

На правах рукописи



Леонтьева Светлана Александровна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ
БУРСАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ С ОЦЕНКОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СОСТАВЕ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ**

Специальность 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания
и биологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Екатеринбург – 2022

Диссертационная работа выполнена на кафедре пищевой инженерии
ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет»

Научный руководитель: кандидат ветеринарных наук, доцент
Кольберг Наталья Александровна (Россия),
доцент кафедры пищевой инженерии
ФГБОУ ВО «Уральский государственный
экономический университет»

Официальные оппоненты: доктор технических наук, доцент
Бабич Ольга Олеговна (Россия),
директор Института живых систем
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта»

доктор технических наук, доцент
Милентьева Ирина Сергеевна (Россия),
доцент кафедры бионанотехнологии ФГБОУ ВО
«Кемеровский государственный университет»

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт
пищевой биотехнологии – филиал ФГБУН
Федерального исследовательского центра питания,
биотехнологии и безопасности пищи

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 г. в 10:00 на заседа-
нии диссертационного совета 24.2.425.03 при ФГБОУ ВО «Уральский государ-
ственный экономический университет» по адресу: 620144, г. Екатеринбург,
ул. 8 Марта/Народной Воли, 62/45, ФГБОУ ВО «Уральский государственный эко-
номический университет», зал диссертационных советов (ауд. 150).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО
«Уральский государственный экономический университет». Автореферат разме-
щен на официальном сайте ВАК Минобрнауки России:
<https://vak.minobrnauki.gov.ru> и на сайте ФГБОУ ВО «Уральский государственный
экономический университет»: <http://science.usue.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

Л. А. Донскова

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Направление фундаментальных и поисковых научных исследований Российской Федерации на ближайшее десятилетие, согласно распоряжению Правительства РФ от 31 декабря 2020 г. № 3694-р, предполагает разработку инновационных технологий, оценку безопасности и эффективности использования новых специализированных пищевых продуктов, биологически активных веществ, а также продуктов на их основе. В связи с этим перспективными являются исследования, направленные на совершенствование биотехнологических способов выделения и дальнейшего практического применения иммуноактивных пептидов. Согласно сложившимся научным представлениям, практически все системы организма животных и птиц могут служить источником для получения пептидов с различной степенью активности в отношении иммунной системы. Выраженным иммуномодулирующим действием обладают пептиды, выделенные из органов лимфоидной ткани животных и птиц, в частности тимуса и селезенки.

Вместе с тем представляются актуальными исследования, посвященные поиску нового сырья животного происхождения, разработке технологий выделения из него пептидов, обладающих выраженными свойствами модуляторов иммунологических реакций специфического и неспецифического иммунитета, и дальнейшему практическому использованию в составе специализированной пищевой продукции.

Не менее важным направлением научных исследований в пищевой биотехнологии является переработка молозива коров как дополнительного источника белка, иммуноглобулинов и других биологически активных веществ. В России сбор и переработка молозива практически не проводится. Как правило, секрет молочных желез коров после отела замораживают и выпаивают заболевшим телятам. За рубежом, в частности в США и Франции, молозиво широко используется для производства продуктов иммуномодулирующего действия, которые не только отправляются на внутренний рынок, но и являются предметом экспорта.

Степень разработанности темы исследования. Существенный вклад в раскрытие вопросов ферментативного гидролиза сырья для дальнейшего выделения, идентификации и исследования биологической активности пептидов с целью использования их в производстве пищевой продукции, в том числе функционального и специализированного назначения, вносят академики РАН А. Б. Лисицын, Л. В. Римарева, И. М. Чернуха, члены-корреспонденты РАН А. Ю. Просеков, Е. М. Серба, профессора Л. В. Антипова, О. О. Бабич, Т. М. Гиро, Т. К. Каленик, Л. С. Кудряшов, О. Я. Мезенова, О. В. Кригер, зарубежные ученые L. Bose, M. L. Catherine, K. Raja, E. Harold, F. Xiuli и др. Исследованию химического состава молозива коров посвящены работы G. Brinkworth, J. Buckley, R. Mehra, L. Pellegrino и других ученых.

Цель и задачи работы. *Цель работы* – разработка технологии получения пептидов с иммуномодулирующими свойствами путем ферментативного гидролиза фабрициевой сумки (бурсы) цыплят-бройлеров и их практическое применение в составе специализированной пищевой продукции.

Задачи:

- установить требования к фабрициевой сумке цыплят-бройлеров как к сырью для получения пептидов;
- определить рациональные параметры ферментативного гидролиза и выделения коротких пептидов из фабрициевой сумки цыплят-бройлеров;
- провести оценку токсичности, цитотоксичности и иммуномодулирующего действия пептидов на мышах линий C57BL/6, C57BL/10, C3H, SJL, культурах клеток L929, J774.1A, HeLaS3, K562, HCT116 и MCF-7, пролиферативной активности лимфоцитов у иммунодепрессивных лабораторных мышей линии BALb/c на фоне экспериментальной сальмонеллезной инфекции;
- дать оценку качества, определить пищевую ценность и усовершенствовать технологию сушки молозива коров и научно обосновать его использование в составе специализированной пищевой продукции;
- разработать белковый сухой напиток для питания спортсменов с использованием сухого молозива коров и пептидов, выделенных из фабрициевой сумки цыплят-бройлеров, определить регламентируемые показатели качества.

Научная новизна. Диссертационная работа содержит элементы научной новизны, соответствующие п. 6, 7, 9, 15 и 25 Паспорта специальности ВАК РФ 4.3.5.

Обосновано применение фабрициевой сумки как источника иммуномодулирующих компонентов – бурсальных пептидов для производства специализированной пищевой продукции на примере сухого белкового напитка для питания спортсменов (п. 6 Паспорта специальности ВАК РФ 4.3.5).

Обоснованы рациональные технологические режимы ферментативного гидролиза фабрициевой сумки, обеспечивающие выделение пептидов с молекулярной массой 27–18 кДа (п. 7 и 15 Паспорта специальности ВАК РФ 4.3.5).

Впервые проведена оценка биологической активности пептидов, выделенных из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки цыплят-бройлеров. Доказано иммуностропное действие бурсальных пептидов на мышах линий C57BL/6, C57BL/10, C3H, SJL с экспериментальным синдромом иммунодефицита. Установлено отрицательное влияние пептидов на жизнеспособность опухолевых клеток MCF-7, показана возможность активизации неспецифического иммунитета мышей бурсальными пептидами на фоне экспериментальной сальмонеллезной инфекции и стимуляции пролиферативной активности лимфоцитов иммунодепрессивных лабораторных мышей линии BALb/c (п. 25 Паспорта специальности ВАК РФ 4.3.5).

Обоснован состав белкового сухого напитка для питания спортсменов, включающего пептиды, выделенные из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки цыплят-бройлеров, и иммуноглобулины сухого молозива коров (п. 9 Паспорта специальности ВАК РФ 4.3.5).

Теоретическая и практическая значимость работы. *Теоретическая значимость* работы заключается в расширении научных знаний в области получения и применения пептидов, выделенных из сырья животного происхождения, в качестве неспецифического стимулятора иммунной системы и снижения жизнеспособности опухолевых клеток.

