....	7
1.2 Біологічні властивості казеїну та фармацевтичні області його застосування.....	11
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	15
2.1 Методи виділення казеїну.....	16
2.2 Методи аналізу біологічної активності.....	18
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	21
3.1 Існуючі методи виділення казеїну та їх аналіз.....	21
3.2 Основні вимоги при отриманні казеїну.....	25
ВИСНОВКИ.....	27
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	28
ДОДАТКИ.....	32

ВСТУП

Молоко є джерелом широкого спектру білків, які забезпечують живлення найперспективніших нових продуктів харчування сьогодні. Ізольовані молочні білки є натуральними, перевіреними харчовими інгредієнтами з відмінною функціональністю. Технології розділення створюють основу для підвищення цінності молока шляхом виробництва білків, які забезпечують харчову промисловість інгредієнтами для задоволення конкретних потреб, чого неможливо зробити з самим молоком чи іншими інгредієнтами [1].

Для фракціонування та виділення основних білків із молозива та молока, а також кількох нативних білків, отриманих із молочної сироватки, доступні промислові або напівпромислові технології обробки. З іншого боку, існує зростаюча потреба в розробці широкомасштабних технологій розділення інших біологічно активних сполук, які містяться в молозиві або молоці у відносно незначних кількостях, але мають потенціал як функціональних інгредієнтів. Такі сполуки включають, наприклад, фактори росту, гормони, цитокіни, протеозо-пептонна фракція, основний білок молока та білки мембран молочних жирових кульок [2].

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Характеристика казеїну молока та молозива

1.1.1 Фізико-хімічні властивості казеїну

Казеїн – білий аморфний порошок без смаку й запаху, його молекулярна маса становить 1,26 – 1,3. Він не розчиняється у спирті й ефірі, погано розчиняється у воді й добре – у розчинах деяких солей. Два основних компоненти казеїну – кальцієва сіль (казеїнат кальцію) та кальцію фосфат – утворюють казеїнкальцій-фосфатний комплекс. До складу цього комплексу входять також магній, калій, натрій і цитрати. Білкова молекула казеїну має вигляд $\text{NH}_2\text{R}(\text{COOH})_8$ [3].

Казеїн має порівняно невелику молекулярну масу - близько 20 кДа. Його характерною особливістю є високий вміст залишків проліну в поліпептидному ланцюзі. З цієї причини поліпептидний ланцюг казеїну при формуванні вторинної структури переважно набуває конформації, що відповідає β -структурі.

Казеїн має амфотерну реакцію, але для нього більш характерні кислотні властивості, його можна розглянути як 4 – 6-основну, а за даними Я.С. Зайковського, як 8-основну кислоту. Казеїн містить 144 кислотних (COOH) і лише 83 аміногрупи (NH₂). Цим зумовлюються його кислотні властивості.

На нейтралізацію 1 г казеїнової кислоти у присутності фенолфталеїнового індикатора витрачається 8,8 мл 0,1 н розчину натрію гідроксиду. Загальна кислотна ємність 3 г казеїну становить 26,4 мл 0,1 н розчину лугу, 1 мл 0,1 н лугу здатний нейтралізувати 0,11315 г казеїну в розчині.

Вивчення розмірів казеїнових частинок під електронним мікроскопом показує, що близько 1/3 їх мають розміри до 400 Å (ангстрем), 1/3 – 400-800 Å та близько 1/3 – 800-1200 Å.

Ізоелектрична точка казеїну настає при рН 4,5 – 4,7. При цьому частки білка стають електронейтральними і втрачають рухливість в електричному полі [3].

1.1.2 Загальна характеристика

Термін казеїн походить від латинського слова *caseus*, що означає сир. Чотири родини казеїнових білків (κ -, β -, α_{S1} - та α_{S2} -казеїни) еволюціонували у різних видів ссавців, щоб зберегти спеціалізовані ролі в молоці, і їх основною функцією є забезпечення поживними речовинами та мінералами, особливо кальцієм, потомство, зберігаючи плинність молочних залоз [4].

Казеїни належать до сімейства фосфопротеїнів, синтезованих у молочній залозі, і вони виділяються у вигляді приблизно сферичних, полідисперсних (50–600 нм із середнім значенням 200 нм), супрамолекулярних колоїдних агрегатів, які називаються міцелами. Казеїни кодуються окремими аутосомними генами, а саме CSN1S1 (α_{S1} -казеїн), CSN2 (β -казеїн), CSN1S2 (α_{S2} -казеїн) і CSN3 (κ -казеїн), організованими як кластер локусів генів казеїну в ділянці ДНК приблизно 250 кб, розташованих на хромосомі 6. У всіх чотирьох обраних видів перші два гени, CSN1S1 і CSN2, розташовані близько один до одного, CSN3 є найвіддаленішим (особливо у слона), а CSN1S2 лежить між ними. Чотири гени є висококонсервативними та щільно згрупованими у верблюдів, тоді як у слонів вони значно віддалені. Варіанти (або ізоформи) цих генів можуть бути результатом однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) і вставок або делецій нуклеотидів.

Бичаче і верблюже молоко містять α_{S1} -, α_{S2} -, β - і κ -казеїни, але в різних відносних співвідношеннях 38:10:40:12 і 22:9:65,5:3,5 відповідно. У жіночому молоці відсутній α_{S2} -казеїн, а відносне співвідношення α_{S1} -, β - і κ -казеїнів у жіночому молоці становить 3:70:27. У молоці африканських слонів відсутні як α_{S1} -, так і α_{S2} -казеїни, і воно містить лише β - та κ -казеїни у співвідношенні 89:11 [5].

У різних видів ссавців казеїни зазнали кількох еволюційних модифікацій своїх первинних послідовностей і посттрансляційних модифікацій шляхом фосфорилювання та глікозилювання, викликаючи загальну зміну їхніх структурних і функціональних властивостей [4].

Відсутність або низький рівень α_S -казеїнів у молоці людини та африканських слонів підтверджує припущення, що лише κ -казеїн і стародавній β -казеїноподібний білок є обов'язковими для утворення стабільних казеїнових міцел, і що α_{S1} - і α_{S2} -

казеїни розвинулися у деяких видів пізніше в ході еволюції. Причина (причини) генетичної мінливості казеїнів та їх вплив на технологічну та поживну якість молока ще не зрозуміла та потребує подальшого дослідження [4].

Білки казеїну, включаючи κ -, β -, α_{S1} - та α_{S2} -казеїни, зібрані в структуру, яка, як уже зазначалося раніше, називається міцелами казеїну. Середній розмір міцел казеїну також може значно відрізнятися від одного виду до іншого. Види тварин відрізняються співвідношенням казеїну і відповідно розміром міцел [6].

Типова міцела казеїну містить тисячі молекул казеїну, більшість з яких утворюють термодинамічно стабільні комплекси з нанокластерами аморфного фосфату кальцію. Як і багато інших розгорнутих білків, казеїни мають реальну або потенційну тенденцію збиратися в токсичні амілоїдні фібрили, особливо у високих концентраціях, які містяться в молоці. Фібрили не утворюються в молоці, оскільки існує альтернативний шлях агрегації, який призводить до утворення казеїнової міцели. В результаті утворення міцел поживне молоко може виділятися і зберігатися, не викликаючи ані патологічної кальцифікації, ані амілоїдозу молочної тканини матері. Здатність секвеструвати нанокластери аморфного фосфату кальцію в стабільний комплекс не є унікальною для казеїнів.

