

## РОЗРОБЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ СУМІШІ АМІНОКИСЛОТ З МОЛОЧНОЇ СИРОВАТКИ

ã Сидоров Ю.І., Познанська С.А., Новіков В.П., 2008

Проведено дослідження за визначенням оптимальних режимів гідролізу білків молочної сироватки у присутності ферментного препарату "Папаїн PSM 400". Встановлено, що оптимальна температура процесу повинна бути в межах 50–55°C, середовище нейтральне або слабкокислое, час проведення гідролізу – 8–16 годин, масове співвідношення папаїн/білок – 1,2 %. Ступінь гідролізу при цьому сягає 75–85 %. Дослідженнями підтвердилося, що за гідролізу білків молочної сироватки ферментним препаратом "Папаїн PSM 400" можна одержати суміш біологічно активних амінокислот з повноцінним співвідношенням компонентів.

Researches on determination of the optimum modes of hydrolysis of albumens of milk whey in presence the enzymic preparation «Papain PSM 400» are conducted. It is set, that the optimum temperature of process must be within the limits of 50-55°C, an environment is neutral or is weak sour, time of conducting of hydrolysis – 8-16 hours, mass correlation of papain/belok – 1,2 %. The degree of hydrolysis here arrives at 75-85 %. It was confirmed by researches, that at the hydrolysis of albumens of milk whey by the enzymic preparation "Papain PSM 400" it is possible to get a mixture biologically active amino acid with valuable correlation of components.

**Постановка проблеми та її зв'язок з науковими та практичними завданнями.** Молочна сироватка є побічним продуктом у виробництві сирів і казеїну. Сироватки містять цінну лактозу, яка уповільнює процеси бродіння у шлунку і у той самий час якнайменше використовується організмом для жирутворення. Вона містить білки, які містять більше незамінних амінокислот, ніж казеїн, тобто є ціннішими. Склад білків молочної сироватки більше відповідає складу білків жіночого молока, ніж склад коров'ячого молока, що дає змогу використовувати білки молочної сироватки у виробництві дитячих молочних продуктів.

Але сироватка містить велику кількість води (93,7 %). Це значно обмежує її використання. Більшу частину цього продукту зливають в каналізацію, намагаються переробити на біогаз, але на багатьох підприємствах сироватку піддають різній обробці з метою виділення окремих компонентів (жир, білки, лактозу) або підвищити в ній вміст сухих речовин чи просто висушити. Оскільки в Україні молочну сироватку в подальшому фактично не обробляють, крім знежирення перед зливанням у каналізацію разом з цінними білками, то проблема розроблення технології глибокого перероблення сироватки є дуже актуальною.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** За останні роки здійснено багато заходів, скерованих на поліпшення використання молочної сироватки. В період 1971–1980 рр. організоване виробництво понад 20 різних продуктів з молочної сироватки – суха і згущена сироватка, новий вид молочного цукру, збагачена, білкова і сирна маса, суха гомогенізуюча добавка (СГД). Молочну сироватку у великій кількості використовують як цінну добавку до кормів сільськогосподарських тварин. За останні роки розроблено технологію і накопичено практичний досвід виробництва концентратів в сухому і згущеному вигляді. З молочної сироватки одержують також молочний цукор і сироваткові білки.

Збагачена біологічно активними речовинами молочна сироватка застосовується з метою профілактики шлунково-кишкових захворювань молодняка сільськогосподарських тварин. Молочна збагачена сироватка готується з натуральної підсирної сироватки з додаванням знежиреного молока у вигляді закваски ацидофільних культур з подальшою ферментацією.

І нарешті з сироватки можна приготувати просто напої, і в деяких регіонах вони є найпопулярнішими [1]. Сироватку можна просто висушити і одержати цінний харчовий продукт. Але на сушіння потрібно витратити величезну кількість тепла, тому сьогодні найперспективнішим процесом перероблення молочної сироватки є ультрафільтрування, за допомогою якого можна сконцентрувати білки [2]. Розроблені УФ-технології дають змогу одержувати концентрати з вмістом білка від 30 до 95 %. Під час концентрування відбувається також відділення розчину лактози і солей. У 1983 році у світі було продано УФ-установок для молочної промисловості з сумарною поверхнею фільтрування близько 100 тис. м<sup>2</sup>, у тому числі для сироватки 80 тис. м<sup>2</sup> і 19 тис. м<sup>2</sup> для молока. У середині 1990-х років для ультрафільтрування у молочній промисловості за рік вже продавалось близько 230 тис. м<sup>2</sup> мембран на суму 50 млн. доларів.