Практическая значимость работы заключается в:

- разработке технологии получения пептидов путем ферментативного гидролиза фабрициевой сумки цыплят-бройлеров;
- разработке рецептуры и технологии напитка для питания спортсменов на основе сухого молозива коров и пептидов, выделенных из гидролизата фабрициевой сумки цыплят-бройлеров;
- усовершенствовании технологии сушки молозива.

Разработаны технические условия и технологическая инструкция (ТУ и ТИ) 1544240-018-02069214-2021 «Напиток белковый сухой для питания спортсменов» (предприятие-разработчик – ООО «Национальная водная компания «Ниагара»). Проведены производственные испытания и внедрение на ООО «Национальная водная компания «Ниагара» (г. Челябинск).

Результаты теоретических и экспериментальных исследований используются в учебном процессе на кафедре пищевой инженерии ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет» при подготовке бакалавров, обучающихся по направлению 19.03.01 «Биотехнология».

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования базировалась на анализе научно-технической литературы, посвященной тематике экспериментов, постановке и достижении цели и реализации поставленных задач, обосновании объектов и методов исследований. При выполнении работы использовались общепринятые и специальные методы, в том числе методы ионообменной хроматографии, гель-хроматографии (гель-фильтрация), электрофореза в полиакриламидом геле, методы иммуногистологии и биологии, используемые при моделировании экспериментального иммунодефицита и заражении сальмонеллезной инфекцией мышей, оценке жизнеспособности культур клеток, в том числе МТТ-тест и спектрофотометрическое сканирование, и др.

Положения, выносимые на защиту:

- технология выделения пептидов из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки цыплят-бройлеров;
- результаты оценки токсичности, цитотоксичности и иммуномодулирующего действия бурсальных пептидов и пролиферативной активности

лимфоцитов у иммунодепрессивных мышей линии BALb/c, доказывающие безопасность и эффективность применения;

– состав, технология и регламентируемые показатели качества белкового сухого напитка для питания спортсменов, выработанного с использованием пептидов и сухого молозива.

Степень достоверности и апробация работы. Анализ полученных данных выполнен в пакете статистических программ Statistica 9.0. Данные представлены в виде среднего арифметического (M) \pm стандартная ошибка среднего (m). Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна – Уитни (Mann–Whitney U-test). Для проверки гипотезы об однородности двух зависимых выборок использовали непараметрический критерий Уилкоксона (Wilcoxon signed-rank test). При проверке статистических гипотез использовали 5 %-й уровень значимости.

Апробация результатов работы. Основные положения и результаты работы представлены на научно-практических мероприятиях различного уровня, в том числе: Всероссийская (национальная) научно-практическая конференция «Научно-инновационные технологии как фактор устойчивого развития агропромышленного комплекса» (Курган, 2020); Всероссийская (национальная) конференция «Актуальные направления научных исследований: технологии, качество и безопасность» (Кемерово, 2020); VIII Международная научно-практическая конференция «Инновации в пищевой промышленности и общественном питании» (Екатеринбург, 2021); 10-й Международный научно-практический симпозиум «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов», посвященный 90-летию ВНИИПБТ (материалы опубликованы в журнале «Пищевая промышленность»); Международная научно-практическая конференция «Современная наука в условиях модернизации процессов: проблемы, реалии, перспективы» (Уфа, 2021); Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы науки и техники» (Уфа, 2021); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2022); CXV Международная научно-практическая конференция «Инновационные подходы в современной науке» (Москва, 2022).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 16 научных работ, из них 8 статей в научных изданиях, включенных в Перечень ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Основное содержание работы изложено на 125 страницах, состоит из трех глав, заключения, списка литературы и приложений; включает 26 таблиц и 28 рисунков. Список литературы насчитывает 188 источников, из них 90 на иностранных языках.

Основное содержание работы

Во *введении* обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы.

В *первой главе* представлен обзор литературы по теме диссертационного исследования.

Во *второй главе* изложена организация эксперимента в соответствии с поставленной целью и задачами. Общая схема исследования приведена на рисунке 1 и состоит из пяти взаимосвязанных этапов.