Взагалі різноманітність поглядів на структуру казеїнової міцели було висловлено в останніх оглядах з точки зору колоїдної та харчової науки [7]. Тож вважаємо за доцільне більш детально розглянути дане питання.

Казеїнові міцели – це високогідратовані колоїдні частинки, що містять приблизно 3,5 мл води на грам білка [8]. κ -Казеїн, присутній у глікозильованій формі, виступає у водній фазі, утворюючи високогідратований поліелектролітний шар, що надає стеричної та електростатичної стабільності.

Внутрішнє ядро казеїнових міцел складається з білкових щільних областей і більш гідратованих кишень [8]. Перегрупування супрамолекулярної структури міцел може відбуватися під час концентрації через зміни відстані між частинками, а також зміни навколишнього середовища, такі як рН або іонний склад. Зменшуючи сили відштовхування, які забезпечують колоїдну стабільність міцел, можна індукувати агрегацію та утворення мережі частинок, а також створити текстуру та структуру, настільки звичну для молочних продуктів [9].

Казеїни можна дестабілізувати, наприклад, за допомогою хімозину в присутності кальцію або підкисленням. Коагуляція молока за допомогою хімозину є важливим етапом у виготовленні сиру. Реакція є специфічним гідролізом, що впливає на стабілізуючий шар κ -CN, і включає 2 стадії, що перекриваються. Первинна стадія – ферментативне розщеплення κ -CN. Як тільки достатня кількість білка гідролізується, відбувається агрегація. У необробленому знежиреному молоці при природному рН друга стадія реакції, утворення казеїнової сітки, відбувається, коли щонайменше 85-90% казеїнового макропептиду вивільняється в розчин. Агрегація залежить від кальцію. У відновлених концентратах молочного білка (МРС) внесок вільного кальцію в утворення гелевої мережі є критичним, і додавання достатньої кількості кальцію є необхідним для відновлення кінетики коагуляції сичужного ферменту та міцності гелю.

Іншим поширеним механізмом, який використовується для утворення гелів у молочних матрицях, є модифікація поверхневого заряду міцел шляхом зміни рН. Під час підкислення негативні заряди білків поступово зменшуються, і нанокластери фосфату кальцію, пов'язані з фосфосерином AA всередині міцел, поступово дифундують у сироватку. Повне вивільнення відбувається при рН приблизно 5,0. Зміна рН спричиняє колапс волосистого шару κ -CN, таким чином, що стерична та електростатична стабілізація зменшуються, і міцели починають агрегувати, коли вони наближаються до своєї ізоелектричної точки (рН~4,6) [10]. У гелях, індукованих кислотою, частинки казеїну зберігають свою індивідуальність у мережі гелю, оскільки міцели все ще вкриті глікозильованою частиною κ -CN.

У молоці, яке було піддано інтенсивній термічній обробці, зв'язки між частинками казеїну зміцнюються теплоіндукованими містками агрегатів сироваткового білка. У кислих гелях, виготовлених з нагрітим молоком, показано вищий рН гелеутворення, а сітка, що утворюється, набагато жорсткіша, ніж у ненагрітих молочних гелях [11, 12]. Це не стосується ферментативно індукованої дестабілізації, де механізм заснований на зменшенні стеричних сил відштовхування через гідроліз глікозильованих фрагментів κ -CN. У цьому випадку присутність індукованих теплом комплексів, що взаємодіють з κ -CN на поверхні міцел, буде пригнічувати агрегацію [13].

З використанням молочно-білкових концентратів (МБК) як інгредієнтів у молочних продуктах зріс інтерес до розуміння впливу концентрації білка на об'ємні

властивості молочних концентратів, ізолятів або суспензій казеїнових міцел та їх властивості під час відновлення [14].

В'язкість суспензій міцели казеїну зростає з концентрацією, із різкою зміною поведінки від ньютонівської до неньютонівської. Подібним чином в'язкість відновленого МБК також збільшується з концентрацією білка, і її можна змінити шляхом модифікації сироватки. Напівемпіричне рівняння було використано для опису залежності в'язкості як функції концентрації з максимальною об'ємною часткою упаковки для міцел казеїну приблизно 0,79. Об'ємна частка визначається як концентрація білка (г/мл) та його об'єм (мл/г), розрахована як для твердих сфер порівнянного діаметру. У знежиреному молоці об'ємна частка (ϕ), зайнята міцелами казеїну, становить 0,1. Об'єм міцел казеїну коливається в літературі між 3,4 і 4,4 мл/г [15].

Зі збільшенням концентрації відстань між частинками міцели та коефіцієнт дифузії зменшуються. Наприклад, при ϕ приблизно 0,2, що відповідає концентрації приблизно в 2 рази, їх міжміцелярні відстані приблизно дорівнюють середньому діаметру міцели.

Об'ємні реологічні властивості були змодельовані в літературі як для суспензії твердих сфер. Однак важливо зазначити, що міцели є високосольватованими білковими комплексами. Частина води, пов'язаної з міцелами (приблизно 20–30%), знаходиться у зовнішньому поліелектролітному шарі [8]. Ядро являє собою відкриту пористу структуру, яка характеризується щільними білками та багатими водою плямами. Іонне середовище є критичним фактором, що впливає на стеричну і електростатичну взаємодію між міцелами казеїну. За допомогою методів концентрування, таких як випаровування та зворотний осмос, вільні іони також концентруються, за допомогою мембранної фільтрації відбувається виснаження розчинних компонентів, що дозволяє досягти більш високого співвідношення білків/іонів у кінцевому концентраті порівняно з концентратами згущеного молока.

Тоді об'ємна в'язкість як функція об'ємної частки залежить від змін, що відбуваються в безперервній фазі, в якій дисперговані взаємодіючі міцели. Критичне значення об'ємної частки, коли міцели втрачають свою рідну колоїдну структуру, свій об'єм і виявляють структурні перебудови, все ще залишається дискусійним.

1.2 Біологічні властивості казеїну та фармацевтичні області його застосування

Хоча жодних конкретних фізіологічних властивостей для всієї казеїнової системи (або її окремих фракцій) не було запропоновано, різні пептиди, приховані (або неактивні) в амінокислотній послідовності, були предметом все більш інтенсивних досліджень. Зараз ведеться велика робота щодо тих пептидів, які, як відомо, мають біоактивність, щодо їх вивільнення шляхом селективного ферментативного гідролізу. Дотепер таке вивільнення було продемонстровано переважно *in vitro* та меншою мірою *in vivo* на тваринних моделях.

Експериментальна перевірка ефективності таких біологічно активних пептидів за участю людей, однак, все ще недостатня. У зв'язку зі зростанням обізнаності про вплив харчових інгредієнтів на зміцнення здоров'я з'явилося кілька публікацій, які висвітлюють останні досягнення в дослідженні пептидів молока [16].

