

На правах рукописи



Мерзлякова Наталия Вадимовна

**ВЫДЕЛЕНИЕ НАТИВНОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО
ПЕПТИДА С СИНТЕЗОМ АНАЛОГА И ПРАКТИЧЕСКОЕ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ МОРОЖЕНОГО**

4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Екатеринбург – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном
бюджетном образовательном учреждении высшего образования
«Уральский государственный экономический университет»

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор
Тихонов Сергей Леонидович (Россия),
заведующий кафедрой – руководитель
«Высшая школа биотехнологии»
ФГБОУ ВО «Уральский государственный
лесотехнический университет»

Официальные оппоненты: доктор технических наук, профессор, профессор РАН
Машенцева Наталья Геннадьевна (Россия),
профессор кафедры биотехнологии
и биоорганического синтеза
ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ)»

доктор технических наук, профессор
Курбанова Марина Геннадьевна (Россия),
заведующий кафедрой технологии продуктов
питания животного происхождения
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный
университет»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Калининградский государственный
технический университет»

Защита диссертации состоится 28 ноября 2025 г. в 10:00 на заседании
диссертационного совета 24.2.425.03, созданного на базе ФГБОУ ВО «Уральский
государственный экономический университет» по адресу: 620144, г. Екатеринбург,
ул. 8 Марта/Народной Воли, 62/45, ФГБОУ ВО «Уральский государственный
экономический университет», зал диссертационных советов (ауд. 150).

Отзывы на автореферат, заверенные гербовой печатью, просим направлять
по адресу: 620144, г. Екатеринбург, ГСП-985, ул. 8 Марта/Народной Воли, 62/45,
ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет», ученому
секретарю диссертационного совета 24.2.425.03.

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

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент



Л. А. Донскова

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 г., утвержденная распоряжением Правительства РФ от 29 июня 2016 г. № 1364-р, направлена на поиск, медико-биологическое обоснование, подтверждение эффективности и введение в состав пищевой продукции массового потребления новых биологически активных веществ (БАВ). К перспективным функциональным ингредиентам относятся биологически активные пептиды (БАП), обладающие различным действием, в том числе антимикробным. Для некоторых антимикробных пептидов (АМП) характерны противовирусные и противоопухолевые свойства. Вместе с тем на потребительском рынке редко встречаются пищевые продукты, обогащенные БАП. Одной из причин является термическая обработка продовольственного сырья и готовых продуктов питания, приводящая к снижению активности БАП. Хотя некоторые АМП, в частности низин, термостабильны и широко используются в рецептуре молочных и мясных продуктов. К молочным продуктам массового потребления относится мороженое, но при этом избыточное его включение в рацион может спровоцировать развитие тонзиллитов, фарингитов и других острых респираторных заболеваний. Соответственно, поиск новых термически стабильных антимикробных противовоспалительных пептидов, их создание и внедрение в производство мороженого может стать одним из перспективных направлений теоретических и прикладных исследований в области пищевой биотехнологии.

Степень разработанности темы исследования. Вопросам пептидомии и исследованию пищевых биопептидов посвящены работы отечественных ученых Е. Ю. Агарковой, О. О. Бабич, Б. А. Баженовой, С. Д. Жамсарановой, Н. Г. Машенцевой, И. С. Милентьевой, А. Г. Кручинина, С. Н. Лебедевой, О. Я. Мезеновой, А. Ю. Просекова, Л. В. Римаревой, Е. М. Сербы, А. Н. Федорова, В. Х. Хавинсона, И. М. Чернухи и зарубежных исследователей М. К. Arihara, К. Bhullar, Р. Duffuler, А. Garg, D. Keizer, E. Zielinski и др.

Цель и задачи работы. *Цель работы* – выделение термостабильного нативного пептида из молозива коров с доказанными функциональными свойствами и синтез его аналога для использования в технологии мороженого.

Задачи:

- 1) определить рациональные технологические параметры протеолиза белка молозива коров для получения нативного пептида с оценкой его состава и антимикробных свойств;
- 2) исследовать цитотоксичность, токсичность и влияние термической обработки на биологическую активность нативного пептида;
- 3) изучить ингибирующее действие нативного пептида в отношении лентивирусов и культур опухолевых клеток;

4) провести синтез пептида (аналог нативного) и определить его характеристики;

5) разработать мороженое, обогащенное синтезированным пептидом;

6) оценить качество и экономическую целесообразность производства мороженого, обогащенного биологически активным пептидом.

Научная новизна. Диссертационная работа содержит элементы научной новизны в рамках п. 6, 7, 8, 10, 25 паспорта научной специальности 4.3.5 (технические науки):

– научно обоснованы и подтверждены в эксперименте рациональные технологические параметры протеолиза белка молозива коров для получения БАП с заданной функциональной направленностью: продолжительность гидролиза 4–5 ч, степень гидролиза 60 %, соотношение фермента трипсина и субстрата 1:17, pH 7,8, температура 39 °С (п. 7);

– установлен состав нативного пептида – 8 аминокислот в последовательности LREGIKNK, смоделирована структура пептида – α -спиральная и спрогнозированы его антимикробные, противовирусные и противоопухолевые свойства (п. 8);

– впервые подтверждено отсутствие токсичности нативного пептида в исследованиях *in vitro* (от 10 до 400 мкг/мл) и *in vivo*; в условиях *in vitro* доказаны антимикробная, противовирусная и противоопухолевая активность нативного пептида: в дозировке 100 мкг снижает проникновение лентивирусных частиц через мембрану клетки человека на 59,2 %, проявляет ингибирующее действие в отношении культуры клеток HelaS53 (карциномы шейки матки человека) при концентрации 40 мкг/мкл (п. 6);

– показана идентичность синтезированного пептида нативному – чистота отделенного от смолы пептида LREGIKNK составила более 90 %, молекулярная масса 9 кДа (п. 10);

– научно обоснованы и экспериментально подтверждены параметры подготовки и стадия внесения в смесь синтезированного пептида LREGIKNK в качестве функционального пищевого ингредиента мороженого «Пломбир ванильный 15 %»: пептид предварительно растворяют в пастеризованной воде, охлажденной до (38 ± 2) °С, в соотношении 1:20 и вносят в смесь для производства мороженого согласно разработанной рецептуре (п. 25).

