

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет»

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук, профессор
Тихонов Сергей Леонидович

Екатеринбург – 2025

Оглавление

Введение.....	4
1 Аналитический обзор литературы.....	9
1.1 Биологически активные пептиды: характеристика, свойства, недостатки и преимущества.....	9
1.2 Технологии получения биологически активных пептидов	16
1.3 Источники и биологические свойства пептидов, определяющие направления их использования	24
1.4 Характеристика и механизм действия антимикробных пептидов.....	29
1.5 Применение функциональных ингредиентов в технологии мороженого.....	35
Заключение по главе 1	38
2 Объекты и методы исследований	40
3 Результаты исследований и их обсуждение	55
3.1 Выделение, характеристика и прогнозирование антимикробной активности пептида из трипсинового гидролизата молозива коров	55
3.2 Исследование биологической активности пептида LREGIKNK	63
3.2.1 Оценка цитотоксического действия пептида <i>in vitro</i>	63
3.2.2 Оценка субхронической токсичности пептида <i>in vivo</i>	65
3.2.3 Исследование влияния термической обработки пептида на антимик- робную активность	69
3.2.4 Изучение противоопухолевой активности пептида	71
3.2.5 Изучение противовирусной активности пептида.....	75
3.3 Твердофазный синтез аналога нативного пептида LREGIKNK	81
3.4 Разработка технологии мороженого, обогащенного биологически активным пептидом LREGIKNK.....	88
3.5 Оценка качества и безопасности разработанного мороженого, обогащенного биологически активным пептидом	91

3.6 Экономическая целесообразность производства мороженого, обогащенного биопептидом LREGIKNK	96
Заключение	98
Список сокращений и условных обозначений	100
Список литературы	101
Приложение А Детализация этапов технологической схемы	136
Приложение Б Протоколы испытаний	141
Приложение В Документы, подтверждающие внедрение результатов исследования	147

Введение

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 пептидомиики 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. Сербь, 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 °C (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 $(38 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 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 биопептида с заданными антимикробными, противовирусными и противоопухолевыми свойствами. Дано научное обоснование механизма действия биопептида.

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 Международном 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 K1 – 2, категории K2 – 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.

1 Аналитический обзор литературы

1.1 Биологически активные пептиды: характеристика, свойства, недостатки и преимущества

К нативным биологически активным веществам относятся витамины, микро- и макроэлементы, фитонутриенты, пре- и пробиотики, пептиды и другие вещества [54; 123; 145; 192; 263].

Пептиды были открыты немецким химиком Г. Э. Фишером в 1900 г. Г. Э. Фишер назвал пептиды органическими соединениями, состоящими из двух и более аминокислот, которые образуют цепочки со специфическим типом связи. В начале XX в. он доказал наличие предполагаемой пептидной связи между аминокислотами. Уже в 1905 г. Г. Э. Фишер разработал способ, позволяющий синтезировать пептиды в лабораторных условиях. Так как пептиды – это короткие белки, а согласно определению жизни, изложенному в трудах Ф. Энгельса, «жизнь – это есть способ существования белковых тел...», на протяжении многих лет большое количество научных исследований было посвящено пептидам и белкам. С середины прошлого века пептиды рассматриваются как новый класс химически активных веществ, которому дано название цитомедины, или биологически активные пептиды (БАП), биорегуляторы, регуляторные пептиды [4].

Пептиды в живом организме выполняют функции регулирования систем и органов, что позволяет их называть «словарь природы». Пептиды входят в состав пищевых продуктов, что позволяет их рассматривать как пищевые вещества, которые кодируются в геномах и считаются «общепризнанными безопасными» (GRAS) [237].

Пептиды – это универсальные молекулы, обладающие антигипергликемическими, противомикробными, противовирусными, противовоспалительными и другими свойствами [232].

Пептиды, как правило, используются в составе детского и спортивного питания, биологически активных добавок [115], так как обладают биологической активностью и не вызывают аллергии. Безопасность и эффективность пептидов доказана в доклинических и клинических исследованиях [237].

Функциональная (биологическая) активность пептидов определяется биохимическими, биологическими и физическими свойствами: структура, количество и последовательность аминокислот, заряд, молекулярная масса, гидрофобность/гидрофильность, основность/кислотность, растворимость и биохимическая стабильность [187], что и обуславливает их функцию в органах-мишенях [132; 133].

Структура пептида может быть описана по-разному. Например, пептиды могут быть описаны их аминокислотной последовательностью (первичная структура), содержанием структурных паттернов, таких как β -листы или α -спирали (вторичная структура), расположением атомов пептида в трехмерном пространстве (третичная структура), составом химических групп (например, карбоксилаты, первичные амины), химическими свойствами (например, полярность, изоэлектрическая точка), среди других химических дескрипторов (например, электротопологические состояния, энтропия). Существуют различные компьютерные программы, предназначенные для вычисления таких структурных дескрипторов пептидов [233]. В то же время функции белков и пептидов систематически аннотируются консорциумом Gene Ontology Consortium [99], при этом распознаются три аспекта: молекулярная функция (активность, осуществляемая пептидом без учета того, где или в каком контексте происходит действие), клеточный компонент (местоположение клетки, где находится пептид) и биологический процесс (клеточная программа, выполняемая несколькими механизмами). Очевидно, что поскольку пептидная структура и пептидная функция наблюдаются в одной и той же молекуле, эти два наблюдения должны быть связаны. Однако пока неясно, какова форма такой взаимосвязи. Признавая существующие ограничения в отношении взаимосвязи струк-

туры и функции белка, в последнее десятилетие был проведен международный эксперимент по формализации взаимосвязи структуры и функции белков – «Критическая оценка алгоритмов аннотирования функций (CAFA)», в настоящее время действует четвертая версия (CAFA4) [247].

Существует множество методов прогнозирования трехмерной структуры пептидов, основанных на физических принципах. Так, известны методы, основанные на анализе водородных связей, стерических эффектов и конформационных характеристик аминокислотных остатков, что дает возможность предсказать вторичную структуру пептида [243]. Статистические модели получены на основе статистического анализа известных структур белка и позволяют оценивать совместимость различных пептидных конформаций с наблюдаемыми структурами белка, тогда как модели, основанные на физике, пытаются смоделировать энергетический ландшафт сворачивания белка и предсказывают стабильность различных пептидных конформаций [135]. Моделирование молекулярной динамики использует вычислительные методы для моделирования движения атомов и молекул с течением времени и предоставления информации о трехмерной структуре, динамике и энергетике пептида. Однако точность результатов зависит от качества параметров силового поля, которые могут быть откалиброваны в соответствии с экспериментальными данными или рассчитаны *ab initio*, и результаты моделирования должны быть проверены экспериментальными данными, когда это возможно [73]. Эти методы дают существенное представление о трехмерной структуре и динамике пептидов, но их точность и вычислительная эффективность имеют ограничения.

Для прогнозирования трехмерной структуры пептида с использованием методов дизайна *de novo* используются различные методы. Методы сборки фрагментов включают предсказание структуры пептида путем объединения меньших фрагментов известных структур для построения полной структуры пептида. Моделирование *ab initio* предсказывает структуру белка путем поиска конформации пептидного остова с наименьшей энергией. Другим широко используемым вычислительным методом является I-TASSER, который генерирует полноразмерные

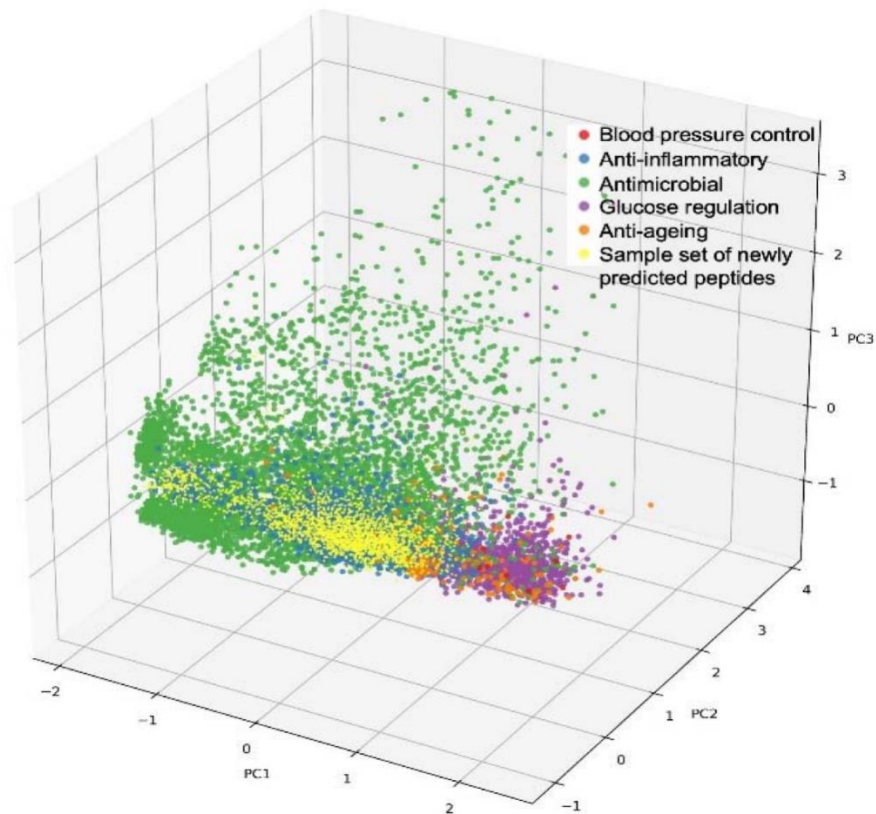
модели, комбинируя моделирование на основе шаблонов с имитацией сборки фрагментов [217].

Следует отметить, что уникальность аминокислотной последовательности пептида может являться интеллектуальной собственностью [91], так как последовательность аминокислот и структура пептида влияют на его биологическую активность, переносимость, стабильность и период полувыведения.

Биодоступность пептида и, соответственно, эффективность применения зависят от возможности его проникновения через мембрану клетки. Пептиды, состоящие из более чем 10 аминокислот, характеризуются высоким сродством к миелину, но низкой проницаемостью через мембрану из-за большого размера. В этом случае проникновение пептида в клетку происходит за счет пассивной диффузии из разницы концентраций веществ в межклеточной жидкости и клетки [90].

Любой пептид характеризуется уникальной последовательностью аминокислот и может проектироваться в одно-, двух- и трехмерные структуры, следовательно, в пространстве занимает уникальное положение. Принимая во внимание, что пептиды имеют уникальные комбинации, соответственно, они обладают различными и многочисленными биологическими свойствами, которые позволяют дать индивидуальную характеристику пептида. Каждый пептид может иметь более 100 характеристик. Многомерное пространство пептида отражает одно или множество биологических свойств. Пространство может быть рассмотрено под углом и в разной глубине, что позволяет утверждать, что один пептид может обладать различными биологическими функциями [168]. Это показано на рисунке 1.

В качестве примера можно рассмотреть природный полипептид аглицин. Несмотря на то, что он состоит из большого количества аминокислот – 37, отличается специфической структурой (цистиновые узлы в молекуле), что обеспечивает его высокую устойчивость к протеолитическим ферментам в желудочно-кишечном тракте. Особая структура пептида аглицина позволяет его использовать в составе функциональной пищевой продукции для профилактики сахарного диабета 2-го типа.



Примечание – 3D-проекция биоактивных пептидов, визуализированных в виде цветных точек в соответствии с различными преимуществами для здоровья: красный – контроль кровяного давления; синий – противовоспалительный; зеленый – антимикробный; пурпурный – регулирование уровня глюкозы; оранжевый – антивозрастной; желтый – набор образцов недавно предсказанных пептидов.

Рисунок 1 – Иллюстрация многомерного пространства свойств пептидов

Недостатком многих пептидов является быстрая перевариваемость в желудочно-кишечном тракте. Поэтому, как правило, пептиды вводятся в организм подкожно и внутривенно (в частности, пептид инсулин вводится подкожно). Хотя употребление БАП в составе пищевых продуктов или биологически активных добавок (БАД) является наиболее удобным и перспективным. Наиболее распространенным примером является пептид инсулин. Пероральное применение инсулина существенно снижает его биодоступность. Для повышения эффективности инсулина при употреблении внутрь его помещают в гидрогели, покрывают нано- и микрокапсулами пищевых веществ [117; 176].

К одним из недостатков применения пептидов как биологически активных веществ относится короткий период полураспада, особенно при пероральном применении, т. е. действие пептидов непродолжительно, и для получения необходи-

мого эффекта следует постоянно вводить в организм новый пептид. Следовательно, пептиды при употреблении внутрь в составе пищевой продукции следует рассматривать как дополнительное средство лечения и профилактики различных заболеваний в зависимости от биологической активности пептида.

Указанные выше недостатки пептидов для перорального применения стали отправной точкой в развитии технологии создания модифицированных пептидов путем включения не менее одной ненатуральной аминокислоты (NNAA) [214]. Введение NNAA позволяет сохранить пептид от распада под действием протеолитических ферментов [165]. Следовательно, такие характеристики природных пептидов, как биологическая активность, сродство к клетке мишени, гидрофобность природных пептидов *in vivo*, могут быть улучшены путем их модификации [213].

В то же время применение пептидов имеет много достоинств по сравнению с лекарственными препаратами и БАД, в частности: проникновение в ткани и интернализация в клетку, отсутствие аллергической реакции, низкая токсичность, высокая эффективность при наноконцентрациях. Еще одной положительной стороной использования пептидов является возможность быстрой модификации [256].

В связи с вышесказанным пептиды сегодня рассматриваются как альтернатива применению БАД и лекарственных препаратов перорального введения. Одним из доказательств указанного направления является разработка и подтверждение высокой эффективности и безопасности в клинических испытаниях пептидного препарата Рыбельсус® [84; 87].

Одним из не менее важных достоинств пептидов является их самосборка из 20 природных аминокислот, что обеспечивает их физико-химическое разнообразие и биологическое действие [175]. Поэтому исследования многих ученых посвящены созданию наноструктур пептидов из самособирающихся в пептидную цепь, образующих α -спираль [150], β -лист [64] и тройные коллагеновые спирали [244]. Некоторые пептиды, имеющие структуру, сходную с фосфолипидами, могут образовывать двойной слой в воде, похожий на липидные мембраны [106], в то время как пептиды, конъюгированные с алифатическими цепями, могут собираться в различные структуры, включая мицеллы, ленты и нановолокна [231; 280].

Наряду с пептидами, имеющими линейную структуру, выделяют циклические пептиды [262], которые отличаются высокой селективностью к мембранам клеток [102; 169].

Использование специальной системы идентификации нестандартных пептидов (RaPID) позволяет создавать большое количество новых циклических пептидов, а также лекарственные препараты и БАДы на их основе. Ежегодно один циклический пептид проходит клинические испытания и утверждается для применения для профилактики и лечения заболеваний [120].

Преимуществом циклических пептидов перед линейными является возможность изменять структуру и гидрофильность под действием окружающей среды. Циклические пептиды могут находиться в различных конформациях или в переходном состоянии от одной структуры к другой [75]. Такое свойство циклических пептидов называют «свойство хамелеона». С помощью разработанной S. Wang и др. [268] модели марковских состояний (MSMS) можно получить информацию о поведении циклических пептидов, которые важны для выяснения механизма мембранной проницаемости и структурной оптимизации для повышения мембранной проницаемости.

Такие пептиды склонны к «открытой» конформации в воде, что повышает растворимость, и «закрытой» конформации в гидрофобных средах, где полярные группы защищены внутримолекулярными водородными связями или липофильными боковыми цепями, что приводит к улучшению проницаемости мембраны [82; 161].

Следовательно, для усиления способности пептидов проникать через мембрану клеток необходимо придавать им «закрытую» структуру, например, за счет экранирования об NH-группы основным N-метилированием [61]. Кроме того, повышение проницаемости мембран возможно за счет замены амида на сложный эфир [242].

1.2 Технологии получения биологически активных пептидов

В зависимости от источника происхождения или выделения БАП подразделяются на природные, искусственно модифицированные и искусственно синтезированные [88; 149]. Они могут быть получены из живых организмов, таких как животные, растения, бактерии и грибы путем протеолиза белка, выделены из ядов, синтезированы химическим путем или с помощью рекомбинантных генов, посредством *in silico* самосборки и с помощью других технологий [130; 184].

Пептиды, созданные *in silico* с использованием передовых алгоритмов и искусственного интеллекта, открывают новые возможности для создания БАД с высокой специфичностью [56]. Вычисления могут помочь в проектировании пептидных структур для имитации активности белка, обеспечивая понимание важных путей развития заболеваний, клеточной локализации и потенциальных вариантов применения в терапевтических целях [148; 151; 224].

Существует множество *in silico* подходов к разработке и созданию БАП. Синтезатор белков *in silico* (InSiPS) – это новый метод конструирования ингибирующих пептидов, способных избирательно связывать и ингибировать специфические белки-мишени в живых организмах [66]. Процесс включает в себя генерацию новых пептидных последовательностей путем модификации пула случайно сгенерированных аминокислотных последовательностей с использованием операций копирования, мутации и кроссовера, а затем оценку пригодности каждого пептида с помощью механизма PIPE, который ранжирует пептиды на основе их прогнозируемого сродства к целевому белку (рисунок 2).

InSiPS генерирует пептиды, специфичные для широкого спектра белковых мишеней. Сначала генерируется начальный пул смешанных случайных пептидов *in silico*. Затем эти пептиды сравниваются с целевым белком, чтобы определить, взаимодействуют ли они. В то же время пептиды оцениваются по заранее определенному набору белков, не являющихся мишенями, для обеспечения высокой специфичности к мишеням.

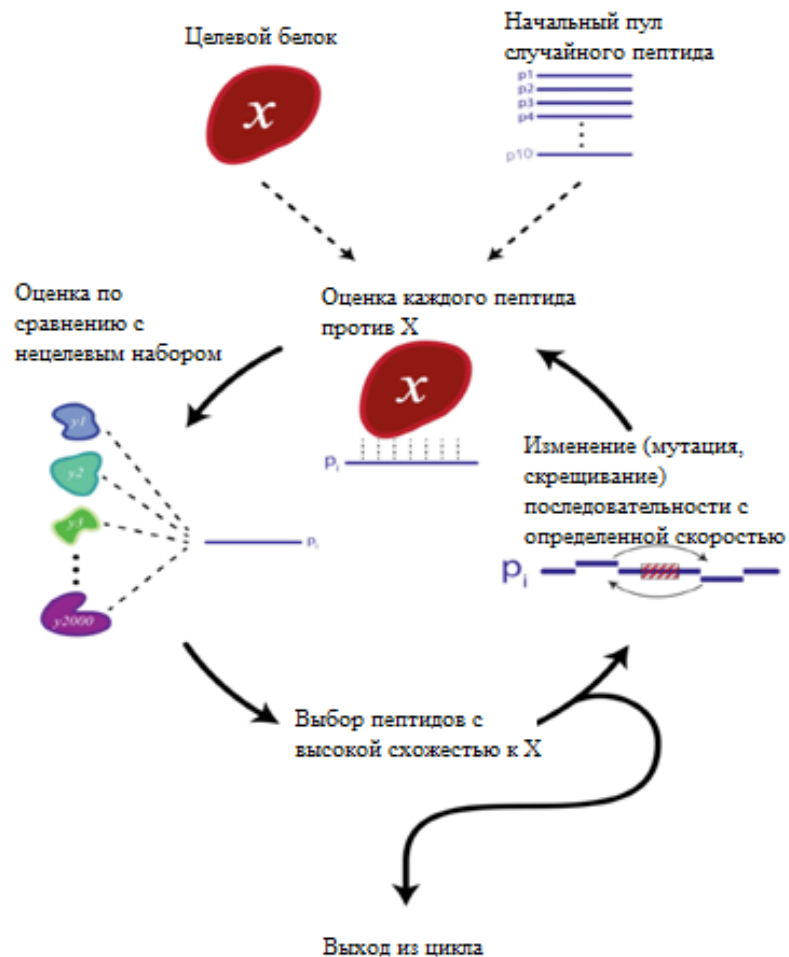


Рисунок 2 – Конструирование белков *in silico*

Пептиды с самым высоким рейтингом, которые связываются с мишенью и избегают попадания в клетки, не являющиеся мишенями, затем модифицируются с помощью мутаций и кроссинговера для повышения сродства к мишени. Этот процесс повторяется до тех пор, пока показатель пептидности (т. е. наивысшее прогнозируемое целевое сродство) не достигнет плато. Метод *in silico* позволяет получать пептиды, готовые для дальнейшего анализа *in vitro* и *in vivo* [66].

Пептиды с самыми высокими показателями пригодности используются для создания нового пула, и этот процесс повторяется до достижения наивысшего уровня пригодности пептидов.

Пептидный дизайн включает три взаимосвязанные технологии, каждая из которых предлагает отдельную перспективу: структурную, имитацию белка и дизайн коротких мотивов (SM-дизайн) (рисунок 3).

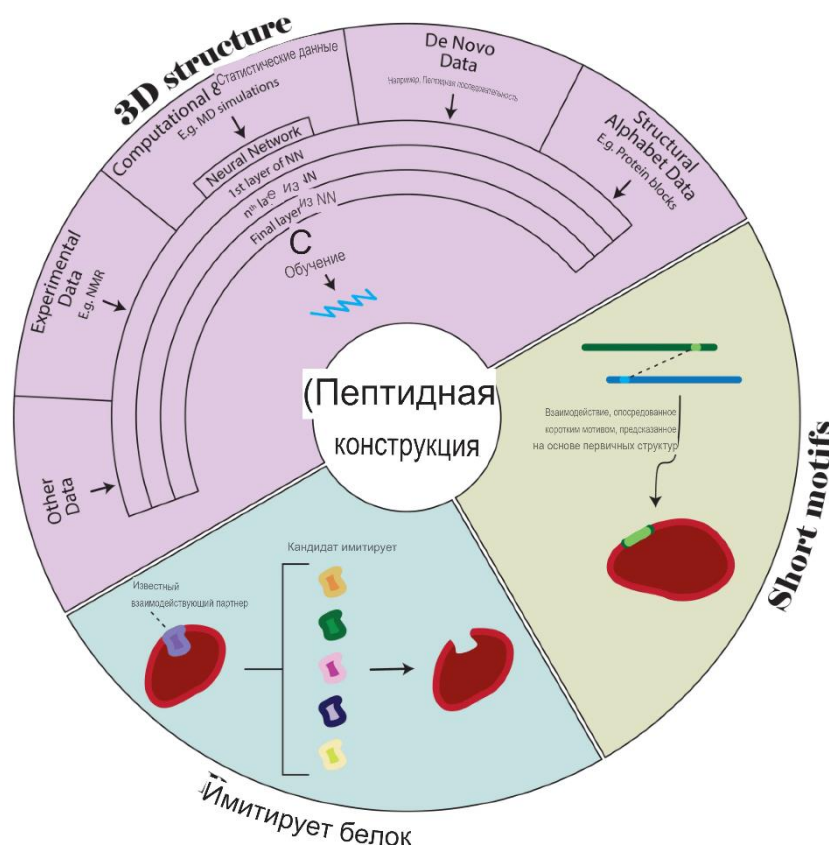


Рисунок 3 – Основные технологии, используемые для разработки пептидных препаратов [224]

Технология трехмерной структуры охватывает большую часть методов, используемых для создания пептидных препаратов. Эта технология использует пять источников данных: экспериментальные, статистические, *de novo*, алфавитные и прочие. На основе этих данных осуществляется обучение нейронных сетей, которые генерируют пептидные конструкции. Технология имитации белка включает в себя генерацию пептидов-кандидатов, полученных от известных науке партнеров по взаимодействию. Затем кандидаты, имитирующие белок, тестируются на партнерах по взаимодействию. В технологии коротких мотивов (SM) исследуются ранее известные фрагменты первичных структур и на этой основе прогнозируется их взаимодействие с клетками-мишенями. Данная технология используется для разработки пептидной терапии.

Метод *de novo mimic* является многообещающей стратегией для разработки новых молекул с потенциальными биологическими свойствами. Одним из примеров его применения является разработка имитаторов костного морфогенетического

белка (BMP), которые представляют собой пептиды, способные индуцировать образование костей и хрящей [269]. Исследователи успешно использовали программный комплекс Rosetta для разработки двух белковых имитаторов BMP-2 методом *de novo*, которые оказались высокостабильными и эффективными в стимулировании роста костей *in vivo* [269]. Этот подход обладает потенциалом для разработки терапии заболеваний костей. Кроме того, подход *de novo mimic* был использован для разработки сплайсостатина E (SPE) – пептида, который избирательно ингибирует активность вариантов сплайсинга рецептора фактора роста фибробластов (FGFR), которые сверхактивны в раковых клетках [215]. Разработанный белок SPE нацелен на участок связывания гепарина FGFR и избирательно ингибирует активность, практически не влияя на другие изоформы. Этот подход имеет перспективы при разработке таргетных методов лечения рака [215].

Подход *de novo mimic* также использовался для разработки модифицированной системы CRISPR-Cas9, dCas9, которая нацеливает ингибитор репрессивного комплекса Polycomb 2 (PRC2) на специфические последовательности ДНК для облегчения экспрессии генов [166]. Было показано, что dCas9 снижает экспрессию Мус и увеличивает H3K27me3, маркер PRC2-опосредованной репрессии генов, демонстрируя его потенциал для использования в регуляции генов и генной терапии. Эти исследования демонстрируют потенциал подхода *de novo mimic* для разработки БАД и лекарственных препаратов на основе пептидов.

Одним из примеров синтезированных пептидов является инсулин [147].

Технология рекомбинантной ДНК (RDT) широко используется для производства гормонов, имеющих широкое применение в медицине. В настоящее время RDT применяется для увеличения производства и выхода специфических БАП. Этот метод позволяет одновременно получать несколько пептидов путем экспрессии пептид кодирующей области в микробах [178]. Примером использования рассматриваемой технологии является получение АМП из молочного белка. Так, в результате экспрессии бычьего лактоферрина B-W10 (Lf_{cinB-W10}) в *E. coli* был получен катионный антимикробный пептид лактоферрина Lf(f17-41). Аналогичным образом, путем сочетания бычьего лактоферрина и индуцируемого насеко-

мыми антимикробного пептида танатина был разработан гибридный антимикробный пептид [109].

Некоторые БАП продуцируются в организме: например, натрийуретические пептиды (NPS) экспрессируются сердцем [100; 208].

Натрийуретические пептиды предсердий и головного мозга (или В-типа) являются истинными гормонами, продуцируемыми кардиомиоцитами, которые оказывают системные эффекты, начиная от регуляции артериального давления до метаболизма глюкозы и липидов, обладают широким спектром кардиометаболических свойств, включая вазодилатацию, натрийурез и ингибирование ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), а также мобилизацию липидов и окисления, потемнения адипоцитов и улучшения чувствительности к инсулину [240].

Для получения пептидов с различной молекулярной массой используют технологию нанофильтрации. Достоинствами данной технологии являются экономичность, отсутствие использования химических реактивов, доступность и простота использования. Белковые гидролизаты, полученные после гидролиза, фракционируют с помощью мембран с ограничением молекулярной массы различных размеров (от 0,5 до 100 кДа). Различные фракции затем проверяют на антимикробную активность. Низкомолекулярные фракции гидролизатов казеина козьего молока (менее 3 кДа) показали высокую антимикробную активность в отношении *E. coli* и *B. cereus* по сравнению с фракциями 3–10 кДа [94]. Метод нанофильтрации также может быть применен для выделения пептида с молярной массой менее 1 кДа, поскольку фильтрование происходит при размере пор 0,5–2 нм [157]. В одном из недавних исследований для повышения эффективности выделения пептидов был применен метод электродиализа с фильтрующей мембраной [41].

В лабораторных условиях по разделению, очистке, обнаружению и выделению новых биологически активных пептидов применяют одномерный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), жидкостную хроматографию с обратной фазой (RP-ВЭЖХ), ионообменную хроматографию (ИЕС), хроматографию с исключением размера (SEC, SE-ВЭЖХ), жидкостную хроматографию на быстрых белках (FPLC), хроматографию с гель-фильтрацией, аффин-

ную хроматографию. RP-ВЭЖХ является наиболее широко используемым методом очистки БАП, полученных из молока, благодаря возможности их быстрого обнаружения и отделения от смеси образцов. Пептиды фракционируют с использованием аналитической колонки RP-C18 на основе кремнезема в стационарной фазе [222]. Полученную фракцию пептидов собирают в промежутке между временем удерживания и градиентом, данные анализируют с помощью ультрафиолетового детектора. Этот метод предпочтительно используется для фракционирования белка и содержания пептидов как в одномерных, так и в многомерных системах разделения на основе полярности пептидов и молекулярной массы. Метод хроматографии с исключением размера также разделяет молекулы пептидов на основе размера молекул [194]. Н. А. Moraes с коллегами [194] с помощью SE-ВЭЖХ разделили гидролизаты концентрата сывороточного протеина на четыре фракции и охарактеризовали пептиды по длине цепи с молярной массой менее 1000 Да. Такие параметры, как размер/объем пор, ионная сила и природа подвижной фазы, влияют на производительность колонки SE-HPLC [103]. Многомерная система разделения, объединяющая несколько разделительных устройств, обеспечивает мощность с высоким разрешением и максимальную производительность по сравнению с одномерным подходом к очистке и разделению. Используя этот подход, М. Rahimi с коллегами [225] провели гидролиз казеина, затем полученные пептиды были фракционированы многомерным методом с использованием ультрафильтрационных мембран и полупрепаративной RP-HPLC. Однако методы многомерного разделения не всегда эффективны, во-первых, по причине высокой стоимости настройки оборудования и, во-вторых, из-за несовместимости растворителей в различных методах. В то же время оптимальная комбинация различных систем многомерного разделения позволит эффективно очистить и идентифицировать пептиды сложных образцов с высокой желаемой биологической активностью [41].

Пептиды, как правило, получают из белка методом ферментативного гидролиза. Так, Е. М. Серба с коллегами [33] из белковых соединений мицелия грибов рода *Aspergillus* в результате ферментативной деструкции внутриклеточными протеазами и β -глюканазой получили пептидно-аминокислотные комплексы с задан-

ными пептидными фракциями. В течение 6 ч гидролиза получены пептиды с молекулярной массой более 29 000 Да. При увеличении времени гидролиза количество пептидов с молекулярной массой менее 500 Да значительно увеличилось.

И. К. Журкович и ее коллегами [12] модифицированы нативные пептиды, выделенные из сосудов, коллагена, слизистой бронхов, головного мозга. Установлено, что полученные короткие пептиды KED, AED, EDG, AEDL и KEDW обладают идентичными биологическими свойствами.

Т. Д. Волковой и ее коллегами [8] проведены исследования по совершенствованию трехфазного синтеза пептидов. В результате получен пептид β -амилоид с высокой степенью очистки – более 95 %.

В исследовании А. Н. Касиновой [15] путем увеличения длины пептидной цепи за счет карбоксильной группы синтезирован короткий БАП со следующей последовательностью аминокислот: лизин – глицин – пролин – тирозин, с выходом более 80 %.

В работе [5] показана возможность создания пептидов на основе 4-аминобутановой кислоты и глицина с применением N-гидроксibenзоил и N-гидроксibenзоилацил хлоридов аминокислот. Технология отличалась высоким выходом, а полученные пептиды имели высокую степень очистки. Доказана высокая эффективность пептидов в качестве нейропротекторов.

Одним из источников БАП являются ферментативные гидролизаты белка.

Многочисленные исследования в литературе сообщают о биоактивности пептидов, полученных из источников пищевого белка. Первые пептиды пищевого происхождения были обнаружены в продуктах на основе молока, и их потенциальное воздействие на здоровье человека было тщательно изучено. Белки мяса, яиц, сои, арахиса считаются «хорошим» источником для получения БАП [251].

БАП можно получить методом протеолиза цельных сывороточных белков с использованием ферментов различного происхождения.

В результате ферментализации сывороточного протеина были получены БАП с молекулярной массой менее 1 кДа с антиоксидантной активностью ($18,44 \pm 2,47$) мкг/мл, ингибирующей АПФ. Гидролизат использовался в качестве

функционального ингредиента в йогурте с низким содержанием жира; сохранял биологическую активность в течение 4 мес. при температуре 20 °С (после размораживания и пастеризации) и в течение одной недели в йогурте при температуре 4 °С [95].

Технология ферментативного гидролиза белка для получения БАП является быстрой, безопасной и контролируемой [89].

Из белка бобовых коллективом авторов [195] получены БАП противодиабетической активности, состоящие из 2–20 аминокислот.

Д. В. Соколовым и его коллегами [35] определены оптимальные параметры двухстадийного ферментализа белка сои на основе созданной модели определения оптимальных показателей двухстадийного процесса ферментативной конверсии соевого белка. Установлены два оптимальных технологических параметра гидролиза белка сои для получения пептидов с антиоксидантными свойствами: на первой стадии продолжительность 5 ч, соотношение фермента (пепсина) и сырья (субстрата) – 1:20; на второй стадии продолжительность 3 ч, соотношение фермента (трипсина) и сырья (субстрата) – 1:19.

R. K. D. Bravo с коллегами [65] использовали ферменты пепсин, химотрипсин и трипсин для ферментативного гидролиза белка гороха и получения пептидов с антиоксидантным действием.

О. Я. Мезеновой и ее коллегами [23] проведен гидролиз голов копченой кильки при температуре 130 °С и давлении 0,25 МПа. В результате гидролиза получены следующие фракции: водорастворимая протеиновая, жировая и осадочная белково-минеральная. Затем фракции центрифугировали и сублимировали. При исследовании установлено, что количество пептидов с молекулярной массой менее 10 кДа составляет 38 %. Следует отметить, что полученные пептидные комплексы характеризовались приятным вкусом и ароматом копченой рыбы.

Благодаря наличию БАП с антиоксидантными свойствами в гидролизатах сардины [236], коже осетровых [212] R. Gao с коллегами [98] рекомендовали их к использованию в качестве функциональных ингредиентов в составе пищевых продуктов. K. Bashir с коллегами [55] получили 10 антиоксидантных пептидов из

гидролизатов мышц скумбрии. Пептид ALSTWTLQLGSTSFASPM обладал самой высокой поглощающей активностью в отношении DPPH, а пептид LGTLLFIAIP – высокой SOD-подобной активностью.

P. Mudgil с коллегами [200] с помощью папаина провели гидролиз белка и получили три БАП.

Для контроля гидролиза и последующего контроля образования пептидов определяют степень протеолиза белка. Д. С. Мягконов с коллегами [25] предлагают определять степень гидролиза белка спектрофотометрическим методом для оценки степени протеолиза. Установлено, что длину волны 280 нм поглощают аминокислоты триптофан и тирозин; определены коэффициенты поглощения, которые коррелируют с результатами определения количества белка методом Кьельдаля ($R^2 > 0,81$).

Пептиды могут быть выделены из ядов. Этот класс пептидов включает короткие биополимеры, образованные аминокислотными остатками, которые естественным образом эволюционировали с течением времени для достижения специфических мишеней у жертвы, таких как рецепторы, связанные с G-белком, ионные каналы или ферменты, без протеолитического расщепления [42]. Пептиды, полученные из ядов, также известны тем, что проявляют терапевтические свойства, включая бактериологические и противораковые [45; 252].

1.3 Источники и биологические свойства пептидов, определяющие направления их использования

Применение БАП в питании позволяет регулировать физиологические процессы, профилактировать и лечить различные заболевания, замедлять процесс старения за счет регенерации клеток, при этом БАП высокоспецифичны, не аллергены и не имеют противопоказаний, в отличие от лекарственных препаратов [22].

БАП принято считать биорегуляторами, обладающими терапевтическими и профилактическими свойствами, которые в скором времени, возможно, станут лекарственными препаратами [2].

Применение БАП в медицине было впервые предложено в 1922 г. путем использования инсулина, выделенного из поджелудочной железы животных, при лечении диабета 1-го типа. На сегодняшний день более 600 пептидов были применены в клинических и доклинических исследованиях, из которых 60 были одобрены в составе биологически активных добавок и лекарственных средств [97]. Направления терапевтического применения этих пептидов включают лечение рака, системы доставки лекарств [246; 181].

Пептиды из бобов люпина, сои, ферментированной сои, черной фасоли, обыкновенной фасоли, нута и твердых в приготовлении бобовых проявляли ингибирующее действие в отношении дипептидилпептидазы-4 (DPP-4). Биохимическим анализом было подтверждено, что пептиды LTFPGSAED, IAVPTGVA, EGLELLLLLAG, AKSPLF, FEELN, KKSSG, GGGLHK, CPGNK, KTYGL, KL и LR ингибируют активность DPP-4.RG, а PLVNPDPKPFL, PHPATSGGGL, YVDGSGTPLT, LLSL и QQEG были идентифицированы как потенциальные ингибиторы DPP-4 путем компьютерного моделирования.

Раствор гидролизата и пептидной фракции обладает потенциалом ингибирования ферментативной активности α -амилазы, α -глюкозидазы и DPP-4. Сообщалось, что щелочная протеаза является лучшим ферментом для производства белковых компонентов черной фасоли с антидиабетическим потенциалом [124].

Значения ингибирования DPP-4, α -амилазы и α -глюкозидазы пептидов фракции алкалазы из черной фасоли составили 96,7 %; 53,4 % и 66,1 % соответственно. Ингибирование α -глюкозидазы в белковых гидролизатах различных сортов фасоли варьировалось от 46,9 % до 60,0 % [191], а IC_{50} ингибирования DPP-4 составлял от 0,14 до 0,33 мг DW/мл [190].