Багато біологічно активних сироваткових білків, зокрема імуноглобулінів, лактоферину та факторів росту, містяться в молозиві в набагато більших концентраціях, ніж у молоці, що відображає їх важливість для здоров'я новонародженого. У таблиці А.1 (Додаток А) наведено перелік основних білків, що містяться в молозиві та молоці великої рогатої худоби, а також інформацію про їх концентрацію, молекулярну масу та встановлені біологічні функції.

Крім того, дослідження, проведені протягом останнього десятиліття, показують, що білки молока мають додаткові фізіологічні функції завдяки численним біоактивним пептидам, які зашифровані в інтактних білках. Було виявлено велику кількість біологічно активних пептидів, які виявляють різноманітну активність, включаючи антиоксидантну, антигіпертензивну, антимікробну, імуномодулюючу, опіюїдну або мінеральну активність. Поглиблення знань про біологічні властивості окремих молочних білків та їх фракцій викликало потребу в розробці технологій отримання цих компонентів у очищеній або збагаченій формі, щоб уможливити їх використання як інгредієнтів у різноманітних функціональних харчових продуктах.

Багато з промислово використовуваних молочних заквасок мають високу протеолітичну дію. Виробництво біологічно активних пептидів з використанням мікробних джерел, заквасок і незаквасок бактерій допоможе в розробці нових ферментованих молочних продуктів. Протеолітична система молочнокислих бактерій

(LAB), таких як *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* і *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, вже добре охарактеризована. Ця система складається з протеїнази, пов'язаної з клітинною стінкою, і ряду окремих внутрішньоклітинних пептидаз, включаючи ендопептидази, амінопептидази, трипептидази та дипептидази.

Lactobacillus helveticus, як відомо, володіє високою протеолітичною активністю, викликаючи вивільнення олігопептидів під час перетравлення білків молока. Ці олігопептиди можуть бути прямим джерелом біоактивних пептидів після гідролізу шлунково-кишковими ферментами. Останніми роками було досягнуто швидкого прогресу в з'ясуванні біохімічних і генетичних характеристик цих ферментів. Той факт, що на активність пептидази впливають умови росту, дозволяє до певної міри маніпулювати утворенням пептидів.

За останні кілька років у багатьох статтях і розділах книг розглядалося вивільнення різних біологічно активних пептидів з білків молока через мікробний протеоліз. Більшість цих досліджень повідомляють про виробництво інгібіторів ангіотензин-І-перетворюючого ферменту (АПФ) або антигіпертензивних пептидів, але також були виявлені імуномодулюючі, антиоксидантні та антимікробні пептиди [2].

Було показано, що функціональні пептиди, отримані з казеїну, присутні в молоці або молочних продуктах, впливають на серцево-судинну систему, головним чином через антитромботичні та антигіпертензивні властивості.

Було доведено, що механізми, що беруть участь у згортанні молока, визначеному як взаємодія κ-казеїну з коагуляційним ферментом, і в згортанні крові, визначеному як взаємодія фібриногену з тромбіном, схожі за своєю природою.

Казоплателіни, які є пептидами, отриманими з казеїну, є інгібіторами як агрегації АДФ-активованих тромбоцитів, так і зв'язування g-ланцюга фібриногену людини зі специфічною рецепторною ділянкою на поверхні тромбоцитів. Крім того, фрагмент κ-казеїну f103–111 може запобігати згортанню крові через інгібування агрегації тромбоцитів.

Нещодавно повідомлялося, що κ-казеїноглікопептиди з кількох видів тварин є джерелом антитромботичних пептидів. Було показано, що послідовність амінокислот у f106–171 овечого κ-казеїну, відомого як κ-казеїноглікопептид, зменшує спричинену тромбіном і колагеном агрегацію тромбоцитів залежно від дози [16].

Автори роботи [17] вивчали АПФ-інгібіторну активність пептидів молочної сироватки та казеїнових білків, ферментованих молочнокислими бактеріями та гідролізованих потім травними ферментами; ферментація молочних білків заквасками не виробляла АПФ-інгібіторних пептидів, але наступний гідроліз призвів до АПФ-інгібіторної активності. Ідентифікованими пептидами були α_{s1} -казеїн f142-147, f157-164 і f194-199, β -казеїн f108-113, f177-183 і f193-198, а також два інших із сироваткових білків. Було показано, що два останніх менш активні, ніж пептиди, отримані з казусу; серед них найвищу інгібіторну активність АПФ мали пептиди, отримані з α_{s1} -казеїну.

Існує кілька досліджень щодо α_{s2} -казеїну, на який припадає бл. 10% (масова частка) системи бичачого казеїну через його погану розчинність і складне очищення.

Кілька пептидів, які вже визначені як похідні від бичачого α_{s2} -казеїну, демонструють слабе інгібування АПФ; ці пептиди відповідають f189–193, f189–197, f190–197 і f198–202 [16].

Дослідження [18] щодо триптичного переварювання бичачого α_{s2} -казеїну дозволили виявити кілька казокінінів. Деякі демонстрували значення IC50, близькі до тих, які характеризують найпотужніші пептиди, знайдені в гідролізатах молочного білка: два пептиди, f174–181 і f174–179, мали дуже низькі значення IC50 порівняно з каптоприлом і були інгібіторами АПФ. Те, чи такі пептиди та цілий триптичний гідролізат виникають *in vivo*, потребує подальшого експериментального підтвердження.

Антигіпертензивну активність молока, збагаченого казеїном, неферментованого або ферментованого *L. helveticus*, оцінювали у роботі [19]; у першій ситуації відбулося значне зниження артеріального тиску, тоді як антигіпертензивну активність, виміряну в останньому випадку, можна пояснити вивільненням АПФ-інгібіторних пептидів з казеїнів під час процесу травлення.

Кілька біоактивних пептидів з АПФ-інгібіторною активністю також були знайдені в сирі; на їх появу впливає протеоліз, але лише до певної міри.

На класичних заквасках у поєднанні з *L. acidophilus* та біфідобактеріями виготовлено новий сорт зрілого нежирного сиру «Фестіво».

Такий новий сир має багатофакторний вплив на здоров'я; він містить кілька корисних компонентів, напр. біоактивні пептиди з потенційним антигіпертензивним

ефектом, пробіотики, кон'югована лінолева кислота та біодоступний кальцій. І навпаки, сири, що характеризуються низьким рівнем протеолізу, демонструють низьку здатність інгібувати АПФ.