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании теоретических исследований предложены оптимальные параметры виртуального протеолиза белка молозива коров для получения гидролизата и био-пептида с заданными антимикробными, противовирусными и противоопухолевыми свойствами. Дано научное обоснование механизма действия био-пептида.

Экспериментально доказана эффективность технологических параметров протеолитического гидролиза молозива для получения биопептидов направленного действия.

Практическая значимость заключается в разработке, промышленной апробации и внедрении в производство (ООО «Хладокомбинат № 3», г. Екатеринбург) мороженого, обогащенного биопептидом.

Результаты исследований используются в учебном процессе на кафедре химической технологии древесины, биотехнологии и наноматериалов ФГБОУ ВО «Уральский государственный лесотехнический университет» по направлениям подготовки 19.03.01 «Биотехнология (бакалавриат)» и 19.04.01 «Биотехнология (магистратура)» в рамках дисциплин «Производство биотехнологической продукции для пищевой промышленности» и «Пищевая биотехнология».

Методология и методы исследования. Методология проведения исследований основана на анализе теоретических знаний, протеомных баз данных и практических результатов в области получения нативных и синтезированных биопептидов и пищевой продукции с их использованием. При выполнении работы использованы общепринятые и специальные методы исследований, в частности, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, проточная цитометрия. Получение пептидов осуществляли твердофазным синтезом.

Положения, выносимые на защиту:

1. Технологические параметры протеолиза белка молозива коров для получения гидролизата и биопептида с заданными свойствами.
2. Характеристики нативного и синтезированного пептидов с доказанными *in vitro* антимикробными, противовирусными и противоопухолевыми свойствами.
3. Экспериментально обоснованные технологические параметры получения мороженого с добавлением БАП. Показатели качества и безопасности мороженого, обогащенного синтезированным пептидом.

Степень достоверности и апробация результатов исследований. Результаты получены с использованием программного обеспечения GraphPad InStat 6.0 и одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA). Данные выражены как средние значения со стандартным отклонением ($M \pm SD$) при уровне значимости $p < 0,05$.

Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и получили положительную оценку на научно-практических мероприятиях различного уровня: I Международном конгрессе «Новейшие достижения в области медицины, здравоохранения и здоровьесберегающих технологий» (Кемерово, 2022); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Потребительский рынок: качество и безопасность товаров и услуг» (Орел, 2022); Международной научно-практической конференции «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» (Москва, 2023); Всероссийской научно-практической конференции «Безопасность и качество сельскохозяйственного сырья и продовольствия – 2023» (Москва, 2023); II Между-

народном симпозиуме «Пищевые здоровьесберегающие технологии» (Кемерово, 2023); VIII Всероссийской межвузовской научно-практической конференции «Физическая культура в системе профессионального образования: идеи, технологии и перспективы» (Омск, 2023); научно-практической конференции с международным участием «Научные достижения генетики и биотехнологии в ветеринарной медицине и животноводстве» (Екатеринбург, 2023); IV Национальной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Холодильная техника и биотехнологии» (Кемерово, 2023); XI Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2023), Международной научно-практической конференции «Обеспечение технологического суверенитета АПК: подходы, проблемы, решения» (Екатеринбург, 2024).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, из них восемь статей в изданиях из перечня ВАК РФ, в том числе в журналах категории К1 – 2, категории К2 – 3, одна статья проиндексирована в базе Scopus (Q3).

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы, включает 23 таблицы, 28 рисунков и 3 приложения. Содержание диссертации изложено на 148 страницах машинописного текста. Список литературы включает 282 источника, из них 242 на иностранном языке.

Основное содержание работы

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

На **первом этапе** проанализирована отечественная и зарубежная научно-техническая литература, посвященная характеристике, технологии получения и источникам биологически активных пептидов; рассмотрен механизм действия антимикробных пептидов; применению функциональных ингредиентов в технологии мороженого.

На **втором этапе** разработана схема исследований (рисунок 1), определены объекты и методы исследований.

Третий этап посвящен выделению, характеристике с прогнозированием антимикробной активности пептида из трипсинового гидролизата молозива коров, исследованию биологической активности и токсического действия пептида LREGIKNK, исследованию влияния термической обработки пептида на его антимикробную активность, изучению противоопухолевой и противовирусной активности пептида; синтезу его аналога и обогащению мороженого синтезированным пептидом LREGIKNK с оценкой безопасности и качества продукта, обоснованию экономической целесообразности производства мороженого, обогащенного биопептидом.



Рисунок 1 – Общая схема проведения исследований

Выделение, характеристика и прогнозирование антимикробной активности пептида из трипсинового гидролизата молозива коров.

С помощью программной среды Microsoft Excel проведена оптимизация процесса гидролиза белка молозива коров трипсином с возможностью выбора целевой биологической активности и используемого фермента. Заданные параметры пептида (активность, количество и последовательность аминокислот, молекулярная масса, заряд и др.) позволяют спрогнозировать процесс ферментативного гидролиза молозива коров ферментом трипсином для получения от двух до шести видов заданной биологической активности (антиоксидантная, антимикробная, антидиабетическая, противоопухолевая, противовирусная). В результате исследований определены рациональные технологические параметры протеолиза белка молозива коров для получения нативного пептида с антимикробными свойствами: продолжительность гидролиза 4–5 ч, степень гидролиза 60 %, соотношение фермента трипсина и субстрата 1:17, pH 7,8, температура 39 °C. Из трипсинового гидролизата выделен олигопептид, состоящий из восьми аминокислот со следующей последовательностью: лейцин – аргинин – глутаминовая кислота – глицин –

изолейцин – лизин – аспарагин – лизин (LREGIKNK), с молекулярной массой 9 кДа и молекулярной формулой $C_{41}H_{77}N_{13}O_{12}S_0$. Гидрофобное соотношение составляет 25 %, общий суммарный заряд +2, изоэлектрическая точка пептида 10,63 Ккал/моль⁻¹. Гидрофобность пептида по Уимли – Уайту в целом остатке (сумма энергии переноса пептида без остатка из воды на поверхность раздела) равна 4,37. Потенциал связывания с белками (индекс Бомана) составляет 3,58 ккал/моль.

Полученные данные позволяют предположить, что исследуемый пептид относится к противобактериальным, противовирусным и противораковым. Смоделирована структура пептида LREGIKNK (рисунок 2).