І все таки білок не можна вважати кінцевим продуктом перероблення молочної сироватки. Існує можливість ще глибшої конверсії цього відходу, а саме – одержання з білка суміші вільних амінокислот, які можна використовувати для дієтичного і лікувального харчування. На ринку можна знайти, наприклад, такі препарати:

- NIGHT REGENERATION (збалансована суміш амінокислот і пептидів з високим вмістом L-аргініну і L-орнітину);

- Whey Amino 3000, Amino 2300 MLO, Amino 2000 (суміші амінокислот для росту і підтримки м'язової маси);

- AMINO FORMULA 2000 + (одна з найбільш діючих амінокислотних формул на ринку спортивного харчування);

- Вітамікст-Р (суміш трьох амінокислот, що містить глутамін, аланін, аспарагінову кислоту; нейтралізує токсичні продукти обміну, які гальмують синтез дофаміну тощо; використовують для відновлення нервових клітин);

- Глюкаприм-Р (суміш амінокислот з підвищеним гліцину, треоніну та інших; гліцин є головним гальмовним медіатором у клітинах мозку, у комбінації з іншими амінокислотами видаляє в ньому надлишок кальцію).

У магазині спортивного харчування “Віта-спорт” (м. Київ) вже зараз можна купити комплекс амінокислот “Amino whey”, одержаних з гідролізованого сироваткового протеїну (325 таблеток за ціною 230 грн). Ці ж кислоти продають також у вигляді розчину. У продажу також є ізоляти сироваткового протеїну “Perfect whey” і “Zero carb Isopure”, які вільні від жирів і вуглеводів. Усі ці продукти одержують за патентованою технологією ультра- і мікрофільтрування. Список можна продовжити, але в ньому ми не знайдемо препаратів вітчизняного виробництва. Отже, власне виробництво чистих індивідуальних амінокислот або їх сумішей є актуальним науково-технічним завданням.

Для гідролізу білків використовують різноманітні ферментні препарати: хімотрипсин, термолізін, пепсин, папаїн, епастазу, α-протеази, виділені з культури *Crotalus atrox* та *Sorangim sp* тощо. Усі вони діють на білки специфічно, у специфічних умовах з одержанням з одного і того самого білка різних продуктів гідролізу, тому в кожному конкретному випадку потрібно вивчати процес гідролізу і знаходити оптимальні умови процесу.

Детальний огляд літератури щодо використання молочної сироватки, мембранних методів її перероблення, а також способів гідролізу можна знайти у [3].

**Мета роботи** – експериментально дослідити технологічні параметри ферментативного гідролізу білків молочної сироватки у присутності ферментного препарату “Папаїн PSM 400”, який випускається у промислових масштабах; вивчити амінокислотний склад кінцевого продукту.

**Обговорення результатів експериментальних досліджень.** У роботі використовували молоко за ТУ У 30080064-002-99 “Молоко питне натуральне стерилізоване з тривалим терміном зберігання “Справжнє молоко” виробництва СП “Атіс-Т” (Україна, Одеська обл.).

Перевіряли вміст молочного жиру і вміст білків в молоці, використовуючи методики відповідно за ГОСТ 22760-77 і ГОСТ 23327-78. Ці показники мало відрізнялись від нормативних. Так, жирність молока і вміст білків за стандартом на молоко повинні бути відповідно 3,2 і 2,8 %, а під час перевірки декількох партій молока, що були взяті для досліджень, вміст жиру становив 2,9...3,5 %, білків – 2,8...3,1 %.

Вміст жирів і білків у молочній сироватці, яку одержували методом природного молочнокислого бродіння з подальшим відстоюванням і відтисканням сирної маси, становив відповідно 0,5 і 0,63 %.

Сироватку знежирювали на лабораторній центрифугі за швидкості обертання 200 с<sup>-1</sup>. Після центрифугування і відділення верхньої частини розділеної емульсії вміст жиру зменшувався до 0,08...0,15 %, а вміст білків зростає до 0,65...0,75 %.

За відсутності ультрафільтраційних мембран для одержання концентрату сироватки використовували просте упарювання розчину у вакуумі за температури 50...60 °С. Ступінь упарювання – 4. Вміст жиру в концентраті в середньому становив 0,52 %, білків – 2,8 %. Сухий залишок при цьому в середньому становив 22,5 %.

Як ферментний препарат для проведення гідролізу концентрату білків молочної сироватки використовували доступний в Україні протеолітичний препарат “Папаїн PSM 400”, який розповсюджує фірма ТЗОВ “Алекс” (м. Київ). Фермент одержують з плодів “динного дерева” або папайї. Папаїн масово випускається і коштує в Україні відносно недорого – 285 грн./кг.