АПФ-інгібіторні пептиди, отримані з молочних продуктів, не такі потужні, як препарати, які зазвичай використовуються для лікування гіпертонії; однак ті продукти, які мають помірну біоактивність, за своєю суттю (і природно) поведуться як функціональні харчові продукти, тому їх можна легко включити в щоденний раціон [16].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Методи виділення казеїну

У молоці казеїни знаходяться у вигляді казеїнату кальцію. Якщо до свіжого молока при помішуванні додавати слабкий розчин кислоти, то з'являться пластівці казеїну. З додаванням кислоти пластівці збільшуються, а при надлишку кислоти можуть знову розчинитися. При природному скисанні молока чи внесенні бактеріальних заквасок утворюється молочна кислота (продукт бродіння лактози під дією ферментів молочних бактерій). При дії молочної кислоти на казеїнат кальцію утворюється казеїн і лактат кальцію. Молекулярні фракції казеїну, що знаходяться на поверхні казеїнових міцел, стають електрично нейтральними (рН = 4,6). Міцели коагулюють і утворюють згусток. Після усунення фільтруванням згорнутого казеїну залишається фільтрат, в якому є сироваткові білки. При кип'ятінні сироваткові білки денатурують і формують помутніння, а згодом - пластівці. Білки переходять з розчиненого стану в нерозчинний [20, 21]

Схему отримання харчового казеїну наведено в роботі [22]. Автори отримували харчовий казеїн за загальною технологічною схемою, яка відрізняється видом коагулянту, що впливає на вихід казеїну та його якісні показники:

1. Сепарування незбираного молока (температура сепарування 40-45°C).
2. Отримання знежиреного молока з масовою часткою жиру не більше 0,05%.

При жирності знежиреного молока вище 0,05% одержання експортного казеїну практично неможливо: жирність його в цьому випадку перевищує припустимі норми, й ціна на казеїн знижується.

3. Пастеризація знежиреного молока (температура 72±2°C протягом 15-20 сек) та охолодження до температури 30-35°C;

4. Внесення коагулянту. Обробка згустку.

- 4.1. Внесення кислої сироватки з титрованою кислотністю 160 0 Т у знежирене молоко температурою 30-35°C (зразок 1). Сироватку заквашували закваскою FD DVS CH-N 22 фірми Христіан Хансен (це мезофільна культура з кількома змішаними штамми, яка складається з *Lactococcus lactis* підвид *cremoris*, *Lactococcus*

lactis підвид *lactis* і *Leuconostoc mesenteroides* підвид *cremoris* і *Lactococcus lactis* підвид *diacetylactis*). Вимішування пластівців казеїну протягом 10-15 хв. Видалення 60% сироватки. Внесення кислої сироватки до кислотності 62-70 0 Т, перемішування до готовності казеїну (рН 4,5-4,8 од.).

4.2. Внесення комбінації заквасок FD DVS CHN-19 + FD DVS Flora Danica у знежирене молоко температурою 30-35°C (зразок 2). Сквашування відбувалося протягом 8-10 годин. Розрізання на кубики. Нагрівання до температури 60-65°C при постійному вимішуванні зерна протягом 10-15 хв. Збільшувати температуру не можна, оскільки погіршується розчинність казеїну.

4.3. Внесення сичугового ферменту у знежирене молоко температурою 30-32°C (зразок 3). Сквашування знежиреного молока протягом 20 хвилин. Розрізання на кубики. Нагрівання до температури 58-60°C при постійному вимішуванні зерна протягом 10-15 хв.

4.4. Внесення лабораторної закваски «Симбітер концентрований» (4% від об'єму знежиреного молока) (закваска складається з *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, число штамів у пробіотику – 14, концентрація клітин 10¹², КУО/дозі) (зразок 4). Флакони (дозу) вносили у знежирене молоко (250 см³) температурою 30-35°C, ретельно перемішували. Сквашування відбувалося протягом 4-6 годин при температурі 30-35°C. Розрізання на кубики. Нагрівання до температури 40-48°C при постійному вимішуванні зерна протягом 25-30 хв.

5. Видалення сироватки.

6. Промивання пластівців (зерна) казеїну пастеризованою та охолодженою водою 3 рази по 10 хвилин.

7. Пресування зерна до вологовмісту 150-170%.

8. Гранулювання казеїну.

9. Сушіння (в завислому шарі, в нерухомому шарі, у вакуум-сушарці) [22].

Для виділення нативних міцел казеїну авторами роботи [23] було використано принцип термодинамічної несумісності в системі «вода–білок–кислий полісахарид» та встановлені раніше оптимальні співвідношення і концентрації компонентів систем. Виділення казеїнових міцел проводили в дві стадії. На першій стадії проводили змішування знежиреного молока з 6,5 % розчином пектину. Компоненти були попередньо охолоджені до 7 °С. Отриману суміш перемішували протягом 10 хв і переливали в ділильну лійку.

Друга стадія процесу передбачала розділення фаз отриманої двофазної системи, яке відбувалось шляхом відстоювання суміші молока і пектину протягом двох годин при 4 °С. Після утворення фаз їх відділяли за допомогою ділильної лійки, об'єднували аналогічні фази [23].

Виділення з молока казеїну сичужним ферментом описано в роботі [20]. Сичужне зсідання білків відбувається у 2 стадії: ферментативну і коагуляційну. На першій стадії під дією сичужного ферменту, який містить дві кислі протеїнази - хімотрипсин і пепсин, відбувається розрив пептидного зв'язку між 105 і 106 залишками амінокислот – фенілаланіном і метіоніном – у ланцюгу χ -фракції казеїну. χ -фракція розташована на поверхні казеїнових міцел. У результаті протеолізу молекула фракції розпадається на дві частини: гідрофобний параказеїн і гідрофільний глікомакропептид.

Глікомакропептид має високий негативний заряд і володіє сильними гідрофільними властивостями. При відщепленні глікомакропептидів дзета- 33 потенціал поверхні казеїнових міцел знижується приблизно наполовину і руйнується гідратна оболонка. Таким чином, знижуються сили електричного відштовхування і дисперсна система втрачає стабільність. Частинки коагулюють з створенням згустку [20].

Вважаємо за доцільне також згадати про сучасні методи кільнісного визначення казеїнів. У дослідженні [24] авторами було розроблено імуносенсор із локалізованим поверхневим плазмонним резонансом (LSPR) на основі субстрату із наночастинок із золотим покриттям для виявлення казеїну.

Виготовлення підкладки із наночастинок із золотим покриттям передбачало шар наночастинок кремнезему з модифікованою поверхнею (ядро) на скляній підкладці між нижнім і верхнім шарами золота (оболонкою). Пік поглинання підкладки із наночастинок із золотою кришкою спостерігався при 520 нм. Крім того, зображення атомно-силової мікроскопії (АСМ) показали, що наночастинки утворюють моношар на предметному склі. Після іммобілізації антитіл проти казеїну на поверхні пристрою, казеїновий імуносенсор, можна легко застосувати для виявлення казеїну в зразку сирого молока без складної попередньої обробки. За оптимальних умов межа виявлення казеїнового імуносенсора була визначена як 10 нг/мл.

Аналітичний діапазон і чутливість казеїнового імуносенсора досліджували шляхом вимірювання різних концентрацій казеїну від 0 до 100 мг/мл. У результаті

встановлено залежності приростів інтенсивності поглинання від концентрації казеїну в молоці. За оптимальних умов було розраховано межу виявлення 10 нг/мл для казеїну.

Крім того, два інших основних алергенних білка в молоці (α -лактальбумін і β -лактоглобулін) мали незначний вплив на антитіла, іммобілізовані на пристроях. Коли надмірна кількість 100 мг/мл α -лактальбуміну та β -лактоглобуліну піддавалася впливу казеїнового імуносенсора, в обох випадках не спостерігалось змін абсорбції.