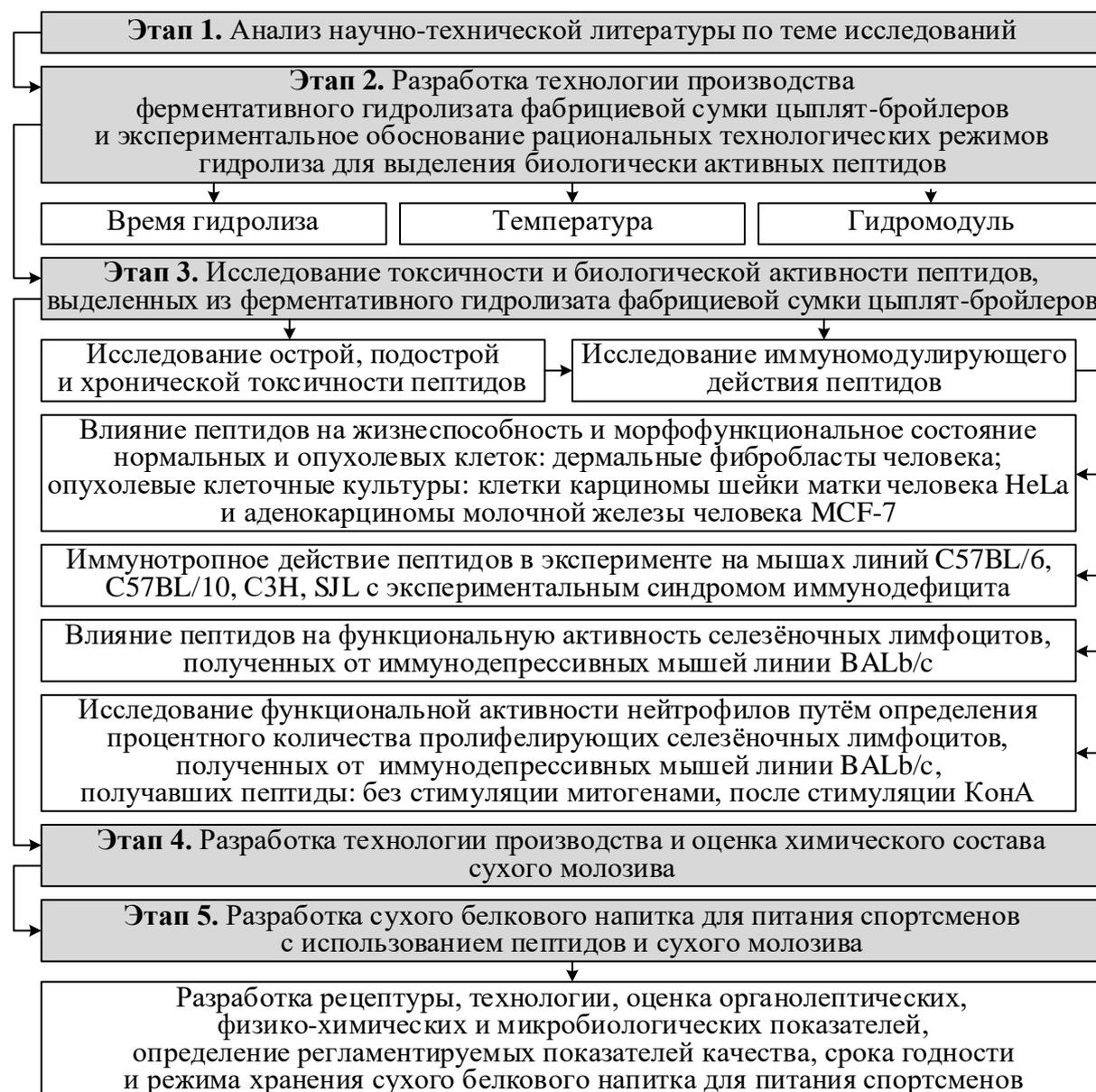


Рисунок 1 – Общая схема исследований

На *первом этапе* проведен анализ научно-технической литературы, посвященной методам исследования и интенсификации процессов получения иммуномодуляторов, характеристике пептидов с иммуномодулирующей

щими свойствами. Рассмотрена возможность использования органов лимфоидной ткани птицы, в частности фабрициевой сумки (ФС), как источника пептидов и производства биологически активных веществ иммуномодулирующего действия. Проанализированы возможности использования молозива как источника эссенциальных веществ для производства новых видов продуктов питания.

Второй этап посвящен установлению требований к ФС цыплят-бройлеров как сырью для получения пептидов; разработке технологии получения ферментативного гидролизата фабрициевой сумки цыплят-бройлеров (ФГФСЦБ); научному и экспериментальному обоснованию рациональных технологических режимов, определяющих функциональную активность выделенных пептидов.

На *третьем этапе* исследована биологическая активность пептидов, выделенных из ФГФСЦБ. Исследована токсичность пептидов с помощью макро- и микроскопирования органов мышей. Проведен эксперимент по изучению иммуномодулирующего действия пептидов на мышах разных линий с экспериментальным синдромом иммунодефицита и влияния пептидов на жизнеспособность и морфофункциональное состояние нормальных и опухолевых клеток. Проведен эксперимент по влиянию пептидов на функциональную активность нейтрофилов.

Третий этап работы выполнен совместно с канд. ветеринар. наук, доц., доцентом кафедры пищевой инженерии УрГЭУ Н. А. Кольберг.

На *четвертом этапе* разработана технология и дана оценка качества сухого молозива.

На *пятом этапе* разработан сухой белковый спортивный напиток «Спортивное долголетие» с использованием пептидов, выделенных из ФГФСЦБ и сухого молозива. Проведена оценка органолептических и физико-химических показателей, исследован химический состав белкового сухого напитка, установлена его микробиологическая безопасность, определены регламентируемые показатели качества, сроки и режим хранения.

Разработка технологии ферментативного гидролизата фабрициевой сумки с целью выделения пептидов

В качестве сырья выбрана ФС (бурса) цыплят-бройлеров, которая играет важную роль в формировании клеток иммунной системы и может служить источником иммуномодулирующих пептидов, обладающих широким спектром свойств.

Сформулированы требования к качеству ФС: форма овальная, цвет светло-розовый, консистенция плотная, масса 0,8–1,1 г, содержание белка 21–25 %, содержание жира 4–6 %, рН 5,9–6,2.

На рисунке 2 представлена технологическая схема производства ФГФСЦБ и выделения пептидов.

Для определения рациональных технологических параметров ферментализации исследовали влияние гидромодуля, концентрации ферментов и продолжительности ферментации на степень протеолиза сырья.

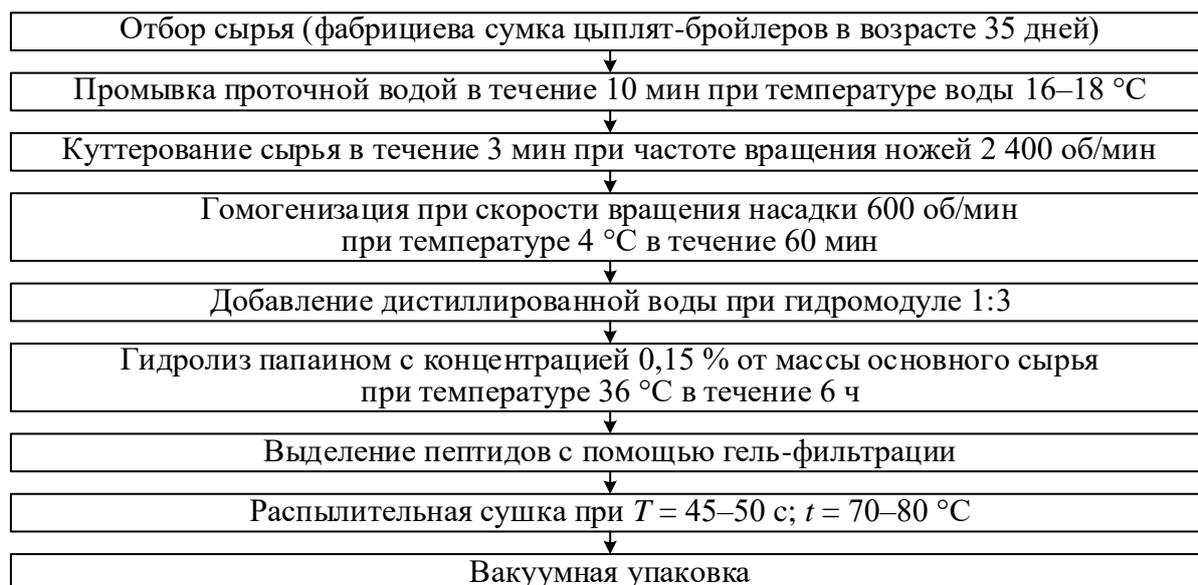


Рисунок 2 – Технологическая схема производства ФГФСЦБ и выделения пептидов

Подготовка сырья включала промывку проточной водой в течение 10 мин при температуре воды 16–18 °С; куттерование в течение 3 мин при частоте вращения ножей 2400 об/мин; гомогенизацию при скорости вращения насадки 600 об/мин при температуре 4 °С в течение 60 мин. Измельченную ФС смешивали с дистиллированной водой в соотношениях 1:1; 1:3 и 1:5. Полученную массу нагревали до температуры оптимума активности фермента папаина (36 °С) и вносили фермент, растворенный в фосфатно-буферном растворе с рН 6,0, из расчета 0,10; 0,15; 0,20 % к основному сырью, выдерживали в течение 6 ч. Степень гидролиза белка оценивали по массовой доле сухих веществ в растворе, содержанию аминного азота и изменению рН, которые служат косвенными признаками стабилизации процесса гидролиза. Лучшие результаты получены при гидромодуле 1:5 (массовая доля аминного азота выше на 13,5 % в сравнении с гидромодулем 1:1), однако слишком большое разбавление продукта приведет к лишним затратам при его фильтровании и сушке. Поэтому за рациональный гидромодуль приняли 1:3 (массовая доля аминного азота выше на 12,3 % в сравнении с гидромодулем 1:1).