Протеолітичну активність використаних препаратів визначали за ГОСТ 20264.2-88.

Папаїн додавали 1,5 мас. % в перерахунку на білок. Після перемішування зразки суміші одночасно нагрівали до 30, 40, 50, 60, 70 °С і витримували протягом 36 годин. Показник рН при цьому був близький до нейтрального. Після цього визначали ступінь ферментативного гідролізу білків, вимірюючи вміст триптофану в гідролізаті: чим більший вміст цієї речовини в гідролізаті, тим більший ступінь конверсії білка. Доцільність визначення ступеня гідролізу саме за вмістом вільних амінокислот, а не за вимірюванням залишку білків гравіметричним способом, пояснюється тим, що вміст цих залишків, особливо наприкінці процесу, є дуже малий. До того ж цей осад, який утворюється при осадженні спиртом, може містити лактозу, солі, його потрібно сушити, що обов'язково призводить до втрат продукту. Отже, метод гравіметрії у цьому випадку є дуже неточним і неприйнятним.

За середніми величинами ступеня гідролізу, який визначався вимірюванням вмісту триптофану, побудовано графік залежності ступеня гідролізу від температури (рис. 1). З графіка можна побачити, що оптимальними температурами гідролізу є температури 50...60 °С.

Наявність оптимального діапазону температур ферментативного гідролізу можна пояснити тим, що за низьких температур активність протеази ще не проявляється повною мірою, а за високих температур фермент інактивується, оскільки він є білком і четвертинна структура білка незворотно руйнується (відбувається процес денатурації).

Було цікаво дослідити залежності ступеня конверсії залежно від рН середовища. Для цього готували три серії концентратів молочної сироватки, які містили папаїн в кількості 1,5 % від маси білків. Температура гідролізу – 55 °С. Показник рН регулювали додаванням до вихідного концентрату розчинів їдкого натрію або хлоридної кислоти. Результати дослідів показано на рис. 2. З графіка можна побачити, що оптимальним показником рН процесу гідролізу є величини, близькі до нейтрального або слабкокислого.

Особливо цікавим моментом досліджень було вивчення кінетики гідролізу, тобто вивчення залежності накопичення вільних кислот у гідролізаті.

Процес гідролізу білків до вільних кислот відбувався формально хімічною реакцією другого порядку, але у реакційній масі є надвеликий надлишок води, концентрація якої в реакційній суміші фактично не змінюється. Отже, загалом реакція повинна відбуватись за кінетикою реакцій першого порядку (біомолекулярна реакція псевдопершого порядку).

Наявність оптимального діапазону температур ферментативного гідролізу можна пояснити тим, що за низьких температур активність протеази ще не проявляється повною мірою, а за високих температур фермент інактивується, оскільки він є білком і четвертинна структура білка незворотно руйнується (відбувається процес денатурації).

Константу швидкості реакції першого порядку визначають за формулою

$$k = \frac{1}{\tau} \ln \frac{C_A^0}{C_A}, \quad (1)$$

де  $C_A^0$  і  $C_A$  – початкова і поточна концентрації речовини А;  $\tau$  – час перебігу процесу.

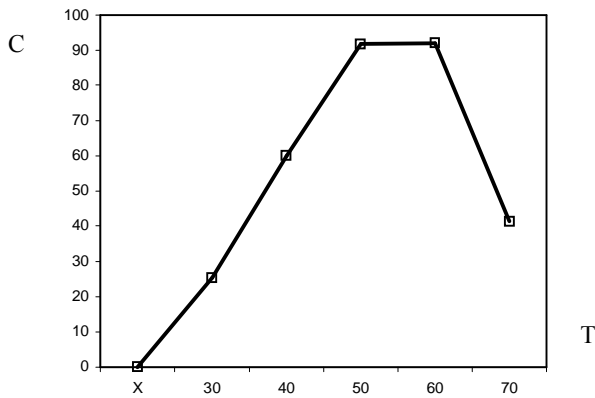


Рис. 1. Ступінь гідролізу білків молочної сироватки (C, %) залежно від температури (T, °C)

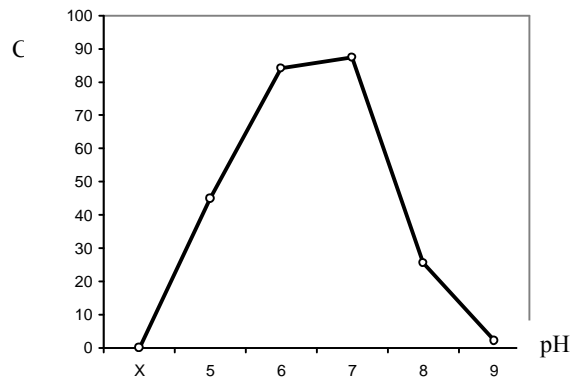


Рис. 2. Ступінь гідролізу білків молочної сироватки (C, %) залежно від кислотності середовища (pH)

У цій роботі замість концентрації  $C_A^0$  і  $C_A$  використовували показник ступеня гідролізу C, який визначали тільки за визначенням вмісту триптофану. Отже,  $C_A^0 = C_0 = 100\%$ .