Завдяки високій точності метод із застосуванням казеїнового імуносенсора на основі субстрату наночастинок із золотою кришкою є перспективним кандидатом для недорогого та високочутливого кількісного визначення аналітів у простому та швидкому форматі [24].

2.2 Методи аналізу біологічної активності

Було розроблено численні методи *in vitro* для виявлення функціональності біоактивних пептидів, отриманих з молочного білка, та їх потенційних ефектів.

Ці методи засновані на прямій взаємодії з реакційноздатними молекулами та реакційній здатності з іонами металів (антиоксидантні пептиди). У кожній ситуації вплив контролюється фізико-хімічним аналізом.

Інгібіторну активність АПФ вимірюють через абсорбцію гіпурової кислоти після реакції зразків гідролізату на гіпурил-гістидил-лейцин. Кількість гіпурової кислоти, утвореної АПФ, вимірюють спектрофотометрично при 228 нм за допомогою спектрофотометра УФ-видимого діапазону. Інгібіторну активність АПФ розраховують і виражають через IC_{50} , що визначається як концентрація білка, яка необхідна в зразку для інгібування АПФ на 50% [25].

Обернено-фазова вискоелективна рідинна хроматографія (ОФ-ВЕРХ) є іншим методом, який використовується лише для скринінгу, щоб відкинути неактивні фракції, отримані після другого фракціонування; у цьому випадку відсоток інгібування АПФ можна розрахувати за допомогою гіпурової кислоти, вивільненої АПФ, і виміряти за допомогою ОФ-ВЕРХ. Поглинання контролюють при 228 нм, а інгібіторну активність АПФ розраховують згідно з рівнянням (1). Відсоток інгібування АПФ виражається на 0,1 мг білка у фракціях.

$$\% \text{ АПФ інгібіторної активності} = \frac{1\text{HA}_{control} - \text{HA}_{sample}}{\text{HA}_{control}} \cdot 100 \quad (1)$$

Визначення АПФ є дуже важливим, оскільки воно є частим тестом для оцінки антигіпертензивних препаратів шляхом інгібування ангіотензину, який викликає підвищення тиску в організмі.

З іншого боку, було розроблено різноманітні методи *in vitro* для виявлення антиоксидантів на основі різних антиоксидантних механізмів у змінних умовах, що відображає багатофункціональні властивості антиоксидантів як у фізіологічних, так і в харчових процесах антиоксидантного захисту. Методи засновані на прямій взаємодії з реакційноздатними молекулами або їх реакційній здатності з іонами металів і ефектах, що відстежуються за допомогою хімічних вимірювань (огляд див. Pihlanto, 2006).

Процеси антиоксидантної активності вимірювали за допомогою трьох функцій пептидів: антиоксидантної здатності, відновної здатності та металохелатуючої активності. Наприклад, антиоксидантну здатність можна визначити через пероксильний радикал пептиду, використовуючи аналіз здатності поглинання кисневих радикалів, заснований на гасінні флуоресценції білка b-фікоеритрину радикалами з використанням методу описаного в роботі [26]. Кінцеві результати розраховуються на основі різниці в площі під кривою загасання флуоресценції між холостою пробою та кожним зразком. Відновна здатність пептиду визначається через його здатність відновлювати такий метал, як Cu^{2+} , до Cu^{+} відповідно до методу [27].

Металохелатну активність визначають за методом [28]. Металохелатну активність досліджуваного зразка щодо іонів заліза розраховують за наступною формулою (2):

$$\text{Активність хелатування металів, \%} = \frac{A_0 - A_a}{A_0} \cdot 100 \quad (2)$$

де A_0 – абсорбція контролю, а A_1 – абсорбція зразка.

Деякий інший метод аналізу антиоксидантної активності пептидів базується на оцінці здатності інгібувати або зупиняти окислення ліпідів у модельних системах. Тест вимірює зміни в концентрації сполук, що окислюються, при виснаженні кисню або при утворенні продуктів окислення. Кількісна оцінка втрати реагентів (кисню, ненасичених жирних кислот), утворення вільних радикалів і утворення продуктів окислення може бути найбільш прийнятним маркером залежно від стадії окислення

[29]. Зниження кисню та детектування радикалів за допомогою спектроскопії електронного спінового резонансу, прямо чи опосередковано за допомогою спінового захоплення, можна використовувати для спостереження за початковими етапами під час окислення.

Крім того, антиоксидантна здатність пептиду аналізується за допомогою синтетичних пептидів за співвідношенням структура-функція між амінокислотними послідовностями. Показано, що пептиди інгібують ферментативне та неферментативне перекисне окислення ліпідів, швидше за все, будучи кращою мішенню над вільними радикалами жирних кислот. Непрямі докази свідчать про те, що білки/пептиди можуть окислюватися під час процесу відповідно до механізму, що залежить від сайту або послідовності [29].

Антимікробна активність є ще однією важливою властивістю біопептидів з молока. Цю властивість автори роботи [30] ідентифікували *in vitro* за допомогою тестів, які складаються з аналізу антимікробних пептидів, що діють проти різних грам-позитивних і грамнегативних бактерій (*Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* і *Staphylococcus*), дріжджів і нитчастих грибів.

Крім того, загальні тести концентрації білка, такі як електрофорез у додецилсульфаті натрію в поліакриламідному гелі (SDS-PAGE), використовувалися для оцінки профілю білка після кожного етапу гідролізу

У всіх експериментальних роботах, розглянутих для отримання пептидів з молока, вони застосовували та розробляли хімічні та біологічні методи для скринінгу біологічно активних пептидів, які могли б сприяти різному впливу на здоров'я. Однак Піхланто (2006) вказує на те, що в більшості методів, які використовуються для виявлення антиоксидантних пептидів, результати активності виражаються різними способами, що ускладнює порівняння. Крім того, загалом основна проблема, пов'язана з використанням цих хімічних аналітичних методів, полягає в тому, що вони проводяться в нефізіологічних умовах. Відповідно до цього результати не можна екстраполювати на ситуацію *in vivo*. Крім того, ймовірно, необхідні більш ретельні механістичні дослідження, щоб виявити невеликі зміни у факторах, що впливають на функцію пептидів *in vitro*, щоб зрозуміти їх вплив також *in vivo*.

У цьому контексті необхідно розробити методи *in vitro* для виявлення властивостей пептидів, які можуть мати потенційну користь *in vivo* [31].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Існуючі методи виділення казеїну та їх аналіз

Основні молочні білки, казеїн і сироватковий білок, можна виділити шляхом зміни їх складу та фізичних властивостей, а потім за допомогою різних технологій розділення для відновлення білків. Крім того, їх можна обробляти різними способами для створення широкого спектру інгредієнтів із різними функціональними характеристиками. Ці інгредієнти включають концентрат молочного білка, ізолят молочного білка, казеїн, казеїнат, концентрат сироваткового білка, ізолят сироваткового білка, гідролізати та різні молочні фракції. У межах кожної з цих категорій інгредієнтів існує подальша диференціація відповідно до функціональних і поживних вимог готової їжі [1].