Следующим этапом производства ФГФСЦБ является обработка папаином. Папаин (КФ 3.4.22.2) был выбран из-за его действия на белки ФС, в результате чего продуктами гидролиза являются прежде всего пептиды и аминокислоты; также учитывался оптимум активности фермента – рН 6,0, что соответствует рН сырья.

Лучшие результаты получены при концентрациях папаина, растворенного в фосфатно-буферном растворе, 0,15 и 0,20 % к основному сырью. Содержание аминного азота в ФГФСЦБ при концентрации папаина 0,15 % к основному сырью составляет 389 мг/100 г, при увеличении концентрации до 0,20 % достоверных отличий не отмечено. Следовательно, для гидролиза

ФС целесообразно использовать концентрацию папаина 0,15 %. Известно, что бурсальные пептиды ВР5 и ВР11 с молекулярной массой 27–18 кДа обладают наибольшей биологической активностью, стимулируют выработку антител и предупреждают иммунодефицитное состояние.

С помощью гель-электрофореза установлено, что молекулярная масса пептидов ФГФСЦБ распределяется в разных значениях и зависит от концентрации папаина. Так, при концентрации папаина 0,15 %, гидро-модуле 1:3, температуре 35 °С, времени гидролиза 6 ч в большей степени накапливаются пептиды с молекулярной массой от 27 до 18 кДа (73 %) (таблица 1). Следовательно, наиболее эффективной для получения данной фракции пептидов в ФГФСЦБ является концентрация папаина 0,15 %.

Таблица 1 – Распределение фракций пептидов ФГФСЦБ в зависимости от концентрации папаина

Молекулярная масса, кДа	Концентрация папаина, %		
	0,10	0,15	0,20
30–27	22	9	29
27–18	62	73	57
Менее 18	16	18	14

При температуре 36 °С количество пептидов с молекулярной массой от 27 до 18 кДа в ФГФСЦБ было максимальным – 85 %. Наибольшее количество пептидов с молекулярной массой 27–18 кДа отмечено при гидро-модуле 1:3 – 78 %.

На рисунке 3 представлено молекулярное распределение пептидов из ФГФСЦБ при концентрации папаина 0,15 %, температуре гидролиза 36 °С, времени гидролиза 6 ч в зависимости от гидромодуля.

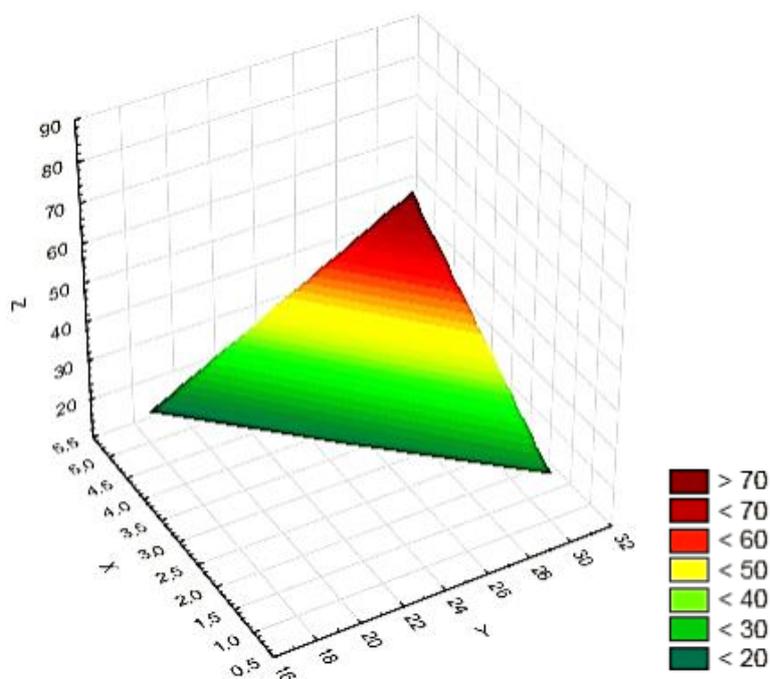


Рисунок 3 – Распределение фракций пептидов из ФГФСЦБ

в зависимости от гидромодуля:

X – гидромодуль (от 1:1 до 1:5); Y – молекулярная масса; Z – распределение фракций

Таким образом, при гидролизе ФС для получения пептидов наилучшими технологическими параметрами являются концентрация папаина 0,15 %, температура 36 °С, гидромодуль 1:3, время гидролиза 6 ч. На долю аминокислот лейцина, изолейцина, глутамина и тирозина в ФГФСЦБ приходится соответственно 12,5; 8,3; 9,6; 10,1 и 7,8 % от общего содержания аминокислот в составе пептидов. Указанные аминокислоты также способствуют усилению иммунитета.

Представленная технология гидролиза ФС позволяет выделить преимущественно пептиды ВР5 и ВР11 с молекулярной массой 27–18 кДа, регулирующие дифференциацию В-клеток, активизирующих выработку антител и неспецифический иммунный ответ.

Оценка биологической активности пептидов, выделенных из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки цыплят-бройлеров

Применение пептидов, полученных при гидролизе ФС цыплят-бройлеров, в производстве пищевых продуктов предполагает предварительную оценку их биологического действия, подтверждающего иммуномодулирующую активность, и оценку возможного негативного воздействия на организм.

При исследовании иммуотропного действия пептидов, выделенных из ФГФСЦБ, на мышах линий С57ВL/6, С57ВL/10, С3Н, SJL с экспериментальным синдромом иммунодефицита, вызванным однократным внутрибрюшинным введением циклофосфамида (ЦФА) (200 мг/кг), установлено, что однократное введение ЦФА вызывает снижение массы тела мышей линий С3Н, С57ВL/6 и С57ВL/10 на 8-е сутки после инъекции (таблица 2). У мышей линии SJL значимых изменений массы тела не отмечается. Введение пептидов в организм лабораторных животных предупреждает снижение массы тела мышей.

Таблица 2 – Масса экспериментальных животных разных линий до и после воздействия

Линия мышей	Физраствор		ЦФА		Пептиды + ЦФА	
	До	После	До	После	До	После
С3Н	26,48 ± 0,38	26,31 ± 0,30	26,32 ± 0,51	25,47 ± 0,49*	26,48 ± 0,38	25,73 ± 0,30*
С57ВL/6	24,53 ± 0,95	24,40 ± 0,60	25,27 ± 0,68	23,46 ± 0,52*	24,38 ± 0,73	23,90 ± 0,58
С57ВL/10	26,32 ± 0,25	26,31 ± 0,30	25,07 ± 0,51	23,13 ± 0,39*	25,58 ± 0,21	24,86 ± 0,27
SJL	21,62 ± 1,19	21,61 ± 1,03	22,56 ± 1,17	21,39 ± 1,00	23,46 ± 1,19	23,02 ± 0,72

Примечание – * Различия с показателем «до воздействия» достоверны (критерий Уилкоксона; $p < 0,05$).