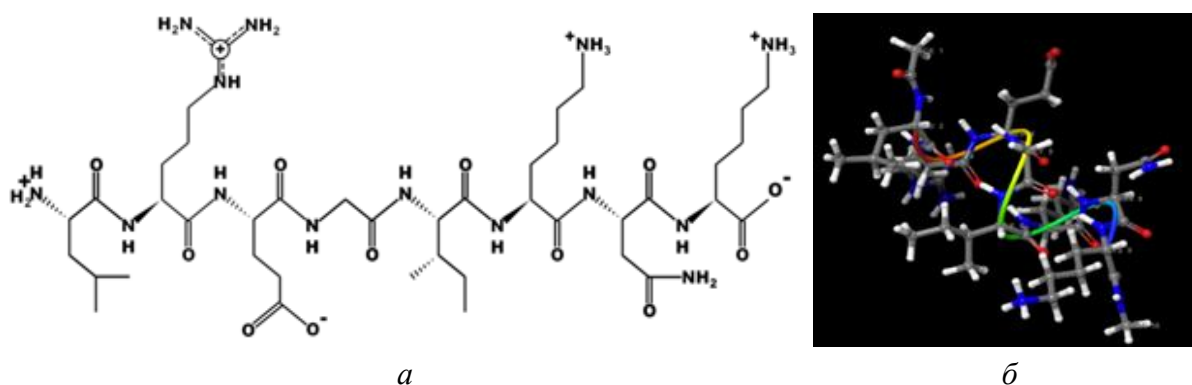


Рисунок 2 – Двухмерная (а) и трехмерная (б) структура пептида LREGIKNK

Из рисунка 2 следует, что пептид относится к α -спиральным антимикробным пептидам. В исследуемом пептиде гидрофобное соотношение составляет 25 % (АМП обычно содержат 25 % и более гидрофобных аминокислот, которые обеспечивают образование амфифильной структуры при взаимодействии с клетками-мишенями). Потенциал связывания с белками (индекс Бомана) составляет 3,58 ккал/моль, что свидетельствует о способности пептида связываться с мембранами бактериальных клеток, проникать в клетку и проявлять высокую антимикробную активность. По базам данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI), противовирусных пептидов (APD) и др. выделенный пептид не идентифицируется, соответственно, биологические свойства пептида неизвестны, но, согласно базе данных APD, пептид имеет сходство до 45 % с другими АМП. На основании проведенных исследований можно предположить, что полученный пептид LREGIKNK обладает антимикробной активностью, что согласуется с результатами моделирования ферментативного гидролиза белка молозива.

Оценка биологической активности пептида LREGIKNK. Исследуемый пептид не обладает цитотоксичностью в отношении клеток эмбриональной почки человека. При повышении дозы пептида с 10 до 400 мкг/мл достоверных изменений цитотоксичности пептида не установлено.

Проведено исследование токсичности пептида при пероральном введении на мышах-самцах BALB/c. В эксперименте по определению острой

токсичности LD_{50} пептида определить не удалось, так как смертельных случаев не зарегистрировано при всех исследуемых дозах (10; 100; 400 мг/кг). Таким образом, LD_{50} был выше 400 мг/кг.

В эксперименте по оценке субхронической токсичности пептида LREGIKNK гибель лабораторных животных контрольной и опытных групп не зарегистрирована. Не отмечено достоверных различий по массе тела животных контрольных и опытных групп. Употребление пептида LREGIKNK в течение 21 сут в дозе 0,8 мг/кг от массы тела мышами BALB/c не оказывает влияния на уровень сывороточной АЛТ, АСТ, креатинина и мочевины, что свидетельствует об отсутствии субхронической токсичности исследуемого пептида. Гистологические картины исследуемых внутренних органов мышей контрольной и опытной группы соответствовали норме и патологических изменений не имели, что свидетельствует об отсутствии субхронической токсичности пептида LREGIKNK при пероральном применении.

Таким образом, результаты оценки острой и субхронической токсичности антимикробного пептида LREGIKNK, полученного при направленном ферментативном гидролизе молозива коров, подтверждают потенциал его использования в качестве функционального ингредиента.

Исследование влияния термической обработки пептида LREGIKNK на антимикробную активность. Пастеризация является одним из наиболее распространенных технологических этапов производства многих продуктов питания и используется для обеспечения их микробиологической безопасности. Технологический процесс производства мороженого включает гомогенизацию смеси для мороженого, перед этим осуществляется подогрев смеси до температуры 75–80 °С, затем пастеризация смеси мороженого при температуре (88 ± 2) °С с последующей выдержкой смеси в накопителе в течение 50 с. Возникает вопрос, будут ли АМП сохранять свою ингибирующую активность после термической обработки.

В таблице 1 представлены результаты влияния температуры 95 °С в течение 3 мин на антимикробную активность пептида LREGIKNK.

Таблица 1 – Антимикробная активность контрольного и опытного образцов 10 % водных растворов пептида LREGIKNK, обработанного температурой 95 °С в течение 3 мин

Образец	Диаметр зоны лизиса, мм			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Первый образец 0,01 % водного раствора пептида (контроль – температурная обработка не проводилась)	10,9 ± 0,2	10,5 ± 0,1	12,7 ± 0,1	9,8 ± 0,1
Второй образец 0,01 % водного раствора пептида (нагревание при температуре 95 °С в течение 3 мин)	11,2 ± 0,2	10,6 ± 0,1	12,5 ± 0,2	9,7 ± 0,1
Антибиотик «Канамицин»	18,7 ± 0,1	14,3 ± 0,2	17,9 ± 0,1	16,5 ± 0,2

На основе полученных данных достоверных различий антимикробной активности термически необработанного пептида (первый образец – контроль) и термически обработанного пептида (второй образец – опытный) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий не отмечено.

Таким образом, пептид LREGIKNK устойчив к термической обработке до 95 °С и может быть использован в качестве функционального антимикробного ингредиента в составе пищевой продукции, требующей пастеризации сырья, в частности мороженого.

Изучение противоопухолевой активности пептида. Проведены исследования противоопухолевой активности пептида в отношении карциномы шейки матки человека HeLa, в качестве контроля использована культура мезенхимальных стволовых клеток (МСК) (рисунок 3). Противоопухолевую активность пептида исследовали в концентрациях 5; 10; 20; 40; 50; 100; 150 и 200 мкг/мкл.