Перетворюючи формулу (1) з урахуванням нової одиниці, що замінює концентрацію триптофану, поточний ступінь конверсії можна виразити як

$$C = 100 - \frac{100}{e^{kt}} \quad (2)$$

Довільно прийємо, що  $k = 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125, 0,15 \text{ год}^{-1}$ . За формулою (2) знайдені залежності C від  $\tau$  за різних значень k і на основі цих розрахунків побудовано сімейство теоретичних кривих (рис. 3).

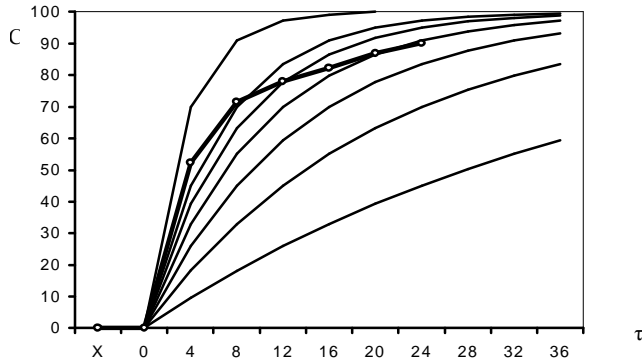


Рис. 3. Ступінь гідролізу (C, %) залежно від часу гідролізу (t, год): 1 – теоретичні криві реакції псевдопершого порядку за  $k = 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125, 0,15 \text{ год}^{-1}$ ; 2 – експериментальна крива

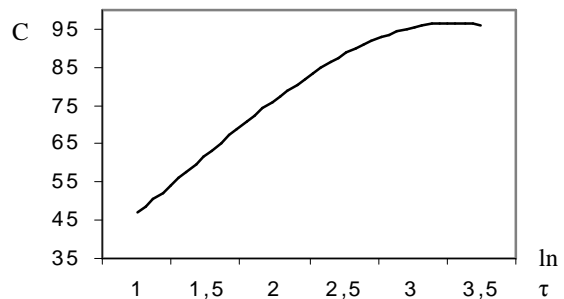


Рис. 4. Ступінь гідролізу (C, %) молочної сироватки залежно від часу (t)

Як бачимо з рис. 3, експериментальні дані різко відрізняються від теоретичних, отже, кінетика гідролізу не відповідає псевдопершому порядку реакції.

Ще наочніше порушення закономірності кінетики псевдопершого порядку реакції проявляється на графіку у напівлогарифмічних координатах, що дає можливість спрямити лінію. У такому разі, якщо процес є дійсно першого порядку, то графік буде прямою лінією. Для побудови графіка використовували ті самі експериментальні дані (рис. 4).

Можна побачити, що тільки на початку і у середині процесу він описується кінетичним рівнянням псевдопершого порядку (пряма лінія), а наприкінці ця закономірність порушується.

Вказане явище пояснюється специфічністю процесу, в якому бере участь фермент.

Ще у 1913 році Л. Міхаеліс і М. Ментен довели, що у ферментативних реакцій є особливість, яка відрізняє їх від звичайних хімічних. Ця особливість полягає у явищі насиченості субстратом. Було знайдено, що за низької концентрації субстрату швидкість реакції зростає пропорційно до концентрації субстрату, тобто у відношенні субстрату реакція має перший порядок.

Однак у міру збільшення концентрації субстрату швидкість реакції зростає все повільніше і пропорційність порушується. За подальшого збільшення концентрації субстрату швидкість реакції стає постійною і вже не залежить від його концентрації. Реакція набуває нульового порядку за субстратом. Хоча ефект насичення характерний для усіх ферментів, конкретні значення концентрації субстрату, за якого досягається насичення, для різних ферментів є різними. І в цих дослідженнях у міру виснаження субстрату (білка) швидкість гідролізу все менше залежить від його гідролізу, і реакція набуває нульового порядку.