В результате гематологических исследований установлено, что у мышей линии С3Н через 8 сут после введения ЦФА повысилось количество лейкоцитов при снижении содержания эритроцитов, гемоглобина и гематокрита. При применении (недельный курс) пептидов, выделенных

из ФГФСЦБ, гематологические изменения менее выражены по сравнению со 2-й группой на фоне введения ЦФА, что свидетельствует об иммуномодулирующем действии полученных пептидов.

В ходе исследования установлено отсутствие цитотоксического действия и нарушения жизнеспособности клеток в культурах L929, J774.1A, HeLaS3, K562 и HCT116 на фоне воздействия пептидов в концентрациях от 0,02 до 10 мг/см³ (рисунок 4).

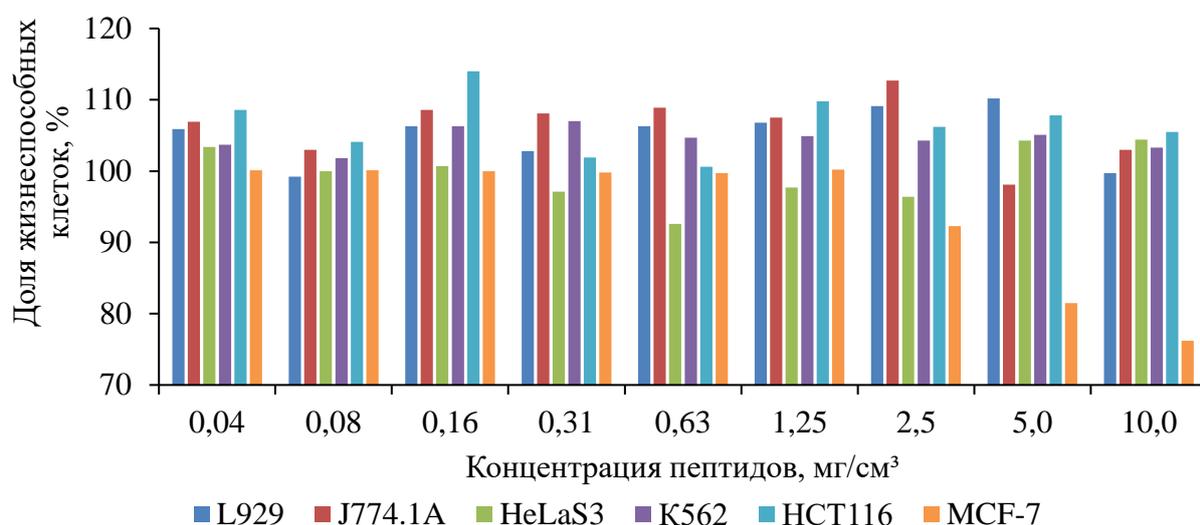


Рисунок 4 – Доля жизнеспособных клеток после 48-часовой инкубации с пептидами при различных концентрациях

Достоверное увеличение жизнеспособности клеток линии L929 на 5,9; 6,3; 6,8; 5,9 и 11,6 % отмечается при концентрациях пептидов 0,04; 0,63; 1,25; 2,5 и 5,0 мг/см³ соответственно в сравнении с их отсутствием. Отмечен выраженный цитотоксический эффект пептидов в концентрациях 5 и 10 мг/см³ на клетки линии MCF-7, о чем свидетельствует достоверное снижение жизнеспособности опухолевых клеток на 18,5 % и 23,8 % соответственно в сравнении с чистой культурой клеток.

Полученные данные позволяют рекомендовать использовать пептиды для активации неспецифического иммунитета и профилактики онкологических заболеваний.

В ходе эксперимента по определению влияния пептидов на неспецифическую резистентность к инфекциям сформировали четыре группы белых беспородных мышей (самцы и самки массой (20 ± 2) г) по 30 голов в каждой. Животные 1-й группы (контроль) пептиды не получали. Остальным животным ежедневно в течение 7 сут скармливали пептиды в дозах: 2-й опытной группе – 150 мг/кг, 3-й – 750 мг/кг, 4-й – 3 750 мг/кг. Через 24 ч после последнего приема пептидов животных внутрибрюшинно заражали суточной агаровой культурой *S. enteritidis* 92.

В таблице 3 представлено влияние пептидов на выживаемость мышей после заражения культурой *S. enteritidis* 92.

Таблица 3 – Влияние пептидов из ФС цыплят-бройлеров на выживаемость мышей после внутрибрюшинного заражения *S. enteritidis* 92 ($M \pm m$)

Показатель	Доза заражения <i>S. enteritidis</i> , КОЕ			
	5	50	500	5 000
1-я группа (контроль)				
Количество выживших животных, голов	3	–	–	–
Средний срок гибели, сут	$6,2 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,1^*$	–	–
<i>S. enteritidis</i> у погибших мышей, КОЕ/г	12	15	–	–
2-я опытная группа				
Количество выживших животных, голов	19	–	–	–
Средний срок гибели, сут	$7,3 \pm 0,5^*$	$5,1 \pm 0,1^*$	–	–
<i>S. enteritidis</i> у погибших мышей, КОЕ/г	9	11	–	–
3-я опытная группа				
Количество выживших животных, голов	22	9	7	–
Средний срок гибели, сут	$8,2 \pm 0,5^*$	$5,4 \pm 0,3^*$	$4,9 \pm 0,2^*$	$4,5 \pm 0,1^*$
<i>S. enteritidis</i> у погибших мышей, КОЕ/г	8	10	10	11
4-я опытная группа				
Количество выживших животных, голов	23	14	9	–
Средний срок гибели, сут	$8,7 \pm 0,6^*$	$6,2 \pm 0,3^*$	$5,2 \pm 0,1^*$	$3,5 \pm 0,1^{**}$
<i>S. enteritidis</i> у погибших мышей, КОЕ/г	5	5	7	9
Примечание – Различия в сравнении с контрольной группой достоверны при * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.				

В контрольной группе при введении 5 КОЕ *S. enteritidis* количество выживших животных составило 3 головы, а во 2-й, 3-й и 4-й опытных группах – 19; 22 и 23 головы соответственно. Полученные результаты демонстрируют положительное влияние пептидов на устойчивость животных к сальмонеллезной инфекции.

Проведена оценка влияния пептидов на пролиферативную активность лимфоцитов на мышах линии BALb/c. У части экспериментальных животных была индуцирована иммунодепрессия однократным введением препарата «Циклофосфан». В качестве митогена для неспецифической активации Т-лимфоцитов использовали конканавалин А (КонаА).

Отмечено повышение пролиферативной активности лимфоцитов селезенки по сравнению с интактными животными за счет однократной пролиферации лимфоцитов до 80,8 % (рисунок 5), а количество индуцированных КонаА возросло до 95,1 %, что свидетельствует о стимуляции лимфоцитарного звена иммунной системы мышей на фоне применения пептидов и КонаА.