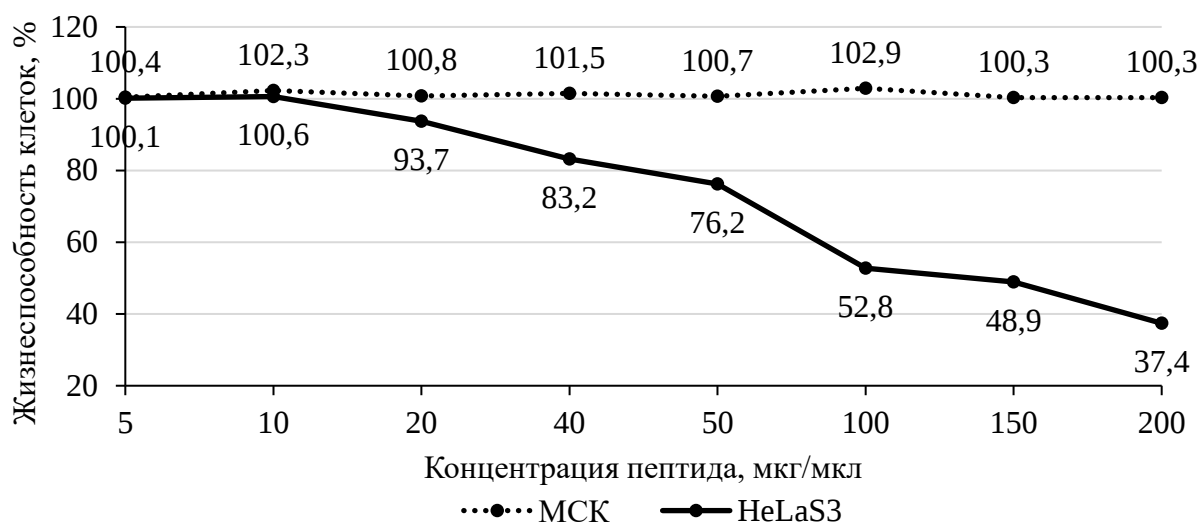


Рисунок 3 – Жизнеспособность клеток HeLa и мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из бедренной кости крыс, при инкубации с пептидом LREGIKNK в различных концентрациях

Установлено, что пептид LREGIKNK начинает ингибирующее действие в отношении культуры клеток HeLaS3 при концентрации 40 мкг/мкл ($p \leq 0,05$), при этом не оказывает влияния на нормальные МСК. Установлено, что максимальная ингибирующая концентрация (IC_{50}) пептида LREGIKNK *in vitro* ≥ 150 мкг/мкл.

Отмечен дозозависимый эффект противоопухолевой активности исследуемого пептида LREGIKNK. Так, концентрация пептида LREGIKNK в дозах 50; 100; 150 и 200 мкг/мкл снижает жизнеспособность клеточной линии до 76,2; 52,8; 48,9 и 37,4 % соответственно.

Таким образом, в результате исследований установлено противоопухолевое свойство АМП LREGIKNK, выделенного из трипсинового гидролизата молозива коров. Полученные данные представляют интерес для раз-

работки принципиально новых пищевых продуктов, обогащенных безопасным функциональным ингредиентом с противоопухолевыми свойствами, в частности мороженого.

Изучение противовирусной активности пептида LREGIKNK. Проведены исследования противовирусных свойств пептида LREGIKNK *in vitro*. Для оценки противовирусных свойств пептида LREGIKNK изучили его влияние на трансдукцию лентивирусных частиц в геном клетки. На рисунке 4 представлена статистическая обработка количества GFP-клеток.

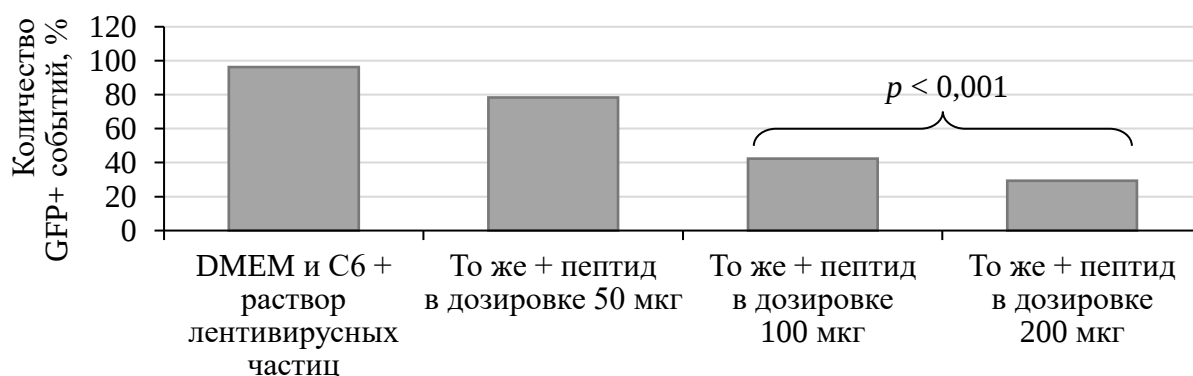


Рисунок 4 – Статистическая обработка количества GFP+ событий

Присутствие пептида в дозировках 50; 100 и 200 мкг снижает трансдукцию ДНК-копии лентивирусных частиц в геном клетки соответственно на 18,6 %; 56,1 % и 69,5 % ($p < 0,001$). Следовательно, отмечается дозозависимый эффект действия пептида: чем выше дозировка, тем ниже трансдукция вируса в геном клетки.

Проведено исследование влияния пептида в зависимости от температуры при дозировке 200 мкг на проникновение в мембрану клетки (рисунки 5 и 6).