Рівняння кінетики Міхаеліса-Ментен має такий вигляд:

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]}, \quad (3)$$

де  $v$  – дійсна поточна швидкість реакції;  $V_{\max}$  – максимальна можлива швидкість процесу (на його початку);  $[S]$  – поточна концентрація субстрату;  $K_m$  – константа, яка дорівнює концентрації субстрату, за якої швидкість реакції становить половину від максимальної (константа Міхаеліса-Ментен).

Для додаткового підтвердження цього явища і визначення оптимальної концентрації папаїну провели таку серію дослідів: до концентрату білків сироватки додавали папаїн у різних кількостях по відношенню до білків концентрату. Гідроліз проводили за температури 55 °С протягом 8 годин. Вимірювали концентрацію триптофану і розраховували ступінь гідролізу. Результати показано на рис. 5.

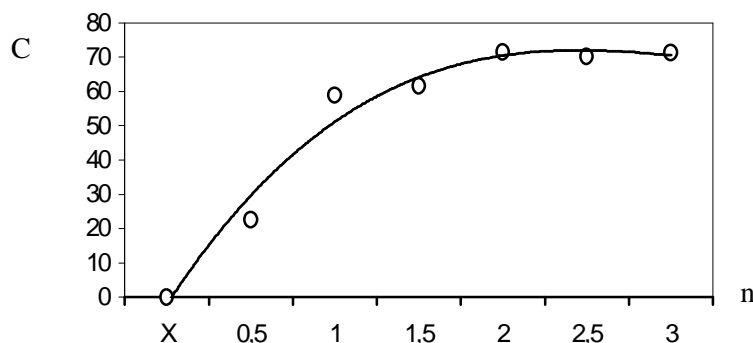


Рис. 5. Ступінь гідролізу (C, %) залежно від масового співвідношення папаїну/білок (n, %)

З рис. 5 зрозуміло, що ступінь гідролізу залежно від масового співвідношення дійсно не є прямою, що було б характерно для неферментного каталізатора, і вже при співвідношенні 1 % майже досягає свого максимуму (згідно з експериментальними даними, а не поліномною кривою, яку застосували для графічного опису залежності). Подальше збільшення вмісту папаїну в системі є вже недоцільним.

Амінокислотний склад білків молочної сироватки добре вивчений, але для молока, яке використовувалось у дослідженнях (молоко жирністю 3,5 % серії “Справжнє молоко” “Ласуня”), він є невідомим. Тому було цікаво дослідити його і порівняти з амінокислотним складом як інших типів молока і молочних продуктів, так і інших продуктів харчування.

Для досліджень використовували автоматичний амінокислотний аналізатор ААА-400 фірми “Kovo” (Чехія).

Вміст незамінних амінокислот у молочної сироватці порівняно з вмістом таких кислот найбільш поширених продуктів харчування [4] показано у табл. 1. При цьому вміст лізину умовно прийнятий за 100 одиниць.

**Амінокислотний склад білків молочної сироватки, що досліджувалась,  
порівняно з амінокислотним складом білків деяких продуктів харчування, %**

| Незамінні амінокислоти | Продукти харчування      |                        |                           |                  |                 |         |              |        |      |                  |           |              |                  |          |
|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|------------------|-----------------|---------|--------------|--------|------|------------------|-----------|--------------|------------------|----------|
|                        | Білок молочної сироватки | Казеїн жіночого молока | Сироватка жіночого молока | М'ясо ссавців, % | М'ясо курчат, % | Риба, % | Кукурудза, % | Рис, % | Яйця | Молоко коров'яче | Яловичина | Сир нежирний | Борошно пшеничне | Картопля |
| Лізин                  | 100                      | 100                    | 100                       | 100              | 100             | 100     | 100          | 100    | 100  | 100              | 100       | 100          | 100              | 100      |
| Гістидин               | 58                       | 68                     | 60                        |                  |                 |         |              |        |      |                  |           |              |                  |          |
| Аргінін                | 75                       | 105                    | 52                        | 146              | 148             | 77      | 150          | 200    |      |                  |           |              |                  |          |
| Треонін                | 60                       | 130                    | 75                        | 71               | 74              | 60      | 108          | 111    | 75   | 53               | 53        | 54           | 125              | 80       |
| Валін                  | 88                       | 92                     | 123                       |                  |                 |         |              |        | 113  | 80               | 65        | 92           | 188              | 100      |
| Ізолейцин              | 74                       | 105                    | 56                        |                  |                 |         |              |        | 100  | 73               | 60        | 77           | 200              | 90       |
| Лейцин                 | 156                      | 186                    | 202                       |                  |                 |         |              |        | 138  | 113              | 93        | 123          | 333              | 100      |
| Метіонін               | 55                       | 41                     | 71                        | 27               | 44              | 40      | 83           | 94     | 50   | 30               | 27        | 38           | 58               | 30       |
| Фенілаланін            | 48                       | 51                     | 52                        |                  |                 |         |              |        | 88   | 57               | 47        | 69           | 242              | 900      |
| Триптофан              | 19                       |                        |                           | 12               | 19              | 15      | 38           | 56     | 25   | 17               | 13        | 15           | 54               | 20       |