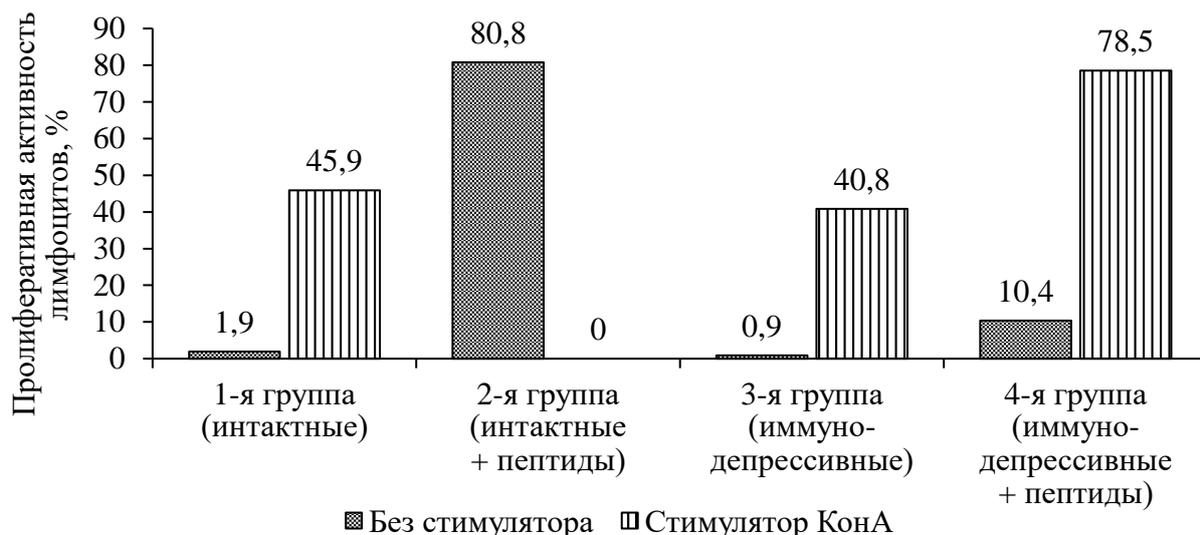


Рисунок 5 – Пролиферативная активность лимфоцитов интактных и иммунодепрессивных мышей линии BALB/c

Из рисунка 6 следует, что процент бласттрансформации (БТ) и митотической активности бластов (МАБ) у интактных мышей на фоне введения пептидов выше во 2-й группе на 4,5; 13,9 и 2,2 %, индекс деления (ИД) – на 2,1 ед. Аналогичные результаты получены у иммунодепрессивных мышей.

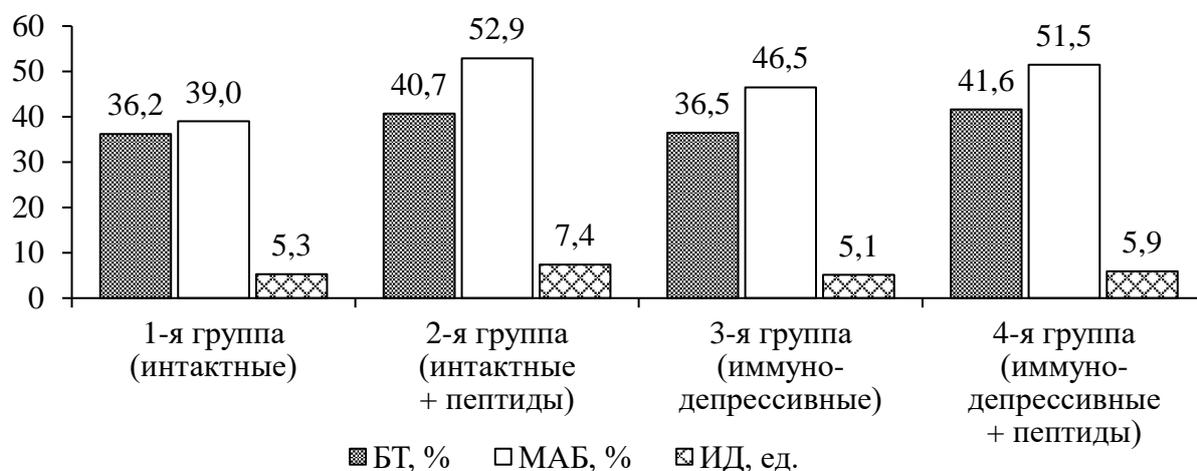


Рисунок 6 – Показатели функциональной активности лимфоцитов интактных и иммунодепрессивных мышей линии BALB/c

Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии пептидов на клеточный иммунитет.

Усовершенствование технологии получения сухого молозива

По результатам исследования наибольшей пищевой ценностью обладало молозиво, полученное сразу после отела коров. Нами усовершенствована технология сушки молозива, включающая следующие стадии: сбор молозива в стеклянные емкости и хранение при температуре 0–4 °С не более 5–6 ч; инактивация протеаз молозива аprotинином в количестве 1 см³ (активность 10 000 КИ) на 1 000 см³ молозива; кратковременная пастериза-

ция в термостате при температуре 70–76 °С с выдержкой 20–30 с; розлив молозива на противень слоем толщиной 0,6–1,0 см; инфракрасная сушка при температуре 42–46 °С до содержания влаги 10–14 %; сушка молозива в псевдокипящем слое (скорость потока воздуха 0,3–0,4 м/с, время 6–8 ч) до содержания влаги 3–4 % в течение 3–4 ч; хранение при температуре 0–4 °С и относительной влажности не более 75 %.

Показатели качества сухого молозива, полученного по разработанной технологии, приведены в таблице 4. Сухое молозиво характеризуется высоким содержанием общих иммуноглобулинов и всех исследуемых классов, что свидетельствует о том, что предложенная технология переработки молозива позволяет концентрировать биологически активные вещества, в частности иммуноглобулины, и обеспечить их сохраняемость. По КМАФАнМ сухое молозиво соответствует требованиям ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».

Исходя из химического состава и микробиологической безопасности сухое молозиво можно использовать в производстве специализированной продукции, в частности для активации иммунной системы спортсменов.

Практическое применение пептидов в технологии специализированной пищевой продукции

Нами разработана рецептура белкового сухого напитка «Спортивное долголетие» для питания спортсменов (таблица 5). В рецептуре белкового сухого напитка использован изолят сывороточного белка, количество которого рассчитано с учетом физиологической потребности в белке взрослого населения (75–114 г/сут) согласно МР 2.3.1.0253-21 «Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации» и норме, указанной в приложении ГОСТ 34621-2019 «Напитки белковые, белково-углеводные и углеводно-белковые сухие для питания спортсменов».

Таблица 4 – Показатели качества сухого молозива ($n = 5$)

Показатель	Значение
Общие иммуноглобулины, г/1000 г	289,5 ± 12,3
Имуноглобулины G, г/1000 г	96,4 ± 3,6
Имуноглобулины A, г/1000 г	3,6 ± 0,2
Имуноглобулины M, г/1000 г	62,7 ± 3,7
Массовая доля влаги, %	3,3 ± 0,4
КМАФАнМ, КОЕ/см ³ (г)	8

Таблица 5 – Рецептура сухого белкового напитка «Спортивное долголетие» для питания спортсменов (на 100 кг)

Наименование сырья	Содержание, кг
Изолят сывороточного белка	53,9
Фруктоза	35,0
Экстракт гибискуса	6,0
Лимонная кислота (E330)	1,2
Гидрокарбонат натрия E500(ii)	1,1
Пектин яблочный	1,0
Сухое молозиво	0,8
Цитрат натрия (E331)	0,5
Пептиды из ФГФСЦБ	0,4
<i>Итого</i>	100,0

Количество сухого молозива в сухом напитке определено с учетом рекомендаций зарубежных компаний «Symbiotis», «California Gold Nutrition», «Now Foods» «Childlife», производящих продукты специализированного назначения на основе сухого молозива.