В другом исследовании *in vitro* 5 мг/мл очищенных гидролизатов γ -конглотина из люпина полностью ингибировали DPP-4. Тот факт, что непереваренный γ -конглотин напрямую не ингибирует активность DPP-4, продемонстрировал, что

этот белок необходимо переваривать для получения гидролизатов, ингибирующих фермент DPP-4 [203].

Гидролизаты бобов Бамбара, продуцируемые алкалазой и термолизином, проявляли сходную ингибирующую активность в отношении DPP-4 с IC_{50} 1,73 мг/мл [202]. Гидролиз белка алкалазы коровьего гороха также показал сильное ингибирование DPP-4 [69].

В настоящее время на рынке доступно более 80 пептидных терапевтических средств; к ним относятся лираглутид (Victoza®) – глюкагоноподобный пептид-1, используемый для лечения сахарного диабета 2-го типа, и лейпролид (Lupron®) – аналог соматостатина, используемый для лечения рака предстательной железы [267].

Е. П. Калинин и его коллегами [14] из сапропеля выделен пептид с антикоагулянтными свойствами за счет влияния конечного этапа плазмокоагуляции.

В исследованиях В. Я. Бродский с коллегами [6] доказали положительное влияние пептидов семакс и HLDF-6 на процесс синтеза белка в гепатоцитах крыс, что позволило рекомендовать вышеуказанные пептиды для замедления процессов старения.

Синтезированный пептид семакс устойчив к гидролизу протеолитическими ферментами, что доказано в исследованиях *in vitro* [40].

Е. В. Наволоцкой и др. [26] получен новый пептид LKEKK, который соответствует пептидной последовательности тимозина от 16-й до 20-й аминокислоты и интерферона- $\alpha 2$ от 131–135-й последовательности. Полученный пептид в концентрации от 50 до 1000 нМ повышает экспрессию противовоспалительного цитокина IL-10.

Ю. О. Некрасовой и ее коллегами [27] разработаны продукты питания специализированного назначения, рекомендованные для спортсменов, с использованием в составе БАП. В частности, батончик, в рецептуру которого в качестве функционального ингредиента включена пептидная и белково-минеральная добавка на основе гидролизата коллагенсодержащей чешуи сардины. Путем математического

моделирования рассчитана оптимальная дозировка пептидной добавки и предложены рекомендации по употреблению разработанного батончика.

В результате исследований М. С. Нестерова и его коллег [28] создан новый липосомальный пищевой продукт с использованием БАП в составе гомогенизированной обработанной высоким давлением препуциальной железы мускуса кабарги сибирской. Полученный новый пищевой продукт обладает выраженными антиоксидантными свойствами.

Путем ферментализа белков молока получены гипоаллергенные пептиды, обладающие умеренным горьким вкусом, имеющие молекулярную массу от 0,3 до 1,5 кДа и состоящие от 6 до 14 аминокислот. Установлено, что пептиды обладают антиоксидантными свойствами. С использованием полученных пептидов и жирорастворимых витаминов D3 и А были созданы биологически активные комплексы порошкообразной формы, способной растворяться в воде. На основании исследований токсичности установлено, что биологически активные комплексы не обладают острой, подострой, хронической токсичностью и относятся к пятому классу опасности. Такие биологически активные комплексы рекомендуется использовать в составе функциональных продуктов питания [21].

Некоторые БАП могут обладать выраженными антимикробными свойствами и применяться при инфекционных заболеваниях. С. В. Клыченковым и его коллегами [17] с помощью ультрафильтрации и ионообменной хроматографии из маточного молочка получены БАП с молекулярной массой до 5000 Да. В исследованиях на бактериях штаммов *S. aureus*, *E. coli*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* и *E. cloacae* установлено, что пептиды не обладают прямым антибактериальным действием, но способны ослаблять активность исследуемых бактерий.

Широко известен эффективный лекарственный препарат Тималин®, полученный из экстракта тимуса кур. Тималин регулирует клеточный и гуморальный иммунный ответ, обладает антиоксидантными свойствами и способствует увеличению фагоцитарной активности нейтрофилов, а также снижает развитие атеросклероза в доклинических исследованиях, замедляет процессы старения у лабораторных животных [38].

В состав лекарственного препарата Тималин, который эффективно используется при заболеваниях с нарушением функции иммунной системы, а также вызванных инфекциями различной этиологии, входят короткие пептиды EW, KE и EDP. Такие ди- и трипептиды влияют на синтез белков теплового шока, цитокинов и практически не имеют противопоказаний к применению [39].

Б. А. Кахоров с коллегами [16] провели исследования эффективности пептидного препарата Тимоген на крысах с экспериментальным гепатитом. Отмечено усиление иммунологической реактивности и нормализации функции иммунной системы на фоне введения Тимогена больным животным, что подтверждается повышением антителообразующих клеток (АОК) в 3,3 раза.

В. Х. Хавинсон с коллегами [37] в исследованиях по лечению остеоартроза и остеопороза доказали высокую эффективность пептидного препарата Хондролукс®.

Одним из перспективных нейропротекторных пептидных препаратов, прошедших клинические испытания, является Кортексин, полученный из коры головного мозга телят. Его синтезированные аналоги – трипептид EDR и дипептид DS – способны влиять на конформацию гистона H1.3, что вызывает активизацию транскрипции гена *Fkbp1b*, что способствует выделению Ca^{2+} из органелл саркоплазматического и эндоплазматического ретикулума нейронов, что повышает их функциональную активность [20].

Согласно изобретению А. В. Трофимова и его коллег [30], применение дипептида L-глутаминовой-L-триптофановой кислоты ежедневно в дозе 1–10 мкг/кг массы тела способствует усилению оксигенации тканей за счет угнетения (снижения синтеза) HIF-1 α фактора при диабетической стопе.

Иммунодоминантные пептиды могут быть использованы в качестве информаторов о заражении клетки вирусами. Одним из примеров является пептид HLA I класса, который прикрепляется к поверхности ядросодержащих клеток и передает информацию иммунной системе о проникновении вируса в клетку. В частности, с помощью пептида HLA можно определить иммунореактивность организма на вирус SARS COV-2. С использованием баз данных NCBI – GenBank, Protein; IEDB –

MHC-I Processing Predictions, Population Coverage; GISAID – CoVsurver: Mutation Analysis of hCoV-19, UNIPROT – BLAST; ToxinPred и др. определены 27 иммунодоминантных пептидов-мишеней для цитотоксических Т-лимфоцитов [10].

1.4 Характеристика и механизм действия антимикробных пептидов

В связи с тем, что диссертационная работа посвящена обогащению мороженого БАП, в частности антимикробными пептидами, целесообразно дать им характеристику и рассмотреть возможные механизмы действия, преимущества и недостатки использования.

АМП – это БАП с низкой молекулярной массой, обеспечивающие врожденный иммунитет [266], эффективны против бактерий, паразитов, грибов и вирусов [143; 164; 188], регулируют иммунный ответ, способствуют заживлению ран и обладают противоопухолевой активностью [193; 219; 234; 282].

АМП имеют ряд преимуществ перед антибиотиками:

- воздействуют на инородные белки, находящиеся на плазматической мембране клетки;
- проникают в бактерии и действуют губительно на их внутриклеточное содержимое и специфические мишени;
- обладают широким спектром действия к патогенным микроорганизмам, устойчивым к антибиотикам [74; 164; 204].

Применение АМП при лечении рака является перспективным направлением исследований, так как химиотерапия приводит к ослаблению иммунитета и повышению восприимчивости к различным бактериальным инфекциям, а АМП обладает и противобактериальными, и противоопухолевыми свойствами [80; 179].

АМП непрерывно присутствуют в организмах и выполняют роль гомеостатических регуляторов, они защищают организм от проникновения патогенов и со-

храняют баланс. Их расположение и функция связаны с определенными факторами:

- передаются от потомства к потомству, обеспечивая быстрое включение пассивного иммунитета. Это особенно важно, так как процесс образования антител требует значительного времени, в отличие от запуска врожденного иммунитета;
- достигают своих специфических мишеней гораздо быстрее, чем иммуноглобулины, благодаря своим небольшим размерам [105].

Механизм действия АМП. Катионные АМП проявляют антибактериальную активность, взаимодействуя с отрицательно заряженной бактериальной мембраной. Они увеличивают проницаемость мембраны и разрушают клеточную структуру, приводя к выходу содержимого клеток наружу. При взаимодействии с микробной мембраной АМП вступают в электростатическое взаимодействие с анионными компонентами плазматической мембраны. Для того чтобы достичь цитоплазматической мембраны, АМП необходимо пройти через капсульный полисахарид и другие компоненты клеточной стенки, такие как LPS грамотрицательных бактерий, липотейхоевая кислота и пептидогликан у грамположительных бактерий [52; 180; 226]. Исследования показали, что α -спиральные АМП преобразуют неупорядоченную структуру анионной липидной мембраны в амфифильную α -спиральную структуру в водном растворе для более эффективного взаимодействия с мембраной [163]. В отличие от α -спиральных пептидов, β -листовые пептиды не подвергаются значительным изменениям своей конформации при взаимодействии с мембраной благодаря прочному дисульфидному связующему мостику [163].

Были представлены гипотетические модели для описания структуры мембранных полостей. Среди этих моделей можно выделить бочкообразную, тороидально-поровую, ковровую и агрегатную (рисунок 4).

В бочкообразной модели при увеличении количества пептидов, связывающихся с мембраной, происходит их агрегация и конформационная трансформация. Это, в свою очередь, приводит к сдвигу местных головных групп фосфолипидов и утоньшению структуры мембраны [156].

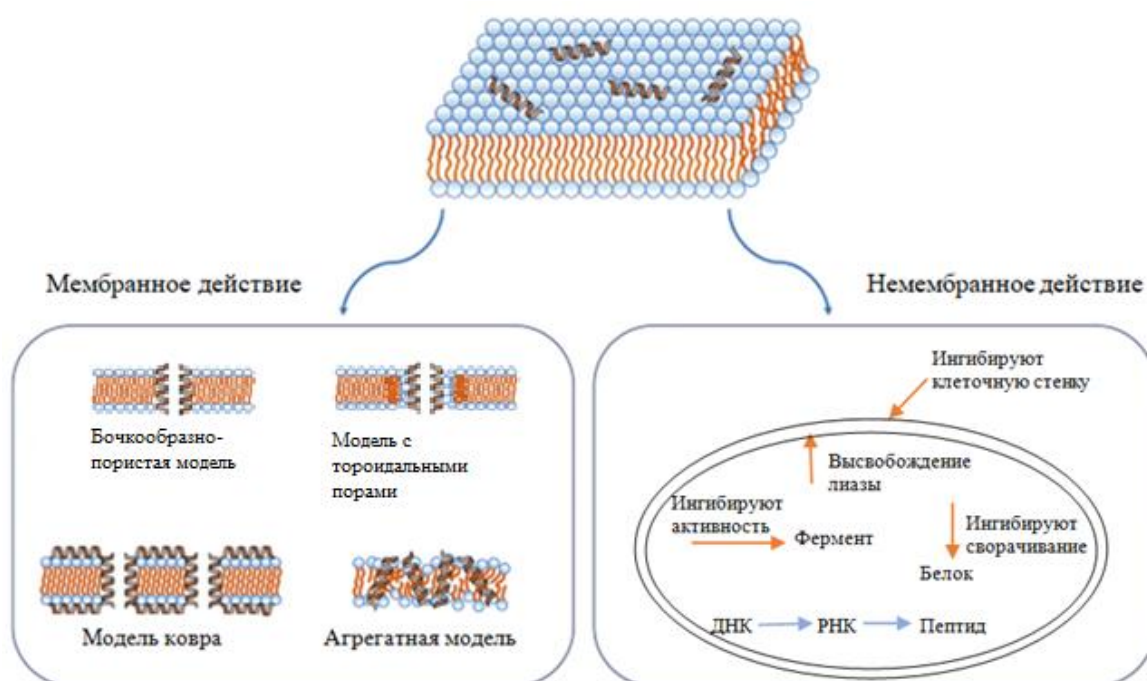


Рисунок 4 – Модели антибактериальных механизмов АМП

Проникая в фосфолипидный бислой, спиральные гидрофобные области α -спиральных пептидов и β -листовых пептидов оказываются ближе к гидрофобным областям мембранного фосфолипида, тогда как гидрофильные области спиралей пептидов ориентированы внутрь. В результате большое количество спиральных молекул располагается параллельно, что создает центральный просвет [163].

Механизм действия АМП направлен на бактерии. АМП взаимодействуют с отрицательно заряженными мембранами бактерий, что влечет за собой увеличение проницаемости мембран, а также либо лизис клеточных мембран, либо высвобождение внутриклеточного содержимого. В результате этих процессов бактерии погибают. Существует и другой механизм бактерицидного действия, заключающийся в проникновении АМП в цитоплазму и взаимодействии с внутриклеточными веществами. Они могут ингибировать синтез ДНК, РНК и белка, а также сворачивание белка. Кроме того, они способны ингибировать активность ферментов и синтез клеточной стенки, а также стимулировать высвобождение лиаз, разрушающих клеточные структуры.

Механизм модели с тороидальными порами аналогичен механизму модели с бочкообразными порами. Однако главное отличие состоит в том, что в модели

с тороидальными порами пептидные спирали проникают в мембрану и взаимодействуют с липидами, образуя комплексы с тороидальными порами. Высокие концентрации локально накапливающихся АМП приводят к деформации изгиба в липидных молекулах, что позволяет пептидам и липидным головным группам проникать внутрь липидного гидрофобного центра [156].

В модели ковра для образования мицеллы и разрушения микробной мембраны необходим электростатический эффект АМП и анионной мембраны в высоких концентрациях [163]. Когда концентрация пептида достигает порогового значения, АМП формируют кластеры на мембране и вызывают ее разрыв, сходный с действием поверхностно-активных веществ. При этом пептиды не образуют каналы и не проникают в гидрофобный центр мембраны. Этот эффект обладает достаточной силой, чтобы полностью или частично разрушить клеточные мембраны и привести к гибели клеток.

В агрегатной модели АМП, пептиды и липиды взаимодействуют с анионной цитоплазматической мембраной, образуя мицеллу пептидно-липидного комплекса [111]. Каналы, образованные комплексом усилителей, липидов и воды, в отличие от модели ковра, способны пропускать ионы и содержимое клетки наружу, вызывая гибель клеток. Кроме того, эти каналы способны позволять АМП проникать в цитоплазму и выполнять свои функции. Такой механизм объясняет не только нацеленность АМП на цитоплазматическую мембрану, но и их способность проникать через эту мембрану и воздействовать на внутриклеточные вещества [113].

В отличие от катионных АМП, действие анионных АМП остается неясным. Считается, что антибактериальный механизм максимина Н5 против золотистого стафилококка (*S. aureus*) связан с разрушением клеточной мембраны [86]. Анионный АМП Xlasp-p1 проявляет широкий спектр антибактериальной активности против грамположительных и грамотрицательных бактерий путем разрушения клеточных мембран и выхода внутриклеточного материала [170]. Недавнее исследование показало, что анионный АМП AP2 снижает выживаемость клеток *C. albicans*, но не

воздействует на активность протопласта. Это позволяет предположить, что АР2 может оказывать влияние на клеточные стенки грибов [239].

Кроме того, АМП также оказывают воздействие на организм через несколько других механизмов. Например, они способны действовать внутри клетки, связываясь с нуклеиновыми кислотами, и напрямую ингибировать синтез ДНК [68]. Они также могут косвенно ингибировать репликацию или транскрипцию ДНК [71; 142; 273], а также ингибировать активность бактериальных ферментов, находящихся внутри клетки [57]. Кроме того, они способны увеличивать проницаемость мембраны путем интеграции с компонентами клеточной стенки, включая пептидогликан [154] и другие механизмы действия АМП [159; 272; 279].

Помимо антибактериального воздействия, АМП также проявляют широкий спектр активности против вирусов, находящихся в оболочке. Например, бычий антимикробный пептид-13 эффективно подавляет размножение вируса гастроэнтерита путем нарушения синтеза вирусного белка и выражения вирусных генов внутри вируса трансмиссивного гастроэнтерита [171]. Протегрин и индолицидин, в свою очередь, блокируют адгезию и проникновение вируса простого герпеса, нацеливаясь на вирусный мембранный гликопротеин [278; 277]. LL-37, проявляющий ингибирующую активность по отношению к разным оболочковым вирусам, включая вирус иммунодефицита человека, грипп А, вирус коровьей оспы, вирусы простого герпеса, денге и Зика [44; 53; 58; 121; 122; 253]. HD5, производный от α -дефензина человека (1–9), способен предотвращать вирусную инфекцию путем ингибирования адгезии и проникновения вируса в клетки [62]. Последние исследования показали, что витамин D способен стимулировать синтез кателицидинов и дефензинов, что позволяет замедлить процесс репликации вируса и снизить риск заражения и смерти от гриппа и коронавирусной инфекции COVID-19 [104].

Иммунотенулирующая активность. Антимикробные пептиды (амплицины) играют важную роль в защите организма от инфекций путем усиления иммунной активности [114; 138; 141; 177]. Вторжение патогенов активнует серию иммунных реакций (рисунок 5).

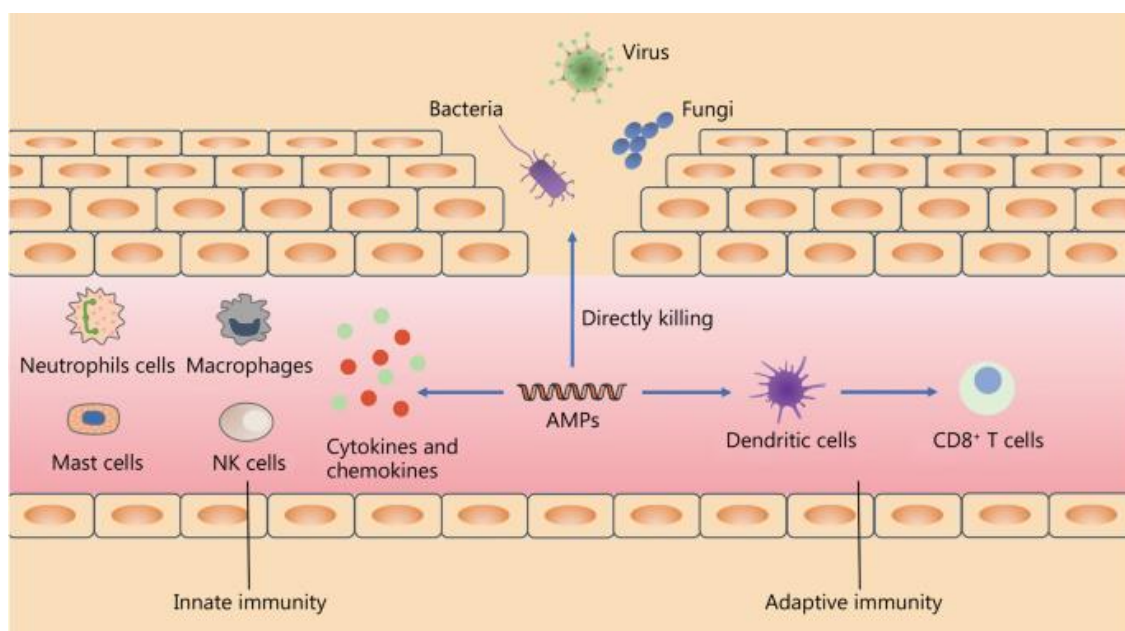


Рисунок 5 – Активация иммунной реакции АМП

Будучи компонентом врожденной иммунной системы, АМП взаимодействуют с иммунными клетками, удаляют патогены и предотвращают инфицирование. Особенности их действия является то, что пептид LL-37 постоянно вырабатывается нейтрофилами [207], тучными клетками, естественными киллерами (NK) и эпителиальными клетками [210]. Он привлекает другие иммунные клетки к местам воспаления за счет взаимодействия с рецептором FPR1 (новое название FPR2) [43; 250; 276]. LL-37 также способствует перемещению мононуклеаров/макрофагов и активирует фагоцитоз макрофагами грамположительных и грамотрицательных бактерий, связываясь с рецептором интегрином $\alpha M \beta 2$ (Mac-1) на поверхности клеток костного мозга [172].

Все больше доказательств подтверждают противоопухолевую активность АМП [143; 281]. АМП избирательно убивают раковые клетки, воздействуя на поверхность мембраны. По сравнению с нормальными клетками анионный состав поверхности мембраны раковых клеток придает АМП специфичность нацеливания [137].

LL-37, единственный кателицидин у людей, ингибирует рост опухоли при раке толстой кишки [158; 211; 220] и раке желудка. LL-37 индуцирует апоптоз-индуцирующий фактор (AIF) или эндонуклеазу G (EndoG), путем активации сигналь-

ного каскада GPCR-p53-Bax/Bak/Bcl-2 в клетках рака толстой кишки. Мыши с дефицитом кателицидина показали более высокую чувствительность к возникновению рака толстой кишки, вызванного азоксиметаном [227].

1.5 Применение функциональных ингредиентов в технологии мороженого

Для удовлетворения потребностей в микронутриентах ассортимент функциональных продуктов питания регулярно расширяется [13; 32; 261].

Результатами научных исследований подтверждено, что употребление молочных продуктов благоприятно влияет на здоровье человека [249]. Мороженое – продукт, широко известный и потребляемый всеми возрастными группами населения по всему миру. Растущие опасения диетологов по поводу воздействия на здоровье привели к росту интереса к мороженому, изготовленному с включением полезных ингредиентов, включая пребиотики, пробиотические бактерии и другие биологически активные вещества. Вместе с тем на потребительском рынке редко встречается мороженое, обогащенное функциональными ингредиентами [241].

В мороженом мало натуральных функциональных соединений, обладающих направленным биологическим действием. Интересной областью исследований является повышение пищевой ценности мороженого с использованием полезных для здоровья ингредиентов растительного и животного происхождения [174; 182].

Исследовано, что применение порошка черного перца и порошка корицы в рецептуре мороженого придает продукту исключительный вкус и обогащают его биологически активными соединениями, в частности антиоксидантами [50].

Для получения витаминизированного мороженого М. И. Сложенкина и ее коллеги [34] включили в рецептуру сушеные фрукты, что позволило повысить содержание пантотеновой кислоты в готовом продукте.

Для придания мороженому функциональной направленности часто используют пробиотические микроорганизмы, пищевые волокна и фруктовое пюре. В исследовании [9] подобраны пробиотические закваски и определена дозировка их внесения.

Для получения мороженого с антигипергликемическим действием разработан состав, включающий ацидофильную палочку, инулин, пребиотик и стевиозид. Установлены регламентируемые показатели качества готового продукта, в том числе определено минимальное значение молочнокислых бактерий по окончании срока годности [31].

Исследования М. А. Вавиловой [7] посвящены разработке синбиотического мороженого с пробиотиками и пребиотиками. В результате моделирования процесса ферментации *Lactobacillus acidophilus* для сохранения биологической активности молочнокислых бактерий доказана целесообразность поэтапного внесения фруктозного сиропа при производстве мороженого. Для проведения эксперимента было рекомендовано вносить сироп поэтапно. Определена дозировка рецептурных компонентов мороженого. Доказано, что снижение начальной концентрации сиропа ускоряет производство мороженого.

В технологии кисломолочного мороженого может быть использована пахта, полученная при производстве сливочного масла. Пахту перед внесением в мороженое необходимо ферментировать бактериями *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. С этой целью используют комплексную бактериальную закваску Profiline YO 22.11 R2 Golden Line. Количество ферментированной пахты в рецептуре мороженого должно составлять от 30 % до 45 % [24].

Ю. И. Держапольской с коллегами разработано кисломолочное мороженое [11] с использованием *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и лактулозы в качестве пребиотика. В результате исследований определена оптимальная дозировка внесения лактулозы в рецептуру мороженого.

Зарубежными учеными проводятся научные исследования по обогащению мороженого функциональными ингредиентами (таблица 1).

Таблица 1 – Функциональные ингредиенты, используемые для обогащения мороженого

Наименование ингредиента и характеристика	Источник
<i>Lactobacillus plantarum</i> UBLP-40; инулин	[230]
Амла (индийский крыжовник) – источник витамина С, фенолов, пищевых волокон и антиоксидантов	[101]
Побочные продукты из граната – источник фенолов (кожура граната); конъюгированная жирная кислота – пуниновая кислота (косточки граната)	[67]
Мука из виноградных выжимок – источник фенолов, флавоноидов, флавонолитов и антоцианов	[209]
Заменитель жира Simplese (R) D-100; инулин	[144]
Микрокапсулы масла базилика – антиоксиданты и фенолы	[216]

S. Maurotti с коллегами [183] доказали, что мороженое, содержащее молочные белки, оказывает значительное влияние на сохранение минеральной плотности костей у женщин после менопаузы.

В результате исследований G. Mendonça с коллегами [185] разработано мороженое из кефира, обогащенное пробиотиками.

Употребление мороженого из овечьего молока, обогащенного пробиотиками и пребиотиками, способствует поддержанию гомеостаза кишечника. Результаты показали, что содержание пробиотиков в тонком кишечнике во всех группах превышало $5 \log \text{КОЕ/г}^{-1}$ [153].

Применение овсяного β -глюкана в производстве мороженого имеет свои преимущества. Ежедневное употребление этого компонента в количестве 3 г помогает снизить риск сердечно-сосудистых заболеваний, а также положительно влияет на работу сердечно-сосудистой системы. Важно отметить, что достоинство использования овсяного β -глюкана в технологии производства мороженого заключается в его способности образовывать вторичную структуру пены, а также предотвращать отделение свободной влаги при производстве кисломолочных продуктов. Кроме того, овсяный β -глюкан может действовать как имитатор молочного жира, что придает мороженому особое качество [205; 206].

В качестве функциональных ингредиентов, используемых для обогащения мороженого, можно рассматривать БАП с противовирусной и антимикробной активностью, полученные из молочных белков [36; 107].

Одним из перспективных направлений обогащения молочных продуктов, в том числе мороженого, является использование гидролизатов белков, содержащих БАП. Е. Ю. Агарковой [1] в рецептуру молочных продуктов введены гидролизаты сывороточных белков, что позволило не только им придать функциональность за счет наличия пептидов с молекулярной массой менее 5 000 Да и более 10 000 Да, но и положительно повлияло на структурно-механические свойства продуктов.

Вместе с тем на потребительском рынке отсутствует мороженое, обогащенное нативными и синтезированными БАП, что и определяет актуальность диссертационного исследования.

Заключение по главе 1

Анализ научной и технической литературы показал, что применение биологически активных пептидов имеет много достоинств по сравнению с лекарственными препаратами и БАД к пище, в частности: проникновение в ткани и интернализация в клетку, отсутствие аллергической реакции, низкая токсичность, высокая эффективность в наноконцентрациях, возможность быстрой модификации.

Показано, что применение БАП в питании позволяет регулировать физиологические процессы, профилактировать различные заболевания, замедлять процесс старения за счет регенерации клеток, при этом БАП высокоспецифичны, неаллергены и не имеют противопоказаний, в отличие от лекарственных препаратов.

В зависимости от источника происхождения или выделения БАП подразделяются на природные, искусственно модифицированные и искусственно синтезированные. Они могут быть получены из живых организмов, таких как животные,

растения, бактерии и грибы, путем протеолиза белка, выделены из ядов, синтезированы химическим путем или с помощью рекомбинантных генов, *in silico* сборки и с помощью других технологий.

В качестве функциональных ингредиентов для обогащения мороженого используют пробиотические микроорганизмы, пищевые волокна, фруктовое пюре, овсяный β -глюкан и т. д. Перспективным является обогащение мороженого биологически активными пептидами, что определяет актуальность диссертационного исследования, а также необходимость проведения исследований по получению нового продукта – мороженого с функциональным ингредиентом – пептидом, впервые спроектированным и синтезированным, с доказанными антимикробными и противовирусными свойствами.

2 Объекты и методы исследований

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет», в аккредитованной лаборатории ООО «Хладокомбинат № 3», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области в Орджоникидзевском, Железнодорожном районах города Екатеринбурга, городе Березовский и городе Верхняя Пышма», Испытательная лаборатория ФГБУ «Свердловский референтный центр Россельхознадзора» (г. Екатеринбург), испытательной лаборатории ГБУ Свердловской области «Свердловская областная ветеринарная лаборатория».

Общая схема проведения исследований представлена на рисунке 6.



Рисунок 6 – Общая схема проведения исследований

В качестве материалов для выполнения исследований использовали:

- молозиво коров черно-пестрой породы;
- фермент трипсин (стандартный), КФ 3.4.21.4, активность 250 000 ед, производитель ООО «Самсон-Мед» (Россия);
- мыши линии BALB/c;
- клетки эмбриональной почки человека НЕК-293Т;
- *S. aureus* ATCC 25923;
- *S. pyogenes* ATCC 19615;
- *E. coli* ATCC 25922;
- *P. aeruginosa* ATCC 27853;
- мезенхимальные стволовые клетки крысы (происхождение: крыса, глиома, индуцированная *in vivo* N-нитрозометилмочевинной; моноклональная клеточная линия. Science 1968. 161: 370; Fed.Proc. 1968. 27: 720; морфология фибробластоподобная; способ культивирования – монослойный; условия культивирования: среда F10 или F12, сыворотка эмбриональная бычья 10 % (F12) или лошадиная 15 %, эмбриональная бычья 2,5 % (F10); процедура пересева – снятие клеток, используя трипсин 0,25 %: версен 0,02 % (1:3), кратность рассева 1:3–1:6, оптимальная плотность $1,0\text{--}3,0 \cdot 10^5$ клеток/см²; криоконсервация – ростовая среда, 5 % DMSO, $2,0\text{--}3,0 \cdot 10^6$ клеток/мл в ампуле; жизнеспособность после криоконсервации 93 % (окраска трипановым синим на нулевом пассаже); контроль контаминации: бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены; контроль видовой идентичности: кариологический, изоферментный (ЛДГ и Г6ФДГ) и иммунофлуоресцентный анализ; кариология: $2n = 42$, пределы изменчивости по числу хромосом 39–44, модальное число хромосом 42, нормальный кариотип крысы (42, XY), в клетках с 43 хромосомами содержится 1 маркер (дифференциальная окраска);
- клетки HeLa, полученные из типовых культур (ATCC, CCL-2). Клетки HeLa инкубировали в модифицированной среде Dulbecco Eagle's Medium (DMEM) с добавлением глюкозы (4500 мг/л), L-глутамина, 10 % фетальной коровьей сыворотки (FBS), пенициллина и стрептомицина (10 000 ед/мл и 10 мг/мл соответственно) (инкубировали в среде CO₂ при 37 °C).

Объектами исследования на разных этапах работы являлись:

1. **Олигопептид**, выделенный из ферментативного гидролизата молозива коров, состоящий из восьми аминокислот со следующей последовательностью: лейцин – аргинин – глутаминовая кислота – глицин – изолейцин – лизин – аспарагин – лизин (LREGIKNK).

Свежее молозиво получали от коров в течение 48 ч после родов. Молозиво собирали в автоклавированные контейнеры и определяли общее количество аэробных бактерий путем посева образцов свежего молозива (100 мкл) на триптиказо-соевый агар (9 мл). Культивирование бактерий осуществляли при 37 °С в течение 24 ч. Для определения общего количества анаэробных бактерий образцы свежего молозива высевали на среду MRS-агар и инкубировали в анаэробных условиях при 37 °С в течение 48 ч. Сразу после сбора свежее молозиво обезжиривали центрифугированием в автоклавированных центрифужных пробирках при 15 000 об/мин в течение 20 мин при 4 °С. Затем супернатант собирали и добавляли фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) до конечной концентрации 5 ммоль/л; аликвоты супернатанта объемом 200 мл, содержащие ФМСФ, замораживали и хранили при температуре 20 °С.

Очистка пептида. Для осаждения высокомолекулярных пептидов и белков к аликвотам супернатанта добавляли концентрированную уксусную кислоту до конечной концентрации 10 %, суспензию центрифугировали (40 000 об/мин в течение 60 мин при 4 °С). Затем супернатанты, содержащие пептиды, подвергали концентрированию с обратной фазой с использованием картриджа Ser-Pak C18 объемом 1 мл (Millipore, Milford, США), которые сначала активировали 5 мл изопропанола, содержащего 0,1 % трифторуксусной кислоты (ТФУ), затем 5 мл метанола и, наконец, промывали 0,1 % ТФУ. После загрузки 5 мл супернатанта картридж промывали 4 мл 0,1 % ТФУ, а связанные пептиды затем элюировали 2 мл 50 % изопропанола, содержащего 0,1 % ТФУ. pH элюата доводили до 6,6 с помощью 1 моль·л⁻¹ NaOH, стерильно фильтровали (0,2 мкм, Life Sciences, Ирландия) и загружали в катионообменную колонку (Mono S HR 5/5; GE Healthcare Biosciences, Великобритания), уравновешенную 10 ммоль·л⁻¹ фосфатом натрия (pH 6,6) при скорости потока

1 мл·мин⁻¹, используя хроматографическую систему АКТА (Amersham Biosciences, Нидерланды). Активные пептиды элюировали линейным градиентом 0–1 моль·л⁻¹ NaCl в 10 ммоль·л⁻¹ фосфате натрия (pH 6,6) и детектировали путем измерения поглощения УФ при 214 и 280 нм. Фракцию собирали, проводили ультрафильтрацию через фильтр 1500 Да, снова загружали в катионообменную колонку и элюировали со скоростью потока 1 мл·мин⁻¹ градиентом 0–40 % изопропанола, содержащим 0,1 % ТФУ, в течение 40 мин, затем градиентом 40–50 % изопропанола с 0,1 % ТФУ в течение 20 мин. Фракцию лиофилизировали для удаления изопропанола и ТФУ, ресуспендировали в 0,01 % уксусной кислоте и анализировали с использованием ВЭЖХ/МС [59].

Обобщенный показатель комплексной оценки гидролизата (D_i) рассчитывали как среднегеометрическое по всем показателям желательности d_i каждого из частных оценочных показателей n по формуле

$$D_i = \sqrt[n]{\prod_i^n d_i}. \quad (1)$$

Значения контуров желательности рассчитывали с использованием функции Харрингтона. В таблице 2 представлены числовые интервалы шкалы Харрингтона.

Таблица 2 – Числовые интервалы шкалы Харрингтона

Оценка	Интервал значений функции желательности d_i	Практическая характеристика уровня
Очень хорошо	1,00–0,80	Допустимый и превосходный
Хорошо	0,80–0,63	Допустимый и хороший
Удовлетворительно	0,63–0,37	Допустимый и достаточный
Плохо	0,37–0,20	Недопустимый
Очень плохо	0,20–0,00	Недопустимый

2. Пептид, полученный твердофазным синтезом с использованием диспергируемых в воде наночастиц Fmoc-аминокислот в последовательности LREGIKNK.

Твердофазный трехфазный синтез пептида проводили в соответствии с разработанной схемой и способом, представленными в параграфе 3.3. Синтез осуществляли в компании Permic Co., Ltd (Китай). Сборку аминокислотной последовательности пептида проводили на смоле в воде с помощью быстрого поточного Fmoc-твердофазного пептидного синтеза (Fmoc-SPPS). В таблице 3 представлены технические характеристики процесса трехфазного синтеза пептида.

Таблица 3 – Технические характеристики трехфазного синтеза пептида LREGIKNK

Показатель	Характеристика
Аминокислотная последовательность	LREGIKNK
Первый насос	0,1 % трифторуксусной кислоты и до 100 % дистиллированной воды
Второй насос	0,1 % трифторуксусной кислоты и до 100 % ацетонитрила
Скорость потока, мл/мин	1
Длина волны, нм	220
Аналитическая колонка	SHIMADZU Inertsil ODS-SP
Впрыск объема, мкл	14
Растворение	Дистиллированная вода

Цитотоксичность образцов нативных и синтезированных пептидов определяли на клетках НЕК29. Каждую клетку высевали в количестве $5 \cdot 10^3$ клеток на лунку с питательной средой DMEM в 96-луночные планшеты за 24 ч до обработки. После обработки пептидом в дозировке 10; 50; 100; 200; 300 и 400 мкг/мл в среду добавляли нейтральный красный (150 мкл/мл) и продолжали инкубировать при температуре 37 °С в течение 2 ч. Затем клетки дважды промывали физиологическим раствором с фосфатным буфером Дульбекко (DPBS) и краситель экстрагировали 200 мкл дезинфицирующего раствора (этанол, деионизированная вода и ледяная уксусная кислота в соотношении 50:49:1). Оптическую плотность считывали при 540 нм с помощью считывателя микропланшетов на мультимодальном ридере ClarioStar (BMGLabtech, Россия). Жизнеспособность клеток выражали в процентах от контроля.

Цитотоксичность вычисляли по формуле

$$\text{ЦТ} = \frac{OD_{\text{отр.конт}} - OD_{\text{иссл.обр}}}{OD_{\text{отр.конт}}} \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где ЦТ – цитотоксичность; $OD_{\text{иссл.обр}}$ – оптическая плотность исследуемого образца; $OD_{\text{отр.конт}}$ – оптическая плотность необработанных клеток.