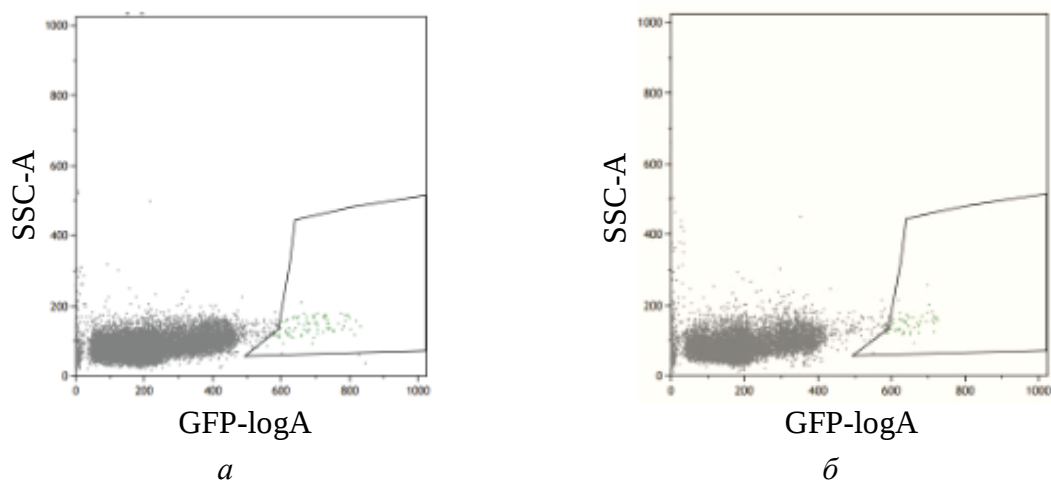


Рисунок 5 – Эффективность проникновения лентивирусных частиц в мембрану клетки (количество SSC-A/GFP-logA) при температуре 4 °C, %:

а – культуральная среда + лентивирусные частицы;
 б – то же плюс пептид в концентрации 200 мкг

Из рисунка 3 следует, что эффективность проникновения лентивирусных частиц через мембрану клетки при температуре 4 °С низкая и не зависит от действия пептида.

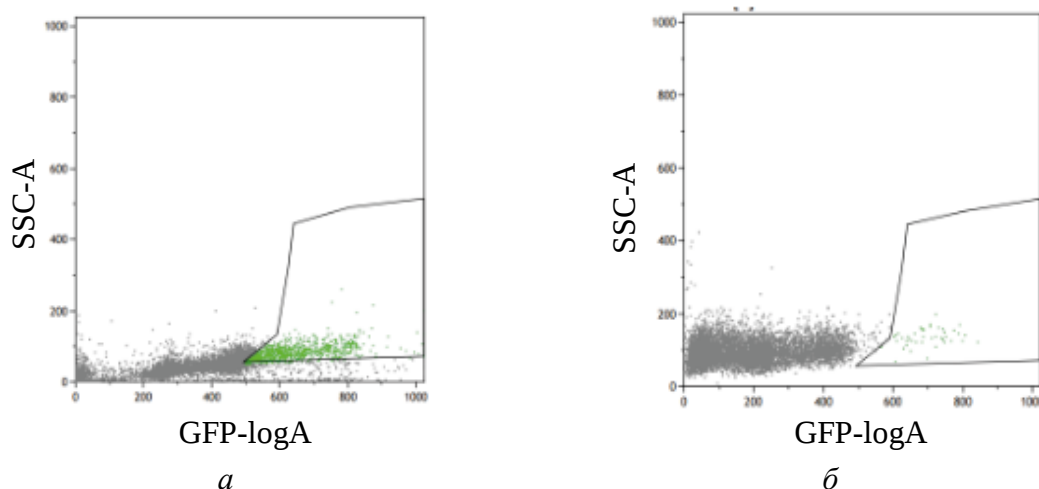


Рисунок 6 – Эффективность проникновения лентивирусных частиц в мембрану клетки (количество SSC-A/GFP-logA) при температуре 37 °С, %:

а – культуральная среда + лентивирусные частицы;
б – то же плюс пептид в концентрации 200 мкг

Установлено, что пептид в дозировке 100 мкг снижает проникновение лентивирусных частиц через мембрану клетки на 59,2 %. Таким образом, доказано противовирусное действие пептида LREGIKNK в отношении лентивирусов.

Твердофазный синтез аналога нативного пептида LREGIKNK. В результате трехфазного синтеза пептида получен полностью идентичный пептид в виде белого мелкодисперсного порошка. Чистота пептида, отделенного от смолы, составила более 90 %, что аналогично результатам, полученным с помощью общего метода синтеза Fmoc с использованием органических растворителей. Молекулярная масса пептида составила 9 кДа и не отличалась от массы нативного пептида. Предложен режим измельчения Fmoc-аминокислот и смолы Rinkamide-TentaGel, включающий использование 0,2 % раствора Triton X-100 в качестве диспергирующего агента и гранул оксида циркония размером 0,5 мм в шаровой вибрационной мельнице, позволяющий получать наноразмерные частицы до 217 нм и проводить быстрый и качественный синтез пептидов.

Полученный синтезированный пептид в дальнейшем был использован для обогащения мороженого.

Разработка технологии мороженого, обогащенного биологически активным пептидом LREGIKNK. Разработано мороженое «Пломбир ванильный 15 %», обогащенное разработанным пептидом. В таблице 2 представлена рецептура мороженого, обогащенного пептидом LREGIKNK.

Таблица 2 – Рецепттура мороженого «Пломбир ванильный 15 %», обогащенного пептидом LREGIKNK

Наименование сырья	Количество, кг	Химический состав, %				Содержание, кг			
		Молочный жир	СОМО	Сахароза	Сухие вещества	Молочный жир	СОМО	Сахароза	Сухие вещества
Молоко цельное	500,000	3,20	8,10	0,00	11,30	16,00	40,50	–	56,50
Молоко сгущенное с сахаром цельное	175,000	8,50	20,00	43,50	72,00	14,88	35,00	76,13	126,00
Масло сливочное	144,400	82,50	1,50	0,00	84,00	119,13	2,17	–	121,29
Молоко сухое обезжиренное	23,500	–	95,00	–	95,00	–	22,33	–	22,33
Сахар-песок	63,900	–	–	100,00	100,00	–	–	63,88	63,88
Стабилизатор-эмульгатор	3,500	–	–	–	95,00	–	–	–	3,33
Пептид LREGIKNK	0,300	–	–	–	–	–	–	–	–
Ароматизатор ванилин	0,100	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Итого сырья</i>	910,679	–	–	–	–	–	–	–	–
Вода питьевая	89,321	–	–	–	–	–	–	–	–
Итого	1000,000	15,00	10,00	14,00	39,38	150,00	100,00	140,00	393,80

В рецептуру мороженого «Пломбир ванильный 15 %» в качестве функционального ингредиента введен пептид LREGIKNK в количестве 30 г на 1000 кг сырья, что обеспечивает в одной порции готового мороженого 20 % дозы пептида при его противоопухолевом эффекте (жизнеспособность клеток HeLaS3 составляет $(52,8 \pm 9,5)$ при дозе 100 мкг пептида).