Завдяки прогресу в технологіях фільтрації міцелярні казеїни та молочні сироваткові білки тепер виробляються зі знежиреного молока за допомогою мікрофільтрації. Мікрофільтровані інгредієнти пропонують унікальні функціональні та поживні переваги, які можна використати при розробці нових продуктів. Мікрофільтрація є багатообіцяючою у сироварінні, де мікрофільтроване молоко можна використовувати для стандартизації білка, щоб покращити вихід і консистенцію сиру та збільшити продуктивність.

Концентрати міцелярного казеїну та протеїни молочної сироватки можуть запропонувати унікальні функціональні та смакові властивості в різних харчових продуктах.

У молочному виробництві використовуються чотири основні мембранні процеси, керовані тиском. Залежно від розміру пор і граничної молекулярної маси процес розділення можна класифікувати як MF, UF, нанофільтрацію та RO.

Мікрофільтрація має найбільший розмір пор (0,1–10 мкм) і найнижчий тиск обробки (0,01–0,2 МПа) і спочатку була запроваджена в молочній промисловості як попередня обробка для зменшення мікробного навантаження (Pouliot, 2008). Оскільки MF охоплює широкий діапазон розмірів пор, він може розділяти різні макромолекули залежно від розміру частинок. Коли використовується мембрана MF 1,4

мкм, як бактерії (10–100 мкм), так і великі кульки молочного жиру (10 мкм) відторгаються мембраною (називається ретентатом), а також міцелярний казеїн (50–500 нм) і білки сироватки (3–6 нм), лактоза (1 нм), мінерали та вода проникають через мембрану (називається пермеатом). Коли мембрана MF 0,1 мкм використовується зі знежиреним молоком, міцели казеїну зберігаються, а протеїн молочної сироватки або сироватковий білок проходить через мембрану, ефективно створюючи міцелярний казеїновий концентрат (МКК) і молочний сироватковий білок. Ультрафільтрація передує МФ у молочній промисловості та широко використовується у виробництві концентрованих молочних білків і молока для виробництва сиру. Ультрафільтраційні мембрани мають розмір пор від 10 до 100 нм з тиском обробки від 0,1 до 1,0 МПа.

Під час ультрафільтрації знежиреного молока лактоза, мінеральні речовини та вода розподіляються в пермеат, а білки та жир – у ретентат. Такий розподіл компонентів дає насичений протеїном ретентат і насичений вуглеводами та мінералами пермеат. Зворотний осмос є методом концентрації, тому має менший розмір пор (<1 нм) вищий тиск обробки (3,0–5,0 МПа). Нанофільтрація – це «вільний» RO з розміром пор від 1 до 10 нм і нижчим тиском обробки від 1,5 до 3,0 МПа [32].

Це метод фракціонування, який відкидає компоненти, крім води та одновалентних солей. Мембранна технологія передбачає кілька варіантів переробки молочної продукції. Мембранні матеріали можуть бути полімерами (ацетат целюлози, полісульфон/поліефірсульфон, поліамід, полівініліденфторид і поліпропілен) або неорганічними матеріалами (кераміка, метал). Бажана більш гідрофільна та негативно заряджена мембрана, щоб уникнути білкового забруднення.

Крім розгляду вибору матеріалу, вартість встановлення та експлуатації часто визначає вибір мембрани. Капітальні інвестиції в полімерні мембрани становлять одну десяту, ніж у керамічних мембран, а керамічні мембрани мають ширший діапазон рН і температур і довший термін служби (принаймні 10 років у порівнянні з 0,5 року для полімерної мембрани [33]). Як правило, у молочних продуктах поліамід використовується для RO, полівініліденфторид і поліпропілен для MF і UF, а кераміка для MF. Мембранна технологія також передбачає кілька модулів для розміщення мембран. Полімерні мембрани зазвичай розміщуються в пластинчасто-каркасних, спіральні намотаних і порожнистих волоконних модулях, а неорганічні мембрани мають власний модуль трубчастої конструкції.

Вибір мембран – це баланс між цільовими продуктами, сировиною, ефективністю обробки та витратами на встановлення, експлуатацію та обслуговування.

Мембранні матеріали також відрізняються за способом і ефективністю поділу. Керамічні мембрани MF розроблені для високої швидкості поперечного потоку при збереженні низького трансмембранного тиску. Це забезпечує стабільність проходження пермеату по всій довжині мембрани та запобігає значному забрудненню з високою швидкістю проходження пермеату [34]. Рівномірний трансмембранний тиск забезпечує максимальне проходження пермеату і досягається за допомогою додаткового насоса для рециркуляції пермеату, вирівнюючи трансмембранний тиск. Керамічні мембрани мають дуже рівномірний розподіл розмірів пор, що дозволяє розділяти молекули за розміром. З іншого боку, полімерні мембрани утворюють забруднюючий або концентраційний поляризаційний шар, який насправді диктує поділ, а не заявлену межу молекулярної маси. Залежно від конструкції системи полімерні системи можуть мати несприятливі умови обробки високого трансмембранного тиску та низької швидкості поперечного потоку, що призводить до нижчої продуктивності та меншої ефективності розділення порівняно з оптимізованими керамічними системами [35].

Методи виділення та очищення казеїнів були розглянуті авторами роботи [36]. У молочній харчовій промисловості великий інтерес був спрямований на розділення та збагачення β -CN, казеїну, казеїнового глікомакропептиду та казеїнового фосфопептиду, які мають потенційне застосування у функціональних харчових продуктах.

β -CN. Було запропоновано як іонообмінний, так і мембранний процеси для отримання фракцій, збагачених β -CN. Мембранні процеси видаються кращими, оскільки вони можуть використовувати переваги розчинення β -CN з казеїнової міцели за низьких температур або чутливості β -CN до кальцію.

Автори роботи [37] виготовили збагачені фракції за допомогою низькотемпературної ультрафільтрації. Отриманий продукт містив близько 80% β -CN, а γ -CN (пептиди, похідні від β -CN) були основними забруднювачами. Можна використовувати додавання кальцію з мікрофільтрацією для приготування фракції, збагаченої β -CN, з казеїнату натрію. Потенційне застосування включає покращену функціональність у порівнянні з казеїнатом натрію в деяких застосуваннях [1].

Казеїновий фосфопептид. Ферментний гідроліз казеїну з наступним або іонним обміном або концентрацією через мембрану був використаний для виробництва матеріалів, збагачених фосфопептидом казеїну, які допомагають запобігти карієсу зубів і покращити біодоступність мінералів. Комерційно доступні продукти містять ~15% фосфопептиду казеїну та 86% білка з молекулярною масою <500 Да.

Глікомакропептид казеїну. Під час виробництва сиру дія хімозину на κ -CN вивільняє глікомакропептид (GMP), який можна відновити з сирної сироватки. GMP становить приблизно від 10 до 20% від загальної кількості білків у сироватці. Широкомасштабне відновлення та заявлені функціональні можливості GMP були розглянуті [38]. Один із процесів відновлення GMP із сирної сироватки використовує комбінацію методів розділення. У цьому процесі сироватка освітлюється мікрофільтрацією, пептидна фракція адсорбується на сильній основній аніонообмінній смолі, десорбується розведеним хлоридом натрію (2%), знесолюється та концентрується ультрафільтрацією з подальшим висушуванням. Процедура забезпечує продукт із 70-80% GMP [1].