З табл. 1 зрозуміло, що співвідношення незамінних амінокислот у білку молочної сироватки дійсно близьке до співвідношення цих кислот, які становлять білки жіночого і коров'ячого молока, і різко відрізняється від співвідношень для білків рослинного походження – кукурудзи і рису. Цікаво, що склад білків картоплі, за винятком лейцину, якого мало, і фенілаланіну, якого багато, також близькі до білків тваринного походження.

Отже, можна зробити висновок, що білки молочної сироватки з якісного погляду є повноцінними для харчування людини.

На рис. 6 подано співвідношення між усіма амінокислотами білка молочної сироватки, які вдалось визначити. Як і раніше, вміст лізину умовно прийнятий за 100 одиниць.

### **Експериментальна частина**

#### *1. Лабораторне одержання знежиреної сироватки.*

У порцію молока (1 дм<sup>3</sup>) додавали 1 столову ложку сметани. Суміш поміщали у тепле місце (25...30 °С). За 18...30 годин спостерігається скисання молока (відбувалось молочнокисле бродіння). Кисле молоко нагрівали на водяній бані до температури не вище 80 °С до утворення щільного сгустку. Одержаний продукт охолоджували до кімнатної температури. Сгусток проціжували через подвійний шар марлі, збираючи сироватку.

Сироватку центрифугували на лабораторній центрифугі з кількістю 10...12 тис. обертів за хвилину. Порції надосадкової освітленої рідини збирали у діляльну лійку. Нижній шар, що не містив жирової фракції, піддавали подальшим дослідженням.

*2. Вміст молочного жиру визначали за ГОСТ 22760-77, ГОСТ 5867-90, а молочного білка – за ГОСТ 23327-78.*

#### *3. Методика визначення триптофану.*

Метод ґрунтується на розвитку кольорової реакції між продуктами розкладання триптофану, які утворюються при обробці його лугом (гідроксидом натрію) і п-диметиламінобензальдегідом у присутності нітрату натрію.

#### Реактиви:

ацетон, х.ч;

3М і 2,5 %-й розчини гідроксиду натрію;  
 2,5 %-й розчин п-диметиламінобензальдегіду у 10 %-м розчині сульфатної кислоти;  
 2 %-й розчин нітрату натрію;  
 хлоридна кислота (густина 1640 кг/м<sup>3</sup>);  
 універсальний індикатор;  
 0,1 %-й розчин фенолроту;  
 триптофан, х.ч.,  
 етанол 96 %-й, х.ч.

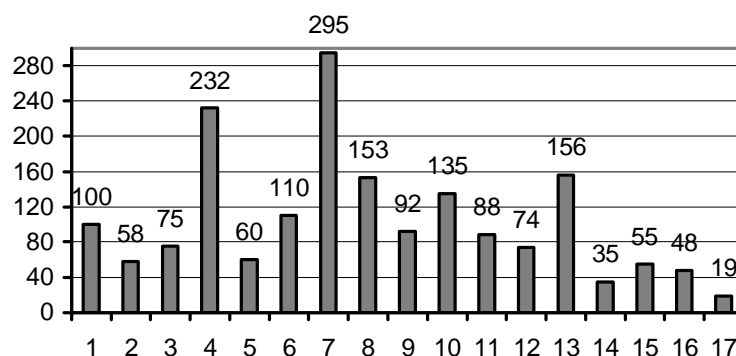


Рис. 6. Співвідношення білків молочної сироватки: 1 – лізин; 2 – гістидин; 3 – аргінін; 4 – аспартат; 5 – треонін; 6 – серин; 7 – глутамат; 8 – пролін; 9 – гліцин; 10 – аланін; 11 – валін; 12 – ізолейцин; 13 – лейцин; 14 – тірозин; 15 – метіонин; 16 – фенілаланін; 17 – триптофан

#### Хід роботи.

Пробу концентрату знежиреної сироватки, яка піддавалась ферментативному гідролізу (точно 100 см<sup>3</sup>), упарювали. Додавали 96 %-й етанол. Осад, що містив негідролізований білок, відділяли центрифугуванням і відкидали. Фугат, що містив вільний триптофан, упарювали і сушили.