Технологическая схема производства мороженого представлена на рисунке 7. Детализация этапов технологической схемы, включая подготовку сырья и ингредиентов, фризирование смеси, фасование и закаливание мороженого, упаковку и маркировку мороженого, приведена в виде блок-схем в приложении к диссертации.

Оценка качества и безопасности разработанного мороженого, обогащенного биологически активным пептидом. Образцы мороженого, обогащенного биопептидом, по органолептическим показателям не отличались от контрольных образцов (без обогащения биопептидом) после выработки и соответствовали требованиям ГОСТ Р ИСО 22935-3:2011 «Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 2. Рекомендуемые методы органолептической оценки». Аналогичные результаты были получены через 5; 6 и 12 мес. хранения.

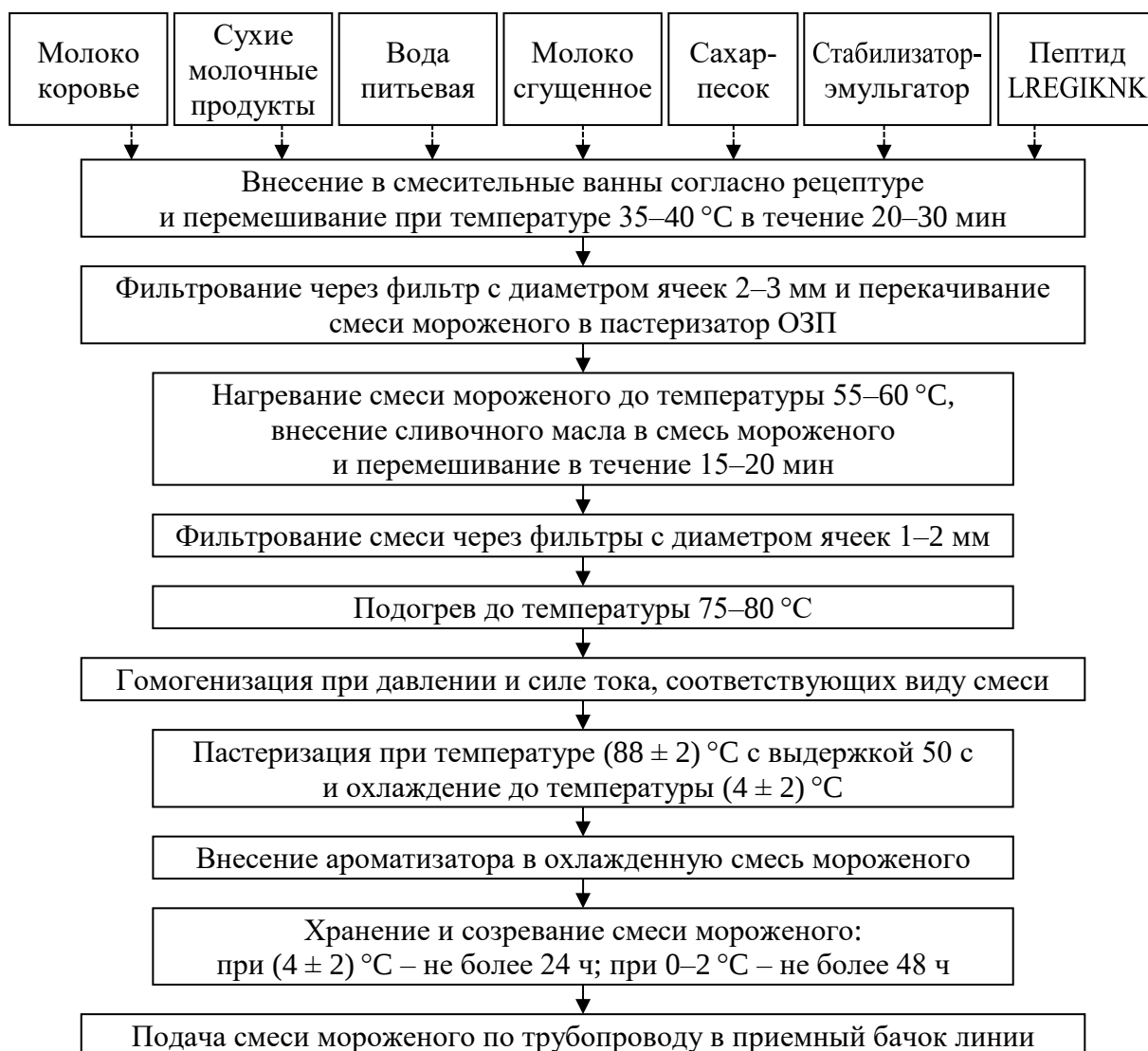


Рисунок 7 – Технологическая схема производства смеси мороженого, обогащенного пептидом LREGIKNK (фрагмент)

Все исследуемые образцы мороженого по показателям безопасности соответствовали требованиям технических регламентов Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции». Следует отметить, что введение биопептида LREGIKNK в рецептуру мороженого позволило снизить КМАФАнМ на 96 %, что, возможно, связано с антибактериальным действием пептида. Полученные данные являются предпосылкой для увеличения срока хранения мороженого с биопептидом по сравнению с мороженым, приготовленным по традиционной рецептуре.

В таблице 3 представлены физико-химические показатели качества мороженого без введения в рецептуру биопептида и мороженого, обогащенного биопептидом. Исследования проведены после выработки.