Важливо зазначити, що у відомих на сьогодні методах виділення казеїнів мало приділяється увага збереженню їх структури і нативних властивостей, що може вплинути на специфічність протеолізу даних білків і біологічну активність продуктів їх розщеплення.

Казеїнові міцели у лабораторних умовах для моделювання різних біологічних і ферментативних процесів одержували в основному методами ультрацентрифування, ультрафільтрації або гель-фільтрації.

Ультрацентрифування є досить складним, трудомістким і дорогим способом виділення міцел казеїну. До того ж при цьому частково можна втратити фракцію малих міцел. Гель-фільтрація на таких матрицях як сефароза, пористе скло завжди викликає зміни співвідношення фракцій і втрату деяких білкових субодиниць та низькомолекулярних компонентів казеїнових міцел. При застосуванні ультрафільтрації близько 20 % білків молока може денатурувати, а також утворюються агрегати казеїну з білками сироватки молока.

З врахуванням цього, на думку авторів роботи [23], для виділення нативних міцел казеїну перспективним може бути використання принципу термодинамічної несумісності в системі «вода–білок–полісахарид». У системі, що включає воду, білки знежиреного молока і пектин, є дві групи білків, одна з яких (казеїни)

відповідає умовам несумісності, а друга група (білки сироватки молока) – не відповідає. Білки сироватки молока не здатні до самоасоціації при природних значеннях рН. Тому можна сподіватися, що в системі «вода–білки молока–пектин» за рахунок розшарування і утворення двох фаз можна отримати фазу, яка буде включати міцели казеїну. Оскільки такий процес відбувається за нативних умов (рН 6,7) без використання дезагрегуючих факторів, то можна сподіватися, що отримані казеїнові міцели за своїм складом і властивостями будуть подібні до міцел, які є в нативному молоці [23].

3.2 Основні вимоги при отриманні казеїну

Казеїни отримують або коагуляцією сичужним ферментом, або ізоелектричним осадженням кислотою. Кислота може бути або мінеральною або молочною кислотою. Останній, як правило, виробляється шляхом додавання молочнокислих заквасок. Модифікація властивостей казеїну залежить від використовуваного коагулянту.

Спеціальні підходи до зневоднення, варіння та миття також можуть вплинути на функціональність казеїну. Сичужний казеїн використовується як ϵ , тоді як більшість кислих казеїнів перетворюються на сольову форму (казеїнат). Луг (натрій, кальцій або калій) змішують з казеїном, щоб довести рН вище 6,5, а потім продукт сушать.

Сичужний казеїн використовується в основному в аналогах сиру, в яких він забезпечує твердість, розтяжність, здатність до подрібнення, емульгування та плавлення.

Казеїнати термостабільні та кислоточутливі. Казеїнати мають різні склади та функціональні можливості, які залежать від виробничих специфікацій. Таким чином, вони відрізняються за формою солі, в'язкістю, властивостями емульгування, аерацією, непрозорістю, здатністю до диспергування та стійкістю до спирту.

Казеїнати натрію та калію розчинні при нейтральному рН, мають хороші емульгуючі та аераційні властивості та забезпечують стабільність при заморожуванні та розморожуванні харчових продуктів, у яких вони використовуються. При концентраціях $>10\%$ вони утворюють дуже в'язкі розчини. Основні сфери застосу-

вання включають порошкоподібні напої, стерилізовані або асептичні рідини, відбілювачі кави, збиті начинки, а також застосування для м'яса та птиці. Окрім використання в харчових продуктах, казеїнат натрію також використовується у виробництві паперу та як клей.

Казеїнат кальцію має певну схожість з казеїнатом натрію, але має ширший спектр застосування завдяки його здатності до диспергування, низькій в'язкості, непрозорості, емульгуванню та стабільності в реторті. Казеїнат кальцію використовується в порошкових напоях, рідинах в реторті, дієтичних батончиках, супах, випічці, кондитерських виробках і десертах [1].

ВИСНОВКИ

1. Казеїни – білки молока та молозива, що складають приблизно 80% від загальної кількості протеїнів. Білки казеїну, включаючи чотири класи, а саме κ -, β -, α_{S1} - та α_{S2} -казеїни, зібрані в структуру, яка називається міцелами казеїну. У різних видів ссавців казеїни зазнали кількох еволюційних модифікацій своїх первинних послідовностей і посттрансляційних модифікацій шляхом фосфорилування та глікозилування, викликаючи загальну зміну їхніх структурних і функціональних властивостей.
2. Функціональні пептиди, отримані з казеїну, присутні в молоці або молочних продуктах, впливають на серцево-судинну систему, головним чином через антитромботичні та антигіпертензивні властивості. Виробництво біологічно активних пептидів з використанням мікробних джерел, заквасок і незаквасок бактерій допоможе в розробці нових ферментованих молочних продуктів.
3. Розглянуто промислову схему отримання казеїнів коагуляцією сичужним ферментом та ізоелектричним осадженням кислотою.
4. Охарактеризовано численні методи *in vitro* для виявлення функціональності біоактивних пептидів, отриманих з молочного білка, та їх потенційних ефектів.
5. Завдяки прогресу в технологіях фільтрації міцелярні казеїни та молочні сироваткові білки наразі виробляються зі знежиреного молока за допомогою мікрофільтрації та використання мембранних матеріалів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Huffman, L. M., & James Harper, W. (1999). Maximizing the Value of Milk Through Separation Technologies. *Journal of Dairy Science*, 82(10), 2238–2244.
2. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2007). Technological Options for the Production of Health-Promoting Proteins and Peptides Derived from Milk and Colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 829–843.
3. Машкін М. І., Париш Н. М. Технологія молока і молочних продуктів: Навчальне видання. — К.: Вища освіта, 2006. — 351 с.: іл.
4. Runthala, Ashish, Mustapha Mbye, Mutamed Ayyash, Yajun Xu, and Afaf Kamal-Eldin. (2023). Caseins: Versatility of Their Micellar Organization in Relation to the Functional and Nutritional Properties of Milk. *Molecules* 28(5).
5. Madende, M., Osthoff, G., Patterton, H.-G., Patterton, H. E., Martin, P., & Opperman, D. J. (2015). Characterization of casein and alpha lactalbumin of African elephant (*Loxodonta africana*) milk. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8308–8318.
6. Hassanin AA, Osman A, Atallah OO, El-Saadony MT, Abdelnour SA, Taha HSA, Awad MF, Elkashef H, Ahmed AE, Abd El-Rahim I, Mohamed A and Eldomiaty AS (2022) Phylogenetic comparative analysis: Chemical and biological features of caseins (alpha-S-1, alpha-S-2, beta and kappa-) in domestic dairy animals. *Front. Vet. Sci.* 9:952319.
7. Holt, C., Carver, J. A., Ecroyd, H., & Thorn, D. C. (2013). Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods¹. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6127–6146.
8. Huppertz, T., I. Gazi, H. Luyten, H. Nieuwenhuijse, A. Alting, and E. Schokker. 2017. Hydration of casein micelles and caseinates: Implications for casein micelle structure. *Int. Dairy J.* 74:1–11.
9. Dalglish, D. G., and M. Corredig. 2012. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 3:449–467.
10. Dalglish, D. G., M. Alexander, and M. Corredig. 2004. Studies of the acid gelation of milk using ultrasonic spectroscopy and diffusing wave spectroscopy. *Food Hydrocoll.* 18:747–755.