Для эксперимента по определению *острой токсичности* сформировали четыре группы мышей BALB/с по 10 животных (самцов) в каждой, массой от 26–32 г. Первая группа – контрольная (животные получали основной рацион (ОР) и внутрь изотонический раствор натрия хлорида в объеме 0,1 мл), вторая опытная – ОР и пептид внутрь в дозе 10 г/кг массы тела, растворенный в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида; третья опытная – ОР и пептид внутрь в дозе 100 г/кг массы тела, растворенный в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида; четвертая опытная – ОР и пептид внутрь в дозе 400 г/кг массы тела, растворенный в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида. Все манипуляции с животными были осуществлены в соответствии с Директивой Совета ЕС 2010/63/EU. После введения животных держали под наблюдением 48 ч.

LD_{50} определяли по ГОСТ 34557-2019 «Методы испытания по воздействию химических веществ на организм человека Испытания по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении. Метод «вверх и вниз».

Для оценки *субхронической токсичности* сформировали две группы самцов BALB/с массой 22–29 г по 10 животных в каждой. Первая группа контрольная – получала ОР и внутрь 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида. Вторая группа мышей получала ОР и 0,8 мг/кг пептида, растворенного в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида ежедневно в течение 21 сут. Вышеуказанная доза пептида выбрана на основании допустимого суточного потребления АМП низин в количестве 33 000 МЕ (0,8 мг/кг массы тела) [119]. Для внутрижелудочных введений пептидов молозива использовали зонд DE006A 18G × 50 mm (Великобритания). Взвешивание животных проводили каждые 7 сут.

Оценку токсичности пептида определяли по биохимическим показателям: аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), мочевины

и креатинин на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе ChemWell 2910 (Awareness Technology, США).

После перорального введения пептида животные всех групп были выведены из эксперимента путем внутримышечного введения пентобарбитала натрия в дозе 40 мг/кг.

Образцы тканей языка, тимуса, сердца, желудка, кишечника, селезенки, головного мозга собирали и фиксировали в 10 % забуференном формалине. Срезы для гистопрепаратов проводили с помощью микротом-криостата Leica CM1510S (Leica, Германия). Гистопрепараты делали с использованием заливочной станции Leica EG1160 (Leica, Германия). Окраску тканей гематоксилин–эозином осуществляли с помощью автоматизированной системы для окраски гистологических препаратов Leica ST5010 (Leica, Германия).

Для исследования влияния температуры приготовили два образца 0,01 % водного раствора пептида. Первый образец раствора пептида являлся контрольным (нагревание не проводили), второй образец (опытный) раствора нагревали при температуре 95 °C в течение 3 мин. Для сравнения антимикробной активности пептида использовали антибиотик широкого спектра действия «Канамицин». Эксперимент осуществляли в трех повторностях.

Антимикробную активность пептида исследовали на грамположительных *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* ATCC 19615 и грамотрицательных *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 бактериях.

Антибактериальную активность пептидов в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий определяли диско-диффузионным методом [131; 146]. На чашки Петри с агазированной питательной средой делали посев бактерий газоном. Бумажные диски пропитывали раствором 0,01 % пептида, в качестве препарата сравнения использовали диск с антибиотиком («Канамицин» из стандартного набора). Чашки Петри помещали в термостат и инкубировали при температуре 37 °C в течение 24 ч. Результаты учитывались по наличию и размеру (в миллиметрах) прозрачной зоны отсутствия роста микроорганизмов вокруг диска. Эксперимент проводили в трех повторностях.

При определении *противоопухолевой активности* пептида LREGIKNK в качестве контроля была использована культура мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенная из берцовой кости крысы (Институт медицинских клеточных технологий (г. Екатеринбург, Россия)), представленная на рисунке 7.

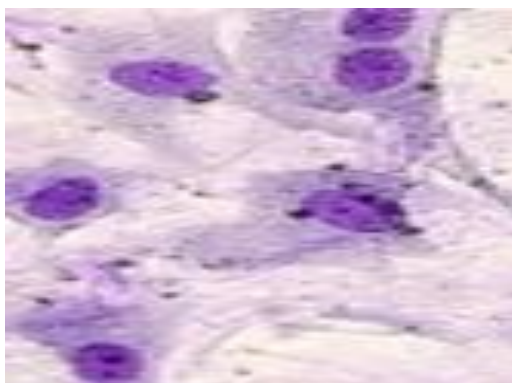


Рисунок 7 – Мезенхимальные стволовые клетки крысы (окраска по Романовскому – Гимзе, увеличение $\times 400$)

В качестве опыта использованы клетки карциномы шейки матки человека HeLa (Институт медицинских клеточных технологий (г. Екатеринбург, Россия)) (рисунок 8).

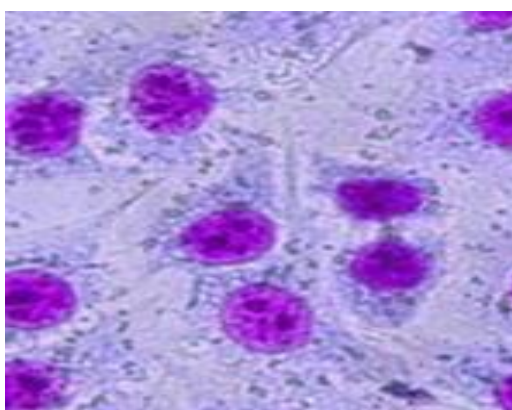


Рисунок 8 – Карцинома шейки матки человека HeLaS3 (окраска по Романовскому – Гимзе, увеличение $\times 400$)

Противоопухолевую активность пептида оценивали с использованием МТТ-теста, описанного Т. Мосманном [196] с незначительными модификациями [257]. После 72-часовой инкубации клеток (10 000 клеток на лунку) с concentra-

цией пептида 5; 10; 20; 40; 50 и 60 мкг/мкл на 96-луночном планшете (Eppendorf, Германия), в каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора МТТ в дозе 5 мг/мл и планшет дополнительно инкубировали при температуре 37 °С в течение 4 ч, затем в лунки добавляли реагент PrestoBlue (Merck, США) (конечная концентрация 1 мкг/мл) для прижизненной оценки жизнеспособности, затем клетки помещали в CO₂-инкубатор на 20 мин. После чего проводили анализ на приборе ClarioStar (BMG Labtech, Россия).

Противовирусную активность пептида исследовали на лентивирусных частицах путем проникновения их через мембрану клетки и интеграцию в геном.

Использование лентивирусных частиц в эксперименте обосновано их высокой способностью проникать в геном клетки и сохранять постоянную экспрессию трансгена. Кроме того, лентивирусные частицы упакованы в оболочку вируса везикулярного стоматита, что позволяет им обладать широким тропизмом к различным клеткам независимо от происхождения и вида. Лентивирусные частицы проявляют свою эффективность на любых клетках человека и животных. Лентивирусы легко проникают в геном клетки и уже через 48–72 ч вызывают экспрессию флуоресцентного белка после добавления к клеточной культуре, по которой оценивают возможность их проникновения через мембрану и геном.

Сборка лентивируса. Сборка лентивируса показана на рисунке 9, а. За 18 ч до трансфекции клетки 293Т инокулировали в 6-луночные планшеты для культивирования клеток с плотностью $4 \cdot 10^5$ клеток на лунку, при этом в каждую лунку добавляли по 2 мл культуральной среды. Для сравнения плотности инокуляции упакованных клеток также применяли плотность $8 \cdot 10^5$ 293Т клеток на лунку. За 1 ч до трансфекции клеточную среду заменяли. Для процесса трансфекции использовали реагент PolyJet (SL100688; SigmaGen) в соответствии с протоколом производителя. При этом 2 мкг плазмиды разводили в 100 мкл DMEM-среды без сыворотки (пробирка А), а 6 мкл реагента PolyJet разводили в других 100 мкл DMEM-среды без сыворотки (пробирка Б). Затем добавляли разведение из пробирки Б в пробирку А и осторожно перемешивали. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 12 мин, а затем добавляли в среду для культивирования кле-

ток. Применяли систему получения лентивируса с плазмидами (pLenti6-GFP (Addgene #35637), psPAX2 (Addgene # 12260), pVSV-G (Addgene #138479)) в молярном соотношении 1:1:1:2. Для сравнения соотношения плазмид использовали молярное соотношение 1:1:1:1, массовое соотношение 1:1:1:1 или массовое соотношение 1:1:1:1. Был применен коэффициент 1:2.

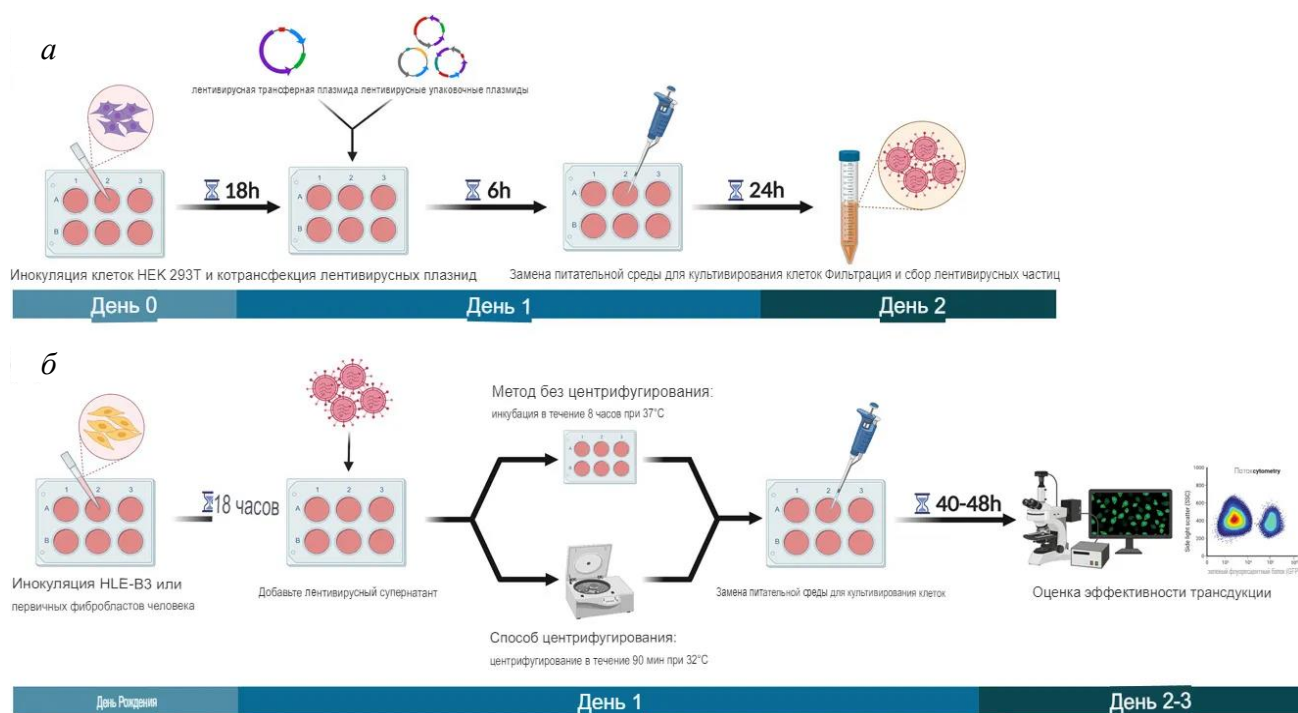


Рисунок 9 – Сборка лентивирусных частиц:
а – сборка лентивируса; б – трансдукция клеток-мишеней

Клетки инкубировали со смесью реагента для трансфекции – плазмида при температуре 37 °С в течение 6 ч перед заменой. Для сравнения времени инкубации смеси реагента для трансфекции и плазмиды в качестве времени инкубации было выбрано 8 ч. Через 24 ч после замены собирали среду для культивирования клеток, содержащую частицы лентивируса, и фильтровали с помощью клеточного сита толщиной 0,45 мкм. Супернатант лентивируса хранили при температуре 4 °С и использовали в течение 2 сут, чтобы избежать снижения титра вируса.

Клетки HEK 293T инокулировали в 12-луночные планшеты для культивирования клеток с плотностью $3 \cdot 10^5$ клеток на лунку, в каждую лунку добавляли по 1 мл среды для культивирования клеток. После инкубации в течение 18 ч среду для

культивирования клеток заменяли 500 мкл свежей среды и 5–20 мкл супернатанта лентивируса, а также бромистого гексаметрина (полибрен, Cell-Land H9868ZJ) с конечной концентрацией 8 мкг/мл. Клетки из одной лунки переваривали, измеряли и регистрировали количество клеток. Через 24 ч после добавления лентивируса в каждую лунку добавляли по 1 мл среды для культивирования клеток, после чего клетки инкубировали еще 24 ч перед анализом проточной цитометрией. Титр лентивируса рассчитывали следующим образом: количество клеток в лунке умножали на процент положительных по флуоресценции клеток и полученный результат делили на объем лентивируса.

Трансдукция клеток-мишеней (рисунок 9, б). Клетки HLE-B3 инокулировали в 6-луночные планшеты для культивирования клеток с плотностью $1,5 \cdot 10^5$ клеток на лунку и инкубировали в течение 18 ч до заражения. Супернатант лентивируса добавляли с множественностью инфекции (MOI) в количестве 60. Также добавляли полибрен в конечной концентрации 3 мкг/мл. Для метода заражения без центрифугирования супернатант лентивируса заменяли свежей полной средой для культивирования клеток через 8 ч, и клетки инкубировали еще 40 ч. Для метода заражения центрифугированием клетки центрифугировали при 1500g в течение 90 мин при температуре 32 °C. После центрифугирования супернатант лентивируса заменяли свежей полноценной средой для культивирования клеток, далее инкубировали клетки в течение 48 ч.

Первичные фибробласты человека инокулировали в 6-луночные планшеты для культивирования клеток с плотностью $1 \cdot 10^5$ клеток на лунку и инкубировали в течение 18 ч до заражения. К супернатанту лентивируса добавляли MOI в количестве 100. Полибрен добавляли в конечной концентрации 6 мкг/мл. Для метода заражения без центрифугирования лентивирусный супернатант заменяли через 8 ч, как описано выше. Для метода заражения центрифугированием клетки центрифугировали при 1500g в течение 90 мин при температуре 32 °C. После центрифугирования супернатант лентивируса заменяли свежей полноценной средой для культивирования клеток, затем инкубировали клетки в течение 48 ч.

Оценку интернационализации лентивирусных частиц в геном проводили на клетках С6. Для эксперимента за 24 ч до начала клетки С6 помещали в 12-луночный планшет из расчета 10^4 клетки на каждую лунку. В лунки с клетками вносили приготовленный раствор лентивирусных частиц (MOI = 50), реагент для трансдукции LentiTrans (полибрен) (Merck, США) и пептид в различных концентрациях. Схема опыта представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Схема опыта по оценке влияния пептида LREGIKNK на интернализацию лентивирусных частиц в геном клетки С6

DMEM и С6 + раствор лентивирусных частиц + пептид (50 мкг)	DMEM и С6 + раствор лентивирусных частиц
DMEM и С6 + раствор лентивирусных частиц + пептид (100 мкг)	DMEM и С6 + раствор лентивирусных частиц
DMEM и С6 + раствор лентивирусных частиц + пептид (200 мкг)	DMEM и С6 + раствор лентивирусных частиц

Через 72 ч в лунки вносили трипсин, затем клетки снимали с культуральной посуды и растворяли в PBS (pH 7,4). Затем проводили оценку проникновения вируса в геном клетки методом проточной цитометрии с помощью проточного цитофлуориметра для анализа и высокоскоростной сортировки клеток Becton Dickinson FACS Aria III SORP (BD Biosciences, США).

Для оценки проникновения лентивирусных частиц через мембрану использовали клетки НЕК 293Т, которые помещали в культуральный флакон Т25 (Eppendorf, Германия), затем при достижении конfluence 65–70 % в клет-плазмидами pLenti-GFP и pVSV-G (Addgene #138479) в количестве 7 и 15 мкг соответственно для сборки джезикул по протоколу. Культуральную среду заменили на 3 мл OPTI-MEM (Gibco, США). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе в течение 30 мин. За это время подготавливали пробирки со смесью pLenti-GFP, pVSV-G, OPTI-MEM и TurboFect (Invitrogen, США), OPTI-MEM, пробирки инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Во флаконы с клетками НЕК 293Т вносили содержимое и инкубировали в течение 12 ч при комнатной температуре, меняли культуральную среду на новую, инкубировали 48 ч, фильтровали через

поры 0,45 нм, полученный фильтрат центрифугировали при следующих параметрах: ускорение 100 000g, продолжительность 120 мин, температура 4 °С. Затем снимали надосадочную жидкость, осадок представлял лентивирусные частицы, которые помещали в морозильную камеру при температуре минус 80 °С.

Клетки линии С6 размораживали и рассаживали в планшеты в количестве $8 \cdot 10^5$ клеток на лунку. Через 24 ч к клеткам в присутствии пептида добавляли лентивирусные джезикулы для оценки соединения с рецепторами клеточной мембраны клеток С6.

Оценку проникновения лентивирусных частиц через мембрану проводили методом проточной цитометрии с помощью проточного цитофлуориметра для анализа и высокоскоростной сортировки клеток Becton Dickinson FACS Aria III SORP (BD Biosciences, США).

3. Образцы мороженого «Пломбир ванильный 15 %», обогащенного пептидом LREGIKNK, в качестве функционального ингредиента в количестве 30 г на 1000 кг сырья. Рецептúra представлена в таблице 16, технологическая схема (по этапам) – в приложении А.

Пробы мороженого были отобраны в соответствии с ГОСТ Р ИСО 707-2010 «Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб». Пробы находились в потребительской упаковке (контейнер 2,5 кг), помещенной в изотермический контейнер с хладоэлементами.

Органолептические показатели мороженого определяли по ГОСТ Р ИСО 22935-32011 «Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 2. Рекомендуемые методы органолептической оценки».

Содержание левомицетина в образцах мороженого определяли согласно МУК 4.1.1912-04 «Определение остаточных количеств левомицетина (хлорамфеникола, хлормецимина) в продуктах животного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и иммуноферментного анализа», п. 5. *Стрептомицин* – по МВИ.МН 2642-2015 «Методика выполнения измерений содержания стрептомицина в продукции животного происхождения с использованием тест-систем Ridascreen @Streptomycin производства RBiopharm AG, Германия».

Антибиотики тетрациклиновой группы – по МУ 3049-84 «Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства». *Пенициллин* – по МВИ.МН 5336-2015 «Методика выполнения измерений содержания антибиотиков группы пенициллинов в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием тест-систем производства (EuroProxima B.V., Нидерланды)».

Бактерии рода Listeria определяли по ГОСТ 32031-2022 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria* (*Listeria* spp.)». *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ 30347-2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*», п. 8.1. *БГКП* – по ГОСТ 32901-2014 «Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа», п. 8.5. *Бактерии рода Salmonella* – по ГОСТ 31659-2012 (БО 6579:2002) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*».

Содержание токсических веществ в мороженом сравнивали с требованием ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции», ТР ТС 033/2013 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции».

Массовую долю сахарозы определяли по ГОСТ Р 54667-2011 «Молоко и продукты переработки молока. Метод определения массовой доли сахаров». Массовую долю сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО) – по ГОСТ Р 54761-2011 «Молоко и молочная продукция. Методы определения массовой доли сухого обезжиренного молочного остатка». Кислотность – по ГОСТ Р 54669-2011 «Молоко и продукты переработки молока. Методы определения кислотности». Массовую долю жира – по ГОСТ 5867-90 «Молоко и молочные продукты. Метод определения жира», п. 2. Массовую долю сухого вещества – по ГОСТ Р 54668-2011 «Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли влаги и сухого вещества». Массовую долю белка – по ГОСТ 34454-2018 «Продукция молочная. Определение массовой доли белка методом Кьельдаля».

Кадмий определяли по ГОСТ 30178-96 «Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов». Мышьяк – по ГОСТ

26929-94 «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов», п. 3; ГОСТ 26930-86 «Сырье и продукты пищевые. Метод определения мышьяка». Ртуть – по ГОСТ 34427-2018 «Продукты пищевые и корма для животных. Определение ртути методом атомно-абсорбционной спектроскопии на основе эффекта Зеемана». Свинец – по ГОСТ 30178-96 «Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов». Удельную активность стронция – по ГОСТ 32163-2013 «Продукты пищевые. Метод определения содержания стронция Sr-90», удельную активность цезия – по ГОСТ 32161-2013 «Продукты пищевые. Метод определения содержания цезия-137». ГХЦГ – по ГОСТ 23452-2015 «Молоко и молочные продукты. Методы определения остаточных количеств хлорорганических пестицидов». ДДТ и его метаболиты – по ГОСТ 23452-2015 «Молоко и молочные продукты. Методы определения остаточных количеств хлорорганических пестицидов».

Генетически модифицированные организмы определяли по ГОСТ Р 53214-2008 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения». Руководствовались инструкцией по применению набора реагентов для обнаружения регуляторных последовательностей 35S, FMV, NOS в геноме ГМО растительного происхождения методом полимеразной цепной реакции в реальном времени PacTEHN35S+FMV/NOS.

Результаты были получены с использованием программного обеспечения GraphPad InStat 6.0. Использовался односторонний дисперсионный анализ (ANOVA). Данные выражены как среднее значение со стандартным отклонением ($M \pm SD$) при уровне значимости $p < 0,05$.

3 Результаты исследований и их обсуждение

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

В последние годы разрабатываются различные модели математического прогнозирования получения биологически активных ферментативных гидролизатов белков на основе предсказания пептидных последовательностей с желаемыми [271] и другими свойствами.

Для прогнозирования биоактивности гидролизатов белка и биопептидов используют различные предиктивные методы, которые могут предсказывать разнородную биологическую активность на основе аминокислотных последовательностей. Так, использование кодирования признаков для генерации числовых признаков на основе пептидных последовательностей является одним из методов машинного обучения, который может быть использован для анализа белковых последовательностей. Этот метод позволяет преобразовать пептидные последовательности в числовые векторы, которые могут быть использованы для обучения моделей машинного обучения. После того как пептидные последовательности были преобразованы в числовые векторы, можно использовать различные алгоритмы машинного обучения, такие как нейронные сети, SVM, деревья решений и др., для обучения моделей и предсказания свойств белков [238].

Согласно [136; 238], методы кодирования признаков подразделяются на две широкие категории: признаки на уровне пептидов и признаки на уровне аминокислот. На уровне пептидов методы машинного обучения в качестве входных данных используют характеристики последовательностей пептидов, а также длину пептида, аминокислотный состав, заряд, изоэлектрическую точку, гидрофобность

и другие свойства. На уровне аминокислот методы машинного обучения используют информацию об аминокислотной последовательности белка, а также о физико-химических свойствах аминокислот, таких как заряд, гидрофобность, размер и другие свойства.

Методы машинного обучения могут включать в себя использование различных алгоритмов, таких как SVM (Support Vector Machines), Random Forest, Neural Networks и др. В целом выбор метода машинного обучения и признаков зависит от конкретной задачи и доступных данных [60; 112].

Программная среда Microsoft Excel позволяет проводить оптимизацию процесса гидролиза с возможностью выбора целевой биологической активности и используемого фермента.

Заданные параметры пептида позволяют спрогнозировать процесс ферментативного гидролиза молозива коров ферментами трипсином и пепсином для получения от двух до шести видов заданной биологической активности (антиоксидантная, антимикробная, антидиабетическая, противоопухолевая, антивирусная, пребиотическая). Параметры гидролиза для получения гидролизата молозива с высокими противомикробными свойствами при воздействии трипсина и пепсина представлены на рисунке 10.

Определение оптимальных параметров ферментативного гидролиза для получения гидролизата с заданной биологической активностью проводили с использованием контуров желательности в зависимости от значений этих параметров.

Для получения гидролизата с антимикробной активностью определен следующий режим гидролиза:

- продолжительность гидролиза 4–5 ч;
- степень гидролиза 60 %;
- соотношение фермента (трипсин) и субстрата 1:17;
- pH 7,8;
- температура 39 °C.

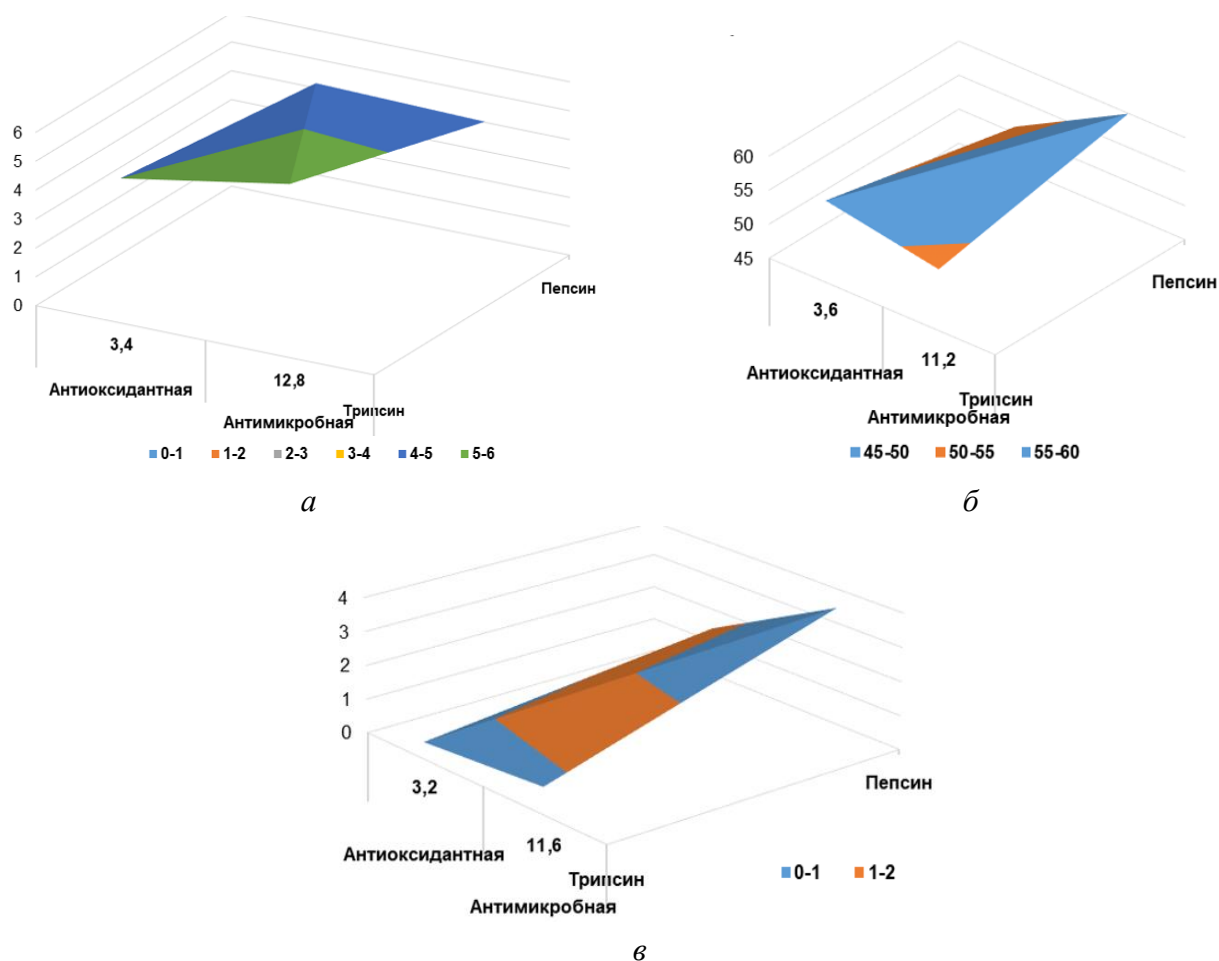


Рисунок 10 – Оптимальные параметры ферментного расщепления молозива коров для получения гидролизата с антиоксидантными и противомикробным свойствами:

a – продолжительность гидролиза, ч; *б* – степень гидролиза, %;

в – соотношение фермента и субстрата, %

Разработка зависимостей для перевода опытных значений оценочных показателей в кодовые для шкалы Y проводилась также с использованием среды Microsoft Excel (таблица 5).

Таблица 5 – Комплексная оценка процесса гидролиза в кодовых шкалах и с использованием функции Харрингтона

Биологическая активность	Частные оценочные показатели						D_i
	Время гидролиза		Степень гидролиза		Соотношение фермента и субстрата		
	Y	d_i	Y	d_i	Y	d_i	
Антимикробная активность	0,49	0,54	0,29	0,47	0,42	0,51	0,51

Полученные результаты, представленные в таблице 5, позволяют проводить обобщенную оценку желательности влияния параметров гидролиза молозива коров при различных значениях заданной биологической активности.

Смоделированные режимы ферментализации молозива коров для получения гидролизатов антимикробной направленности были в дальнейшем подтверждены экспериментальными исследованиями антибактериальной, противогрибковой, противовирусной и противоопухолевой активности пептида, выделенного из гидролизата.

Характеристика пептида, выделенного из трипсинового гидролизата, с прогнозируемой антимикробной активностью

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 $C_{41}H_{77}N_{13}O_{12}S_0$.

Молекулярно-массовое распределение пептида оценивали масс-спектрометрическим методом [126]. Идентификацию пептида осуществляли методом MALDI-TOF MS Ultraflex (Bruker, Германия) [270]. Анализ масс-спектров проводили с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint (Matrix Science, США).

На рисунке 11 представлен масс-спектр пептида LREGIKNK.

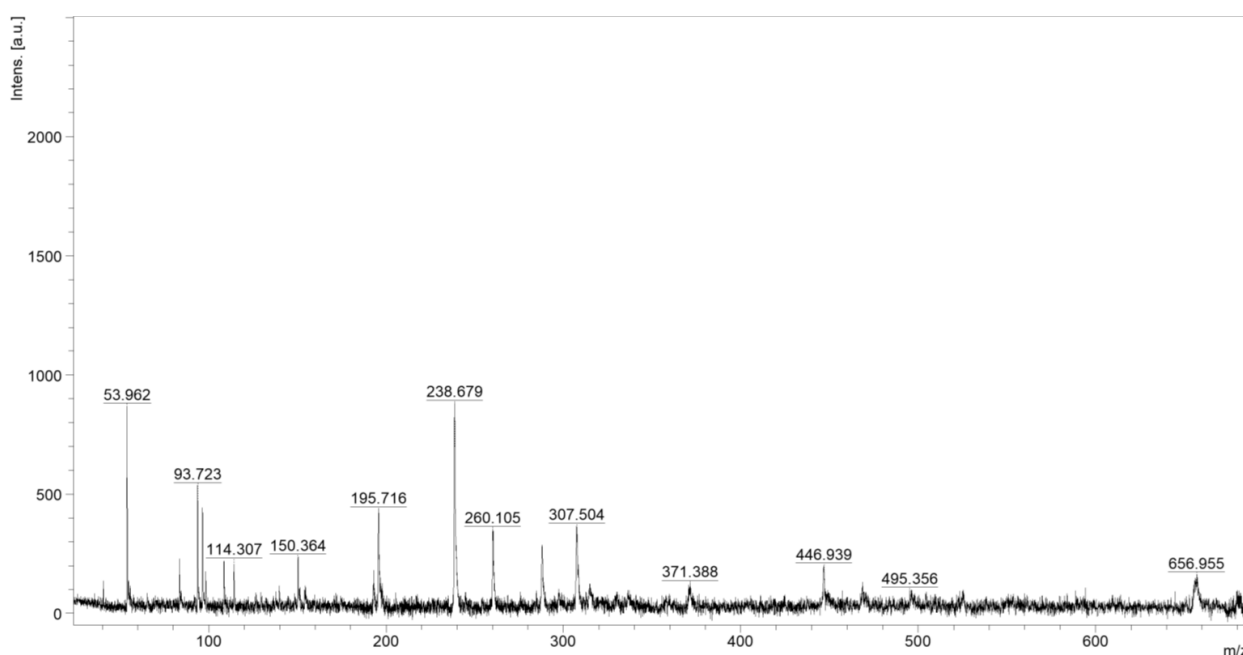


Рисунок 11 – Масс-спектр пептида LREGIKNK

В таблице 6 представлена характеристика аминокислотного состава пептида LREGIKNK.

Таблица 6 – Аминокислотный состав пептида LREGIKNK

Аминокислота	Характеристика
Гидрофобная аминокислота	I: 1 V: 0 L: 1 F: 0 C: 0 M: 0 A: 0 W: 0
Количество G и P	G: 1 P: 0
Отрицательно заряженная аминокислота	E: 1 D: 0
Положительно заряженная аминокислота	K: 2 R: 1 H: 0
Другая аминокислота	T: 0 S: 0 Y: 0 Q: 0 N: 1

Процентное содержание каждой аминокислоты пептида следующее, %: Ile 13, Leu 13, Gly 13, Asn 13, Glu 13, Lys 25 и Arg 13. Гидрофобное соотношение составляет 25 %, общий суммарный заряд +2.

Соотношение катионных и гидрофобных остатков определяет активность антимикробных пептидов. Катионные остатки включают аминокислоты, такие как аргинин (R), лизин (K) или гистидин (H). Их роль заключается в посредничестве реакций с отрицательно заряженными бактериальными липидами. Гидрофобные остатки, содержащие триптофан – W, фенилаланин – F и лейцин – L, участвуют в соединении с клеточными мембранами и определяют их повреждение [76]. Полярные катионные остатки способствуют солюбилизации молекул в воде, в то время как липофильные остатки обеспечивают локализацию в липидных мицеллах [191; 265].

Определение физико-химических показателей пептида: изоэлектрическая точка пептида, гидрофобность пептида по Уимли – Уайту в целом остатке (сумма энергии переноса пептида без остатка из воды на поверхность раздела), потенциал связывания с белками (индекс Бомана) определяли по базе данных антимикробных пептидов APD (<https://aps.unmc.edu/home>).

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.

Так, в составе известного антибактериального пептида лизоцима содержатся все аминокислоты, присутствующие в пептиде LREGIKNK. В частности, пять остатков лейцина, в исследуемом пептиде – 1; шесть остатков аргинина, в исследуемом – 1; два остатка глутаминовой кислоты, в исследуемом – 1; шесть остатков глицина, в исследуемом – 1; один остаток изолейцина, в исследуемом – 1; три остатка лизина, в исследуемом – 2; семь остатков аспарагина, в исследуемом – 2; по одной последовательности глицин – изолейцин.

Также в известном противомикробном пептиде мелиттине, выделенном из яда пчел, содержится последовательность глицин – изолейцин; мелиттин активен в отношении *E. coli* W 160-37 (МКГ 5–10 мкг/мл), *S. aureus* 8530В (МКГ 10–15 мкг/мл), *B. subtilis* (2–4 мкг/мл) и *P. putida* NCIM 2102 (25–35 мкг/мл). Также активен в отношении грамположительных *B. megaterium* Bm11 (смертельная концентрация LD 0,6 мкм), *S. aureus* Cowan I, *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis* YPIII, *P. aeruginosa* ATCC15692, *A. hydrophila* Bo-3N (NA) и *E. agglomerans* Bo-1S (LD 0,2–2,8 мкм). Активен против резистентного к колистину *A. baumannii*, *C. albicans* (MIC 3–6 мкм) и ВПГ-1, ВПГ-2. Он также является инсектицидным (EC_{50} 5,9 ммоль/мг). Активен в отношении грамположительных бактерий *S. mutants* (МИК 1,1 мкм), *S. aureus* (4,4 мкм) и *E. faecium* (2,2 мкм), а также грамотрицательных бактерий *E. coli* O-157 (MIC 1,1 мкм), *P. aeruginosa* (2,2 мкм) и *V. vulnificus* (4,4 мкм) и грибов *C. albicans* (8,8 мкм), *T. beigelii* (4,4 мкм), *M. furfur* (8,8 мкм). Сообщалось, что аналогичная последовательность активна в отношении *L. panamensis* [218], ингибирует ВИЧ, подавляя экспрессию вирусных генов [264].

Возможно, исследуемый пептид относится к катионным α -спиральным антимикробным пептидам, так как пептидная последовательность составляет не более 40 аминокислот, а общий заряд от +2 до +9, что согласуется с данными [245].

Нами смоделирована структура пептида LREGIKNK (рисунок 12).

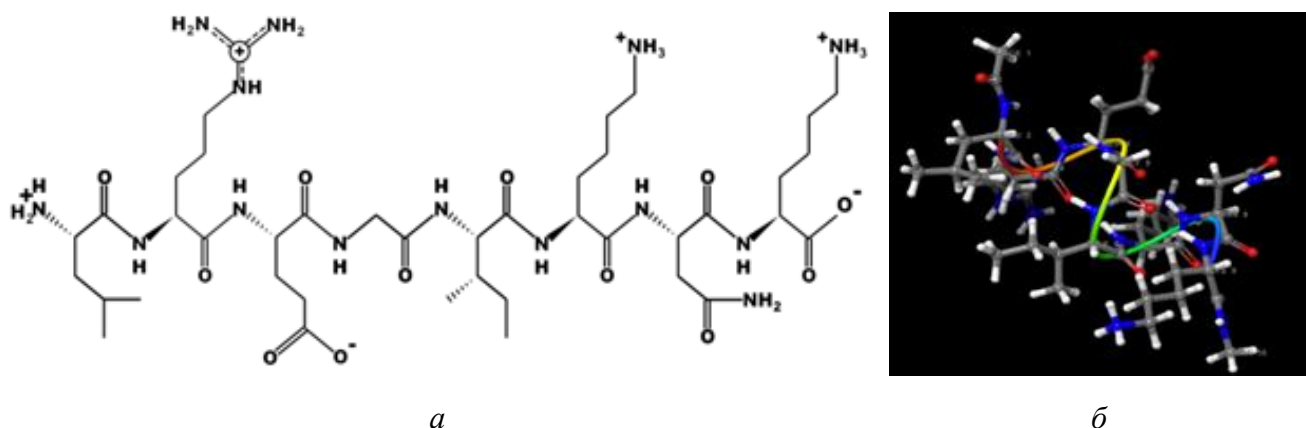


Рисунок 12 – Двухмерная (*a*) и трехмерная (*б*) структура пептида LREGIKNK

Из рисунка 12 следует, что пептид относится к α -спиральным антимикробным пептидам.