Все исследуемые показатели качества белкового сухого напитка (органолептические, физико-химические), показатели безопасности соответствовали требованиям ТР ТС 021/2011 и ГОСТ 34621-2019 после производства и в течение 14 мес. хранения при температуре $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ и относительной влажности 75–85 %.

На основании проведенных исследований установлены регламентируемые показатели качества, срок и режим хранения сухого белкового напитка «Спортивное долголетие» для питания спортсменов (таблица 6).

Таблица 6 – Регламентируемые показатели качества сухого белкового напитка «Спортивное долголетие» для питания спортсменов

Показатель	Характеристика
Внешний вид	Мелкий дисперсный порошок
Цвет	Красный
Вкус и запах	С ароматом гибискуса
Влага, %	Не более 6,4
Массовая доля общего белка, %	50–80
Доля бурсальных пептидов ВР5 и ВР11 с молекулярной массой 27–18 кДа, %	Не менее 0,4

При употреблении взрослым человеком рекомендуемой порции (50 г) в сутки обеспечивается не менее 50 % суточной нормы потребления белка.

Заключение

Тканевые иммуномодулирующие пептиды на основе ферментативных гидролизатов применяют при иммунодефицитах, хронических воспалительных процессах и т. д. Вместе с тем остается много нерешенных вопросов в выделении и оценке биологической эффективности пептидов, полученных из органов иммунной системы птиц. В результате исследования выделены пептиды из ферментативного гидролизата ФС – органа лимфоидной ткани цыплят-бройлеров, проведена оценка биологической эффективности и разработан продукт специализированного назначения с их использованием.

По результатам работы сделаны следующие выводы.

1. Установлены требования к органолептическим, физико-химическим показателям и химическому составу ФС цыплят-бройлеров как сырья для получения бурсальных пептидов.

2. Разработана технология выделения пептидов из ФГФСЦБ, включающая отбор сырья (ФС цыплят-бройлеров в возрасте 35 дней), промывку проточной водой в течение 10 мин при температуре воды 16–18 °С; куттерование сырья в течение 3 мин при частоте вращения ножей 2 400 об/мин; гомогенизацию при скорости вращения насадки 600 об/мин при температуре 4 °С в течение 60 мин и ферментативный гидролиз с последующей гель-фильтрацией, распылительную сушку и упаковку. На основе максимального содержания (82 % от общего количества) бурсальных пептидов ВР5 и ВР11 с молекулярной массой 27–18 кДа и свободных аминокислот лейцина, изолейцина, глутамина и тирозина определены рациональные технологические режимы гидролиза ФС: концентрация фермента папаина 0,15 % от субстрата, время гидролиза 6 ч, гидромодуль 1:3, температура 36 °С.

3. Проведена оценка биологической активности пептидов, выделенных из ФГФСЦБ.

3.1. На основе макро- и микроскопирования внутренних органов нелинейных белых мышей на 1-е и 7-е сутки после окончания месячного внутрижелудочного введения пептидов в дозе 15 000 мг/кг установлено, что пептиды не обладают острой и подострой токсичностью.

3.2. Изучение иммуномодулирующего действия пептидов на мышах линий С57ВL/6, С57ВL/10, С3Н, SJL с экспериментальным синдромом иммунодефицита свидетельствует, что у мышей исследуемых линий через 8 сут после введения ЦФА отмечается повышение количества лейкоцитов в основном за счет средних клеток (моноцитов, эозинофилов, базофилов) и гранулоцитов, снижение содержания эритроцитов и гемоглобина. Доказано, что введение внутрь пептидов лабораторным мышам уменьшает отклонения исследуемых гематологических показателей от физиологической нормы, что свидетельствует об иммуотропном действии пептидов.

3.3. Проведена оценка влияния пептидов на цитотоксичность клеточных линий и первичных культур клеток экспериментальных животных L929, J774.1A, HeLaS3, K562, НСТ116 и MCF-7. Установлено, что пептиды не нарушают жизнеспособность здоровых клеток млекопитающих и не проявляют цитотоксических свойств, что свидетельствует об их безопасности. Пептиды проявили цитотоксические свойства в отношении клеток MCF-7. Полученные данные позволяют предположить, что пептиды влияют не только на клетки иммунной системы, их действие может быть направлено непосредственно на злокачественные клетки либо опосредованно через злокачественные клетки, влияющие на опухолевое образование.

3.4. При исследовании влияния пептидов на неспецифический иммунитет мышей на фоне экспериментальной сальмонеллезной инфекции установлено, что пептиды активизировали неспецифический иммунитет в отношении сальмонеллезной инфекции, что выражалось в увеличении

количества выживших и среднего срока гибели животных, зараженных *S. enteritidis* (доза 5 КОЕ), в 6,3–7,7 раза и на 17,8–40,3 % соответственно. Наиболее эффективны дозы пептидов 750 и 3 750 мг/кг массы тела.

3.5. При оценке влияния пептидов на пролиферативную активность лимфоцитов на мышях линии BALb/c установлено, что пептиды стимулируют активность перитонеальных нейтрофилов и селезеночных лимфоцитов как у здоровых, так и у иммунодепрессивных мышей. Также отмечено повышение пролиферативной активности лимфоцитов селезенки по сравнению с интактными животными за счет однократной пролиферации лимфоцитов до 80,8 %, а количество индуцированных Кона возросло до 84,74 %, что свидетельствует о стимуляции лимфоцитарного звена иммунной системы мышей.

4. Дана оценка качества и свойств молозива коров и научно обосновано его использование в составе сухого белкового напитка «Спортивное долголетие» для питания спортсменов в качестве источника иммуноглобулинов. Установлено, что химический состав молозива коров зависит от времени, прошедшего с момента отела. Процентное содержание белка, жира и золы в молозиве сразу после отела составляет 23,8 %; 6,2 % и 1,3 % соответственно; в молозиве, полученном через 12 ч после отела, – 14,7 %; 5,4 % и 1,1 % соответственно. Количество общих иммуноглобулинов по всем исследуемым классам сразу после отела, через 12 и 24 ч после него составляет 89,4; 60,3 и 25,7 г/л соответственно. Разработана технология получения сухого молозива. Доказано, что при использовании разработанной технологии сухого молозива в нем отмечается высокое содержание общих иммуноглобулинов (289,5 г/1000 г) и иммуноглобулинов классов G, A, M.

5. Разработан состав белкового сухого напитка «Спортивное долголетие» для питания спортсменов с использованием пептидов, выделенных из ФС цыплят-бройлеров, сухого молозива коров и изолята сывороточного белка.