Наважку продукту (4 г) кількісно переносили в колбу Кйольдаля ємністю 100 см<sup>3</sup> зі шліфом для під'єднання зворотного холодильника. Додавали 20 см<sup>3</sup> 3М розчином гідроксиду натрію. До колби приєднували кульковий холодильник і подавали в нього воду. Нагрівання вели протягом двох годин з моменту закипання рідини. Потім колбу від'єднували від холодильника, її вміст переносили у мірну колбу на 50 см<sup>3</sup>. Колбу, в якій відбувався гідроліз, декілька разів промивали дистильованою водою, слідкуючи за тим, щоб кількість рідини не перевищувала половини об'єму мірної колби.

Гідролізат обережно нейтралізували спочатку невеликою кількістю 3М розчину сульфатної кислоти, а потім рН доводять до 6,5...7, використовуючи слабкіші розчини сульфатної кислоти. Величину рН перевіряли після щезання піни потенціометром зі скляним електродом або індикаторами (універсальний, фенолрот). Після встановлення величини рН мірну колбу з розчином охолоджували, об'єм доводили дистильованою водою до мітки. Осад відфільтровували крізь щільний паперовий фільтр (за лужного гідролізу внаслідок взаємодії лугу зі склом утворюється велика кількість солей кремнієвої кислоти, яка за рН 6,5 випадає в осад і важко фільтрується). Якщо фільтрат був мутним його ще декілька разів фільтрували крізь той самий фільтр, поки він не ставав зовсім прозорим.

Для проведення кольорової реакції у мірну колбу і циліндр ємністю 100 см<sup>3</sup> з притертим корком вносять піпеткою розчини у такій послідовності: 1 см<sup>3</sup> розчину, що досліджується, 0,5 см<sup>3</sup> розчину п-диметиламінобензальдегіду (за енергійного струшування), 0,2 см<sup>3</sup> розчину нітрату натрію (за струшування) і 28 см<sup>3</sup> концентрованої хлоридної кислоти. Розчин залишають за кімнатної температури на 30 хвилин для розвитку забарвлення, а потім об'єм доводять до мітки 50 %-м

етанолом. Одночасно проводять два основні і два контрольні визначення. В останніх розчин, що досліджується, заміняють 1 см<sup>3</sup> дистильованої води.

Інтенсивність синього забарвлення вимірюють на фотометрі СФ за довжини хвилі 610 нм або ФЕК з червоним світлофільтром. За величиною оптичної густини на калібровочному графіку знаходять концентрацію триптофану в об'ємі рідини, яку взято для кольорової реакції.

Для побудови калібрувального графіка готували розчини, що містять певну кількість триптофану. Для цього брали три наважки по 50 мг чистого триптофану і розчиняли його в 20 см<sup>3</sup> 3М розчину гідроксиду натрію. Розчини триптофану послідовно піддавали усім операціям, починаючи з гідролізу і закінчуючи фільтруванням розчину після доведення його об'єму до 50 см<sup>3</sup>. Концентрація триптофану в 1 см<sup>3</sup> дорівнює 1 мг. Потім готували багато стандартних розчинів (табл. 2).

Таблиця 2

**Стандартні розчини**

| Вміст триптофану, мкг | Кількість стандартного розчину, см <sup>3</sup> | Кількість води, см <sup>3</sup> | Вміст триптофану, мкг | Кількість стандартного розчину, см <sup>3</sup> | Кількість води, см <sup>3</sup> |
|-----------------------|---|---------------------------------|-----------------------|---|---------------------------------|
| 100                   | 0,1   | 0,9                             | 400                   | 0,4   | 0,6                             |
| 200                   | 0,2   | 0,8                             | 500                   | 0,5   | 0,5                             |
| 300                   | 0,3   | 0,7                             | 600                   | 0,6   | 0,4                             |

За середніми даними трьох серій визначень будували калібрувальний графік, відкладаючи на осі ординат величини оптичної густини, а на осі абсцис – концентрацію триптофану.

Ступінь гідролізу визначали як відношення початкового вмісту триптофану у білку до поточного.

#### 4. Характеристика автоматичного амінокислотного аналізатора ААА-400 фірми "Ково" (Чехія).

Автоматичний амінокислотний аналізатор ААА-400 призначений для визначення амінокислот в гідролізатах білків і пептидів, для визначення вільних амінокислот у фізіологічних рідинах і екстрактів. Принцип дії ґрунтується на хроматографічній хемосорбції амінокислот на катіонообмінній смолі з подальшим елююванням і визначенням типу амінокислоти за кольоровою реакцією з нінгідрином.