Следует отметить, что известный АМП лизоцим объединяет α -спиральную и β -структуру (по данным базы APD).

В исследуемом пептиде гидрофобное соотношение составляет 25 %, что согласуется с исследованиями [167], из которых следует, что 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. Пептид обладает высоким потенциалом связывания, если значение индекса превышает 2,48 [63].

В исследуемом пептиде индекс Бомана выше, чем у АМП лизоцима (индекс Бомана 2,28).

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 антимикробными пептидами.

На рисунке 13 показаны АМП из базы данных APD, имеющие наибольшее сходство с полученным пептидом, что позволяет сделать предположение о его антимикробных свойствах.



Рисунок 13 – Результаты сходства пептида LREGIKNK с известными АМП

Таким образом, на основании проведенных исследований можно предположить, что полученный пептид LREGIKNK обладает антимикробной активностью, что согласуется с результатами моделирования ферментативного гидролиза белка молозива (параграф 3.1).

3.2 Исследование биологической активности пептида LREGIKNK

3.2.1 Оценка цитотоксического действия пептида *in vitro*

Цитотоксичность – способность вызвать некротическую или апоптотическую гибель клеток путем нарушения синтеза белка и (или) изменения проницаемости клеточной мембраны [201]. Цитотоксичность можно измерить различными методами, включая 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (MTT) тест, ССК-8 тест, АТФ-тест, тест на лактатдегидрогеназу (LDH), тест AlamarBlue™ и тест на поглощение нейтрального красного (Neutral Red Assay) [162].

При исследовании цитотоксичности пептида LREGIKNK использован метод нейтрального поглощения красного, основанный на способности живых клеток поглощать нейтральный красный краситель. Краситель проникает в клетки посредством неионной диффузии и накапливается в лизосомах. После промывки краситель экстрагируют из клеток подкисленным этанолом и измеряют спектрофотометрически. Этот анализ основан на способности клеток сохранять градиент pH, который позволяет красителю проникать через клеточную мембрану и удерживаться в лизосомах. Поскольку такой способностью обладают только живые клетки, количество измеряемого красителя напрямую коррелирует с количеством живых клеток. Этот метод используется в качестве альтернативы другим тестам, например MTT [228].

Проведены исследования цитотоксичности пептида LREGIKNK. Результаты исследований представлены в таблице 7.

Из таблицы 7 следует, что 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. Цитотоксичность пептида в указанных выше дозировках составляет от –0,35 до 0,26.

Таблица 7 – Результаты оценки цитотоксичности пептида LREGIKNK

Дозировка пептида, мкг/мл	Оптическая плотность опытного образца с пептидом	Цитотоксичность
10	90 347 ± 124	–0,88
50	89 436 ± 51	0,14
100	90 249 ± 93	–0,35
200	89 476 ± 117	0,10
300	89 795 ± 46	0,26
400	89 785 ± 85	–0,25

Полученные данные согласуются с исследованиями [221], в которых доказана безопасность применения олиго- и полипептида на здоровых клетках.

Кроме того, полученные данные согласуются с результатами исследования токсичности АМП Р34 *in vitro* на эукариотических клетках [259]. Клетки VERO обрабатывали АМП Р34 и низином; значения EC_{50} в анализах МТТ, нейтрального красного и лактатдегидрогеназы были одинаковыми для обоих пептидов. Пептиды характеризовались отсутствием цитотоксичности. При оценке параметров жизнеспособности сперматозоидов, подвижности и акросомального экзоцитоза пептиды также показали сходные эффекты – не цитотоксичны.

Аналогичные результаты были получены китайскими учеными [223], которые доказали, что пептиды, выделенные из мышечного белка лягушки-быка (*Rana catesbeiana* Shaw), не проявляют цитотоксичности по отношению к клеточной линии MRC-5 эмбриональных фибробластов легких человека.

Таким образом, пептид LREGIKNK не обладает цитотоксическим эффектом, и предполагается, что указанный пептид может быть использован в составе пищевой продукции в качестве функционального ингредиента при условии дополнительных исследований его безопасности в экспериментах *in vivo*.

3.2.2 Оценка субхронической токсичности пептида *in vivo*

Исследование токсичности АМП LREGIKNK *in vitro* и *in vivo* является важным этапом перед тем, как его можно будет рассматривать для использования в составе пищевых продуктах в качестве функционального ингредиента.

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. Результаты исследований имеют решающее значение для оценки токсичности АМП как потенциальных функциональных ингредиентов в составе пищевой продукции, так как в настоящее время существует мало исследований острой токсичности для сравнения. Обширные токсикологические исследования показали, что прием известного АМП низина при пероральном введении не оказывает токсического воздействия на организм человека с зарегистрированным LD_{50} , равным 6950 мг/кг, что аналогично пищевой соли [139]. Исследование [81] подтверждает, что АМП педиоцин РА-1 не обладает токсичностью, хотя его применение еще не было рекомендовано ВОЗ [85]. Некоторые авторы [77] связывают высокий уровень LD_{50} АМП с действием протеолитических ферментов в желудочно-кишечном тракте, способных инактивировать пептиды, – в частности, трипсина и химотрипсина, вырабатывающихся в поджелудочной железе и высвобождаемых в тонкий кишечник. Некоторые АМП чувствительны к трипсину [198]. Низкая токсичность АМП – в частности, низина, введенного в состав молочного шоколада, возможно, связана с действием ферментов слюны. Установлено, что через 1 мин после употребления молочного шоколада, содержащего низин, его количество в ротовой полости составляет 25 % от первоначальной концентрации. Некоторые бактериоцины также могут быть иногда чувствительны к пталину и не обнаруживаются в слюне человека уже через 10 мин после употребления жидкости, содержащей бактериоцин [70].

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. Результаты исследований представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Динамика массы тела групп мышей BALB/с при исследовании субхронической токсичности пептида ($n = 10$)

Группа животных	Масса тела, г	
	в начале эксперимента	на 22-е сутки
1-я группа – контрольная (ОР + 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида)	$26,4 \pm 0,5$	$31,7 \pm 0,3$
2-я группа (ОР + 0,8 мг/кг пептида, растворенного в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида)	$25,9 \pm 0,6$	$31,9 \pm 0,4$

Результаты исследований биохимических показателей крови лабораторных животных представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Динамика биохимических показателей крови групп мышей BALB/с при исследовании субхронической токсичности пептида LREGIKNK ($n = 10$; $p \leq 0,05$)

Группа животных	АСТ, ед/л	АЛТ, ед/л	Креатинин, мг/дл	Мочевина, мг/дл
В начале эксперимента				
1-я группа – контрольная (ОР + 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида)	$149,3 \pm 18,1$	$72,8 \pm 21,8$	$0,14 \pm 0,04$	$57,4 \pm 16,9$
2-я группа (ОР + 0,8 мг/кг пептида, растворенного в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида)	$142,8 \pm 14,5$	$71,6 \pm 12,9$	$0,13 \pm 0,02$	$52,8 \pm 16,3$
На 22-е сутки эксперимента				
1-я группа – контрольная (ОР + 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида)	$147,4 \pm 17,2$	$74,9 \pm 11,8$	$0,19 \pm 0,05$	$58,8 \pm 15,2$
2-я группа (ОР + 0,8 мг/кг пептида, растворенного в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида)	$146,3 \pm 11,9$	$72,7 \pm 14,6$	$0,14 \pm 0,05$	$57,1 \pm 13,4$

Из таблицы 9 следует, что пероральное 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. Полученные данные согласуются с результатами исследований [258], в которых установлено отсутствие субхронической токсичности пищевых АМП *in vivo*.

Проведены гистологические исследования внутренних органов лабораторных животных (желудка, тонкой и толстой кишки, печени, тимуса, селезенки, головного мозга, сердца и легких) (рисунок 14).

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. Полученные данные согласуются с результатами исследований об отсутствии побочных эффектов и токсичности пептидов, выделенных из молочного белка, что позволяет сделать вывод о безопасности их использования в составе пищевой продукции в качестве пищевого функционального ингредиента [155]. Результаты субхронической пероральной токсичности запатентованной белковой фракции молочной сыворотки указывают на то, что она безопасна для употребления в дозе 3000 мг/кг в сутки [93]. Исследование показало, что пептид низин А, вводимый крысам в количестве 5 % от рациона в течение 90 сут, не вызывает токсикологических эффектов, хотя в группе, получавшей низин А, было обнаружено статистически значимое увеличение массы почек и случаи минимальной плоскоклеточной гиперплазии пограничного гребня в передней части живота [110]. Эти изменения были связаны с NaCl, поскольку они также были отмечены у крыс, получавших рацион, содержащий аналогичное количество соли. Хотя в этом исследовании подобных изменений не наблюдалось, представляется возможным, что воспалительная реакция может быть связана с высоким потреблением соли. Посмертное обследование животных, отравленных солью, может включать раздражение желудка, а гистопатологические поражения могут быть обусловлены видом животных [248].

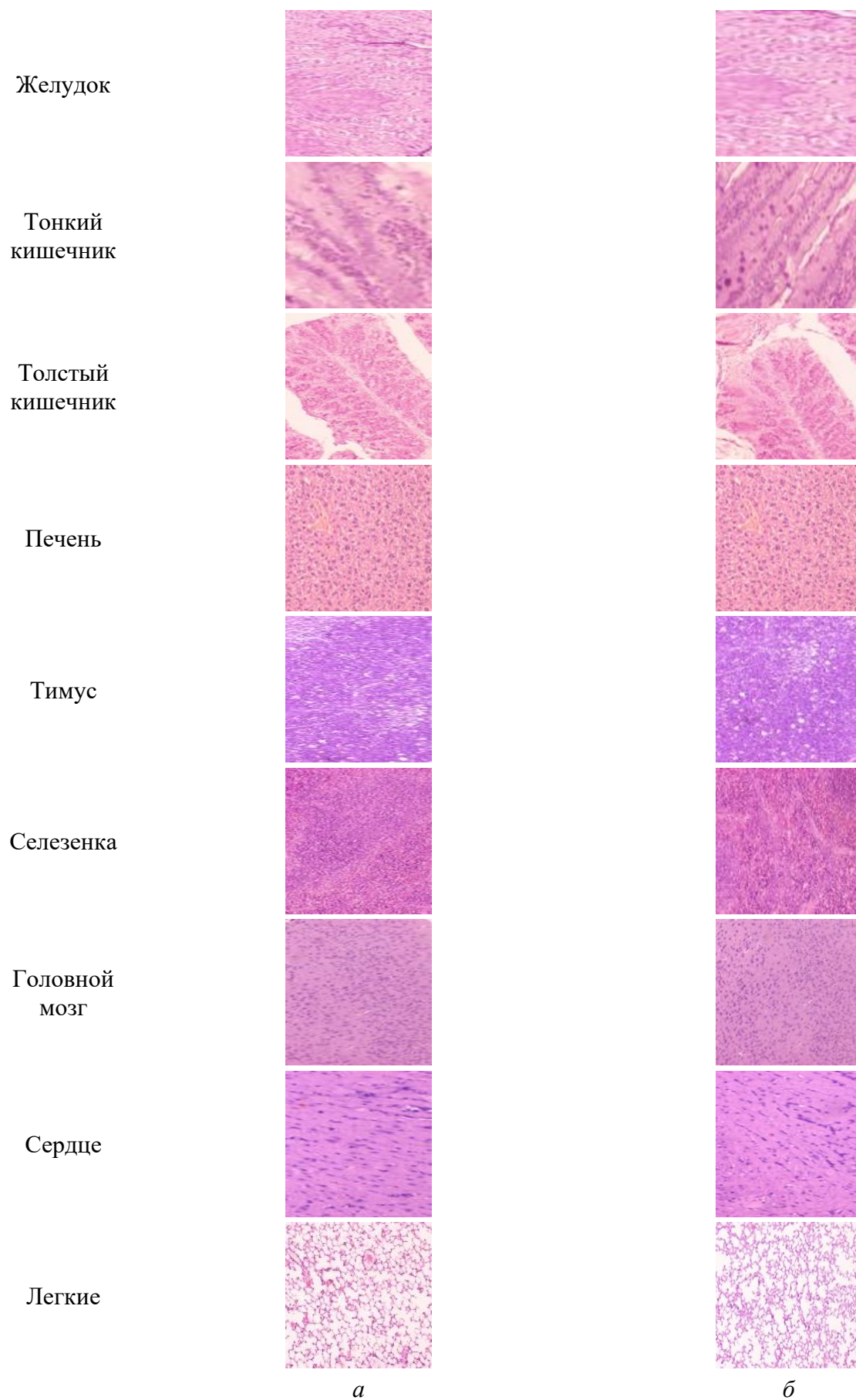


Рисунок 14 – Микроструктура внутренних органов мышей (увеличение $\times 20$):
a – контрольная группа; *б* – опытная группа

За исключением исследований с низином [96; 119], имеется мало сообщений об использовании моделей на животных для оценки токсичности АМП *in vivo* [197]. АМП низин тестировали на беременных крысах. Клинических признаков токсичности низина не было установлено [108]. Результаты наших исследований об отсутствии токсичности пептида LREGIKNK согласуются с экспериментами *in vivo* [81]. Потребление корма, содержащего педиоцин РА-1, не влияло на микрофлору кишечника, изменение веса или развитие животных.

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

3.2.3 Исследование влияния термической обработки пептида 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. Хотя известно, что АМП низин широко используется в технологии молочных и мясных продуктов, подвергнутых термической обработке [19] и позволяет сократить время термической обработки пищевой продукции.

В связи с вышеизложенным проведено сравнительное исследование по влиянию температуры 95 °С в течение 3 мин на антимикробную активность пептида LREGIKNK.

В таблице 10 представлены результаты влияния температуры 95 °С в течение 3 мин на антимикробную активность пептида LREGIKNK.

Таблица 10 – 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 основании 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. Результаты исследований согласуются с данными [275], в которых пептиды, полученные из казеина, сохраняют биологическую активность после термической обработки до 110 °С в кислых, нейтральных и слабощелочных условиях (рН 1,0–8,0). Обработка пептидов, выделенных при гидролизе казеина температурой 110–120 °С, приводила к потере биологической активности. При этом пептиды после тепловой обработки также не проявляют цитотоксичность по отношению к клеткам Сасо-2 или ECV-304.

Полученные нами результаты по антимикробной активности пептида согласуются с исследованиями [134], в которых не было обнаружено достоверных различий в ингибирующей активности АПФ между пептидами, полученными из казе-

ина, нагретыми до температуры от 40 °C до 100 °C ($P > 0,05$), и термически необработанными пептидами.

Аналогичным образом в исследовании [274] обнаружено, что биологическая активность пептидов DFHINQ и GFHI из экстрактов саркоплазматического белка говядины не показала существенных изменений после нагревания при 70; 80; 90 или 100 °C в течение 20 мин.

Биологическая активность пептидов, полученных из соевого белка, сохранялась при различных режимах температурной обработки [127]. Вместе с тем сильное нагревание потенциально может менять биологическую активность пептидов [173]. Однако в исследовании [46] доказано обратное, что ингибирующая активность пептидов бобовых видов повышается после термической обработки в течение 50 мин.

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

3.2.4 Изучение противоопухолевой активности пептида

Более 75 % лекарственных средств на основе пептидов используются при лечении рака. Селективная природа делает их многообещающим лекарственным препаратом-кандидатом [116]. В первой главе приведены данные о том, что АМП могут обладать противоопухолевой активностью. Например, пептид аскафин-8 (GFKDLLKGAALKALVKTVLF-NH₂), выделенный из стимулируемого норэпинефрином кожного секрета североамериканской хвостатой лягушки *Ascaphus truei*, представляет собой С-концевой α -спиральный антимикробный пептид с 19 аминокислотными остатками [140]. В исследованиях [78] показано, что аскафин-8 может ингибировать рост *Candida albicans*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*,

а также может лизировать эритроциты человека. Кроме того, аскафин-8 обладает потенциальной противоопухолевой активностью и ингибирующим действием на рост клеток рака печени HepG2 человека [79].

В связи с вышеизложенным проведены исследования по противоопухолевой активности пептида в отношении карциномы шейки матки человека HeLa. В качестве контроля использована культура мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Противоопухолевую активность пептида исследовали в концентрациях 5; 10; 20; 40; 50; 100; 150 и 200 мкг/мкл. Результаты исследований представлены в таблице 11. Графическое представление изображено на рисунке 15.

Таблица 11 – Жизнеспособность клеток HeLa и мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из бедренной кости крыс, при инкубации с пептидом LREGIKNK в различных концентрациях

Концентрация пептида, мкг/мкл	Жизнеспособность клеточной линии, %	
	МСК	HeLaS3
5	100,4 ± 4,5	100,1 ± 3,7
10	102,3 ± 4,7	100,6 ± 4,1
20	100,8 ± 5,9	93,7 ± 5,9
40	101,5 ± 7,1	83,2 ± 6,0*
50	100,7 ± 6,4	76,2 ± 4,8**
100	102,9 ± 9,2	52,8 ± 9,5**
150	100,3 ± 11,5	48,9 ± 14,3**
200	100,3 ± 10,8	37,4 ± 11,8**
Примечание – Достоверно при * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.		

На рисунке 16 представлены клетки HeLa без обработки пептидом и обработанные пептидом в концентрации 100 мкг/мкл (клетки, подвергшиеся апоптозу и аутофагии).

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.

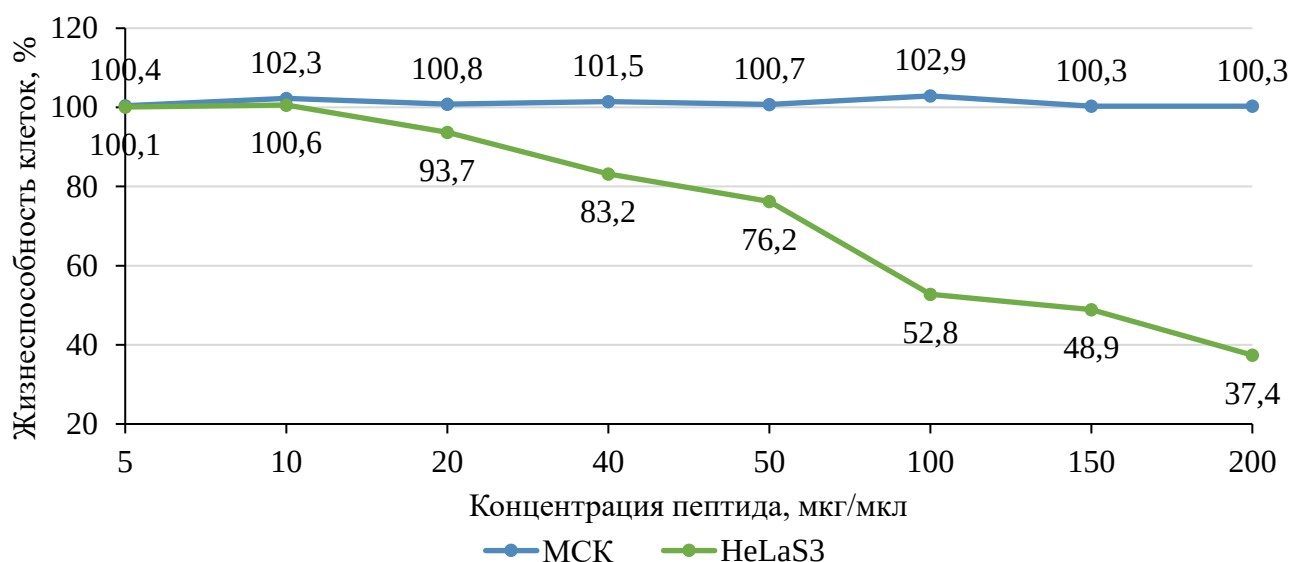
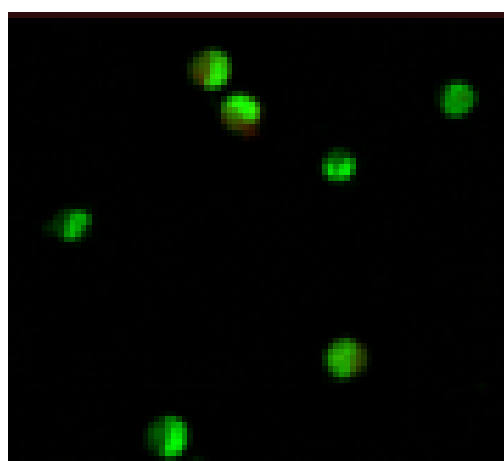
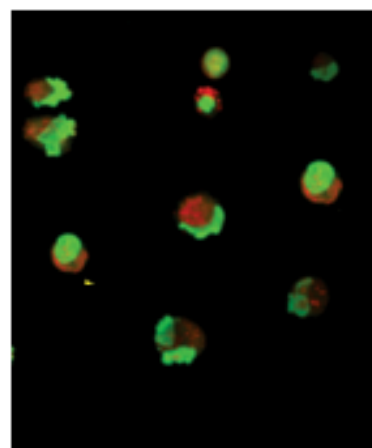


Рисунок 15 – Жизнеспособность клеток HeLa и мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из бедренной кости крыс, при инкубации с пептидом LREGIKNK в различных концентрациях



a



б

Рисунок 16 – Клетки HeLa без обработки пептидом (*a*) и обработанные пептидом в концентрации 100 мкг/мкл (клетки, подвергшиеся апоптозу и аутофагии) (*б*) (шкала 30 мкм)

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 %. Полученные данные согласуются с исследованиями [47], в которых проводилась обработка клеток HeLa синтезированными пептидами в концентрации 20 мкг/мл в течение 24 ч. Обнаружено, что данный пептид вызывает разрыв кле-

точной мембраны, в результате чего происходит выход цитоплазматического содержимого из клеток. Эффект мембранолитического действия пептида был подтвержден с использованием анализа окрашивания родамином 123 и PI. Эти результаты хотя и требуют дальнейшей оценки, однако показывают, что конъюгат 4 взаимодействует с липидами мембраны и внедряется в них, приводя к образованию пор и разрушению мембраны. Причина избирательного действия конъюгата 4 против клеток рака шейки матки также нуждается в дальнейшем изучении [47].

Возможно, гибель опухолевых клеток связана с высокой гидрофобностью пептида (гидрофобное соотношение 25 %), что играет решающую роль в механизме действия против раковых клеток, что согласуется с исследованиями [125], в которых установлено, что пептиды с большей гидрофобностью проявляли более сильную противоопухолевую активность и характеризовались некротическим механизмом разрушения мембран.

В исследовании [199] установлено, что спиральность наряду с гидрофобностью является ключевым фактором биологической активности противоопухолевых пептидов. Согласно результатам исследований, представленных в параграфе 3.1, исследуемый пептид относится к α -спиральным, что теоретически обосновывает его противоопухолевые свойства.

Вместе с тем было замечено [152], что противоопухолевая активность сшитых антимикробных пептидов не была строго линейно связана со степенью спиральности, а следовательно, другие механизмы также могут иметь значение для их противоопухолевой активности АМП. Среди них А8-4-Dr продемонстрировал относительно низкую спиральность, но сильную противоопухолевую активность, что также указывает на то, что более высокая степень гидрофобности может быть более важной, чем образование спирали.

Таким образом, в результате исследований установлено противоопухолевое свойство АМП LREGIKNK, выделенного из трипсинового гидролизата молозива коров. Полученные данные представляют интерес для разработки принципиально новых пищевых продуктов, обогащенных безопасным функциональным ингредиентом с противоопухолевыми свойствами, в частности мороженого.

3.2.5 Изучение противовирусной активности пептида

АМП потенциально могут быть использованы для профилактики и лечения вирусных инфекций. АМП, эффективные против вирусов называют противовирусными (АВП). Они действуют либо непосредственно на вирус, либо через клетку-хозяина. В исследовании [72] установлено, что АВП нацелены в основном на прикрепление, проникновение и слияние вируса с клеткой.

Так как противовирусные пептиды обычно короткие (до 12 аминокислот), имеют заряд от +2, гидрофобные или амфифильные [255], можно предположить, что исследуемый пептид LREGIKNK обладает противовирусными свойствами.

Проведенный нами поиск пептида по известным базам данных, в том числе Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и базе противовирусных пептидов (APD), результатов не дал (пептид не найден). Предварительно перед исследованиями противовирусных свойств пептида нами была использована глубокая генеративная модель для открытия антимикробных, в том числе противовирусных, пептидов – HydrAMP.

HydrAMP – это модель машинного обучения для создания новых антимикробных пептидов. По сути, существует два способа работы с моделью через этот веб-сервис:

- генерация аналога: получение списка последовательностей, которые будут рассматриваться как отправные точки для открытия аналога. Модель будет направлена на улучшение исходных последовательностей. Хотя результирующие последовательности будут похожи на исходные данные, они могут проявлять более высокую антимикробную активность;

- неограниченная генерация: можно спроектировать до 100 противовирусных пептидов без predetermined начальных последовательностей. Поскольку HydrAMP содержит данные о типичной структуре АМП, АВП и различает активные и неактивные пептиды, то она способна предложить новые антимикробные и противовирусные пептиды из исходного пептида.

На рисунке 17 представлены результаты генерации аналога пептида LREGIKNK.

Последовательность	Pr(AMP)	Pr (микрофон)	Длина	Зарядка	Гидрофобность	Гидрофобный момент	График
LREGIKNK (54 аналога)	0.04	0.00	8	2.997	-0.505	0.496	→

Рисунок 17 – Результаты генерации аналога пептида LREGIKNK

При генерации аналога пептида LREGIKNK с помощью модели HydrAMP установлено, что существует 50 аналогов выделенного нами пептида со сходной биологической активностью, но нативного пептида LREGIKNK нет в известных базах данных.

В таблице 12 представлены результаты неограниченной генерации пептида LREGIKNK, что свидетельствует о возможности новых разнообразных пептидов из известной пептидной последовательности LREGIKNK с аналогичными биологическими свойствами.

Таблица 12 – Результаты неограниченной генерации пептида LREGIKNK (фрагмент)

Последовательность	Pr (AMP)	Pr (микрофон)	Длина	Заряд	Гидрофобность	Гидрофобный момент
KLIWWRQWWRYGWLGMAAKK	1,00	1,00	20	5,994	0,020	0,121
GAKLELALKKLAAILKKLAA	1,00	1,00	21	5,095	0,170	0,221
YKMAIRALKWLAMKWW	0,92	1,00	16	4,994	0,152	0,444
HLHIWWIMQRRWWYIGMM	1,00	1,00	18	3,193	0,253	0,182
FIWWRRYNLLNLELGIRRWLDAM	1,00	1,00	25	2,997	0,106	0,200
WANEKLDLKQLLKAAWKAFMYW	1,00	1,00	22	2,996	0,097	0,312
MFRWRPLLKLWYYRH	1,00	1,00	15	5,093	-0,133	0,180

Из данных таблицы 12 видно, что из пептидной последовательности LREGIKNK можно создать 98 пептидов с аналогичными биологическими свойствами.

Таким образом, с помощью метода генерации АМП и АВП *in silico* можно предположить, что выделенный нами пептид является антимикробным и противовирусным, и его пептидную последовательность можно использовать для создания новых перспективных противовирусных биопептидов.

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 18 изображена флуоресцентная микроскопия трансдукции лентивирусных частиц в геном клетки.

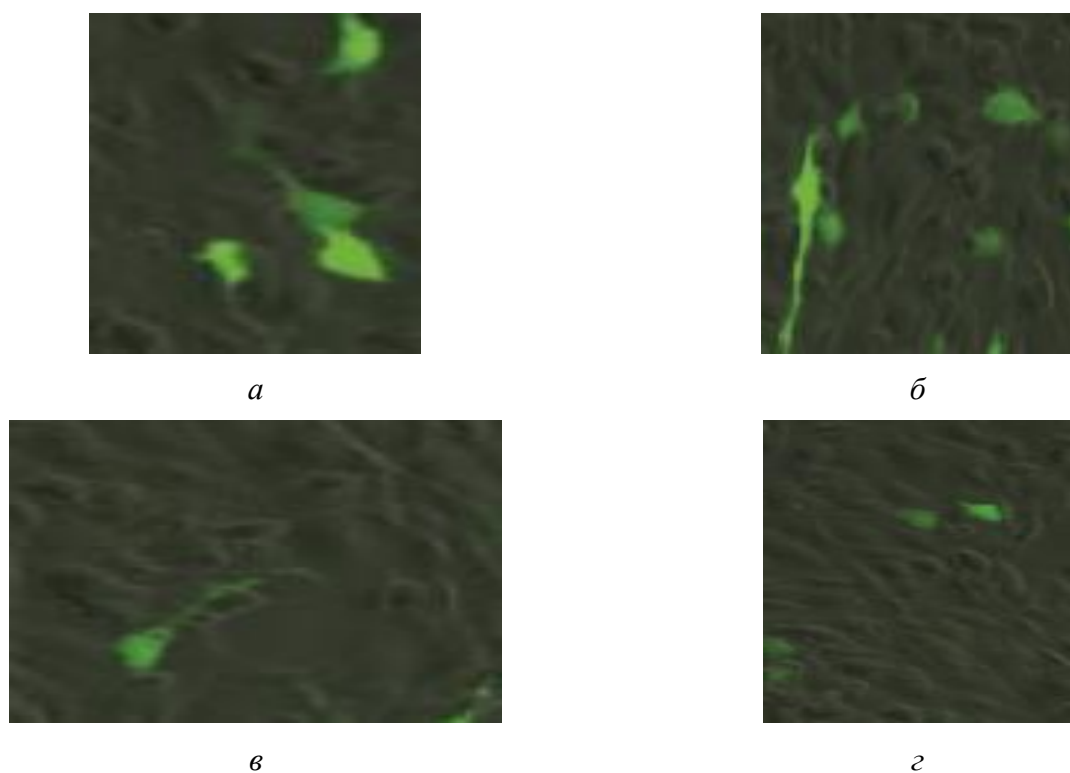
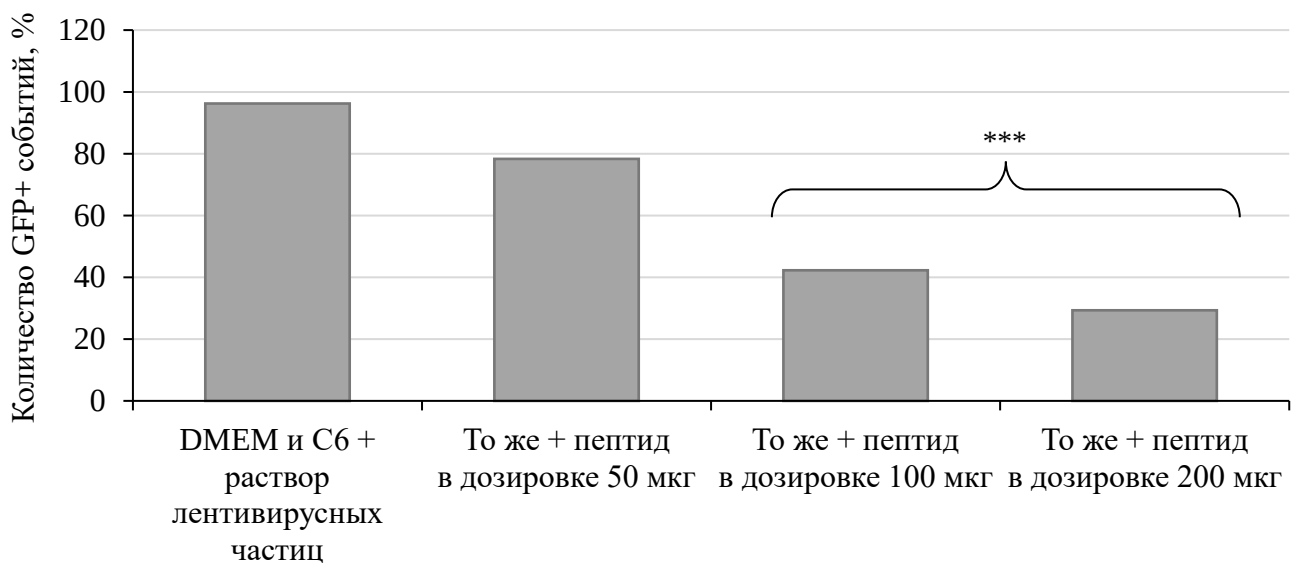


Рисунок 18 – Флуоресцентная микроскопия трансдукции лентивирусных частиц в геном клетки:

а – культуральная среда DMEM и C6 + раствор лентивирусных частиц;
б – то же плюс пептид в дозировке 50 мкг; *в* – то же плюс пептид в дозировке 100 мкг;
г – то же плюс пептид в дозировке 200 мкг

Обработка клеток лентивирусными частицами приводит к проникновению в цитоплазму клетки РНК вируса, после этого под РНК-геном вируса и вирусная обратная транскриптаза продуцируют ДНК-копию генома вируса, которая затем трансдуцируется в геном клетки. После этого в трансдуцированных клетках происходит экспрессия зеленого флуоресцентного белка, которая фиксируется флуоресцентной микроскопией.

На рисунке 19 представлена статистическая обработка количества GFP-клеток.



Примечание – *** $p < 0,001$.

Рисунок 19 – 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 по влиянию пептида в зависимости от температуры при дозировке пептида 200 мкг на проникновение в мембрану клетки (рисунки 20 и 21).

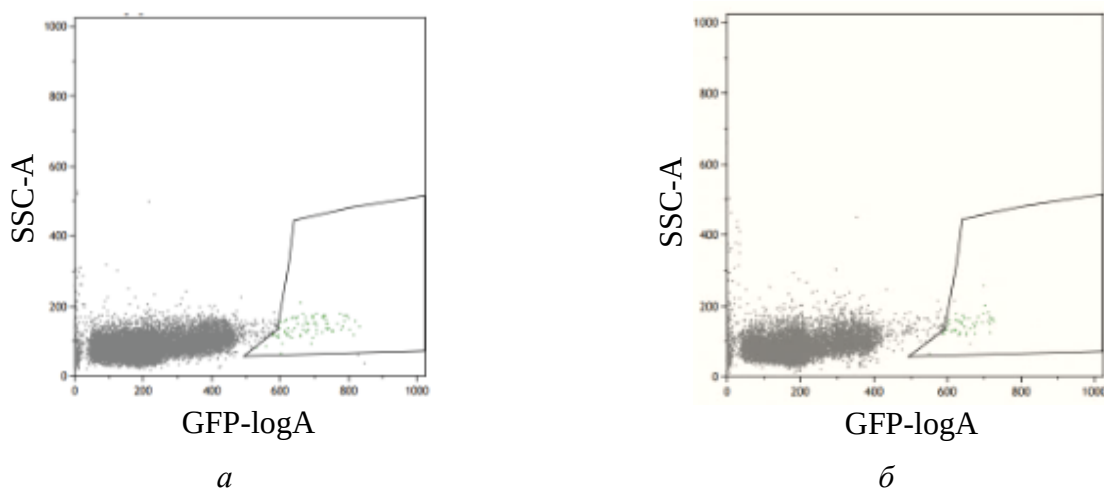


Рисунок 20 – Эффективность проникновения лентивирусных частиц в мембрану клетки (количество SSC-A/GFP-logA) при температуре 4 °C, %:

a – культуральная среда + лентивирусные частицы;

б – то же плюс пептид в концентрации 200 мкг

Из рисунка 20 следует, что эффективность проникновения лентивирусных частиц через мембрану клетки при температуре 4 °C низкая и не зависит от действия пептида.