Таблица 3 – Сравнительная оценка физико-химических показателей качества мороженого без введения в рецептуру биопептида и мороженого, обогащенного биопептидом

Показатель	Характеристика		Норма по ГОСТ 31457
	Мороженое без биопептида	Мороженое, обогащенное биопептидом	
Массовая доля белка, %	3,52 ± 0,01	3,51 ± 0,01	Не менее 3,2
Массовая доля сахарозы, %	15,76 ± 0,01	15,79 ± 0,01	Не менее 14,0
Массовая доля сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО), %	9,22 ± 0,01	9,20 ± 0,01	Не более 10,0
Кислотность, °Т	21,40 ± 1,9	21,20 ± 1,7	Не менее 21,0
Массовая доля жира, %	15,50 ± 0,4	15,50 ± 0,3	Не менее 15,0
Массовая доля сухого вещества, %	42,30 ± 0,3	41,90 ± 0,2	Не менее 39,0

Из данных таблицы 3 следует, что все исследуемые физико-химические показатели контрольных и опытных образцов соответствуют требованиям ГОСТ 31457-2012 «Мороженое молочное, сливочное и пломбир. Технические условия».

По показателям безопасности мороженое, обогащенное LREGIKNK, и мороженое, не содержащее в составе пептид, не имели достоверных различий и соответствовали требованиям нормативной документации технических регламентов Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и ТР ТС «О безопасности молока и молочной продукции». Таким образом, обогащение мороженого биопептидом LREGIKNK не оказывает отрицательного влияния на органолептические, физико-химические, микробиологические показатели и безопасность полученного продукта. Введение пептида в рецептуру мороженого достоверно снижает микробную обсемененность продукта.

Экономическая целесообразность производства мороженого, обогащенного биопептидом LREGIKNK. Проведен сравнительный расчет себестоимости по сырью мороженого, обогащенного биопептидом и необогащенного.

Цена 1 кг мороженого без пептида составляет 153,67 р.; цена мороженого, обогащенного биопептидом, – на уровне 153,90 р., что выше на 0,23 р. (0,2 %).

Следовательно, обогащение мороженого биопептидом не приводит к существенному увеличению стоимости, что позволяет разработанному продукту быть конкурентоспособным на потребительском рынке. Следует отметить, что обогащение мороженого биопептидом позволяет позиционировать его на потребительском рынке как инновационный биопродукт, повысить стоимость на 7 % и, соответственно, получить дополнительную прибыль в размере 10,7 р. за килограмм, или 10 700 р. за тонну.

Таким образом, обогащение мороженого биопептидом экономически целесообразно, что позволяет получить дополнительную прибыль при розничной продаже в размере 10 700 р. за тонну за счет продвижения его на рынке как инновационного биопродукта профилактического назначения.

Заключение

1. Определены рациональные технологические параметры протеолиза белка молозива коров для получения нативного пептида: продолжительность гидролиза 4–5 ч, степень гидролиза 60 %, соотношение фермента трипсина и субстрата 1:17, pH 7,8, температура 39 °С. Установлены состав нативного пептида (8 аминокислот в последовательности LREGIKNK; молекулярная масса 9 кДа; брутто-формула $C_{41}H_{77}N_{13}O_{12}S_0$; гидрофобное соотношение 25 %; общий суммарный заряд +2) и спрогнозированы его антимикробные, противовирусные и противоопухолевые свойства.

2. Установлено, что нативный пептид в условиях *in vitro* не обладает цитотоксичностью при дозировке от 10 до 400 мкг/мл. Показано, что пероральное употребление мышами BALB/c пептида LREGIKNK в течение 21 сут в дозе 0,8 мг/кг от массы тела не оказывает влияния на уровень сывороточной АЛТ, АСТ, креатинина и мочевины. Гистологическое исследование внутренних органов мышей выявило отсутствие субхронической токсичности пептида и отсутствие токсичности *in vivo*. Установлено, что полученный пептид устойчив к термической обработке до 95 °С.

3. Установлено, что пептид LREGIKNK проявляет ингибирующее действие в отношении культуры клеток HelaS53 (карциномы шейки матки человека) при концентрации 40 мкг/мкл, при этом не оказывает влияния на мезенхимальные стволовые клетки. Установлено, что максимальная ингибирующая концентрация (IC_{50}) пептида в условиях *in vitro* составляет ≥ 150 мкг/мкл. Показано, что пептид в дозировке 100 мкг снижает проникновение лентивирусных частиц через мембрану клетки человека в условиях *in vitro* на 59,2 %.

4. Проведен твердофазный синтез пептида с последовательностью аминокислот LREGIKNK (аналог нативного) в воде с использованием диспергируемых водорастворимых защищенных аминокислот и смолы. Предложен режим измельчения Fmoc-аминокислот и смолы Rinkamide-TentaGel, включающий использование 0,2 % раствора Triton X-100 в качестве диспергирующего агента и гранул оксида циркония размером 0,5 мм в шаровой вибрационной мельнице, позволяющий получать наноразмерные частицы до 217 нм и проводить быстрый и качественный синтез пептидов. Установлено, что чистота пептида LREGIKNK, отделенного от смолы, составила более 90 % с молекулярной массой 9 кДа и не отличалась от массы нативного пептида.

5. Разработано мороженое «Пломбир ванильный 15 %» с использованием в качестве функционального ингредиента синтезированного пептида LREGIKNK. Для обогащения мороженого пептид предварительно растворяют в пастеризованной воде, охлажденной до $(38 \pm 2) ^\circ\text{C}$, в соотношении 1:20 и вносят в смесь для производства мороженого согласно предложенной рецептуре.

6. Проведена оценка качества мороженого, обогащенного биологически активным пептидом LREGIKNK. Установлено, что мороженое по органолептическим, физико-химическим, микробиологическим показателям и безопасности соответствует требованиям нормативной документации. Техничко-экономическая оценка разработанной технологии получения мороженого «Пломбир сливочный 15 %», обогащенного пептидом, показала, что цена 1 кг мороженого составит 153,90 р., что позволит получить дополнительную прибыль при розничной продаже в размере 10 700 р. за тонну при увеличении затрат на производство на 0,2 %.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

Статьи в изданиях, входящих в Перечень ведущих рецензируемых научных изданий ВАК РФ

1. **Мерзлякова, Н. В.** Математическое моделирование ферментации белка молозива коров для получения антимикробных и противогрибковых пептидов / Н. В. Мерзлякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, С. В. Шихалев // АПК России. – 2023. – Т. 30, № 3. – С. 433–439. (K2)

2. **Мерзлякова, Н. В.** Прогнозирование антимикробной активности пищевого пептида и оценка его эффективности *in vitro* / Н. В. Мерзлякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова [и др.] // Вестник МГТУ. Труды Мурманского государственного технического университета. – 2023. – Т. 26, № 3. – С. 232–241. (K2)