5.1. Исследованы показатели качества и пищевой ценности разработанного белкового напитка «Спортивное долголетие» для питания спортсменов с использованием сухого молозива коров и биологически активных пептидов, выделенных из ФГФСЦБ; установлены регламентируемые показатели качества, срок и режим хранения (12 мес. при температуре (25 ± 2) °С и относительной влажности 75–85 %).

Публикации по теме диссертации

Статьи в изданиях из Перечня ВАК РФ

1. Кольберг, Н. А. Разработка биотехнологии и оценка противоопухолевых свойств БАД тканевого происхождения на культурах клеток / Н. А. Кольберг, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, **С. А. Леонтьева**. – DOI 10.52653/PPI.2021.9.9.011 // Пищевая промышленность. – 2021. – № 9. – С. 33–34.

2. Кольберг, Н. А. Оценка влияния ферментативного гидролизата фабрициевой сумки цыплят-бройлеров на цитотоксическую активность и неспецифический иммунитет / Н. А. Кольберг, **С. А. Леонтьева**, С. Л. Тихонов [и др.]. – DOI 10.21443/1560-9278-2021-24-3-259-266 // Вестник МГТУ. Труды Мурманского государственного технического университета. – 2021. – Т. 24, № 3. – С. 259–266.

3. Кольберг, Н. А. Оценка влияния биологически активной добавки из лимфоидной ткани цыплят-бройлеров на цитотоксическую активность и неспецифическую резистентность к инфекциям / Н. А. Кольберг, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, **С. А. Леонтьева**. – DOI 10.53859/02352451_2021_35_7_69 // Достижения науки и техники АПК. – 2021. – Т. 35, № 7. – С. 69–72.

4. **Леонтьева, С. А.** Разработка технологии, исследование химического состава и оценка токсикологической безопасности биологически активной добавки из сырья тканевого происхождения / С. А. Леонтьева, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // АПК России. – 2021. – Т. 28, № 4. – С. 523–530.

5. **Леонтьева, С. А.** Молозиво коров – перспективное сырье для производства пищевых продуктов / С. А. Леонтьева, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, В. А. Лазарев. – DOI 10.29141/2500-1922-2021-6-2-3 // Индустрия питания. – 2021. – Т. 6, № 2. – С. 23–33.

6. Кольберг, Н. А. Коррекция иммунодефицита мышей биологически активным веществом тканевого происхождения / Н. А. Кольберг, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, **С. А. Леонтьева**. – DOI 10.37493/2307-910X.2021.2.10 // Современная наука и инновации. – 2021. – № 2 (34). – С. 107–118.

7. Кольберг, Н. А. Разработка и влияние добавки из лимфоидной ткани птицы на жизнеспособность клеток в культуре / Н. А. Кольберг, Н. В. Тихонова, С. Л. Тихонов, **С. А. Леонтьева**. – DOI 10.21603/2074-9414-2021-3-492-502 // Техника и технология пищевых производств. – 2021. – Т. 51, № 3. – С. 492–502.

8. Кольберг, Н. А. Разработка технологии выделения и исследования иммуотропного действия бурсальных пептидов на мышях с экспериментальным иммунодефицитом / Н. А. Кольберг, Н. В. Тихонова, С. Л. Тихонов, **С. А. Леонтьева**, И. Ю. Сергеева. – DOI 10.21603/2074-9414-2022-2-2364 // Техника и технология пищевых производств. – 2022. – Т. 52, № 2. – С. 296–309.

Прочие публикации

9. Кольберг, Н. А. Оценка иммуномодуляторного действия биологически активных добавок на основе фабрициевой сумки / Н. А. Кольберг, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, **С. А. Леонтьева** // Инновационные технологии в пищевой промышленности и общественном питании : материалы VIII Междунар. науч.-практ. конф. (Екатеринбург, 20 апр. 2021 г.). – Екатеринбург : УрГЭУ, 2021. – С. 67–69.

10. **Леонтьева, С. А.** Иммуномодулятор для повышения устойчивости к стрессам сельскохозяйственной птицы и эффективность применения / С. А. Леонтьева, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Актуальные направления научных исследований: технологии, качество и безопасность : сб. материалов Нац. (Всерос.) конф. (Кемерово, 25–27 мая 2020 г.). – Кемерово : КемГУ, 2020. – С. 72–73.

11. **Леонтьева, С. А.** Оценка влияния БАД на основе фабрициевой сумки цыплят-бройлеров на гематологические показатели различных линий мышей с иммунодефицитом / С. А. Леонтьева, Н. В. Тихонова, С. Л. Тихонов // Актуальные проблемы науки и техники : сб. науч. ст. по материалам VI Междунар. науч.-практ. конф. (Уфа, 5 окт. 2021 г.). – Уфа : Вестник науки, 2021. – С. 29–35.

12. **Леонтьева, С. А.** Разработка кормовой добавки и ее апробация в птицеводстве / С. А. Леонтьева, С. Л. Тихонов // Научно-инновационные технологии как фактор устойчивого развития агропромышленного комплекса : сб. ст. по материалам Всерос. (нац.) науч.-практ. конф. (Курган, 12 марта 2020 г.). – Курган : КГСХА им. Т. С. Мальцева, 2020. – С. 92–96.

13. **Леонтьева, С. А.** Оценка химического состава и производство пищевого продукта на основе молозива коров / С. А. Леонтьева, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Пищевые технологии: исследования, инновации, маркетинг : сб. тр. по материалам I Междунар. науч.-практ. конф. (Керчь, 23–25 сент. 2021 г.). – Керчь : КГМТУ, 2021. – С. 102–108.

14. **Леонтьева, С. А.** Оценка качества биологически активной добавки к пище на основе ферментативного гидролизата фабрициевой сумки / С. А. Леонтьева, Н. В. Тихонова, С. Л. Тихонов // Современная наука в условиях модернизационных процессов: проблемы, реалии, перспективы : сб. науч. ст. по материалам VI Междунар. науч.-практ. конф. (Уфа, 1 окт. 2021 г.). – Уфа : Вестник науки, 2021. – С. 6–10.

15. **Леонтьева, С. А.** Разработка технологии выделения и исследование иммунотропных пептидов / С. А. Леонтьева, М. С. Тихонова, Н. А. Кольберг, С. Л. Тихонов // Пищевые инновации и биотехнологии : сб. тез. X Междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых (Кемерово, 17 мая 2022 г.). – Кемерово : КемГУ, 2022. – С. 497–499.

16. Тихонов, С. Л. Разработка напитка для питания спортсменов с использованием пептидов и молозива коров / С. Л. Тихонов, **С. А. Леонтьева** // Инновационные подходы в современной науке : сб. ст. по материалам CXV Междунар. науч.-практ. конф. (Москва, 5 апр. 2022 г.). – Москва : Интернаука, 2022. – С. 43–48.

Подписано в печать 10.10.2022.
Формат 60 × 84 ¹/₁₆. Гарнитура Таймс. Бумага офсетная. Печать плоская.
Уч.-изд. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ

Отпечатано с готового оригинал-макета в подразделении оперативной полиграфии
Уральского государственного экономического университета
620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта/Народной Воли, 62/45