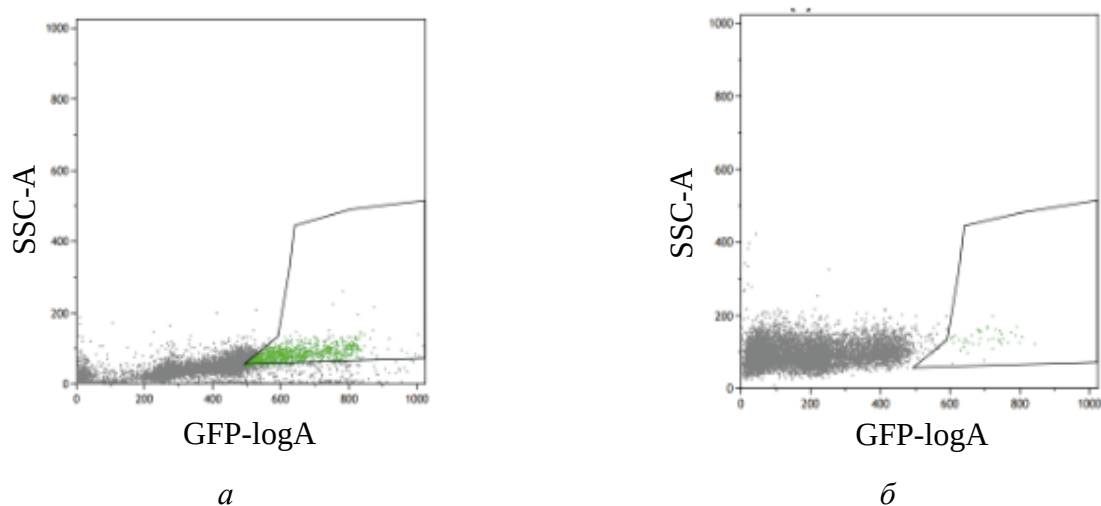
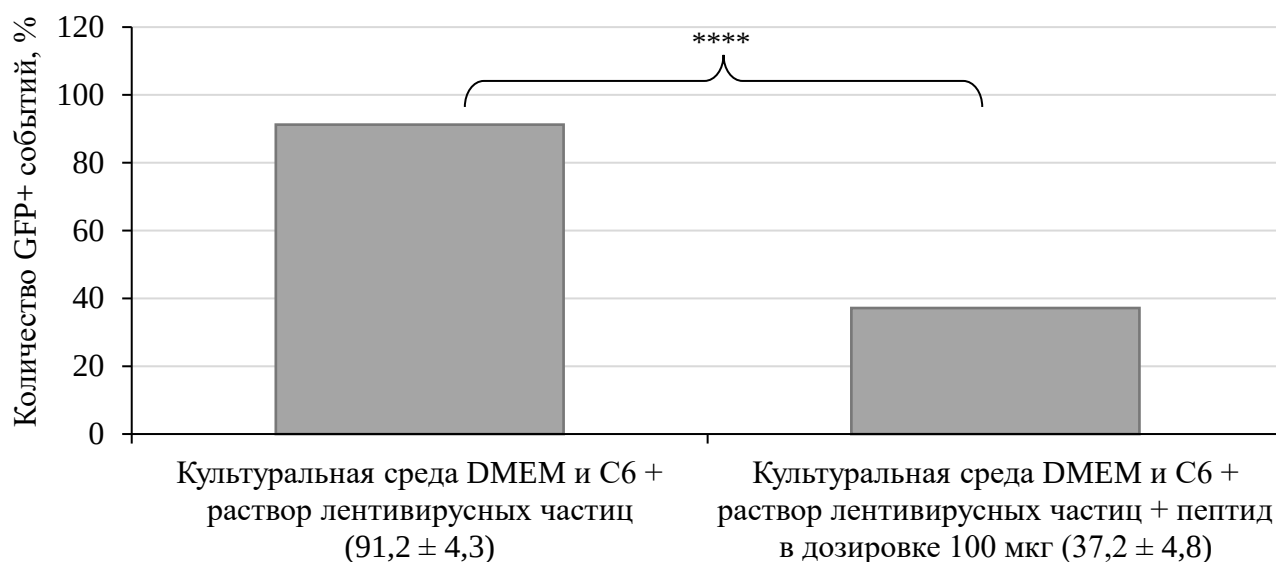


Рисунок 21 – Эффективность проникновения лентивирусных частиц в мембрану клетки (количество SSC-A/GFP-logA) при температуре 37 °C, %:

a – культуральная среда + лентивирусные частицы;

б – то же плюс пептид в концентрации 200 мкг

На рисунке 22 представлена статистическая обработка количества GFP+ событий при проникновении в мембрану клеток.



Примечание – **** $p < 0,0001$.

Рисунок 22 – Статистическая обработка количества GFP+ событий при проникновении лентивирусных частиц в мембрану клеток при температуре 37 °C

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.

Согласно классификации противовирусных пептидов в зависимости от механизма действия их делят на следующие категории (ингибиторы) [128]:

- связывания;
- слияния и проникновения;
- вирусных ферментов;
- сборки вирусов;
- пептиды с косвенным воздействием на вирусы.

По результатам проведенных исследований пептид LREGIKNK относится к ингибиторам слияния и проникновения. Такие пептиды могут быть выделены из природных источников [260], что нами и сделано – пептид получен в результате направленного гидролиза белка молозива коров.

Полученные результаты о безопасности, биологической активности и термической устойчивости пептида LREGIKNK в качестве функционального ингредиента в составе пищевой продукции противобактериального, противоопухолевого и противовирусного действия.

3.3 Твердофазный синтез аналога нативного пептида LREGIKNK

Пептиды являются одной из наиболее часто синтезируемых и исследуемых групп соединений [160]. Как правило, в фармацевтической и пищевой промышленности используются синтезированные пептиды, так как достаточно сложно и дорого получать нативные пептиды в промышленных масштабах. Кроме того, на биологическую активность выделенного пептида влияет множество факторов: качество сырья, технологические режимы гидролиза (температура, pH, соотношение фермента и субстрата и др.).

Для разработки способа синтеза пептида предложено модифицировать известный способ, описанный в источнике [118], путем получения наночастиц аминокислот и смолы и их связывания в воде.

Поскольку твердофазный синтез выполняется в двухфазной среде (жидкая и твердая фазы), то для эффективной реакции необходимо, чтобы аминокислоты и реагенты имели хорошую растворимость. В настоящее время твердофазный синтез пептидов в большинстве случаев выполняется с использованием стратегии Fmoc. Однако аминокислоты, защищенные Fmoc, плохо растворимы в воде и, следовательно, не подходят для использования в твердофазном синтезе в воде. С целью достижения твердофазного синтеза пептидов в воде необходимо использовать диспергируемые в воде наночастицы Fmoc-аминокислот.

На рисунке 23 представлена разработанная схема твердофазного синтеза пептида.

В последние годы использование технологий на основе наночастиц стало стратегией при решении проблем, связанных с плохо растворимыми в воде препаратами. Измельчение частиц до наноразмеров может привести к увеличению удельной площади поверхности и однородному смешиванию нескольких компонентов.

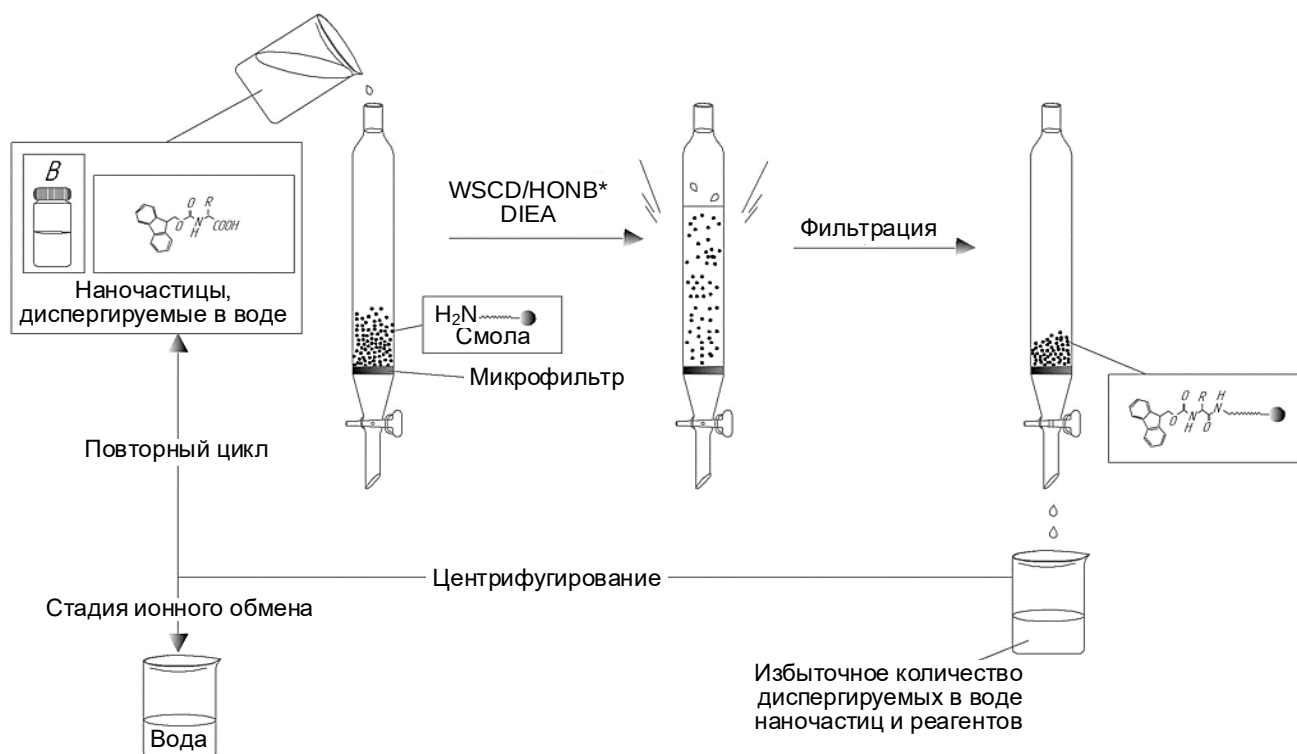


Рисунок 23 – Твердофазный синтез пептидов в воде с использованием диспергируемых в воде наночастиц Fmoc-аминокислот

В связи с этим было сформулировано предположение, что преобразование Fmoc-аминокислот в однородно диспергируемые в воде наночастицы позволит увеличить удельную площадь поверхности и однородное смешивание со смолой в воде, что обеспечит условия для более быстрой и качественной реакции синтеза пептидов (рисунок 24).

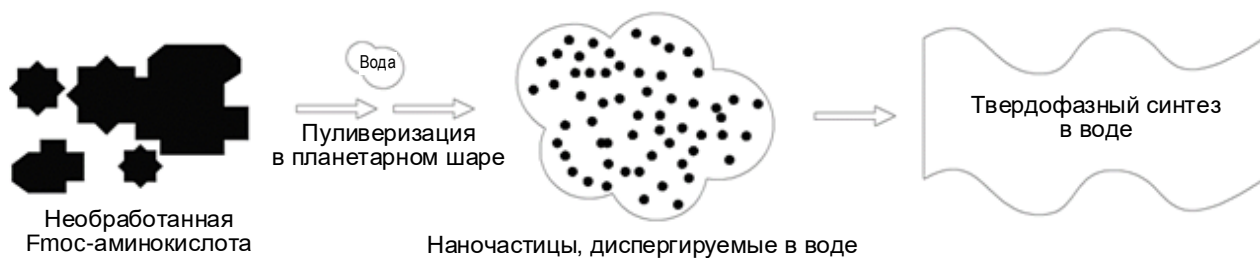


Рисунок 24 – Получение наноразмерных частиц приводит к более быстрой и качественной твердофазной реакции в воде

Наночастицы могут быть получены с помощью процессов, основанных на дисперсии. Мокрое измельчение – это процесс, основанный на трении, в котором

нерастворимый материал диспергируется в водном растворе поверхностно-активного вещества, а полученный материал преобразовывается в диспергируемые в воде наночастицы. Диспергируемые в воде наночастицы Fmoc-аминокислот получены путем мокрого измельчения с использованием планетарных шаровых мельниц (рисунок 25) в присутствии полиэтиленгликоля в качестве диспергирующего агента.



Рисунок 25 – Шаровая вибрационная мельница Retsch CryoMill

Для более тонкого измельчения в среду добавляли гранулы оксида циркония. Средние размеры полученных диспергируемых в воде наночастиц определяли с помощью анализа динамического рассеяния света на приборе (анализатор частиц лазерный Zetasizer, Нидерланды). Установлено, что размер частиц в результате обработки на шаровой мельнице составил от 250 до 500 нм.

На рисунке 26 представлены фотоизображения Fmoc-аминокислоты в воде до и после преобразования в диспергируемые в воде наночастицы.

*a*

Измельчение в течение 2 ч
в шаровой мельнице
с циркониевыми шариками

*б*

Рисунок 26 – Фотоизображение частиц Fmoc-аминокислоты:

a – необработанные частицы (виден нерастворимый осадок);

б – диспергируемые в воде наночастицы

Изображения тех же наночастиц, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), также показали образование наночастиц Fmoc-аминокислоты (рисунок 27).

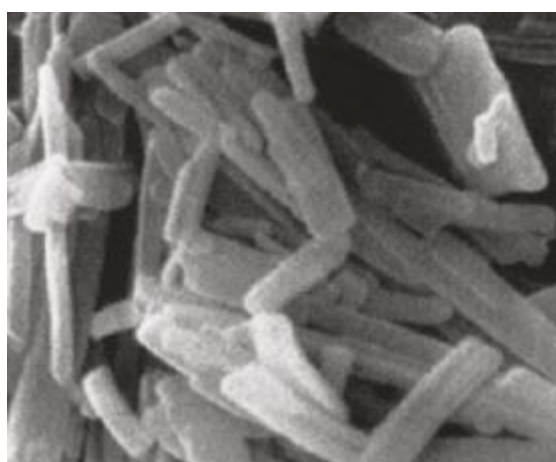
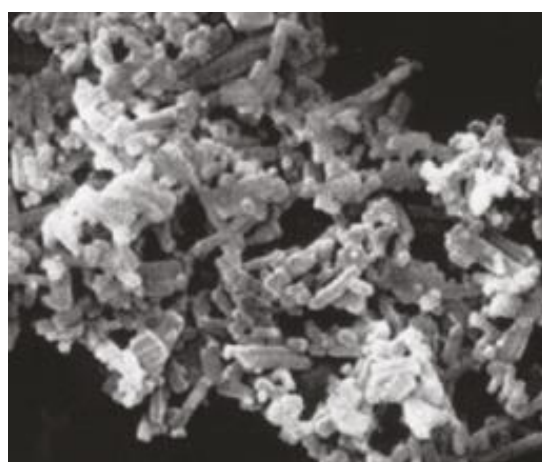
*a**б*

Рисунок 27 – Изображение частиц Fmoc-аминокислоты, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии (параметры микрофотографирования: 10 кВ $\times$ 10 000, масштаб 1 нм):
a – необработанные частицы; *б* – диспергируемые в воде наночастицы

В результате проведенных экспериментов была выдвинута гипотеза, что уменьшение размера частиц Fmoc-аминокислот до наномасштаба может повысить эффективность твердофазной реакции в воде. Поэтому следующим этапом исследований являлось проведение твердофазной реакции в воде с использованием диспергируемых в воде наночастиц.

В таблице 13 обобщены результаты реакции твердофазного связывания в воде диспергируемых в воде наночастиц Fmoc-аминокислот со смолой H-Leu-Rinkamide-TentaGel с использованием водорастворимых связующих реагентов: водорастворимого карбодиимида (1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорида) в сочетании с N-гидрокси-5-норборнен-эндо-2,3-дикарбоксимидом и N,N-диизопропилэтиламином.

Таблица 13 – Реакция твердофазного соединения в воде с использованием диспергируемых в воде наночастиц

Номер эксперимента	Реагент 1	Реагент 2	Реагент 3	Время, мин	Выход, %
1	1-этил-3-(3'-диметил-аминопропил)карбодиимид гидрохлорид	N-гидрокси-5-норборнен-эндо-2,3-дикарбоксимид	N,N-диизо-пропилэтиламин	15	68
2				30	100
Примечание – Реакции проводились между диспергируемыми в воде наночастицами Fmoc-аминокислоты и смолой TentaGelH-Leu-Rinkamide. После реакции смола была гидрирована. Выход реакции связывания рассчитан из аминокислотного соотношения с помощью аминокислотного анализа.					

Установлено, что после 15 мин скорость связывания аминокислот со смолой составила 68 % при проведении реакции в воде, после 30 мин скорость связывания составила 100 %. Таким образом, реакции связывания с использованием диспергируемых в воде наночастиц протекают за 30 мин.

По результатам проведенных реакций можно предположить, что реакция связывания между водным нанокolloидом и твердой подложкой может быть завершена за более короткий промежуток времени. Такая высокая эффективность реакции связывания, вероятнее всего, связана с гомогенным смешиванием наночастиц со смолой в воде.

Для разработки способа синтеза пептидов с использованием диспергируемых в воде наночастиц Fmoc-аминокислот была взята следующая последовательность LREGIKNK. В таблице 14 представлен протокол синтеза, в котором все этапы проводятся в водной среде.

Таблица 14 – Протокол твердофазного синтеза в воде с использованием наночастиц

Шаг	Реагент	Продолжительность стадии
1	Вода	1 мин × 5
2	Диспергируемая в воде наночастица Fmoc-аминокислоты с реагентами из таблицы 13	1 ч
3	Вода	1 мин × 5
4	Водный раствор 50 % этанола	1 мин × 2
5	Водные растворы 0,1 Н NaOH/90 % этанола	5 мин × 3
6	Водный раствор 50 % этанола	1 мин × 2

В качестве носителя для твердофазного синтеза использовалась смола Rinkamide-TentaGel, а для реакций конденсации – реагенты из таблицы 14.

Одним из важных факторов, влияющих на твердофазную реакцию в воде, является однородное смешивание наночастиц аминокислот и смолы. Известно, что поверхностно-активные вещества благоприятно влияют на процесс диспергирования. Следовательно, наносuspensions защищенных аминокислот, диспергированных с активными поверхностно-активными веществами, приведут к повышению реакционной способности. Известно, что Triton X-100 ингибирует агрегацию пептидной цепи. Вследствие этого проведено исследование по приготовлению диспергируемых наночастиц Fmoc-аминокислот в воде, содержащей Triton X-100 в качестве диспергирующего агента. Результаты исследований по установлению размеров полученных диспергируемых в воде наночастиц представлены в таблице 15.

В результате проведенных исследований установлено, что наиболее благоприятным условием измельчения частиц является использование 0,2 % водного раствора Triton X-100 в сочетании с размером гранул оксида циркония 0,5 мм. Размер частиц при таком режиме измельчения составил 217 нм.

Таблица 15 – Условия измельчения и размер частиц диспергируемых в воде наночастиц Fmoc-аминокислоты

Раствор Triton X-100, %	Размер гранул оксида циркония, мм	Размер частиц, нм
0,4	0,5	292 ± 12
0,2	0,5	217 ± 10
0,2	1,0	362 ± 15
0,1	1,0	484 ± 18
0,01	1,0	2581 ± 19

В результате разработанного способа трехфазного синтеза пептида получен полностью идентичный пептид в виде белого мелкодисперсного порошка. Чистота пептида, отделенного от смолы, составила более 90 % и аналогична 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.

Таким образом, разработан эффективный способ твердофазного синтеза в воде с использованием диспергируемых водорастворимых защищенных аминокислот. Общие твердофазные синтезы основаны на реакциях твердых веществ и жидкостей, в то время как разработанный способ основан на реакциях между твердым и водным нанокolloидным реагентами. Можно предположить, что разработанный способ будет применим к многим органическим реакциям. Существуют некоторые преимущества использования вододиспергированных наночастиц реагентов по сравнению с водорастворимыми реагентами. После проведения реакции в воде наночастицы легко отделить от смолы путем пропускания через микрофильтр. Помимо этого, наночастицы в фильтрате могут легко отделяться от воды центрифугированием или методом высаливания.

Полученный синтезированный пептид в дальнейшем был использован для обогащения мороженого.

3.4 Разработка технологии мороженого, обогащенного биологически активным пептидом LREGIKNK

Разработано мороженое «Пломбир ванильный 15 %», обогащенное разработанным пептидом. В таблице 16 представлена рецептура мороженого, обогащенного пептидом LREGIKNK.

Таблица 16 – Рецептура 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 100 мкг пептида).

Технологическая схема производства мороженого представлена на рисунке 28. Детализация этапов технологической схемы, включая подготовку сырья и ингредиентов, фризирование смеси, фасование и закаливание мороженого, упаковку и маркировку мороженого приведена в блок-схемах приложения А.

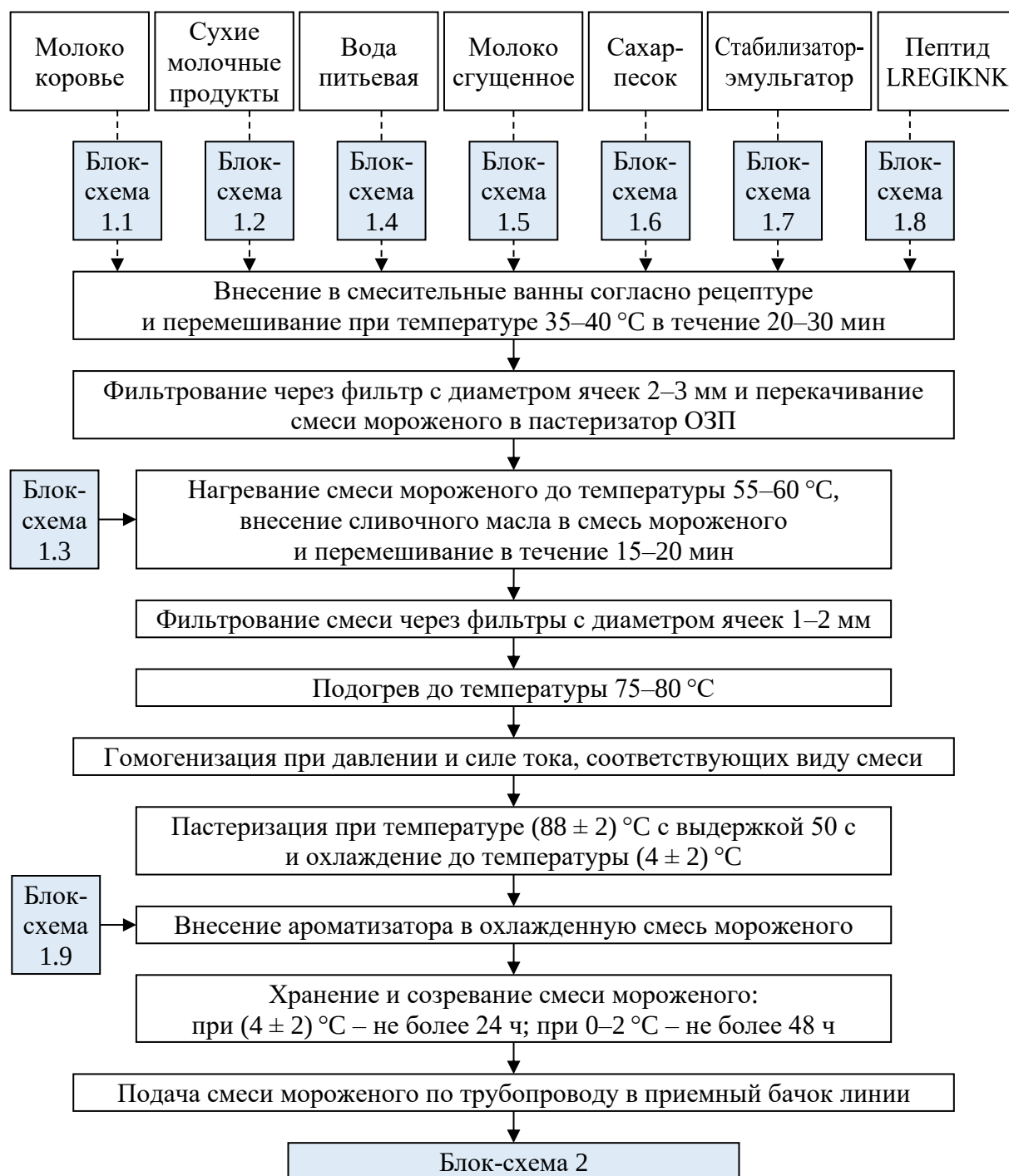


Рисунок 28 – Технологическая схема производства смеси мороженого, обогащенного пептидом LREGIKNK (фрагмент)

Как видно из рисунка 28, технологический процесс производства обогащенного пептидом мороженого в пластиковом контейнере с крышкой состоит из стадий, осуществляемых в следующей последовательности:

- приемка сырья;
- хранение сырья;
- подготовка сырья;
- смешивание компонентов;
- фильтрование смеси;
- гомогенизация смеси;
- пастеризация смеси;
- охлаждение смеси;
- созревание и хранение смеси;
- фризирование смеси;
- фасование и закаливание мороженого. Технологическая детализация данного этапа и этапа фризирования смеси приведена в блок-схеме 2 приложения А;
- упаковка и маркировка мороженого (блок-схема 3 приложения А).

Приемка сырья. При приемке сырьевых компонентов их качество подвергается оценке на соответствие установленным нормативным требованиям.

Хранение сырья. Хранение сырьевых компонентов проводят в соответствии с требованиями нормативных документов. При использовании импортного сырья хранение осуществляют в соответствии с требованиями и рекомендациями фирмы-изготовителя.

Подготовка сырья. Для оптимизации процесса приготовления смеси для мороженого отдельные сырьевые компоненты перед использованием подготавливают:

- молоко цельное коровье при приемке фильтруют, пастеризуют (при температуре $(78 \pm 2)^\circ\text{C}$ с выдержкой в накопителе в течение 20 с) и охлаждают до температуры $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$;

– сливочное масло в монолитах при наличии на монолите окисленного слоя толщиной более 2 мм зачищают и расплавляют на маслоплавителе (температура расплавленного сливочного масла 36–38 °C);

– воду питьевую фильтруют;

– комплексную пищевую добавку смешивают с сахаром.

Отличительным этапом технологической схемы получения обогащенного пептидом мороженого от традиционной является получение и подготовка пептида LREGIKNK: пептид после приемки хранится на складе при температуре от 0 °C до 23 °C и относительной влажности воздуха не более 75 %, для производства партии мороженого в заводской упаковке транспортируется в аппаратно-варочное отделение, после вскрытия заводской упаковки неиспользованная часть перемещается в маркированную тару, для составления смеси мороженого взвешивают необходимое количество пептида из расчета 3 г на 1000 кг сырья и растворяют в пастеризованной воде (38 ± 2) °C в соотношении 1:20, после чего полученный раствор перемещают к смесительным ваннам и вносят согласно производственному регламенту.

Таким образом, разработана рецептура мороженого «Пломбир ванильный 15 %», включающая введение в рецептуру функционального ингредиента пептида LREGIKNK и технологическая схема производства мороженого, отличающаяся наличием технологического этапа – приготовление раствора пептида и его внесение в смесь для производства мороженого.

3.5 Оценка качества и безопасности разработанного мороженого, обогащенного биологически активным пептидом

В таблице 17 представлена сравнительная оценка органолептических показателей качества мороженого без введения в рецептуры биопептида и мороженого, обогащенного биопептидом. Исследования проведены после выработки.

Таблица 17 – Сравнительная оценка органолептических показателей качества мороженого без введения в рецептуру биопептида и мороженого, обогащенного биопептидом

Показатель	Характеристика		Соответствие требованиям ГОСТ 31457
	Мороженое без биопептида	Мороженое, обогащенное биопептидом	
Вкус	Чистый, свойственный для мороженого пломбира ванильного по ГОСТу, без постороннего привкуса	Чистый, свойственный для мороженого пломбира ванильного по ГОСТу, без постороннего привкуса	Соответствует
Внешний вид	Однослойное мороженое в потребительской упаковке прямоугольной формы, без глазури. Структура однородная	Однослойное мороженое в потребительской упаковке прямоугольной формы, без глазури. Структура однородная	Соответствует
Консистенция	Плотная	Плотная	Соответствует

Согласно проведенным органолептическим исследованиям образцы мороженого, обогащенного биопептидом, не отличаются от контрольных образцов (без обогащения биопептидом) после выработки и соответствуют требованиям ГОСТ Р ИСО 22935-32011 «Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 2. Рекомендуемые методы органолептической оценки». Аналогичные результаты были получены через 5; 6 и 12 мес. хранения.

В таблице 18 представлена сравнительная оценка содержания антибиотиков и микотоксинов в мороженом без введения в рецептуру биопептида и мороженом, обогащенном биопептидом. Исследования проведены после выработки.

Таблица 18 – Сравнительная оценка содержания антибиотиков и микотоксинов в мороженом без введения в рецептуру биопептида и в мороженом, обогащенном биопептидом

Показатель	Характеристика		Норма по ТР ТС 021/2011
	Мороженое без биопептида	Мороженое, обогащенное биопептидом	
А6. Амфениколы Левомецетин (хлорамфеникол), мг/кг	Не обнаружено (менее 0,00008)	Не обнаружено (менее 0,00008)	Не допускается (менее 0,0003)
В1. Аминогликозиды Стрептомицин, мг/кг	Не обнаружено (менее 0,01)	Не обнаружено (менее 0,01)	Не допускается (менее 0,2)
В1. Антибиотики тетрациклиновой группы Тетрациклиновая группа, мг/кг	Не обнаружено (менее 0,01)	Не допускается (менее 0,01)	—

Продолжение таблицы 18

Показатель	Характеристика		Норма по ТР ТС 021/2011
	Мороженое без биопептида	Мороженое, обогащенное биопептидом	
В1. Пенициллиновая группа Пенициллин, мг/кг	Не обнаружено (менее 0,0025)	Не обнаружено (менее 0,0025)	Не допускается (менее 0,004)
В3d. Микотоксины Афлатоксин М1, мг/кг	Менее 0,0005	Менее 0,0005	Не более 0,0005

Левомецетин (хлорамфеникол), стрептомицин, пенициллин и афлатоксин в исследуемых контрольных и опытных образцах мороженого не обнаружены, что свидетельствует о безопасности продукта.

В таблице 19 представлены микробиологические показатели мороженого без введения в рецептуру биопептида и мороженого, обогащенного биопептидом. Исследования проведены после выработки.

Таблица 19 – Сравнительная оценка микробиологических показателей мороженого без введения в рецептуру биопептида и мороженого, обогащенного биопептидом

Показатель	Характеристика		Норма по ТР ТС 021/2011
	Мороженое без биопептида	Мороженое, обогащенное биопептидом	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Не обнаружены в 25 г		Не допускаются в 25 г
<i>S. aureus</i>	Не обнаружены в 1,0 г		Не допускаются в 1,0 г
БГКП (колиформы)	Не обнаружены в 0,01 г		Не допускаются в 0,01 г
Бактерии рода <i>Salmonella</i>	Не обнаружены в 25 г		Не допускаются в 25 г
КМАФАнМ, КОЕ/г	75	3,3	Не более $1 \cdot 10^5$

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

Таблица 20 – 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, %	$3,52 \pm 0,01$	$3,51 \pm 0,01$	Не менее 3,20
Массовая доля сахарозы, %	$15,76 \pm 0,01$	$15,79 \pm 0,01$	Не менее 14,00
Массовая доля сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО), %	$9,22 \pm 0,01$	$9,20 \pm 0,01$	Не более 10,00
Кислотность, °Т	$21,40 \pm 1,9$	$21,20 \pm 1,7$	Не менее 21,00
Массовая доля жира, %	$15,50 \pm 0,4$	$15,50 \pm 0,3$	Не менее 15,00
Массовая доля сухого вещества, %	$42,30 \pm 0,3$	$41,90 \pm 0,2$	Не менее 39,00

Из данных таблицы 20 следует, что все исследуемые физико-химические показатели контрольных и опытных образцов соответствуют требованиям ГОСТ 31457-2012 «Мороженое молочное, сливочное и пломбир. Технические условия».

В таблице 21 представлены показатели безопасности мороженого без введения в рецептуру биопептида и мороженого, обогащенного биопептидом. Исследования проведены после выработки.

По показателям безопасности мороженое, обогащенное LREGIKNK, и мороженое, не содержащее его 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».

Таблица 21 – Показатели безопасности мороженого без введения в рецептуру биопептида и в мороженом, обогащенном биопептидом

Показатель	Характеристика		Норма по ТР ТС 021/2011
	Мороженое без биопептида	Мороженое, обогащенное биопептидом	
Токсичные элементы			
Кадмий, мг/кг	Менее 0,01 (не обнаружено)	Менее 0,01 (не обнаружено)	Не более 0,03
Мышьяк, мг/кг	Менее 0,03 (не обнаружено)	Менее 0,03 (не обнаружено)	Не более 0,05
Ртуть, мг/кг	Менее 0,0025 (не обнаружено)	Менее 0,0025 (не обнаружено)	Не более 0,005
Свинец, мг/кг	Менее 0,01 (не обнаружено)	Менее 0,01 (не обнаружено)	Не более 0,005
Радионуклиды			
Удельная актив- ность стронция- 90, Бк/кг	Менее 4,52	Менее 4,52	Не более 25
Удельная актив- ность цезия, Бк/кг	Менее 3,29	Менее 3,29	Не более 100
Пестициды			
ГХЦГ γ-изомеры, мг/кг	Менее 0,005 (не обнаружено)	Менее 0,005 (не обнаружено)	Не более 1,25
ДДТ и его мета- болиты, мг/кг	Менее 0,005 (не обнаружено)	Менее 0,005 (не обнаружено)	—
Генетически модифицированные организмы (ГМО)			
Регуляторные по- следовательности в геноме ГМ-рас- тений (p-35S; t-NOS; pFMV)	В анализируемой пробе материал, являющийся производным ГМО (регу- ляторные последователь- ности p-35S/FMV, t-NOS) не обнаружен	В анализируемой пробе материал, являющийся производным ГМО (регу- ляторные последователь- ности p-35S/FMV, t-NOS) не обнаружен	Отсутствие матери- ала, являющегося производным ГМО (регуляторные по- следовательности p-35S/FMV, t-NOS) не обнаружен

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.

3.6 Экономическая целесообразность производства мороженого, обогащенного биопептидом LREGIKNK

Для расчета экономической целесообразности производства мороженого, обогащенного биопептидом, нами проанализирован потребительский рынок мороженого по показателям: объем розничных продаж, стоимость розничных продаж и средняя цена за килограмм по данным компании NielsenIQ (таблица 22).

Таблица 22 – Динамика потребительского рынка мороженого за 2020–2022 гг. [29]

Показатель	Год			Динамика, %	
	2020	2021	2022	2021/2020	2022/2021
Объем розничных продаж, т	239 417,0	253 140,0	231 696,0	5,7	–8,5
Стоимость розничных продаж, млн р.	118 938,0	137 445,0	152 939,0	15,6	11,3
Средняя розничная цена за 1 кг, р.	497,0	543,0	660,0	9,3	21,6

Из данных таблицы 22 следует, что объем розничных продаж мороженого в натуральном выражении в 2021 г. по сравнению с 2020 г. вырос на 5,7 %, но в 2022 г. в сравнении с 2021 г. снизился на 11,3 %. Возможной причиной является рост цен при некотором сокращении доходов населения. Так, стоимость розничных продаж в 2022 г. в сравнении с 2021 г. выросла на 11,3 млн р. при сокращении объема продаж. Что касается средней розничной цены мороженого за килограмм, то она выросла в 2021 г. по сравнению с 2020 г. на 9,3 %, в 2022 г. на 21,6 % по сравнению с 2021 г.

Средняя розничная цена мороженого в 2022 г. составила 660 р. за килограмм.

Проведен сравнительный расчет себестоимости по сырью мороженого, обогащенного биопептидом и необогащенного (таблица 23).

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

Таблица 23 – Сравнительный расчет себестоимости по сырью мороженого, обогащенного биопептидом и необогащенного

Наименование сырья	Количество , кг	Цена за 1 кг, без НДС, р.	
		Мороженое без пептида	Мороженое, обогащенное пептидом
Молоко цельное	500,000	32,00	32,00
Молоко сгущенное с сахаром цельное	175,000	188,00	188,00
Масло сливочное	144,400	610,00	610,00
Молоко сухое обезжиренное	23,500	195,00	195,00
Сахар-песок	63,900	64,00	64,00
Стабилизатор – эмульгатор	3,500	2 300,00	2 300,00
Пептид LREGIKNK	0,003	–	80 000,00
Ароматизатор ванилин	0,100	2 000,00	2 000,00
<i>Итого сырья</i>	910,679	–	–
Вода питьевая	89,321	0,04	0,04
Итого	1 000,000	–	–
Итого за 1 т, р.	–	153 665,67	153 905,67
Итого за 1 кг, р.	–	153,67	153,90

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 и 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/с 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 сокращений и условных обозначений

АВП – противовирусный пептид.

АЛТ – аланинаминотрансфераза.

АМП – антимикробный пептид.

АСТ – аспаргатаминотрансфераза.

БАВ – биологически активные вещества.

БАД – биологически активная добавка.

БАП – биологически активный пептид.

МСК – мезенхимальные стволовые клетки.

ОР – основной рацион.

СОМО – сухой обезжиренный молочный остаток.

ТФУ – трифторуксусная кислота.

ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид.

HLA – антиген тканевой совместимости.

Список литературы

1. Агаркова, Е. Ю. Аэрированные продукты с производными белков молочной сыворотки / Е. Ю. Агаркова. – DOI 10.52653/PPI.2022.3.3.006 // Пищевая промышленность. – 2022. – № 3. – С. 24–27.
2. Алборов, Р. Г. Короткие пептиды как перспективные биорегуляторы / Р. Г. Алборов, А. В. Шипицына, С. Р. Галиева [и др.] // Заметки ученого. – 2022. – № 1-1. – С. 102–104.
3. Андреев, В. А. Антимикробное действие пептида пентадефенина / В. А. Андреев, А. А. Колобов, О. В. Шамова [и др.] // Военно-медицинский журнал. – 2021. – Т. 342. – № 1. – С. 43–48.
4. Болдырева, Ю. В. Олигопептиды как биохимически значимые молекулы ФГБОУ / Ю. В. Болдырева, И. А. Лебедев, Е. В. Захарчук [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 138–146.
5. Брель, А. К. Применение *n*-гидроксibenзоил хлоридов для получения конъюгатов с биологически активными дипептидами / А. К. Брель, С. В. Лисина, Ю. Н. Будаева // Журнал органической химии. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 517–523.
6. Бродский, В. Я. Пептиды семакс и HLDF-6, введенные крысам разного возраста, регулируют ритм синтеза белка в гепатоцитах, исправляя нарушения при старении / В. Я. Бродский, Ю. А. Золотарев, Л. А. Мальченко [и др.] // Онтогенез. – 2020. – Т. 51, № 2. – С. 113–120.
7. Вавилова, М. А. Моделирование процесса ферментации синбиотического мороженого / М. А. Вавилова // Новые технологии. – 2021. – Т. 17, № 3. – С. 15–23.
8. Волкова, Т. Д. Оптимизация твердофазного синтеза бета-амилоида (1-40) и получение антител, выявляющих его в условиях иммуноблота / Т. Д. Волкова, Д. О. Короев, А. В. Камынина [и др.] // Биоорганическая химия. – 2020. – Т. 46, № 2. – С. 181–187.