Таблиця 3

**Технічні характеристики аналізатора ААА-400**

|  |  |
|--|--|
| Чутливість   | <50 пмоль (S/N=5)  |
| Діапазон використання  | Більше 150 нінгідринових субстанцій  |
| Стандарт визначення  | Одночасне розділення 45-ти амінокислот   |
| Скляна колонка   | 03.7x450 мм  |
| Сталева колонка  | різні розміри  |
| Температурний контроль колонки                                     | 20...95 °С (крок 0,1°С)  |
| Змінні наповнювачі (смоли):<br>гідролізати,<br>вільні амінокислоти | Ostion LG ANB<br>Ostion LG FA  |
| Насосна система (для нінгідринового і буферного розчину)           | Насоси двопоршневі високого тиску без пульсації (0...40 МПа), витрата 0,01...0 см <sup>3</sup> /хв |
| Двоканальний фотометричний детектор                                | 440 і 570 нм   |
| Безперервний час роботи в автоматичному режимі                     | 7 діб  |
| Габарити   | 700x600x550  |
| Вага   | 68 кг  |



У систему ААА-400 входить бібліотека прикладів аналізу, яку представлено в PDF-форматі. Система ААА-400 повністю керується комп'ютером. Здійснюється контроль кожної операції. На кожному етапі відбувається оцінка результатів, яка може бути видана на принтер у вигляді протоколу.

Аналізатор ААА-400 підтримується усіма необхідними реактивами і стандартами. Деякі технічні характеристики аналізатора подано у табл. 3.

Хід роботи був зумовлений інструкцією з використання аналізатора.

#### **Висновки:**

1. Для проведення ферментного гідролізу білків молочної сироватки при використанні як протеази ферментного препарату "Папаїн PSM 400" оптимальна температура процесу повинна бути в межах 50...55 °С, середовище нейтральне або слабкокислое, час проведення гідролізу – 8...16 годин, масове співвідношення папаїн/білок – 1...2 %. Ступінь гідролізу при цьому досягає 75...85 %.

2. Дослідженнями підтвердилось, що за гідролізу білків молочної сироватки ферментним препаратом "Папаїн PSM 400" можна одержати суміш біологічно активних амінокислот з повноцінним співвідношенням компонентів.

1. Крусь Г.Н., Тиняков В.Г., Фофанов Ю.Ф. *Технология молока и оборудование предприятий молочной промышленности.* – М.: Агропромиздат, 1986. 2. Зябрев А.Ф. *Применение мембранных процессов при переработке молочных продуктов. Мембранные системы БИОКОН.* – <http://biosop-russia.narod.ru/russian/application/milk.html>. 3. Познанська С.А. *Розробка технології одержання суміші амінокислот з молочної сироватки: Магістерська кваліфікаційна робота за спеціальністю 8.092902 "Біотехнологія біологічно активних речовин". На правах рукопису.* – Львів: НУ «Львівська політехніка», 2006. – 94 с. 4. Алексеев Л.П. *Аминокислотный анализ белков, тканевых экстрактов и биологических жидкостей: В кн. "Современные методы в биохимии".* – М.: Медицина, 1964. – Т.1. – С. 129–161.

УДК 615.322:582.657.24.

**М.Й. Білозір, В.П. Новіков**

Національний університет "Львівська політехніка",  
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

## **РОЛЬ БАС ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ У КАРДІОЛОГІЇ**

© Білозір М.Й., Новіков В.П., 2008

**Детально розглянуто склад біологічно активних сполук досліджуваних нами лікарських рослин (*Adonis vernalis* L., *Arnica montana*, *Gnaphalium uliginosum* L., *Juglans regia*, *Crataegus*, *Leonurus Cardiaca* L.) і виділено ті діючі сполуки, які мають пряму дію на серцево-судинну систему.**

**In the review detailed structure of biologically active compounds researched by us medical plants (*Adonis vernalis* L., *Arnica montana*, *Gnaphalium uliginosum* L., *Juglans regia*, *Crataegus*, *Leonurus Cardiaca* L.) , and excreting, those active compounds, that have direct effect on cardio-vascular system is considered.**

Захворювання серцево-судинної системи посідає чільне місце серед хвороб внутрішніх органів і часто є причиною ранньої втрати працездатності та передчасної смерті хворих.

Ще за сивої давнини люди використовували лікарські рослини для зцілення різноманітних недуг. Не втратило свою актуальність лікування рослинами і сьогодні. Лікувальні властивості