3. Тихонов, С. Л. Классификация и подтверждение антимикробной активности пищевого пептида в эксперименте *in vitro* / С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, И. Г. Пестова, **Н. В. Мерзлякова** // Ползуновский вестник. – 2023. – № 3. – С. 150–155. (K1)

4. Тихонов, С. Л. Характеристика и противомикробная активность пептида, выделенного из сырья животного происхождения / С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, **Н. В. Мерзлякова** [и др.] // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. – 2023. – № 4 (81). – С. 16–24. (K2)

5. Тихонов, С. Л. Перспективы использования нового пищевого биопептида замедленного высвобождения в составе продуктов питания с антимикробными и противоопухолевыми свойствами / С. Л. Тихонов, А. В. Смирнова, **Н. В. Мерзлякова** [и др.] // Пищевая промышленность. – 2023. – № 12. – С. 38–44. (K1)

6. **Мерзлякова, Н. В.** Разработка мороженого, обогащенного биологически активным пептидом с противовирусными свойствами / Н. В. Мерзлякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Дальневосточный аграрный вестник. – 2023. – Т. 17, № 3. – С. 97–104.

7. Тихонов, С. Л. Физико-химические характеристики, антиоксидантная активность и эффективность пептида, выделенного из молозива коров, на экспериментальной модели сахарного диабета 2-го типа / С. Л. Тихонов, **Н. В. Мерзлякова**, Н. В. Тихонова, А. С. Ожгихина // Вестник ВСГУТУ. – 2023. – № 1 (88). – С. 36–45.

8. Тихонов, С. Л. Теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение антибактериальных и противогрибковых свойств природного пептида / С. Л. Тихонов, **Н. В. Мерзлякова**, С. В. Шихалев [и др.] // Вестник ВСГУТУ. – 2023. – № 2 (89). – С. 40–46.

Публикации в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования

9. **Merzlyakova, N. V.** The use of a biopeptide with antiviral properties as a functional ingredient for ice cream / N. V. Merzlyakova, S. L. Tikhonov, N. V. Tikhonova // BIO Web of Conferences. – 2024. – Vol. 108. – Art. 25007.

Прочие публикации

10. Тихонов, С. Л. Пептиды как функциональный ингредиент для продуктов профилактического назначения / С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, **Н. В. Мерзлякова**, А. С. Ожгихина // Новейшие достижения в области медицины, здравоохранения и здоровьесберегающих технологий : сб. материалов I Междунар. конгресса (Кемерово, 28–30 нояб. 2022 г.). – Кемерово : КемГУ, 2022. – С. 437–440.

11. **Мерзлякова, Н. В.** Новый антимикробный пептид / Н. В. Мерзлякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Горизонты биотехнологии : сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф. (Орел, 7 дек. 2023 г.). – Орел : ОГУ им. И. С. Тургенева, 2024. – С. 206–209.

12. Тихонов, С. Л. Перспективы использования биопептидов в питании спортсменов для коррекции окислительного стресса / С. Л. Тихонов, **Н. В. Мерзлякова**, Н. В. Тихонова, А. С. Ожгихина // Физическая культура в системе профессионального образования: идеи, технологии и перспективы : материалы VIII Всерос. межвуз. науч.-практ. конф. (Омск, 31 марта 2023 г.). – Омск : ОАБИН ВА МТО, 2023. – С. 144–148.

13. Тихонов, С. Л. Синтез и противоопухолевые свойства пептида молозива коров / С. Л. Тихонов, **Н. В. Мерзлякова**, Н. В. Тихонова [и др.] // Научные достижения генетики и биотехнологии в ветеринарной медицине и животноводстве : сб. материалов науч.-практ. конф. с междунар. участием (Екатеринбург, 27 апр. 2023 г.). – Екатеринбург : УрФАНИЦ УрО РАН, 2023. – С. 162–166.

14. Тихонов, С. Л. Моделирование пространственной структуры пептидов ренинового гидролизата молозива коров / С. Л. Тихонов, **Н. В. Мерзлякова**, Н. В. Тихонова, А. С. Ожгихина // Холодильная техника и биотехнологии : сб. тез. IV Нац. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых (Кемерово, 1–3 дек. 2022 г.). – Кемерово : КемГУ, 2023. – С. 166–167.

15. **Мерзлякова, Н. В.** Влияние термической обработки пептида l-k на противобактериальную активность / Н. В. Мерзлякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихо-

нова, Е. В. Мутовкина // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК : материалы Междунар. науч.-практ. конф. (Лосино-Петровский, 1 нояб. 2023 г.). – Лосино-Петровский : ВНИТИБП, 2023. – С. 221–224.

16. **Мерзлякова, Н. В.** Исследование термолабильности и цитотоксичности синтезированного противомикробного пептида / Н. В. Мерзлякова, С. Л. Тихонов // Безопасность и качество сельскохозяйственного сырья и продовольствия – 2023 : материалы Всерос. науч.-практ. конф. (Москва, 22–23 нояб. 2023 г.). – Москва : Сам полиграфист, 2023. – С. 264–268.

17. **Мерзлякова, Н. В.** Мороженое с противовирусным пептидом / Н. В. Мерзлякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, Е. А. Мутовкина // Пищевые здоровьесберегающие технологии : сб. тез. II Междунар. симпозиума (Кемерово, 2–3 нояб. 2023 г.). – Кемерово : КемГУ, 2023. – С. 403–405.

18. **Мерзлякова, Н. В.** Исследование цитотоксичности пищевого антимикробного пептида / Н. В. Мерзлякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Пищевые здоровьесберегающие технологии : сб. тез. II Междунар. симпозиума (Кемерово, 2–3 нояб. 2023 г.). – Кемерово : КемГУ, 2023. – С. 83–85.

Список сокращений и условных обозначений

АЛТ – аланинаминотрансфераза.

АМП – антимикробный пептид.

АСТ – аспартатаминотрансфераза.

БАВ – биологически активные вещества.

БАП – биологически активный пептид.

МСК – мезенхимальные стволовые клетки.

Подписано в печать 26.09.2025.
Формат $60 \times 84 \frac{1}{16}$. 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