9. Гашева, М. А. Подбор пробиотических заквасочных культур для производства кисломолочного мороженого с заданными функциональными свойствами / М. А. Гашева // Новые технологии. – 2022. – Т. 18, № 3. – С. 17–23.

10. Гумилевский, Б. Ю. Поиск безопасных иммунодоминантных пептидов SARSCOV-2 *in silico* / Б. Ю. Гумилевский, А. М. Цыганков, В. В. Янченко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2021. – № 3. – С. 45–55.

11. Держапольская, Ю. И. Изучение показателей качества смеси для кисломолочного мороженого, обогащенного пребиотиком / Ю. И. Держапольская, Е. И. Решетник // Дальневосточный аграрный вестник. – 2016. – № 1 (37). – С. 71–76.

12. Журкович, И. К. Идентификация коротких пептидов в составе полипептидных комплексов, выделенных из органов животных / И. К. Журкович, Н. Г. Ковров, Г. А. Рыжак [и др.] // Успехи современной биологии. – 2020. – Т. 140, № 2. – С. 140–148.

13. Иванкина, И. Ф. Функциональная пищевая добавка вторичного сырья пантового оленеводства для обогащения кондитерских изделий / И. Ф. Иванкина, Н. Ф. Иванкина, Е. И. Решетник [и др.] // Дальневосточный аграрный вестник. – 2013. – № 4 (28). – С. 50–52.

14. Калинин, Е. П. Биологические эффекты и оценка острой токсичности антикоагулянтов растительного происхождения / Е. П. Калинин, Н. Н. Буслаева, Д. И. Бояринцев // Медицинская наука и образование Урала. – 2020. – Т. 21, № 4 (104). – С. 27–29.

15. Касирова, А. Н. Синтез Аналогов тимопентина. Синтез тетрапептида H-LIS-GLI-PRO-TIR-OH / А. Н. Касирова // Вестник Педагогического университета. Естественные науки. – 2022. – № 1 (13). – С. 120–125.

16. Кахоров, Б. А. Влияние на иммунную систему биостимуляторов из пептидных соединений при экспериментальном гепатите / Б. А. Кахоров, С. Л. Расулова, Ф. Б. Хаитова [и др.] // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных и пути их решения : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной Дню Белорусской науки и 95-летию кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней (Витебск, 15–16 декабря 2022 г.). – Витебск : ВГАВМ, 2023. – С. 136–138.

17. Клыченков, С. В. Изучение антибактериальной активности пептидных фракций маточного молочка и трутневого расплода / С. В. Клыченков, А. Д. Кручинина, Л. А. Бичурина, И. А. Сорокин. – DOI 10.21685/2072-3032-2022-4-10 // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2022. – № 4 (64). – С. 97–106.
18. Кручинин, А. Г. Кручинин, А. Г. Ферментативный способ производства биоактивных пептидов из молочного сырья: обзор предметного поля / А. Г. Кручинин, Е. И. Большакова. – DOI 10.37442/fme.2023.3.24 // Пищевая метаинженерия. – 2023. – Т. 1, № 3. – С. 47–65.
19. Кудряшов, В. Л. Низин и натамицин – эффективные пищевые микробиологические консерванты / В. Л. Кудряшов, В. В. Алексеев, Н. А. Фурсова // Пищевая индустрия. – № 2 (44). – 2020. – С. 67–71.
20. Кузник, Б. И. Эпигенетические механизмы пептидной регуляции и нейротекторный белок FKBP1B / Б. И. Кузник, С. О. Давыдов, Е. С. Поправка [и др.] // Молекулярная биология. – 2019. – Т. 53, № 2. – С. 339–348.
21. Курченко, В. П. Мультикомпонентные композиты наноконструкций циклодекстрина с биологически активными веществами для функциональных продуктов питания / В. П. Курченко, Т. Н. Головач, Н. В. Сушинская [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2022. – Т. 52, № 2. – С. 375–389.
22. Лебедев, И. А. Биологически активные пептиды и их роль в жизнедеятельности человека / И. А. Лебедев, Л. С. Гафнер, Г. Р. Мухамадеева [и др.] // Заметки ученого. – 2021. – № 8. – С. 145–148.
23. Мезенова, О. Я. Исследование протеиновых фракций высокотемпературных гидролизатов из голов копченой кильки / О. Я. Мезенова, В. В. Волков, Л. С. Байдалинова [и др.] // Рыбное хозяйство. – 2020. – № 2. – С. 113–117.
24. Мельникова, Е. И. Применение пахты в технологии кисломолочного мороженого / Е. И. Мельникова, Е. Б. Станиславская, В. Е. Диденко [и др.] // Вестник Международной академии холода. – 2020. – № 1. – С. 60–66.

25. Мяконосов, Д. С. Спектрофотометрический метод оценки протеолиза в сырах и ароматических добавках с сырным вкусом / Д. С. Мяконосов, Д. В. Абрамов, Е. Г. Овчинникова [и др.] // Пищевые системы. – 2021. – Т. 4, № 1. – С. 45–55.
26. Наволоцкая, Е. В. Действие пептида LKEKK на кератиноциты человека / Е. В. Наволоцкая, В. Б. Садовников, Д. В. Зинченко [и др.] // Биоорганическая химия. – 2020. – Т. 46, № 6. – С. 670–675.
27. Некрасова, Ю. О. Моделирование рецептуры протеинового батончика, предназначенного для спортивного питания / Ю. О. Некрасова, О. Я. Мезенова // Вестник молодежной науки. – 2021. – № 5 (32). – URL: <http://vestnikmolnauki.ru/wp-content/uploads/2022/02/statya-9-Nekrasova-Mezenova.pdf> (дата обращения: 27.02.2024).
28. Нестеров, М. С. Стандартизация критических показателей качества липосом экстракта препуциальной железы мускуса кабарги сибирской / М. С. Нестеров, Р. А. Агельдинов, Д. В. Хвостов [и др.] // Биомедицина. – 2021. – Т. 17, № 3. – С. 62–67.
29. Обзор рынка мороженого в России в 2020, 2021 и 2022 года / Союз мороженщиков России. – URL: <https://morogenoe.ru/page36324044.html> (дата обращения: 24.10.2023).
30. Патент № 2717674 Российская Федерация, МПК А61К 38/05, А61Р 17/02, А61Р 3/10. Лекарственное средство, усиливающее оксигенацию тканей при диабетической стопе, и способ его применения : № 2019129166 : заявл. 08.11.2017 : опубл. 25.03.2020 / А. В. Трофимов, В. Х. Хавинсон, О. М. Ивко [и др.].
31. Петреченко, М. И. Функциональное кисломолочное мороженое / М. И. Петреченко, И. С. Полянская, Д. С. Габриелян [и др.] // Молочная промышленность. – 2021. – № 5. – С. 49–51.
32. Решетник, Е. И. Влияние компонентного состава на пищевую и биологическую ценность продукта / Е. И. Решетник, Е. А. Уточкина // Вестник ВСГУТУ. – 2013. – № 2 (41). – С. 63–67.

33. Серба, Е. М. Получение пептидно-аминокислотных ингредиентов на основе грибной биомассы *Aspergillus Oryzae* / Е. М. Серба, П. Ю. Таджибов, Л. В. Римарева [и др.] // Микология и фитопатология. – 2020. – Т. 54, № 1. – С. 23–32.
34. Сложенкина, М. И. Совершенствование рецептуры производства мороженого / М. И. Сложенкина, Н. И. Мосолова, К. Г. Тутарашвили [и др.] // Аграрно-пищевые инновации. – 2019. – № 1 (5). – С. 97–103.
35. Соколов, Д. В. Ферментативный гидролиз соевого белка / Д. В. Соколов, Б. А. Болхонов, С. Д. Жамсаранова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2023. – Т. 53, № 1. – С. 86–96.
36. Тихонов, С. Л. Полипептид молозива коров – перспективный функциональный ингредиент специализированной пищевой продукции для профилактики вирусных инфекций / С. Л. Тихонов, И. М. Чернуха // Ползуновский вестник. – 2023. – № 1. – С. 114–122.
37. Хавинсон, В. Х. Изучение влияния пептида КЕ на длину теломер хромосом ФГА-стимулированных лимфоцитов человека / В. Х. Хавинсон, Н. С. Линькова, А. А. Пендина [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19, № 5. – С. 166–168.
38. Хавинсон, В. Х. Применение препарата Тималин® при заболеваниях органов дыхания. Перспективы использования при COVID-19 / В. Х. Хавинсон, Б. И. Кузник, В. Г. Стуров [и др.] // РМЖ. – 2020. – Т. 28, № 9. – С. 24–30.
39. Хавинсон, В. Х. Тималин: применение для иммунокоррекции и молекулярные аспекты биологической активности / В. Х. Хавинсон, Н. С. Линькова, Н. И. Чалисова [и др.] // Успехи современной биологии. – 2021. – Т. 141, № 1. – С. 25–31.
40. Шевченко, К. В. Синтез и изучение свойств фосфинового псевдопролилглицилпролина / К. В. Шевченко, М. Э. Дмитриев, А. В. Винюков [и др.] // Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах. – 2021. – Т. 498, № 1. – С. 30–33.

41. Acquah, C. Structure-informed separation of bioactive peptides / C. Acquah, Y. W. Chan, S. Pan [et al.]. – DOI 10.1111/jfbc.12765 // Journal of food biochemistry. – 2019. – Vol. 43 (1). – Art. e12765.
42. Ageitos, J. M. Antimicrobial peptides (AMPs): ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria / J. M. Ageitos, A. Sánchez-Pérez, P. Calo-Mata [et al.]. – DOI 10.1016/j.bcp.2016.09.018 // Biochemical pharmacology. – 2017. – Vol. 133. – P. 117–138.
43. Agier, J. Cathelicidins and defensins regulate mast cell antimicrobial activity / J. Agier, E. Brzezińska-Błaszczyk. – DOI 10.5604/17322693.1205357 // Postępy higieny i medycyny doświadczalnej. – 2016. – Vol. 70. – P. 618–636.
44. Ahmed, A. Human antimicrobial peptides as therapeutics for viral infections / A. Ahmed, G. Siman-Tov, G. Hall [et al.] – DOI 10.3390/v11080704 // Viruses. – 2019. – Vol. 11 (8). – Art. 704.
45. Akef, H. M. Anticancer and antimicrobial activities of scorpion venoms and their peptides / H. M. Akef. – DOI 10.1080/15569543.2017.1414847 // Toxin reviews. – 2019. – Vol. 38. – P. 41–53.
46. Akıllıoğlu, H. G. Effects of heat treatment and *in vitro* digestion on the angiotensin converting enzyme inhibitory activity of some legume species / H. G. Akıllıoğlu, S. Karakaya. – DOI 10.1007/s00217-009-1133-x // European food research and technology. – 2009. – Vol. 229 (6). – P. 915–921.
47. Ali, H. Furan-conjugated tripeptides as potent antitumor drugs / H. Ali, A. Jabbeen, R. Maharjan [et al.]. – DOI 10.3390/biom10121684 // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, iss. 12. – Art. 1684.
48. Ali, H. Furan-conjugated tripeptides as potent antitumor drugs / H. Ali, A. Jabbeen, R. Maharjan [et al.]. – DOI 10.3390/biom10121684 // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10 (12). – Art. 1684.
49. Aljewicz, M. Comprehensive study of the impacts of oat β -glucan and bacterial curdlan on the activity of commercial starter culture in yogurt / M. Aljewicz, M. Majcher, B. A. Nalepa. – DOI 10.3390/molecules25225411 // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – Art. 5411.

50. Aumpa, P. Determination for a suitable ratio of dried black pepper and cinnamon powder in the development of mixed-spice ice cream / P. Aumpa, A. Khawsud, T. Jannu [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-022-19451-7 // Scientific reports. – 2022. – Vol. 12 (1). – Art. 15121.

51. Babich, O. O. Structure and properties of antimicrobial peptides produced by antagonist microorganisms isolated from Siberian natural objects / O. O. Babich, I. S. Milentyeva, L. S. Dyshlyuk [et al.] // Foods and raw materials. – 2022. – Vol. 10, iss. 1. – P. 27–39.

52. Baek, M. H. Lipopolysaccharide-bound structure of the antimicrobial peptide cecropin P1 determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy / M. H. Baek, M. Kamiya, T. Kushibiki [et al.]. – DOI 10.1002/psc.2865 // Journal of peptide science. – 2016. – Vol. 22 (4). – P. 214–221.

53. Barlow, P. G. Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37 / P. G. Barlow, P. Svoboda, A. Mackellar [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0025333 // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6 (10). – Art. e25333.

54. Barrera-Reyes, P. K. circulating structurally related (–)-epicatechin metabolite species and levels after sustained intake of a cocoa powder high in polyphenols are comparable to those achieved after a single dose / P. K. Barrera-Reyes, J. C.-F de Lara, L. Poquet [et al.]. – DOI 10.3390/nu13113829 // Nutrients. – 2021. – Vol. 13. – Art. 3829.

55. Bashir, K. M. I. Identification and characterization of novel antioxidant peptides from mackerel (*Scomber japonicus*) muscle protein hydrolysates / K. M. I. Bashir, J. H. Sohn, J. S. Kim [et al.]. – DOI 10.1016/j.foodchem.2020.126809 // Food chemistry. – 2020. – Vol. 323. – Art. 126809.

56. Basith, S. Machine intelligence in peptide therapeutics: a next-generation tool for rapid disease screening / S. Basith, B. Manavalan, T. H. Shin, G. Lee. – DOI 10.1002/med.21658 // Medicinal research reviews. – 2020. – Vol. 40 (4). – P. 1276–1314.

57. Bechinger, B. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance / B. Bechinger, S. U. Gorr. – DOI 10.1177/0022034516679973 // Journal of dental research. – 2017 – Vol. 96 (3). – P. 254–260.

58. Bergman, P. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication / P. Bergman, L. Walter-Jallow, K. Broliden [et al.]. – DOI 10.2174/157016207781023947 // Current HIV research. – 2007. – Vol. 5 (4). – P. 410–415.

59. Birkemo, G. A. Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum / G. A. Birkemo, O. O'Sullivan, R. P. Ross, C. Hill. – DOI 10.1111/j.1365-2672.2008.03996.x // Journal of applied microbiology. – 2009. – Vol. 106, iss. 1. – P. 233–240.

60. Blondelle, S. E. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities / S. E. Blondelle, R. A. Houghten. – DOI 10.1021/bi00165a020 // Biochemistry. – 1992. – Vol. 31. – P. 12688–12694.

61. Bockus, A. T. Going out on a limb: delineating the effects of β -branching, *n*-methylation, and side chain size on the passive permeability, solubility, and flexibility of sanguinamide analogues / A. T. Bockus, J. A. Schwochert, C. R. Pye [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jmedchem.5b00919 // Journal of medicinal chemistry. – 2015. – Vol. 58. – P. 7409–7418.

62. Boffert, R. The human alpha-defensin-derived peptide HD5 (1-9) inhibits cellular attachment and entry of human cytomegalovirus / R. Boffert, R. Businger, H. Preiss [et al.]. – DOI 10.1016/j.antiviral.2020.104779 // Antiviral research. – 2020. – Vol. 177. – Art. 104779.

63. Boman, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and new concepts / H. G. Boman // Journal of internal medicine. – 2003. – Vol. 254 (3). – P. 197–215.

64. Bowerman, C. J. Review self-assembly of amphipathic β -sheet peptides: insights and applications / C. J. Bowerman, B. L. Nilsson. – DOI 10.1002/bip.22058 // Peptide science. – 2012. – Vol. 98 (3). – P. 169–184.

65. Bravo, R. K. D. Isolation, purification and characterization of the antibacterial, antihypertensive and antioxidative properties of the bioactive peptides in the purified and proteolyzed major storage protein of pigeon pea (*Cajanus cajan*) seeds / R. K. D. Bravo,

M. R. N. Angelia, L. Y. C. Uy [et al.]. – DOI 10.1016/j.fochms.2021.100062 // Food chemistry: molecular sciences. – 2022. – Vol. 4. – Art. 100062.

66. Burnside, D. *In silico* engineering of synthetic binding proteins from random amino acid sequences burnside / D. Burnside, D. Schoenrock, A. Moteshareie [et al.]. – DOI 10.1016/j.isci.2018.11.038 // iScience. – 2018. – Vol. 11. – P. 375–387.

67. Çam, M. Enrichment of functional properties of ice cream with pomegranate by-products / M. Çam, F. Erdoğan, D. Aslan, M. Dinç. – DOI 10.1111/1750-3841.12258 // Journal of food science. – 2013. – Vol. 78 (10). – P. 1543–1550.

68. Cardoso, M. H. Non-lytic antibacterial peptides that translocate through bacterial membranes to act on intracellular targets / M. H. Cardoso, B. T. Meneguetti, B. O. Costa [et al.]. – DOI 10.3390/ijms20194877 // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20 (19). – Art. 4877.

69. Castañeda-Pérez, E. Enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltered peptide fractions from Cowpea *Vigna unguiculata* L bean with in vitro antidiabetic potential / E. Castañeda-Pérez, K. Jiménez-Morales, C. Quintal-Novelo [et al.]. – DOI 10.1007/s13738-019-01651-0 // Journal of the Iranian chemical society. – 2019. – Vol. 16. – P. 1773–1781.

70. Chandrapati, S. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* / S. Chandrapati, D. J. O'Sullivan. – DOI 10.1016/s0168-1656(98)00090-x // Journal of biotechnology. – 1998. – Vol. 63. – P. 229–233.

71. Chen, X. Non-membrane mechanisms of antimicrobial peptide P7 against *Escherichia coli* / X. Chen, L. Li // Wei Sheng Wu Xue Bao. – 2016. – Vol. 56 (11). – P. 1737–1745.

72. Chew, M. F. Peptides as therapeutic agents for dengue virus / M. F. Chew, K. S. Poh, C. L. Poh. – DOI 10.7150/ijms.21875 // International journal of medical sciences. – 2017. – Vol. 14 (13). – P. 1342–1359.

73. Childers, M. C. Validating molecular dynamics simulations against experimental observables in light of underlying conformational ensembles / M. C. Childers,

V. Daggett. – DOI 10.1021/acs.jpcc.8b02144 // The journal of physical chemistry. – 2018. – Vol. 122. – P. 6673–6689.

74. Chung, P. Y. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria / P. Y. Chung, R. Khanum. – DOI 10.1016/j.jmii.2016.12.005 // The journal of microbiology, immunology and infection. – 2017. – Vol. 50 (4). – P. 405–410.

75. Cipcigan, F. Membrane permeability in cyclic peptides is modulated by core conformations / F. Cipcigan, P. Smith, J. Crain. – DOI 10.1021/acs.jcim.0c00803 // Journal of chemical information and modeling. – 2021. – Vol. 61. – P. 263–269.

76. Clark, S. The lexicon of antimicrobial peptides: a complete set of arginine and tryptophan sequences / S. Clark, A. T. Jowitt, K. L. Harris [et al.]. – DOI 10.1038/s42003-021-02137-7 // Communications biology. – 2021. – Vol. 4. – Art. 605.

77. Cleveland, J. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation / J. Cleveland, T. J. Montville, I. F. Nes [et al.]. – DOI 10.1016/s0168-1605(01)00560-8 // International journal of food microbiology. – 2001. – Vol. 71. – P. 1–20.

78. Conlon, J. M. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs / J. M. Conlon, J. Kolodziejek, N. Nowotny. – DOI 10.1016/j.bbame.2008.09.018 // Biochimica et biophysica acta. – 2009. – Vol. 1788. – P. 1556–1563.

79. Conlon, J. M. Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the naturally occurring frog skin peptides, ascaphin-8 and peptide XT-7 / J. M. Conlon, S. Galadari, H. Raza, E. Condamine – DOI 10.1111/j.1747-0285.2008.00671.x // Chemical biology and drug design. – 2008. – Vol. 72. – P. 58–64.

80. Costa, F. Clinical application of AMPs / F. Costa, C. Teixeira, P. Gomes, M. C. L. Martins. – DOI 10.1007/978-981-13-3588-4_15 // Advances in experimental medicine and biology. – 2019. – Vol. 1117. – P. 281–298.

81. Dabour, N. *In vivo* study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes* / N. Dabour, A. Zihler, E. Kheadr [et al.]. – DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.005 // International journal of food microbiology. – 2009. – Vol. 133. – P. 225–233.

82. Danelius, E. Solution conformations explain the chameleonic behaviour of macrocyclic drugs / E. Danelius, V. Poongavanam, S. Peintner [et al.]. – DOI 10.1002/chem.201905599 // Chemistry: a European journal. – 2020. – Vol. 26. – P. 5231–5244.

83. de Almeida, N. R. Design, synthesis, and nanostructure-dependent antibacterial activity of cationic peptide amphiphiles / N. R. de Almeida, Y. Han, J. Perez [et al.]. – DOI 10.1021/acsami.8b17808 // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2018. – Vol. 11. – Art. 2790.

84. de Groot, A. E. Targeting interleukin 4 receptor alpha on tumor-associated macrophages reduces the pro-tumor macrophage phenotype / A. E. de Groot, K. V. Myers, T. E. G. Krueger [et al.]. – DOI 10.1016/j.neo.2022.100830 // Neoplasia. – 2022. – Vol. 32. – Art. 100830.

85. Deegan, L. H. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension / L. H. Deegan, P. D. Cotter, C. Hill [et al.]. – DOI 10.1016/J.IDAIRYJ.2005.10.026 // International dairy journal. – 2006. – Vol. 16. – P. 1058–1071.

86. Dennison, S. R. Low pH enhances the action of maximin H5 against *Staphylococcus aureus* and helps mediate lysylated phosphatidylglycerol-induced resistance / S. R. Dennison, L. H. Morton, F. Harris [et al.]. – DOI 10.1021/acs.biochem.6b00101 // Biochemistry. – 2016. – Vol. 55 (27). – P. 3735–3751.

87. Di Lauro, L. Role of gonadotropin-releasing hormone analogues in metastatic male breast cancer: results from a pooled analysis / L. Di Lauro, L. Pizzuti, M. Barba [et al.]. – DOI 10.1186/s13045-015-0147-z // Journal of hematology and oncology. – 2015. – Vol. 8. – P. 1–5.

88. Dias, S. A. New potent membrane-targeting antibacterial peptides from viral capsid proteins / S. A. Dias, J. M. Freire, C. Pérez-Peinado [et al.]. – DOI 10.3389/fmicb.2017.00775 // Frontiers in microbiology. – 2017. – Vol. 8. – Art. 775.

89. Ding, J. Optimization of pea protein hydrolysate preparation and purification of antioxidant peptides based on an *in silico* analytical approach / J. Ding, R. Liang, Y. Yang [et al.]. – DOI 10.1016/j.lwt.2020.109126 // LWT – Food science and technology. – 2020. – Vol. 123. – Art. 109126.

90. Dougherty, P. G. Understanding cell penetration of cyclic peptides / P. G. Dougherty, A. Sahni, D. Pei. – DOI 10.1021/acs.chemrev.9b00008 // Chemical reviews. – 2019. – Vol. 119 (17). – P. 10241–10287.

91. Duffuler, P. Bioactive peptides: from basic research to clinical trials and commercialization / P. Duffuler, K. S. Bhullar, S. C. de Campos Zani [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jafc.1c06289 // Journal of agricultural and food chemistry. – 2022. – Vol. 70. – P. 3585–3595.

92. Durmaz, Y. Using spray-dried microalgae in ice cream formulation as a natural colorant: effect on physicochemical and functional properties / Y. Durmaz, M. Kilicli, O. S. Toker [et al.]. – DOI 10.1016/j.algal.2020.101811 // Algal research. – 2020. – Vol. 47. – Art. 101811.

93. Dyer, A. R. *In vitro* and *in vivo* safety studies of a proprietary whey extract / A. R. Dyer, G. A. Burdock, I. G. Carabin [et al.]. – DOI 10.1016/j.fct.2007.12.029 // Food and chemical toxicology. – 2008. – Vol. 46. – P. 1659–1665.

94. Esmaeilpour, M. Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins / M. Esmaeilpour, M. R. Ehsani, M. Aminlari [et al.]. – DOI 10.1007/s00580-016-2237-x // Comparative clinical pathology. – 2016. – Vol. 25. – P. 599–605.

95. Estévez, N. Development and sensory test of a dairy product with ACE inhibitory and antioxidant peptides produced at a pilot plant scale / N. Estévez, C. Fuciños, A. Rodríguez-Sanz [et al.]. – DOI 10.1016/j.foodchem.2022.133459 // Food chemistry. – 2022. – Vol. 394. – Art. 133459.

96. Frazer, A. C. The biological effects of food additives. I. Nisin / A. C. Frazer, M. Sharratt, J. R. Hickman. – DOI 10.1002/jsfa.2740130106 // Journal of the science of food and agriculture. – 1962. – Vol. 13, iss. 1. – P. 32–42.

97. Fuchs, J. A. Lipophilicity prediction of peptides and peptide derivatives by consensus machine learning / J. A. Fuchs, F. Grisoni, M. Kossenjans Sanz [et al.]. – DOI 10.1039/c8md00370j // Medicinal chemistry communication. – 2018. – Vol. 9. – P. 1538–1546.

98. Gao, R. Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: developments and challenges / R. Gao, Q. Yu, Y. Shen. – DOI 10.1016/j.tifs.2021.02.031 // Trends in food science and technology. – 2021. – Vol. 110. – P. 687–699.

99. Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology resource: enriching a Gold mine / Gene Ontology Consortium. – DOI 10.1093/nar/gkaa1113 // Nucleic acids research. – 2021. – Vol. 49. – P. 325–334.

100. Goetze, J. P. Cardiac natriuretic peptides / J. P. Goetze, B. G. Bruneau, H. R. Ramos [et al.]. – DOI 10.1038/s41569-020-0381-0 // Nature reviews cardiology. – 2020. – Vol. 17. – P. 698–717.

101. Goraya, R. K. Enhancing the functional properties and nutritional quality of ice cream with processed amla (Indian gooseberry) / R. K. Goraya, U. Bajwa. – DOI 10.1007/s13197-015-1877-1 // Journal of food science and technology. – 2015. – Vol. 52 (12). – P. 7861–7871.

102. Goto, Y. The rapid platform for the discovery of pseudo-natural macrocyclic peptides / Y. Goto, H. A. Suga. – DOI 10.1021/acs.accounts.1c00391 // Accounts of chemical research. – 2021. – Vol. 54. – P. 3604–3617.

103. Goyon, A. Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 μm particles for the analysis of biopharmaceutical proteins / A. Goyon, A. Beck, O. Colas [et al.]. – DOI 10.1016/j.chroma.2016.11.056 // Journal of chromatography A. – 2017. – Vol. 1498. – P. 80–89.

104. Grant, W. B. Evidence that vitamin D supplementation could reduce risk of influenza and COVID-19 infections and deaths / W. B. Grant, H. Lahore, S. L. McDonnell [et al.]. – DOI 10.3390/nu12040988 // Nutrients. – 2020. – Vol. 12 (4). – Art. 988.

105. Groisman, E. A. How bacteria resist killing by host-defense peptides / E. A. Groisman. – DOI 10.1016/0966-842x(94)90802-8 // Trends in microbiology. – 1994. – Vol. 2 (11). – P. 444–449.

106. Gudlur, S. Peptide nanovesicles formed by the self-assembly of branched amphiphilic peptides / S. Gudlur, P. Sukthankar, J. Gao [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0045374 // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – Art. e45374.

107. Guha, S. A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species / S. Guha, H. Sharma, G. K. Deshwal. – DOI 10.1186/s43014-020-00045-7 // Food production, processing and nutrition. – 2021. – Vol. 3 (2). – Art. 2.

108. Gupta, S. M. Evaluation of developmental toxicity of microbicide nisin in rats / S. M. Gupta, C. C. Aranha, K. V. Reddy. – DOI 10.1016/j.fct.2007.09.006 // Food and chemical toxicology. – 2008. – Vol. 46. – P. 598–603.

109. Hafeez, Z. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products / Z. Hafeez, C. Cakir-Kiefer, E. Roux [et al.]. – DOI 10.1016/j.foodres.2014.06.002 // Food research international. – 2014. – Vol. 63. – P. 71–80.

110. Hagiwara, A. A 90-day oral toxicity study of nisin A, an anti-microbial peptide derived from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, in F344 rats / A. Hagiwara, N. Imai, H. Nakashima [et al.]. – DOI 10.1016/j.fct.2010.06.002 // Food and chemical toxicology. – 2010. – Vol. 48. – P. 2421–2428.

111. Hale, J. D. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria / J. D. Hale, R. E. Hancock. – DOI 10.1586/14787210.5.6.951 // Expert review of anti-infective therapy. – 2007. – Vol. 5 (6). – P. 951–959.

112. Han, Y. Deep convolutional neural networks for pan-specific peptide-MHC class I binding prediction / Y. Han, D. Kim. – DOI 10.1186/s12859-017-1997-x // BMC Bioinformatics. – 2017. – Vol. 18 (1). – P. 585.

113. Hancock, R. E. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics / R. E. Hancock, A. Patrzykat. – DOI 10.2174/1568005024605855 // Current drug targets. Infectious disorders. – 2002. – Vol. 2 (1). – P. 79–83.

114. Hancock, R. E. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity / R. E. Hancock, E. F. Haney, E. E. Gill. – DOI 10.1038 / nri.2016.29 // Nature reviews immunology. – 2016. – Vol. 16 (5). – P. 321–334.

115. Hayes, M. Food proteins and bioactive peptides: new and novel sources, characterisation strategies and applications / M. Hayes. – DOI 10.3390/foods7030038 // Foods. – 2018. – Vol. 7 (3). – P. 38.

116. He, R. Peptide conjugates with small molecules designed to enhance efficacy and safety / R. He, B. Finan, J. P. Mayer [et al.]. – DOI 10.3390/molecules24101855 // Molecules. – 2019. – Vol. 24 (10). – Art. 1855.

117. Hofland, L. J. Somatostatin receptors and disease: role of receptor subtypes / L. J. Hofland, S. W. Lamberts. – DOI 10.1016/s0950-351x(96)80362-4 // Baillière's clinical endocrinology and metabolism. – 1996. – Vol. 10. – P. 163–176.

118. Hojo, K. Development of a method for environmentally friendly chemical peptide synthesis in water using water-dispersible amino acid nanoparticles / K. Hojo, A. Hara, H. Kitai [et al.]. – DOI 10.1186/1752-153X-5-49 // Chemistry central journal. – 2011. – Vol. 5. – Art. 49.

119. Hoover, D. G. Bacteriocins of lactic acid bacteria / D. G. Hoover, L R. Steenson. – San Diego : Academic Press, 1993. – 275 p.

120. Hosono, Y. Amide-to-ester substitution as a stable alternative to *N*-methylation for increasing membrane permeability in cyclic peptides / Y. Hosono, S. Uchida, M. Shinkai [et al.]. – DOI 10.1038/s41467-023-36978-z // Nature communications. – 2023. – Vol. 14 (1). – Art. 1416.

121. Howell, M. D. Cathelicidin deficiency predisposes to eczema herpeticum / M. D. Howell, A. Wollenberg, R. L. Gallo [et al.]. – DOI 10.1016/j.jaci.2005.12.1345 // The journal of allergy and clinical immunology. – 2006. – Vol. 117 (4). – P. 836–841.

122. Howell, M. D. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum / M. D. Howell, J. F. Jones, K. O. Kisich [et al.]. – DOI 10.4049/jimmunol.172.3.1763 // The journal of immunology. – 2004. – Vol. 172 (3). – P. 1763–1767.

123. Howes, M.-J. R. The role of phytochemicals as micronutrients in health and disease / M.-J. R. Howes, M. S. J. Simmonds. – DOI 10.1097/MCO.0000000000000115 // Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. – 2014. – Vol. 17. – P. 558–566.

124. Huang, M. H. High-level expression and activity determination of hypoglycemic peptide aglycin / M. H. Huang, J. L. Lin, M. Wang [et al.] // Modern food science and technology. – 2020. – Vol. 36. – P. 143–149.

125. Huang, Y.-B. Role of helicity on the anticancer mechanism of action of cationic-helical peptides / Y.-B. Huang, L.-Y. He, H.-Y. Jiang, Y.-X. Chen. – DOI 10.3390/ijms13066849 // The international journal of molecular sciences. – 2012. – Vol. 13 (6). – P. 6849–6862.

126. Hubler, S. L. Periodic patterns in distributions of peptide masses / S. L. Hubler, G. Craciun // BioSystems. – 2012. – Vol. 109, iss. 2. – P. 179–185.

127. Hwang, J. S. Impact of processing on stability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from tuna cooking juice / J. S. Hwang. – DOI 10.1016/j.foodres.2009.12.012 // Food research international. – 2010. – Vol. 43 (3). – P. 902–906.

128. Ianevski, A. Seven classes of antiviral agents / A. Ianevski, A. Shahzaib, A. Kraipit [et al.]. – DOI 10.1007/s00018-022-04635-1 // Cellular and molecular life sciences. – 2022. – Vol. 79 (12). – Art. 605.

129. Ibrahim, H. R. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action / H. R. Ibrahim, U. Thomas, A. Pellegrini. – DOI 10.1074/jbc.M106317200 // Journal of biological chemistry. – 2001. – Vol. 276 (47). – P. 43767–43774.

130. Iikuni, N. Potential for anti-DNA immunoglobulin peptide therapy in systemic lupus erythematosus / N. Iikuni, B. H. Hahn, A. la Cava. – DOI 10.1517/14712590802681636 // Expert opinion on biological therapy. – 2009. – Vol. 9. – P. 201–206.

131. Ishnava, K. B. Antibacterial and phytochemical studies on *Calotropis gigantea* (L.) R. Br. Latex against selected cariogenic bacteria / K. B. Ishnava, J. B. Chauhan, A. A. Garg [et al.]. – DOI 10.1016/j.sjbs.2011.10.002 // Saudi journal of biological sciences. – 2012. – Vol. 19 (1). – P. 87–91.

132. Jakubczyk, A. Current trends of bioactive peptides-new sources and therapeutic effect / A. Jakubczyk, M. Karas, K. Rybczynska-Tkaczyk [et al.]. – DOI 10.3390/foods9070846 // Foods. – 2020. – Vol. 9 (7). – Art. 846.

133. Jakubczyk, A. Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds / A. Jakubczyk, M. Karas, U. Zlotek [et al.]. – DOI 10.1016/j.foodres.2017.07.046 // Food research international. – 2017. – Vol. 100. – P. 489–496.

134. Jang, A. Storage stability of the synthetic angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides separated from beef sarcoplasmic protein extracts at different pH, temperature, and gastric digestion / A. Jang, C. Jo, M. Lee // Food science and biotechnology. – 2007. – Vol. 16 (4). – P. 572–575.

135. Jendrusch, M. AlphaDesign: a *de novo* protein design framework based on AlphaFold / M. Jendrusch, J. O. Korbel, S. K. Sadiq. – DOI 10.1101/2021.10.11.463937 // bioRxiv. – 2021. – URL: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5770456> (дата обращения: 27.02.2024).

136. Jensen, K. K. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules / K. K. Jensen, M. Andreatta, P. Marcatili [et al.]. – DOI 10.1111/imm.12889 // Immunology. – 2018. – Vol. 154 (3). – P. 394–406.

137. Jin, G. Human antimicrobial peptides and cancer / G. Jin, A. Weinberg. – DOI 10.1016/j.semcdb.2018.04.006 // Seminars in cell and developmental biology. – 2019. – Vol. 88. – P. 156–162.

138. Jirillo, E. Editorial: antimicrobial peptides as mediators of innate immunity / E. Jirillo, T. Magrone. – DOI 10.2174/1381612824666180416113811 // Current pharmaceutical design. – 2018. – Vol. 24 (10). – P. 1041–1042.

139. Jozala, A. F. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost / A. F. Jozala, M. S. Andrade, L. J. Arauz [et al.]. – DOI 10.1007/s12010-007-9076-9 // Applied biochemistry and biotechnology. – 2007. – Vol. 136. – P. 515–528.

140. Kamech, N. Improving the selectivity of antimicrobial peptides from anuran skin / N. Kamech, D. Vukicevic, A. Ladram [et al.]. – DOI 10.1021/ci300328y // Journal of chemical information and modeling. – 2012. – Vol. 52. – P. 3341–3351.

141. Kang, H. K. Antimicrobial and immunomodulatory properties and applications of marine-derived proteins and peptides / H. K. Kang, H. H. Lee, C. H. Seo [et al.]. – DOI 10.3390/md17060350 // Marine drugs. – 2019. – Vol. 17 (6). – Art. 350.

142. Kang, H. K. Pse-T2, an antimicrobial peptide with high-level, broad-spectrum antimicrobial potency and skin biocompatibility against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection / H. K. Kang, C. H. Seo, T. Luchian [et al.]. – DOI 10.1128/AAC.01493–18 // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2018. – Vol. 62 (12). – P. e01493–e1518.

143. Kang, H. K. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review / H. K. Kang, C. Kim, C. H. Seo [et al.]. – DOI 10.1007/s12275-017-6452-1 // The journal of microbiology. – 2017. – Vol. 55 (1). – P. 1–12.