11. Lucey, J. A., M. Tamehana, H. Singh, and P. A. Munro. 1998. Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *J. Dairy Res.* 65:555–567.
12. Donato, L., M. Alexander, and D. G. Dalgleish. 2007. Acid gelation in heated and unheated milks: Interactions between serum protein complexes and the surfaces of casein micelles. *J. Agric. Food Chem.* 55:4160–4168.
13. Kethireddipalli, P., A. R. Hill, and D. G. Dalgleish. 2011. Interaction between casein micelles and whey protein/ κ -casein complexes during renneting of heat-treated reconstituted skim milk powder and casein micelle/serum mixtures. *J. Agric. Food Chem.* 59:1442–1448.
14. Gazi, I., and T. Huppertz. 2015. Influence of protein content and storage conditions on the solubility of caseins and whey proteins in milk protein concentrates. *Int. Dairy J.* 46:22–30.
15. Nöbel, S., K. Weidendorfer, and J. Hinrichs. 2012. Apparent voluminosity of casein micelles determined by rheometry. *J. Colloid Interface Sci.* 386:174–180.
16. Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15(1), 1–15.
17. Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., & Korhonen, H. (1998). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8(4), 325–331.
18. Tauzin, J., Miclo, L., & Gaillard, J.-L. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α 2-casein. *FEBS Letters*, 531(2), 369–374.
19. Leclerc, P. L., Gauthier, S. F., Bachelard, H., Sature, M., & Roy, D. (2002). Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 12(12), 995–1004.
20. Шевчук Т. В., Огороднічук Г.М. Біохімія молока і молочних продуктів: Навчальний посібник. - Вінниця: ОЦ ВНАУ, 2010. – 88 с.
21. Лабораторний практикум з хімії і фізики молока і молочних продуктів / Укладачі: В.П. Ясній, Т.А. Довбуш. – Тернопіль : Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, 2018. – 182 с.
22. Скрипніченко Д.М., Котляр Є.О., Галкіна Д.В., Панфілов М.О., Куделько С.Ю. (2019). Дослідження способів отримання та сушіння харчового казеїну. *Вчені*

записки ТНУ імені В.І. Вернадського. Серія: технічні науки, 30 (69) Ч. 2 № 2, 176 – 181.

23. Сторож Л. А., Юкало А. В. (2011). Електронна мікроскопія нативних казеїнових міцел, Біологія тварин, 13(1-2), 436-440.
24. Нєр, Н. М., Endo, Т., Kerman, К., Chikae, М., Kim, D.-К., Yamamura, S., ... Tamiya, E. (2007). A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk. *Science and Technology of Advanced Materials*, 8(4), 331–338.
25. Mao XY, Ni JR, Sun LW, Hao PP and Fan L (2007). Valueadded utilization of yak milk casein for the production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Chemistry* 103(4): 1282–1287.
26. Cao G, Sofic E and Prior R (1997). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* 22(5): 749–760.
27. Aruoma OI, Deiana M, Jenner A, Halliwell B, Kaur H and Banni S (1998). Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on lowdensity lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 46(2): 5181–5187.
28. Decker EA and Welch B (1990). Role of ferritine as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 38(3): 674–677.
29. Pihlanto A (2006). Review: antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal* 16(11): 1306–1314.
30. FitzGerald RJ and Murray BA (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology* 59(2): 118–125.
31. Muro Urista, C., Álvarez Fernández, R., Riera Rodriguez, F., Arana Cuenca, A., & Téllez Jurado, A. (2011). Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, 17(4), 293–317.
32. Smith, K. 2013. Development of membrane processes. Pages 1–9 in *Membrane Processing: Dairy and Beverage Application*. A. Y. Tamime, ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
33. Gitis, V., and G. Rothenberg. 2016. *Ceramic Membranes: New Opportunities and Practical Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

34. Karasu, K., Glennon, N., Lawrence, N. D., Stevens, G. W., O'connor, A. J., Barber, A. R., Kentish, S. E. (2010). A comparison between ceramic and polymeric membrane systems for casein concentrate manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 63(2), 284–289.
35. B. G. Carter, N. Cheng, R. Kapoor, G. H. Meletharayil, and M. A. Drake (2021). Invited review: Microfiltration-derived casein and whey proteins from milk. *J. Dairy Sci.* 104:2465–2479
36. Idolo-Imafidon, G., N. Y. Farkye, and A. M. Spanier. 1997. Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37:663–689.
37. Murphy, J. M., and P. F. Fox. 1991. Fractionation of sodium caseinate by ultrafiltration. *Food Chem.* 39:27–38.
38. Abd-El-Salam, M. H., S. El-Shibiny, and W. Buchheim. 1996. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *Int. Dairy J.* 6:327–341.

Додаток А

Таблиця А.1 Концентрація, молекулярна маса та потенційні біологічні функції основних білків бичачого молозива та молока [2].

Білок	Концентрація (г/л)		Молекулярна маса, Дальтон	Біологічні функції
	Молозиво	Молоко		
Казеїни (κ-, β-, α _{S1} - та α _{S2} -казеїни)	26	28	14000-20000	Іонний носій (Ca, PO ₄ , Fe, Zn, Cu), попередник біоактивних пептидів, імуномодулятор
β-лактоглобулін	8,0	3,3	18400	Носій ретинолу, потенційний антиоксидант, попередник біоактивних пептидів, зв'язує жирні кислоти
α-лактоглобулін	3,0	1,2	14200	Синтез лактози в молочній залозі, носій Ca, імуномодулятор, попередник біоактивних пептидів, антиканцерогенний
Імуноглобуліни	20-150	0,5-1,0	150000-1000000	Специфічний імунний захист (антитіла та система комплементу), потенційний попередник біоактивних пептидів
Глікомакропептид	2,5	1,2	8000	Протимікробний, антитромботичний, біфідогенний, шлунковий регулятор
Лактоферин	1,5	0,1	80000	Антимікробний, антиоксидантний, антиканцерогенний, проти-запальний, транспорт заліза, регуляція росту клітин, попередник біоактивних пептидів, імуномодулятор

Продовження таблиці А.1

Білок	Концентрація (г/л)		Молекулярна маса, Дальтон	Біологічні функції
	Молозиво	Мо-локо		
Лактопероксидаза	0,02	0,03	78000	Протимікробну, синергетичну дію з імуноглобулінами та лактоферином
Лізоцим	0,0004	0,0004	14000	Протимікробну, синергетичну дію з імуноглобулінами та лактоферином
Сироватковий альбумін	1,3	0,3	66300	Попередник біоактивних пептидів
Протеозо-пептони	не оголошено	0,8	4000-40000	Потенційний мінеральний носій