144. Karaca, O. B. The functional, rheological and sensory characteristics of ice creams with various fat replacers / O. B. Karaca, M. Güven, K. Yasar [et al.]. – DOI 10.1111/j.1471-0307.2008.00456.x // International journal of dairy technology. – 2009. – Vol. 62 (1). – P. 93–99.

145. Karami, Z. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties / Z. Karami, B. Akbari-Adergani. – DOI 10.1007/s13197-018-3549-4 // Journal of food science and technology. – 2019. – Vol. 56. – P. 535–547.

146. Kawo, A. Phytochemical properties and antibacterial activities of the leaf and latex extracts of *Calotropis procera* (ait. f.) Ait.f. / A. Kawo, A. Mustapha, B. Abdullahi [et al.]. – DOI 10.4314/bajopas.v2i1.58453 // Bayero journal of pure and applied sciences. – 2009. – Vol. 2 (1). – URL: <https://www.ajol.info/index.php/bajopas/article/view/58453> (дата обращения: 27.02.2024).

147. Kazmirchuk, T. D. D. Peptides of a feather: how computation is taking peptide therapeutics under its wing / T. D. D. Kazmirchuk, C. Bradbury-Jost, T. A. Withey [et al.]. – DOI 10.3390/genes14061194 // Genes. – 2023. – Vol. 14 (6). – Art. 1194.

148. Kim, J. Recombinant protein mimicking the antigenic structure of the viral surface envelope protein reinforces the induction of an antigen-specific and virus-neutralizing immune response against the dengue virus / J. Kim, T. Y. Lim, J. Park [et al.]. – DOI 10.1007/s12275-023-00021-z // The journal of microbiology. – 2022. – Vol. 61. – P. 131–143.
149. Kim, J. S. Design, characterization, and antimicrobial activity of a novel antimicrobial peptide derived from bovine lactophorin / J. S. Kim, J. H. Jeong, Y. Kim. – DOI 10.4014/jmb.1609.09004 // Journal of microbiology and biotechnology. – 2017. – Vol. 27. – P. 759–767.
150. King, N. P. Computational design of self-assembling protein nanomaterial with atomic level accuracy / N. P. King, W. Sheffler, M. R. Sawaya [et al.]. – DOI 10.1126/science.1219364 // Science. – 2012. – Vol. 336. – P. 1171–1174.
151. Kobayakawa, T. Low-molecular-weight anti-HIV-1 agents targeting HIV-1 capsid proteins / T. Kobayakawa, M. Yokoyama, K. Tsuji [et al.]. – DOI 10.1039/d2ra06837k // RSC Advances. – 2023. – Vol. 13. – P. 2156–2167.
152. Kong, X. N. Design, synthesis and antitumor activity of Ascaphin-8 derived stapled peptides based on halogen-sulfhydryl click chemical reactions / X. Kong, N. Zhang, H. Shen [et al.]. – DOI 10.1039/d3ra02743k // RSC Advances. – 2023. – Vol. 13. – P. 19862–19868.
153. Kowalczyk, M. Sheep milk symbiotic ice cream: effect of inulin and apple fiber on the survival of five probiotic bacterial strains during simulated *in vitro* digestion conditions / M. Kowalczyk, A. Znamiorska-Piotrowska, M. Buniowska-Olejniak [et al.]. – DOI 10.3390/nu14214454 // Nutrients. – 2022. – Vol. 14. – Art. 4454.
154. Kragol, G. The antibacterial peptide pyrrhocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding / G. Kragol, S. Lovas, G. Varadi [et al.]. – DOI 10.1021/bi002656a // Biochemistry. – 2001. – Vol. 40 (10). – P. 3016–3026.
155. Kruger, C. L. Safety evaluation of a milk basic protein fraction / C. L. Kruger, K. M. Marano, Y. Morita [et al.]. – DOI 10.1016/j.fct.2007.01.017 // Food and chemical toxicology. – 2007. – Vol. 45. – P. 1301–1307.

156. Kumar, P. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo* / P. Kumar, J. N. Kizhakkedathu, S. K. Straus. – DOI 10.3390/biom8010004 // Biomolecules. –2018. – Vol. 8 (1). – Art. 4.
157. Kumar, P. Perspective of membrane technology in dairy industry: a review / P. Kumar, N. Sharma, R. Ranjan [et al.]. – DOI 10.5713/ajas.2013.13082 // Asian-Australas journal of animal science. – 2013. – Vol. 26. – P. 1347–1358.
158. Kuroda, K. Antimicrobial peptide FF/CAP18 induces apoptotic cell death in HCT116 colon cancer cells via changes in the metabolic profile / K. Kuroda, T. Fukuda H. Isogai [et al.]. – DOI 10.3892/ijo.2015.2887 // International journal of oncology. – 2015. – Vol. 46 (4). – P. 1516–1526.
159. Kurpe, S. R. Antimicrobial and amyloidogenic activity of peptides. Can antimicrobial peptides be used against SARS-CoV-2? / S. R. Kurpe, S. Y. Grishin, A. K. Surin [et al.]. – DOI 10.3390/ijms21249552 // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21 (24). – Art. 9552.
160. Laszuk, P. The effect of selected flavonoids and lipoic acid on natural and model cell membranes: langmuir and microelectrophoretic methods / P. Laszuk, W. Urbaniak, A. D. Petelska. – DOI 10.3390/molecules28031013 // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – Art. 1013.
161. Lee, D. Interplay among conformation, intramolecular hydrogen bonds, and chameleonicity in the membrane permeability and cyclophilin a binding of macrocyclic peptide cyclosporin O derivatives / D. Lee, S. Lee, J. Choi [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jmedchem.1c00211 // Journal of medicinal chemistry. – 2021. – Vol. 64. – P. 8272–8286.
162. Lee, G. H. Ultrasmall lanthanide oxide nanoparticles for biomedical imaging and therapy / G. H. Lee, Y. Chang, T.-J. Kim. – Amsterdam : Elsevier, 2014. – 208 p.
163. Lee, T. H. Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure / T. H. Lee, K. N. Hall, M. I. Aguilar. – DOI 10.2174/1568026615666150703121700 // Current topics in medicinal chemistry. – 2016. – Vol. 16 (1). – P. 25–39.

164. Lei, J. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications / J. Lei, L. Sun, S. Huang [et al.] // American journal of translational research. – 2019. – Vol. 11 (7). – P. 3919–3931.
165. Lenci, E. Peptidomimetic toolbox for drug discovery / E. Lenci, A. Trabocchi. – DOI 10.1039/d0cs00102c // Chemical society reviews. – 2020. – Vol. 49 (11). – P. 3262–3277.
166. Levy, S. dCas9 fusion to computer-designed PRC2 inhibitor reveals functional TATA box in distal promotor region / S. Levy, L. Somasundaram, I. X. Raj [et al.]. – DOI 10.1016/j.celrep.2022.110457 // Cell reports. – 2022. – Vol. 38. – Art. 110457.
167. Lewies, A. The potential use of natural and structural analogues of antimicrobial peptides in the fight against neglected tropical diseases / A. Lewies, J. F. Wentzel, G. Jacobs [et al.]. – DOI 10.3390/molecules200815392 // Molecules. – 2015. – Vol. 20 (8). – P. 15392–15433.
168. Li, G. Bioinformatics and computer simulation approaches to the discovery and analysis of bioactive peptides / G. Li, Z. Shuli, L. Linlin [et al.]. – DOI 10.2174/1389201023666220106161016 // Current pharmaceutical biotechnology. – 2022. – Vol. 23. – P. 1541–1555.
169. Li, J. Plasma protein binding prediction focusin gonresidue level features and circularity of cyclic peptides by deeplearning. / J. Li, K. Yanagisawa, Y. Yoshikawa [et al.]. – DOI 10.1093/bioinformatics/btab726 // Bioinformatics. – 2022. – Vol. 38. – P. 1110–1117.
170. Li, S. A novel short anionic antibacterial peptide isolated from the skin of *Xenopus laevis* with broad antibacterial activity and inhibitory activity against breast cancer cell / S. Li, L. Hao, W. Bao [et al.]. – DOI 10.1007/s00203-016-1206-8 // Archives of microbiology. – 2016. – Vol. 198 (5). – P. 473–482.
171. Liang, X. Antiviral effects of Bovine antimicrobial peptide against TGEV *in vivo* and *in vitro* / X. Liang, X. Zhang, K. Lian [et al.]. – DOI 10.4142/jvs.2020.21.e80 // The journal of veterinary science. – 2020. – Vol. 21 (5). – Art. e80.
172. Lishko, V. K. Identification of human cathelicidin peptide LL-37 as a ligand for macrophage integrin $\alpha M\beta 2$ (Mac-1, CD11b/CD18) that promotes phagocytosis by

opsonizing bacteria / V. K. Lishko, B. Moreno, N. P. Podolnikova [et al.]. – DOI 10.2147/RRBC.S107070 // Research and reports in biochemistry. – 2016. – Vol. 6. – P. 39–55.

173. López-Fandino, R. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity / R. López-Fandino, J. Otte, J. van Camp. – DOI 10.1016/j.idairyj.2006.06.004 // International dairy journal. – 2006. – Vol. 16 (11). – P. 1277–1293.

174. López-Martínez, M. I. Development of functional ice cream with egg white hydrolysates / M. I. López-Martínez, S. Moreno-Fernández, M. Miguel. – DOI 10.1016/j.ijgfs.2021.100334 // International journal of gastronomy and food science. – 2021. – Vol. 25. – Art. 100334.

175. Lou, S. Peptide tectonics: encoded structural complementarity dictates programmable self-assembly / S. Lou, X. Wang, Z. Yu [et al.]. – DOI 10.1002/advs.201802043 // Advanced science. – 2019. – Vol. 6. – Art. 1802043.

176. Lu, Y.-S. Ovarian function suppression with luteinizing hormone-releasing hormone agonists for the treatment of hormone receptor-positive early breast cancer in premenopausal women / Y.-S. Lu, A. Wong, H.-J. Kim. – DOI 10.3389/fonc.2021.700722 // Frontiers in oncology. – 2021. – Vol. 11. – Art. 700722.

177. Mack, M. R. Superficial immunity: antimicrobial responses are more than skin deep / M. R. Mack, B. S. Kim. – DOI 10.1016/j.immuni.2016.07.001 // Immunity. – 2016. – Vol. 45 (1). – P. 6–8.

178. Mada, S. B. Health promoting effects of food-derived bioactive peptides: a review / S. B. Mada, C. P. Ugwu, M. M. Abarshi. – DOI 10.1007/s10989-019-09890-8 // International journal of peptide research and therapeutics. – 2020. – Vol. 26. – P. 831–848.

179. Mahlapuu, M. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents / M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad [et al.]. – DOI 10.3389/fcimb.2016.00194 // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2016. – Vol. 6. – P. 194.

180. Malanovic, N. Gram-positive bacterial cell envelopes: the impact on the activity of antimicrobial peptides / N. Malanovic, K. Lohner. – DOI 10.1016/j.bbamem.2015.11.004 // *Biochimica et biophysica acta*. – 2016. – Vol. 1858 (5). – P. 936–946.

181. Manavalan, B. MLACP: machine-learning-based prediction of anticancer peptides / B. Manavalan, S. Basith, T. H. Shin [et al.]. – DOI 10.18632/oncotarget.20365 // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – Art. 77121.

182. Marcillo-Parra, V. Encapsulation of bioactive compounds from fruit and vegetable by-products for food application – a review / V. Marcillo-Parra, D. S. Tupuna-Yerovi, Z. González [et al.]. – DOI 10.1016/j.tifs.2021.07.009 // *Trends in food science and technology*. – 2021. – Vol. 116. – P. 11–23.

183. Maurotti, S. Effects of a functional ice cream enriched with milk proteins on bone metabolism: a feasibility clinical study and *in vitro* investigation / S. Maurotti, Y. Ferro, R. Pujia [et al.]. – DOI 10.3390/nu15020344 // *Nutrients*. – 2023. – Vol. 15. – Art. 344.

184. McGovern, D. P. Task-specific transfer of perceptual learning across sensory modalities / D. P. McGovern, A. T. Astle, S. L. Clavin [et al.]. – DOI 10.1016/j.cub.2015.11.048 // *Current biology*. – 2016. – Vol. 26. – P. 20–21.

185. Mendonça, G. M. N. Vegan ice cream made from soy extract, soy kefir and jaboticaba peel: antioxidant capacity and sensory profile / G. M. N. Mendonça, E. M. D. Oliveira, A. O. Rios [et al.]. – DOI 10.3390/foods11193148 // *Foods*. – 2022. – Vol. 11. – Art. 3148.

186. Millington, P. F. Studies of the effects of aminopterin on the small intestine of rats: I. The morphological changes following a single dose of aminopterin / P. F. Millington, J. B. Finean, O. C. Forbes [et al.]. – DOI 10.1016/0014-4827(62)90326-9 // *Experimental cell research*. – 1962. – Vol. 28 (1). – P. 162–178.

187. Minkiewicz, P. Common amino acid subsequences in a universal proteome – relevance for food science / P. Minkiewicz, M. Darewicz, A. Iwaniak [et al.]. – DOI 10.3390/ijms160920748 // *International journal of molecular sciences*. – 2015. – Vol. 16 (9). – P. 20748–20773.

188. Mohammed, I. Human antimicrobial peptides in ocular surface defense / I. Mohammed, D. G. Said, H. S. Dua. – DOI 10.1016/j.preteyeres.2017.03.004 // Progress in retinal and eye research. – 2017. – Vol. 61. – P. 1–22.

189. Mojica, L. Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress / L. Mojica, D. A. Luna-Vital, E. Gonzalez de Mejia. – DOI 10.1002/jsfa.8053 // Journal of the science of food and agriculture. – 2017. – Vol. 97. – P. 2401–2410.

190. Mojica, L. Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after pepsin-pancreatin hydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl peptidase-IV / L. Mojica, K. Chen, E. G. de Mejia. – DOI 10.1111/1750-3841.12726 // Journal of food science. – 2015. – Vol. 80. – P. 188–198.

191. Mollica, A. Arginine- and lysine-rich peptides: synthesis, characterization and antimicrobial activity / A. Mollica, G. Macedonio, A. Stefanucci [et al.]. – DOI 10.2174/1570180814666170213161341 // Letters in drug design and discovery. – 2018. – Vol. 15. – P. 220–226.

192. Monteiro, J. P. The genomics of micronutrient requirements / J. P. Monteiro, M. Kussmann, J. Kaput. – DOI 10.1007/s12263-015-0466-2 // Genes and nutrition. – 2015. – Vol. 10. – Art. 19.

193. Mookherjee, N. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential / N. Mookherjee, M. A. Anderson, H. P. Haagsman [et al.]. – DOI 10.1038/s41573-019-0058-8 // Nature reviews drug discovery. – 2020. – Vol. 19 (5). – P. 311–332.

194. Morais, H. A. Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate: effect of enzyme type and enzyme:substrate ratio on peptide profile / H. A. Morais, M. P. C. Silvestre, M. R. Silva [et al.]. – DOI 10.1007/s13197-013-1005-z // Journal of food science and technology. – 2015. – Vol. 52. – P. 201–210.

195. Moreno-Valdespino, C. A. Bioactive proteins and phytochemicals from legumes: mechanisms of action preventing obesity and type-2 diabetes / C. A. Moreno-Valdespino, D. Luna-Vital, R. M. Camacho-Ruiz [et al.]. – DOI 10.1016/j.foodres.2019.108905 // Food research international. – 2020. – Vol. 130. – Art. 108905.

196. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann. – DOI 10.1016/0022-1759(83)90303-4 // Journal of immunological methods. – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63.
197. Mota-Meira, M. *In vivo* activity of mutacin B-Ny266 / M. Mota-Meira, H. Morency, M. C. Lavoie. – DOI 10.1093/jac/dki295 // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2005. – Vol. 56. – P. 869–871.
198. Motta, A. S. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon Basin / A. S. Motta, D. M. Lorenzini, A. Brandelli. – DOI 10.1007/s00284-006-0414-x // Current microbiology. – 2007. – Vol. 54. – P. 282–286.
199. Mourtada, R. Design of stapled antimicrobial peptides that are stable, non-toxic and kill antibiotic-resistant bacteria in mice / R. Mourtada, H. D. Herce, D. J. Yin [et al.]. – DOI 10.1038/s41587-019-0222-z // Nature biotechnology. – 2019. – Vol. 37. – P. 1186–1197.
200. Mudgil, P. Identification and molecular docking study of novel cholesterol esterase inhibitory peptides from camel milk proteins / P. Mudgil, B. Baby, Y. Y. Ngoh [et al.]. – DOI 10.3168/jds.2019-16520 // Journal of dairy science. – 2019. – Vol. 102. – P. 10748–10759.
201. Mukherjee, P. K. Bioassay-guided isolation and evaluation of herbal drugs / P. K. Mukherjee. – DOI 10.1016/B978-0-12-813374-3.00013-2 // Quality control and evaluation of herbal drugs. – Amsterdam : Elsevier, 2019. – P. 515–537.
202. Mune Mune, M. A. Investigation on antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of Bambara bean protein hydrolysates / M. A. Mune Mune, S. R. Minka, T. Henle. – DOI 10.1016/j.foodchem.2018.01.001 // Food chemistry. – 2018. – Vol. 250. – P. 162–169.
203. Muñoz, E. B. Gamma-conglutin peptides from Andean lupin legume (*Lupinus mutabilis* Sweet) enhanced glucose uptake and reduced gluconeogenesis *in vitro* / E. B. Muñoz, D. A. Luna-Vital, M. Fornasini [et al.]. – DOI 10.1016/j.jff.2018.04.021 // Journal of functional foods. – 2018. – Vol. 45. – P. 339–347.

204. Mwangi, J. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance / J. Mwangi, X. Hao, R. Lai [et al.]. – DOI 10.24272/j.issn.2095-8137.2019.062 // Zoological research. – 2019. – Vol. 40 (6). – P. 488–505.

205. Mykhalevych, A. Functional and technological properties of oat beta-glucan in acidophilic whey ice cream / A. Mykhalevych, V. Sapiga, G. Polischuk [et al.] // Food and environment safety. – 2022. – Vol. 21. – P. 116–128.

206. Mykhalevych, A. β -Glucan as a techno-functional ingredient in dairy and milk-based products – a review / A. Mykhalevych, G. Polishchuk, K. Nassar [et al.]. – DOI 10.3390/molecules27196313 // Molecules. – 2022. – Vol. 27. – Art. 6313.

207. Nagaoka, I. Therapeutic potential of cathelicidin peptide LL-37, an antimicrobial agent, in a murine sepsis model / I. Nagaoka, H. Tamura, J. Reich. – DOI 10.3390/ijms21175973 // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21 (17). – Art. 5973.

208. Nakagawa, H. Roles of natriuretic peptides and the significance of neprilysin in cardiovascular diseases / H. Nakagawa, Y. Saito. – DOI 10.3390/biology11071017 // Biology. – 2022. – Vol. 11, iss. 7. – Art. 1017.

209. Nascimento, E. Ice cream with functional potential added grape agro-industrial waste / E. Nascimento, E. de A. Melo, V. L. A. G. Lima. – DOI 10.1080/15428052.2017.1363107 // Journal of culinary science and technology. – 2018. – Vol. 16 (3). – P. 1–21.

210. Neumann, A. Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases / A. Neumann, L. Vollger, E. T. Berends [et al.]. – DOI 10.1159/000363699 // Journal of innate immunity. – 2014. – Vol. 6 (6). – P. 860–868.

211. Niemirowicz, K. Magnetic nanoparticles enhance the anticancer activity of cathelicidin LL-37 peptide against colon cancer cells / K. Niemirowicz, I. Prokop, A. Z. Wilczewska [et al.]. – DOI 10.2147/IJN.S76104 // International journal of nanomedicine. – 2015. – Vol. 10. – P. 3843–3853.

212. Nikoo, M. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin / M. Nikoo, S. Benjakul, A. Ehsani [et al.]. – DOI 10.1016/j.jff.2013.12.024 // Journal of functional foods. – 2014. – Vol. 7. – P. 609–620.
213. Ochoa, R. PARCE: protocol for amino acid refinement through computational evolution / R. Ochoa, M. Soler, A. Laio [et al.]. – DOI 10.1016/j.cpc.2020.107716 // Computer physics communications. – 2021. – Vol. 260. – Art. 107716.
214. Ochoa, R. Protocol for iterative optimization of modified peptides bound to protein targets / R. Ochoa, P. Cossio, T. Fox. – DOI 10.1007/s10822-022-00482-1 // Journal of computer-aided molecular design. – 2022. – Vol. 36. – P. 825–835.
215. Park, J. S. Isoform-specific inhibition of FGFR signalling achieved by B de-novo-designed mini protein / J. S. Park, J. Choi, L. Cao [et al.]. – DOI 10.1016/j.celrep.2022.111545 // Cell reports. – 2022. – Vol. 41. – P. 111545.
216. Paul, V. A. Development of functional ice cream using basil oil microcapsules / V. A. Paul, D. C. Rai, S. Pandhi [et al.]. – DOI 10.33785/ijds.2020.v73i06.005 // Indian journal of dairy science. – 2020. – Vol. 73 (6). – P. 542–548.
217. Pearce, R. *De novo* protein fold design through sequence-independent fragment assembly simulations / R. Pearce, X. Huang, G.S. Omenn [et al.]. – DOI 10.1073/pnas.2208275120 // Proceedings of the National academy of sciences. – 2023. – Vol. 120. – Art. e2208275120.
218. Perez-Cordero, J. J. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells / J. J. Perez-Cordero, J. M. Lozano, J. Cortés [et al.]. – DOI 10.1016/j.peptides.2011.01.011 // Peptides. – 2011. – Vol. 32. – P. 683–690.
219. Pfalzgraff, A. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds / A. Pfalzgraff, K. Brandenburg, G. Weindl. – DOI 10.3389/fphar.2018.00281 // Frontiers in pharmacology. – 2018. – Vol. 9. – Art. 281.
220. Piktel, E. The role of cathelicidin LL-37 in cancer development / E. Piktel, K. Niemirowicz, U. Wnorowska [et al.]. – DOI 10.1007/s00005-015-0359-5 // Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. – 2016. – Vol. 64 (1). – P. 33–46.

221. Polonini, H. Characterization and safety profile of transfer factors peptides, a nutritional supplement for immune system regulation / H. Polonini, A. E. d. S. S. Gonçalves, E. Dijkers [et al.]. – DOI 10.3390/biom11050665 // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11. – Art. 665.

222. Poole, C. F. Applications of the solvation parameter model in reversed-phase liquid chromatography / C. F. Poole, N. Lenca. – DOI 10.1016/j.chroma.2016.05.099 // Journal of chromatography A. – 2017. – Vol. 1486. – P. 2–19.

223. Qian, Z. J. Antihypertensive effect of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw) muscle protein in spontaneously hypertensive rats / Z. J. Qian, W. K. Jung, S. H. Lee [et al.]. – DOI 10.1016/j.procbio.2007.05.013 // Process biochemistry. – 2007. – Vol. 42 (10). – P. 1443–1448.

224. Qui, Y. Persistent spectral theory-guided protein engineering / Y. Qui, G. Wei. – DOI 10.1101/2022.12.18.520933 // Nature computational science. – 2023. – Vol. 3. – P. 149–163.

225. Rahimi, M. ACE-inhibitory and radical scavenging activities of bioactive peptides obtained from camel milk casein hydrolysis with proteinase K / M. Rahimi, S. M. Ghafari, M. Salami [et al.]. – DOI 10.1007/s13594-016-0283-4 // Dairy science and technology. – 2016. – Vol. 96. – P. 489–499.

226. Rajagopal, M. Envelope structures of gram-positive bacteria / M. Rajagopal, S. Walker. – DOI 10.1007/82_2015_5021 // Current topics in microbiology and immunology. – 2017. – Vol. 404. – P. 1–44.

227. Ren, S. X. Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses colon cancer / S. X. Ren, A. S. Cheng, K. F. To [et al.]. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-12-2359 // Cancer research. – 2012. – Vol. 72 (24). – P. 6512–23.

228. Repetto, G. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity / G. Repetto, A. del Peso, J. L. Zurita. – DOI 10.1038/nprot.2008.75 // Nature protocols. – 2008. – Vol. 3. – P. 1125–1131.

229. Rezaei, R. Potential of β -d-glucan to enhance physicochemical quality of frozen soy yogurt at different aging conditions / R. Rezaei, M. Khomeiri, M. Kashaninejad

[et al.]. – DOI 10.22067/ifstrj.v15i3.69900 // Iranian food science and technology research. – 2019. – Vol. 15. – P. 1–12.

230. Robins, A. Development of synbiotic ice cream from goat milk / A. Robins, K. Radha. – DOI 10.33785/IJDS.2020.v73i02.002 // Indian journal of dairy science. – 2020. – Vol. 73 (2). – P. 111–115.

231. Rodrigues, C. F. Susceptibility of *Candida glabrata* biofilms to echinocandins: alterations in the matrix composition / C. F. Rodrigues, M. E. Rodrigues, M. Henriques. – DOI 10.1080/08927014.2018.1472244 // Biofouling. – 2018. – Vol. 34, iss. 5. – P. 569–578.

232. Rodrigues, C. H. M. CSM-peptides: a computational approach to rapid identification of therapeutic peptides / C. H. M. Rodrigues, A. Garg, D. Keizer [et al.]. – DOI 10.1002/pro.4442 // Protein science. – 2022. – Vol. 31 (10). – Art. e4442.

233. Romero-Molina, S. ProtDCal-Suite: a web server for the numerical codification and functional analysis of proteins / S. Romero-Molina, Y. B. Ruiz-Blanco, J. R. Green [et al.]. – DOI 10.1002/pro.3673 // Protein science. – 2019. – Vol. 28. – P. 1734–1743.

234. Roudi, R. Antimicrobial peptides as biologic and immunotherapeutic agents against cancer: a comprehensive overview / R. Roudi, N. L. Syn, M. Roudbary. – DOI 10.3389/fimmu.2017.01320 // Frontiers in immunology. – 2017. – Vol. 8. – Art. 1320.

235. Sapiga, V. Polyfunctional properties of oat β -glucan in the composition of milk-vegetable ice cream / V. Sapiga, G. Polischuk, N. Breus [et al.]. – DOI 10.24263/2304-974X-2021-10-4-5 // Ukrainian food journal. – 2021. – Vol. 10. – P. 691–702.

236. Sarteshnizi, R. A. Antioxidant activity of sind sardine hydrolysates with pistachio green hull (PGH) extracts / R. A. Sarteshnizi, M. A. Sahari, H. A. Gavlighi [et al.]. – DOI 10.1016/j.fbio.2018.11.007 // Food bioscience. – 2019. – Vol. 27. – P. 37–45.

237. Schaafsma, G. Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition / G. Schaafsma // European journal of clinical nutrition. – 2009. – Vol. 63. – P. 1161–1168.

238. Singh, V. StaBle-ABPpred: a stacked ensemble predictor based on biLSTM and attention mechanism for accelerated discovery of antibacterial peptides / V. Singh,

S. Shrivastava, S. K. Singh [et al.]. – DOI 10.1093/bib/bbab439 // Briefings in bioinformatics. – 2022. – Vol. 23. – Art. bbab439.

239. Sowa-Jasilek, A. Antifungal activity of anionic defense peptides: insight into the action of *Galleria mellonella* anionic peptide 2 / A. Sowa-Jasilek, A. Zdybicka-Barabas, S. Staczek [et al.]. – DOI 10.3390/ijms21061912 // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21 (6). – Art. 1912.

240. Spannella, F. Association between cardiac natriuretic peptides and lipid profile: a systematic review and meta-analysis / F. Spannella, F. Giulietti, M. Bordicchia [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-019-55680-z // Scientific reports. – 2019. – Vol. 9. – Art. 19178.

241. Sun-Waterhouse, D. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review / D. Sun-Waterhouse. – DOI 10.1111/j.1365-2621.2010.02499.x // International journal of food science and technology. – 2011. – Vol. 46. – P. 899–920.

242. Taechalertpaisarn, J. A new amino acid for improving permeability and solubility in macrocyclic peptides through side chain-to-backbone hydrogen bonding / J. Taechalertpaisarn, S. Ono, O. Okada [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jmedchem.2c00010 // Journal of medicinal chemistry. – 2022. – Vol. 65. – P. 5072–5084.

243. Tan, K. P. Peptide bond planarity constrains hydrogen bond geometry and influences secondary structure conformations / K. P. Tan, K. Singh, A. Hazra [et al.]. – DOI 10.1016/j.crstbi.2020.11.002 // Current research in structural biology. – 2021. – Vol. 3. – P. 1–8.

244. Tanrikulu, I. C. Peptide tessellation yields micrometer-scale collagen triple helices / I. C. Tanrikulu, A. Forticaux, S. Jin [et al.]. – DOI 10.1038/nchem.2556 // Nature chemistry. – 2016. – Vol. 8 (11). – P. 1008–1014.

245. Teixeira, V. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes / V. Teixeira, M. J. Feio, M. Bastos. – DOI 10.1016/j.plipres.2011.12.005 // Progress in lipid research. – 2012. – Vol. 51, iss. 2. – P. 149–177.

246. Tesauro, D. Peptide-based drug-delivery systems in biotechnological applications: recent advances and perspectives / D. Tesauro, A. Accardo, C. Diaferia [et al.]. – DOI 10.3390/molecules24020351 // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – Art. 351.

247. The Function Special Interest Group / The CAFA challenge. – URL: <https://www.biofunctionprediction.org/cafa/> (дата обращения: 27.11.2023).

248. Thompson, L. J. Sodium chloride (salt) / L. J. Thompson // *Veterinary toxicology* / ed. by R. C. Gupta. – New York : Elsevier, 2007. – P. 461–464.

249. Thorning, T. K. Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: current evidence and knowledge gaps / T. K. Thorning, H. C. Bertram, J.-P. Bonjour [et al.]. – DOI 10.3945/ajcn.116.151548 // *The American journal of clinical nutrition*. – 2017. – Vol. 105. – P. 1033–1045.

250. Tjabringa, G. S. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors / G. S. Tjabringa, D. K. Nijboer, J. W. Drijfhout [et al.]. – DOI 10.1159/000092305 // *International archives of allergy and immunology*. – 2006. – Vol. 140 (2). – P. 103–112.

251. Toldrá, F. Generation of bioactive peptides during food processing / F. Toldrá, M. Reig, M.-C. Aristoy [et al.]. – DOI 10.1016/j.foodchem.2017.06.119 // *Food chemistry*. – 2018. – Vol. 267. – P. 395–404.

252. Torres, M. D. T. The wasp venom antimicrobial peptide polybia-CP and its synthetic derivatives display antiplasmodial and anticancer properties / M. D. T. Torres, A. F. Silva, G. P. Andrade [et al.]. – DOI 10.1002/btm2.10167 // *Bioengineering and translational medicine*. – 2020. – Vol. 5. – Art. e10167.

253. Tripathi, S. The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins / S. Tripathi, T. Tecle, A. Verma [et al.] – DOI 10.1099/vir.0.045013-0 // *Journal of General Virology*. – 2013. – Vol. 94(Pt 1). – P. 40–49.

254. Tyagi, A. CancerPPD: a database of anticancer peptides and proteins / A. Tyagi, A. Tuknait, P. Anand [et al.]. – DOI 10.1093/nar/gku892 // *Nucleic acids research*. – 2015. – Vol. 43. – P. 837–843.

255. Urmi, U. L. A review of the antiviral activity of cationic antimicrobial peptides / U. L. Urmi, A. K. Vijay, R. Kuppusamy [et al.]. – DOI 10.1016/j.peptides.2023.171024 // Peptides. – 2023. – Vol. 166. – Art. 171024.

256. Vadevoo, S. M. P. Peptides as multifunctional players in cancer therapy / S. M. P. Vadevoo, S. Gurung, H.-S. Lee [et al.]. – DOI 10.1038/s12276-023-01016-x // Experimental and molecular medicine. – 2023. – Vol. 55. – P. 1099–1109.

257. Van Rensburg C. E. J. Novel tetramethylpiperidine-substituted phenazines are potent inhibitors of P-glycoprotein activity in a multi drug resistant cancer cell line / C. E. J. Van Rensburg, R. Anderson, G. Jooné [et al.]. – DOI 10.1097/00001813-199708000-00010 // Anti-cancer drugs. – 1997. – Vol. 8. – P. 708–713.

258. Vaucher R. de A. Evaluation of the immunogenicity and *in vivo* toxicity of the antimicrobial peptide P34 / R. de A. Vaucher, C. de C. V. V. Gewehr, A. P. F. Correa [et al.]. – DOI 10.1016/j.ijpharm.2011.09.020 // International journal of pharmaceutics. – 2011. – Vol. 421 (1). – P. 94–98.

259. Vaucher, R. A. Evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of the antimicrobial peptide P34 / R. A. Vaucher, A. de S. da Motta, A. Brandelli. – DOI 10.1042/CBI20090025 // Cell biology international. – 2010. – Vol. 34. – P. 317–323.

260. Vilas Boas, L. C. P. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs / L. C. P. Vilas Boas, M. L. Campos, R. L. A. Berlanda [et al.]. – DOI 10.1007/s00018-019-03138-w // Cellular and molecular life sciences. – 2019. – Vol. 76. – P. 3525–3542.

261. Villalva, F. J. Formulation of a peach ice cream as potential symbiotic food / F. J. Villalva, A. P. Cravero Bruneri, G. Vinderola [et al.]. – DOI 10.1590/1678-457X.19716 // Food science and technology. – 2017. – Vol. 37. – P. 456–461.

262. Vinogradov, A. A. Macrocyclic peptides as drug candidates: recent progress and remaining challenges / A. A. Vinogradov, Y. Yin, H. Suga. – DOI 10.1021/jacs.8b13178 // American chemical society. – 2019. – Vol. 141. – P. 4167–4181.

263. Vyas, U. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond / U. Vyas, N. Ranganathan. – DOI 10.1155/2012/872716 // Gastroenterology research and practice. – 2012. – Vol. 2012. – Art. 872716.

264. Wachinger, M. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression / M. Wachinger, A. Kleinschmidt, D. Winder [et al.]. – DOI 10.1099/0022-1317-79-4-731 // Journal of general virology. – 1998. – Vol. 79 (pt. 4). – P. 731–740.

265. Walde, P. Lipid vesicles and other polymolecular aggregates – from basic studies of polar lipids to innovative applications / P. Walde, S. Ichikawa. – DOI 10.3390/app112110345 // Applied sciences. – 2021. – Vol. 11. – Art. 10345.

266. Wang, J. Antimicrobial peptides: promising alternatives in the post feeding antibiotic era / J. Wang, X. Dou, J. Song [et al.]. – DOI 10.1002/med.21542 // Medicinal research reviews. – 2019. – Vol. 39 (3). – P. 831–859.

267. Wang, L. Therapeutic peptides: current applications and future directions / L. Wang, N. Wang, W. Zhang [et al.]. – DOI 10.1038/s41392-022-00904-4 // Signal transduction and targeted therapy. – 2022. – Vol. 7. – Art. 48.

268. Wang, S. Effect of flexibility, lipophilicity, and the location of polar residues on the passive membrane permeability of a series of cyclic decapeptides / S. Wang, G. König, H.-J. Roth [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jmedchem.1c00775 // Journal of medicinal chemistry. – 2021. – Vol. 64. – P. 2761–2773.

269. Wang, X. *De novo* design of BMP mimics / X. Wang, J. M. Guillem, D. Lee [et al.]. – DOI 10.1016/j.bpj.2022.11.1751 // Biophysical journal. – 2023. – Vol. 122. – Art. 312a.

270. Webster, J. Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry / J. Webster, D. Oxley. – DOI 10.1007/978-1-61779-349-3_15 // Methods in molecular biology (Clifton, N. J.). – 2012. – Vol. 800. – P. 227–240.

271. Wei, L. ACPred-FL: a sequence-based predictor using effective feature representation to improve the prediction of anti-cancer peptides / L. Wei, C. Zhou, H. Chen [et al.]. – DOI 10.1093/bioinformatics/bty451 // Bioinformatics. – 2018. – Vol. 34. – P. 4007–4016.

272. Wilmes, M. Killing of *Staphylococci* by theta-defensins involves membrane impairment and activation of autolytic enzymes / M. Wilmes, M. Stockem, G. Bierbaum

[et al.]. – DOI 10.3390/antibiotics3040617 // Antibiotics (Basel). – 2014. – Vol. 3 (4). – P. 617–631.

273. Wu, C. Investigations into the mechanism of action of sublancin / C. Wu, S. Biswas, C. V. Garcia De Gonzalo [et al.]. – DOI 10.1021/acsinfecdis.8b00320 // ACS Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 5 (3). – P. 454–459.

274. Wu, J. P. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides / J. P. Wu, X. L. Ding // Food research international. – 2002. – Vol. 35 (4). – P. 367–375.

275. Wu, W. Stability and cytotoxicity of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine casein / W. Wu, P.-P. Yu, F.-Y. Zhang [et al.]. – DOI 10.1631/jzus.B1300239 // Journal of Zhejiang University – Science B. – 2014. – Vol. 15. – P. 143–152.

276. Yang, D. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells / D. Yang, Q. Chen, A. P. Schmidt [et al.]. – DOI 10.1084/jem.192.7.1069 // Journal of experimental medicine. – 2000. – Vol. 192 (7). – P. 1069–1074.

277. Yasin, B. Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides / B. Yasin, M. Pang, J. S. Turner [et al.]. – DOI 10.1007/s100960050457 // European journal of clinical microbiology and infectious diseases. – 2000. – Vol. 19 (3). – P. 187–194.

278. Yasin, B. Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry / B. Yasin, W. Wang, M. Pang [et al.]. – DOI 10.1128/jvi.78.10.5147-5156.2004 // Journal of virology. – 2004. – Vol. 78 (10). – P. 5147–5156.

279. Yasir, M. Mode of action of the antimicrobial peptide Mel4 is independent of *Staphylococcus aureus* cell membrane permeability / M. Yasir, D. Dutta, M. D. P. Willcox. – DOI 10.1371/journal.pone.0215703 // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14 (7). – Art. e0215703.

280. Zaldivar, G. Self-assembled nanostructures of peptide amphiphiles: charge regulation by size regulation / G. Zaldivar, S. Vemulapalli, V. Udumula [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jpcc.9b04280 // The journal of physical chemistry C. – 2019. – Vol. 123. – P. 17606–17615.

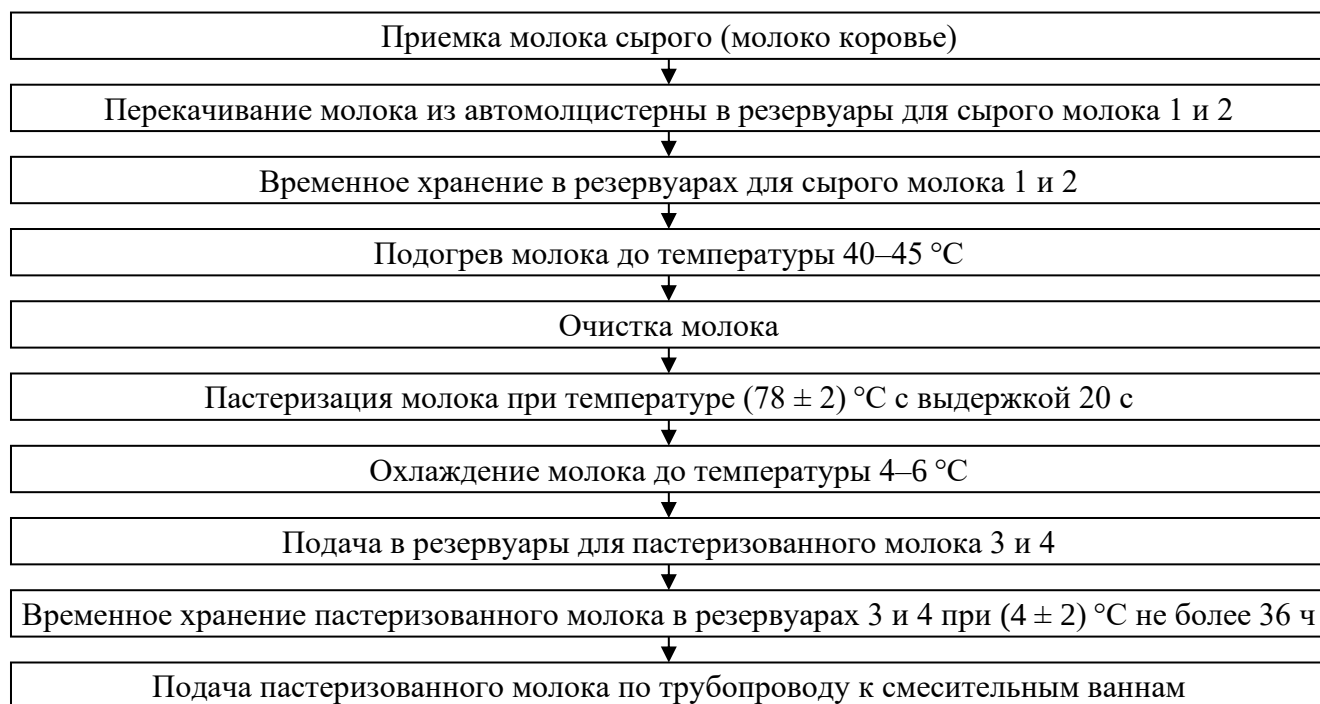
281. Zhang, C. Antimicrobial peptides: potential application in liver cancer / C. Zhang, M. Yang, A. C. Ericsson // Frontiers in microbiology. – 2019. – Vol. 10. – Art. 1257.

282. Zhang, L. J. Antimicrobial peptides / L. J. Zhang, R. L. Gallo. – DOI 10.1016/j.cub.2015.11.017 // Current biology. – 2016. – Vol. 26 (1). – P. 14–19.

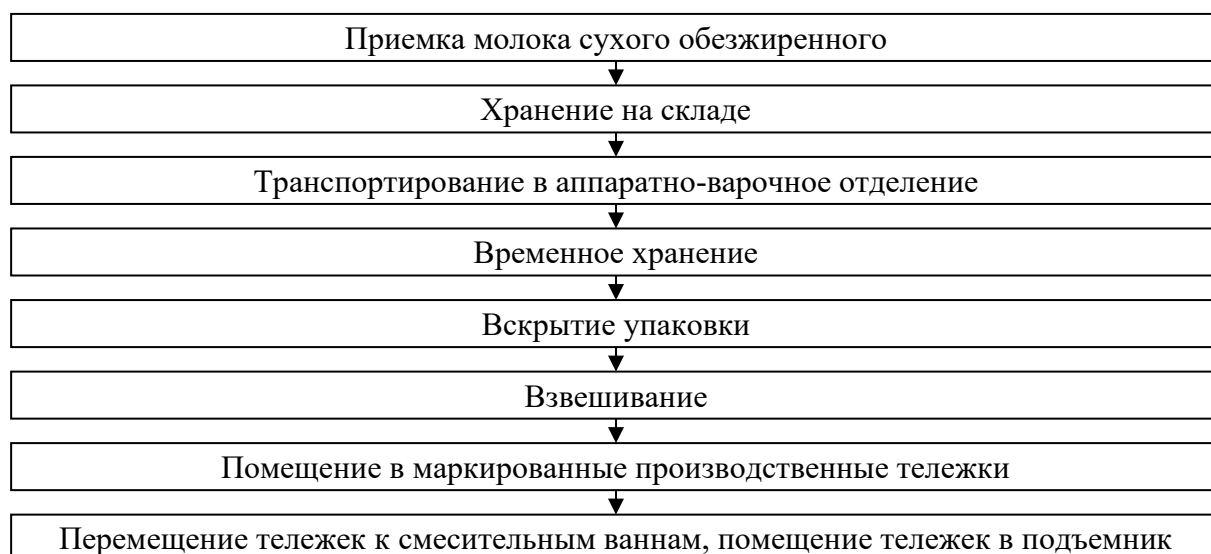
Приложение А

(обязательное)

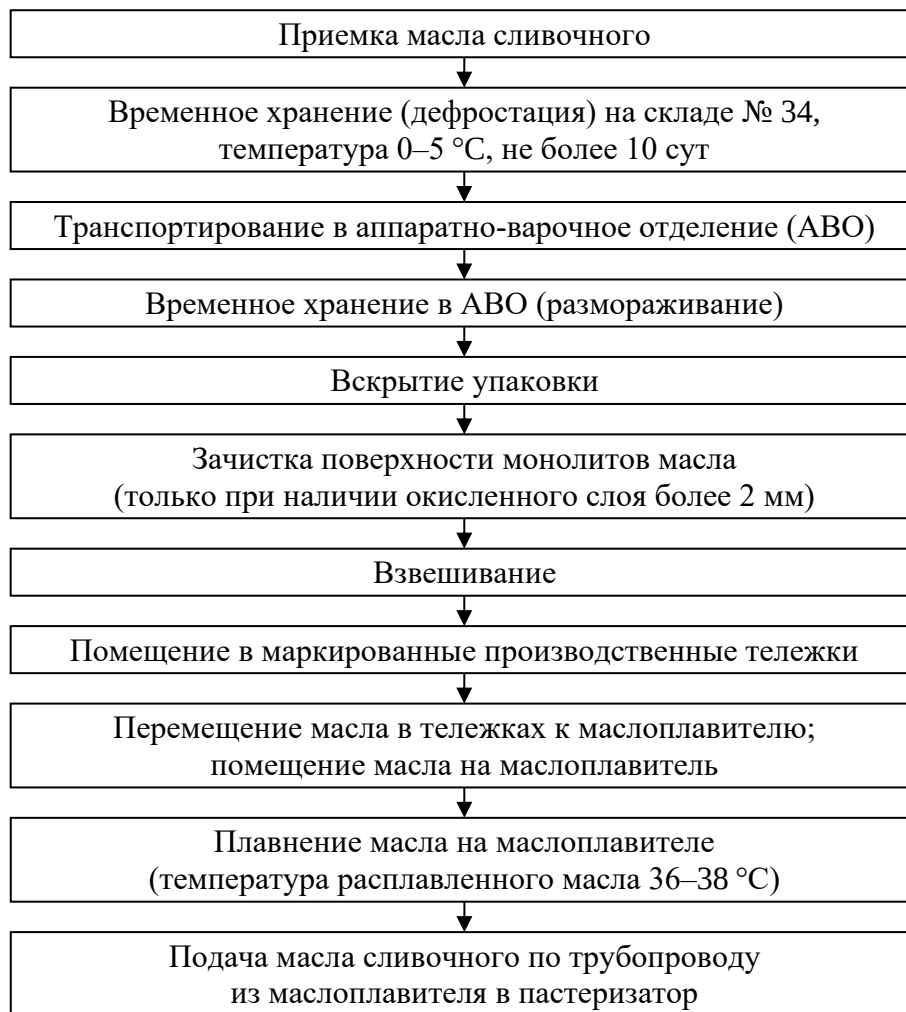
Детализация этапов технологической схемы



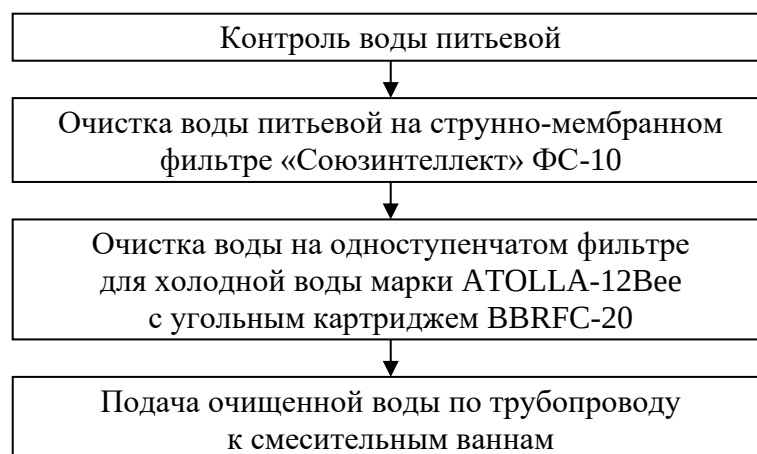
Блок-схема 1.1 – Приготовление молока сырого (молоко коровье)



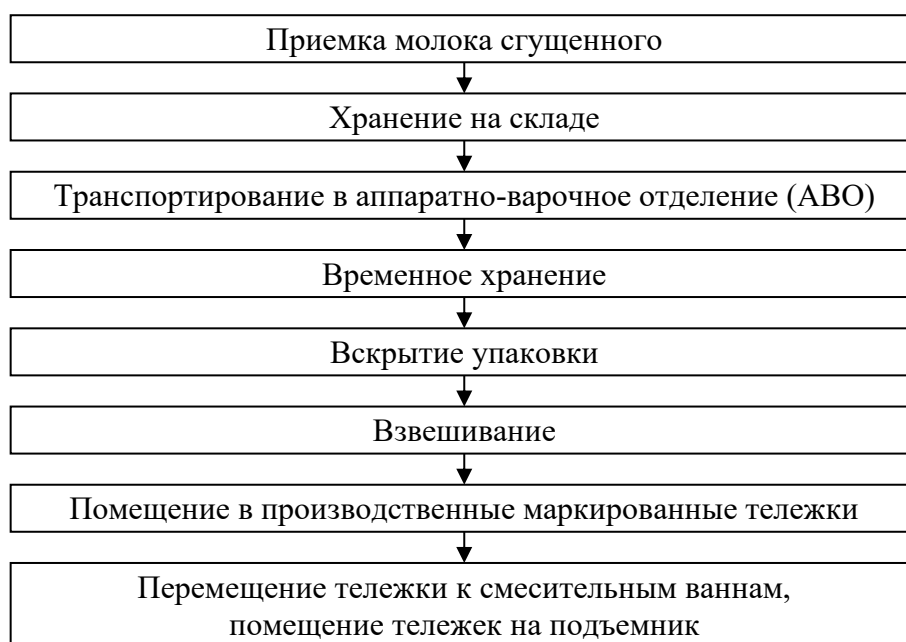
Блок-схема 1.2 – Приготовление сухих молочных продуктов
(молоко сухое обезжиренное)



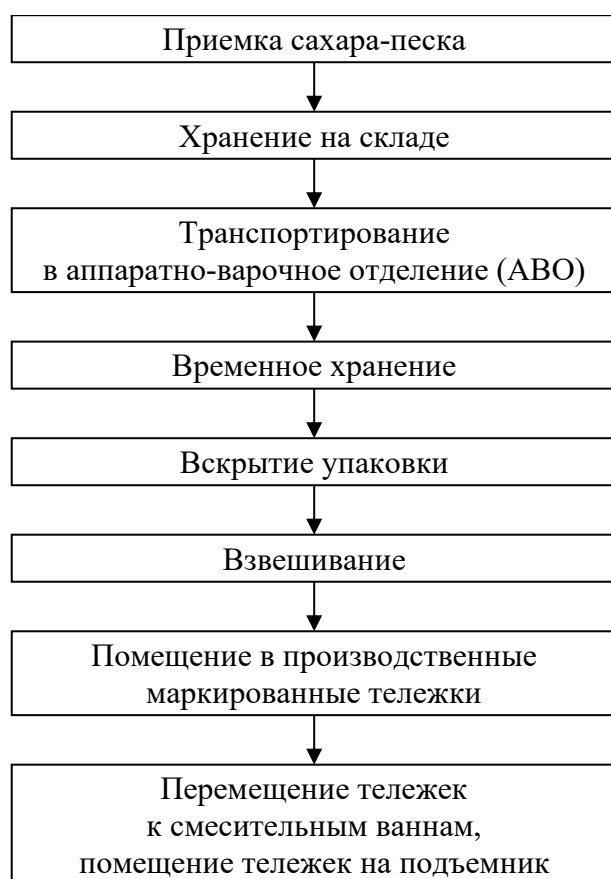
Блок-схема 1.3 – Приготовление сливочного масла



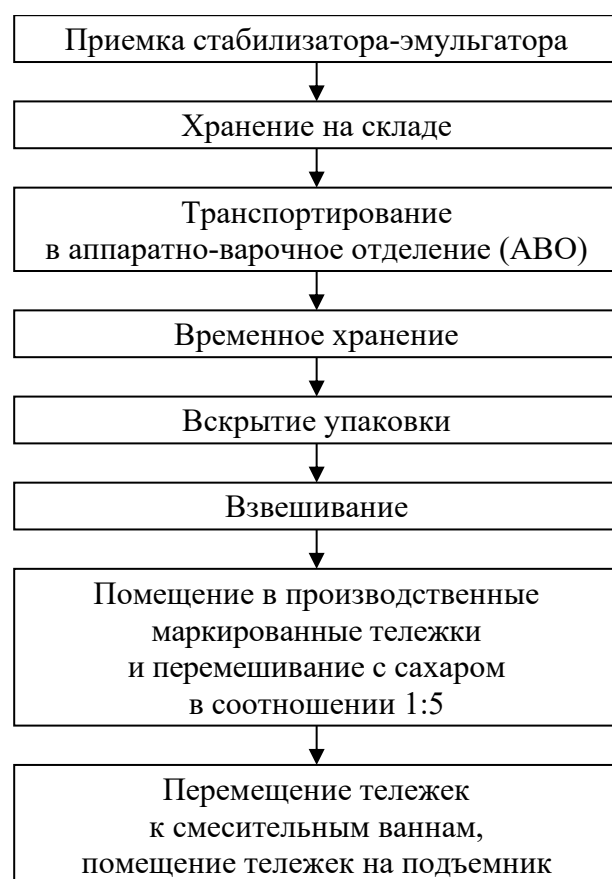
Блок-схема 1.4 – Приготовление воды питьевой



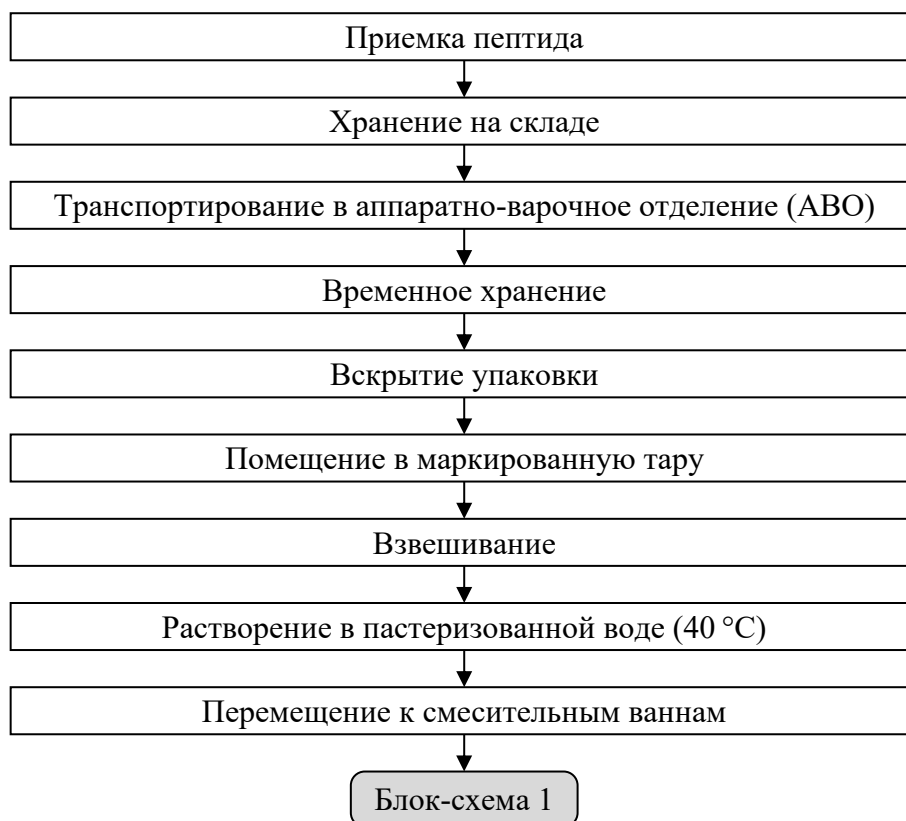
Блок-схема 1.5 – Приготовление молока сгущенного



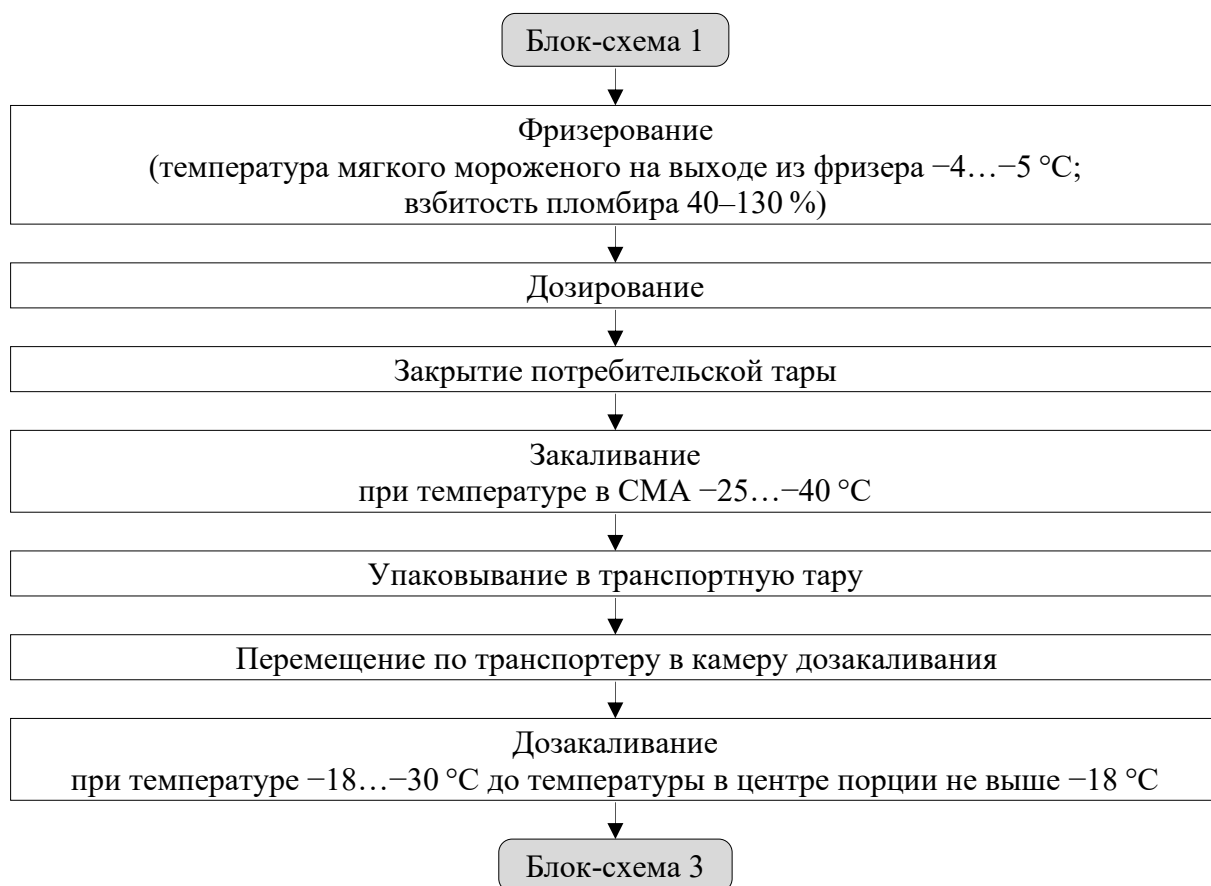
Блок-схема 1.6 – Приготовление сахара-песка



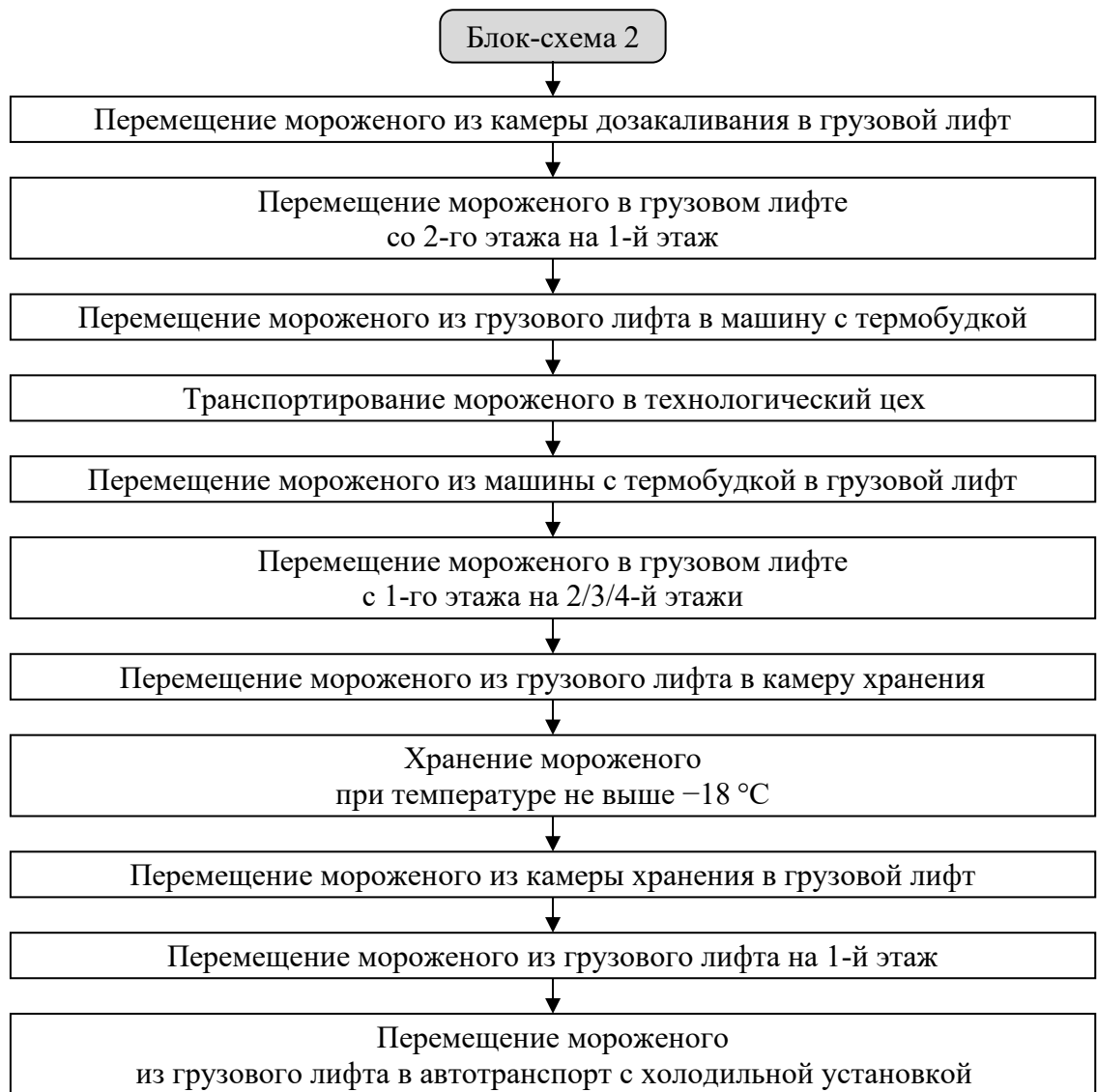
Блок-схема 1.7 – Приготовление стабилизатора-эмульгатора



Блок-схема 1.8 – Приготовление пептида LREGIKNK



Блок-схема 2 – Производство мороженого в пластиковом контейнере с крышкой



Блок-схема 3 – Транспортирование в камеры хранения, хранение и погрузка мороженого

Приложение Б (обязательное)

Протоколы испытаний

**Испытательная лаборатория государственного бюджетного учреждения Свердловской области
«Свердловская областная ветеринарная лаборатория»
(ГБУСО Свердловская облетлаборатория)**

Адрес: 620063, Россия, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Белинского, 112а, тел. (343)257-11-26,
тел/факс: (343)257-56-62 E-mail: 2571126@mail.ru; сайт: www.covl.ru

Уникальный номер записи в реестре аккредитованных лиц RA.RU.21ПЩ09
Дата внесения в реестр 20.04.2016 года



УТВЕРЖДАЮ
Руководитель ГБУСО Свердловская облетлаборатория
Н.И. Сюткина
10.02.2023

Протокол испытаний № 1269 от 10.02.2023

Наименование образца испытаний: Мороженое пломбир ванильный "ГОСТОВский" массовая доля жира 15%
нормативный документ по которому произведен продукт: ГОСТ 31457-2012
заказчик: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ХЛАДОКОМБИНАТ № 3", ИНН: 6659059688, 620134, Российская Федерация, Свердловская обл., г. Екатеринбург, Ангарская ул., д. Д. 75
основание для проведения лабораторных исследований: исследование с целью декларирования продукции
место отбора проб: Российская Федерация, Свердловская обл., г. Екатеринбург, ул. Ангарская, д.75, фабрика мороженого, камера 21
акт отбора проб: № б/н от 31.01.2023 г.
дата и время отбора проб: 31.01.2023
отбор проб произвел: заместитель начальника ОКК Минина Е.В.
НД, регламентирующий правила отбора: ГОСТ Р ИСО 707-2010
номер партии: 1083
масса партии: 1850
производство: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ХЛАДОКОМБИНАТ № 3", ИНН: 6659059688, 620134, Российская Федерация, Свердловская обл., г. Екатеринбург, Ангарская ул., д. Д. 75
дата изготовления: 17.10.2022
срок годности: 24 месяца при температуре минус 18 градусов Цельсия
сопроводительный документ: заявка на исследование б/н от 31.01.2023
масса пробы: 5 килограмм
дата поступления: 31.01.2023 10:33
даты проведения испытаний: 31.01.2023 - 10.02.2023
фактический адрес места осуществления деятельности: г. Екатеринбург, ул. Белинского, 112а
на соответствие требованиям: ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции", ТР ТС 033/2013 Технический регламент Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции", ГОСТ 31457-2012 Мороженое молочное, сливочное и пломбир. Технические условия
примечание: Данные, содержащиеся в полях: наименование образца испытаний, нормативный документ по которому произведен продукт, заказчик, основание для проведения лабораторных исследований, место отбора проб, акт отбора проб, дата и время отбора проб, отбор проб произвел, НД, регламентирующий правила отбора, номер партии, масса партии, производство, дата изготовления, срок годности, сопроводительный документ, масса пробы - предоставлены заказчиком.

Результаты испытаний:

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Результат испытаний	Погрешность (неопределенность)	Норматив	НД на метод испытаний
А6.	Амфениколы					

1	Левомецитин (Хлорамфеникол)	мг/кг	не обнаружено (менее 0,00008)	-	не допускается (менее 0,0003)	МУК 4.1.1912-04 - Определение остаточных количеств левомецитина (Хлорамфеникола, Хлормецитина) в продуктах животного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и иммуноферментного анализа, п.5
В1. Аминогликозиды						
2	Стрептомицин	мг/кг	не обнаружено (менее 0,01)	-	не допускается (менее 0,2)	МВИ.МН 2642-2015 Методика выполнения измерений содержания стрептомицина в продуктах животного происхождения с использованием Ridascreen® Streptomycin и ПРОДАСКРИН® Стрептомицин
В1. Антибиотики тетрациклиновой группы						
3	Тетрациклиновая группа	мг/кг	не обнаружена (менее 0,01)	-	не допускается (менее 0,01)	МУ 3049-84 - Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства.
В1. Пенициллиновая группа						
4	Пенициллин	мг/кг	не обнаружено (менее 0,0025)	-	не допускается (менее 0,004)	МВИ.МН 5336-2015 - Методика выполнения измерений содержания антибиотиков группы пенициллинов в продуктах животного происхождения методом ИФА с использованием тест-систем производства EuroProxima B.V., Нидерланды
В3d. Микотоксины						
5	Афлатоксин М1	мг/кг	менее 0,0005	-	не более 0,0005	ГОСТ 30711-2001 - Продукты пищевые. Методы выявления и определения содержания афлатоксинов В1 и М1
Микробиологические показатели						
6	Listeria monocytogenes	-	не обнаружена в 25 г	-	не допускается в 25 г	ГОСТ 32031-2022 - Продукты пищевые. Методы выявления бактерий Listeria monocytogenes и других видов Listeria (Listeria spp.)
7	S. aureus	-	не обнаружен в 1,0 г	-	не допускается в 1,0 г	ГОСТ 30347-2016 - Молоко и молочная продукция. Методы определения Staphylococcus aureus, п.8.1
8	БГКП (колиформы)	-	не обнаружены в 0,01 г	-	не допускаются в 0,01 г	ГОСТ 32901-2014 - Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа, п.8.5
9	Бактерии рода сальмонелла	-	бактерии рода Salmonella не обнаружены в 25 г	-	не допускаются в 25 г	ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002) - Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella

10	КМАФАнМ	КОЕ/г	менее $1,5 \cdot 10^2$	-	не более $1,0 \cdot 10^5$	ГОСТ 32901-2014 - Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа, п.8.4
Органолептические показатели						
11	Вкус	-	Чистый, свойственный для данного наименования продукта, без постороннего привкуса.	-	Чистый, характерный для данного вида мороженого, без посторонних привкусов и запахов.	ГОСТ Р ИСО 22935-3-2011 - Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 3. Руководство по оценке соответствия техническим условиям на продукцию для определения органолептических свойств путем подсчета баллов
12	Внешний вид	-	Однослойное мороженое в потребительской упаковке прямоугольной формы, без глазури. Структура однородная.	-	Внешний вид: порции однослойного или многослойного мороженого различной формы, обусловленной геометрией формирующего или дозирующего устройства, формой вафельных изделий (печенья) или потребительской тары, полностью или частично покрытые глазурью (шоколадом) или без глазури (шоколада). Допускаются незначительные (не более 10 мм) механические повреждения и отдельные (не более пяти на порцию) трещины глазури (шоколада), печенья или вафель, в том числе кромок вафельных изделий, длиной не более 10 мм. Структура: однородная, без ощутимых комочков жира, стабилизатора и эмульгатора, частичек белка и лактозы, кристаллов льда. При использовании пищевкусовых продуктов в целом виде или в виде кусочков, «прослоек», «прожилку», «стержня», «спиралевидного рисунка» и др. с наличием их включений. В глазированном мороженом структура глазури (шоколада) однородная, без ощутимых частиц сахара, какао-продуктов, сухих молочных продуктов, с включением частиц орехов, арахиса, вафельной крошки и др. при их использовании.	ГОСТ Р ИСО 22935-2-2011 - Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 2. Рекомендуемые методы органолептической оценки
13	Запах и аромат	-	Чистый, свойственный данному наименованию продукта, без постороннего запаха.	-	Чистый, характерный для данного вида мороженого, без посторонних привкусов и запахов.	ГОСТ Р ИСО 22935-2-2011 - Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 2. Рекомендуемые методы органолептической оценки
14	Консистенция	-	Плотная.	-	Плотная.	ГОСТ Р ИСО 22935-2-2011 - Молоко и молочные продукты. Органолептический анализ. Часть 2. Рекомендуемые методы органолептической оценки
Показатели качества						
15	Массовая доля сахарозы	%	15,8	0,5	не менее 14,0	ГОСТ Р 54667-2011 - Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли сахаров, п.6
16	Массовая доля сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО)	%	9,2	0,4	7-10	ГОСТ Р 54761-2011 - Молоко и молочная продукция. Методы определения массовой доли сухого обезжиренного молочного остатка

Применяемое оборудование:

№ п/п	Наименование оборудования	Дата поверки/калибровки/аттестации	Дата окончания поверки/калибровки/аттестации
1	Анализатор иммуноферментный SUNRISE BASIC TS, зав. № 808053057	27.04.2022	26.04.2023
2	Баня термостатирующая прецизионная LOIP LB-212, зав. № 758	28.10.2021	28.10.2023
3	Баня термостатирующая прецизионная LOIP-LB-212, № 061	10.12.2021	10.12.2023
4	Баня термостатирующая прецизионная серии LOIP LB -212, зав. № 2736	09.12.2022	09.12.2023
5	Весы лабораторные ЕК-610i зав. № 6A4411274	05.09.2022	04.09.2023
6	Весы неавтоматического действия GH-252, зав. № 15111415	18.07.2022	17.07.2023
7	Весы неавтоматического действия VIBRA LN623RCE, зав. № 151420005	18.07.2022	17.07.2023
8	Весы электронные Sartorius BP-110 S, зав. № 71007352	05.12.2022	04.12.2023
9	Дозатор механический 1 – каналный ВЮНПТ объем дозирования (5-50) мкл, зав. № 10075738	18.04.2022	17.04.2023
10	Дозатор механический 1-канальный ВЮНПТ объем дозирования (10-100) мкл, зав. № 12504829	18.04.2022	17.04.2023
11	Дозатор механический 8-канальный ВЮНПТ, зав. № 10047641	25.04.2022	24.04.2023
12	Дозатор переменного объема, 1-канальный объем дозирования (100-1000) мкл, зав. № 1706001	23.03.2022	22.03.2023
13	Орбитальный шейкер S-3.10L, зав. № 1011799	Не требуется	Не требуется
14	Осветитель люминисцентный диагностический "Parther" PW -061	Не требуется	Не требуется
15	Ротационный испаритель RE 52-A A, инв. № BA0000000928	Не требуется	Не требуется
16	Термостат ТС-80М-2, зав. № 6933	26.02.2021	26.02.2023
17	Термостат воздушный лабораторный ТВЛ-К (120), зав. № 2599	09.12.2022	09.12.2023
18	Термостат воздушный лабораторный ТВЛ-К (120), зав. № 2601	09.12.2022	09.12.2023
19	Термостат воздушный лабораторный ТВЛ-К (120), зав. № 2603	09.12.2022	09.12.2023
20	Термостат воздушный лабораторный ТВЛ-К (120), зав. № 2604	09.12.2022	09.12.2023
21	Термостат воздушный лабораторный ТВЛ-К (120), зав. № 2600	09.12.2022	09.12.2023
22	Термостат воздушный лабораторный ТВЛ-К (120), зав. № 2605	09.12.2022	09.12.2023
23	Центрифуга лабораторная медицинская ОПн - 8, зав. № 9214.90	15.11.2021	15.11.2023

Испытательная лаборатория не несет ответственность за отбор образцов и информацию предоставленную Заказчиком.

Результат распространяется на доставленный образец.

Частичная перепечатка протокола без согласия лаборатории запрещена.

Зам. руководителя по производственной деятельности -

зав. отделом приемки проб

10.02.2023

Конец протокола испытаний.



Е.В. Емельянова

Ответственный за оформление протокола: Сурина Е.А.

**Испытательная лаборатория государственного бюджетного учреждения Свердловской области
«Свердловская областная ветеринарная лаборатория»
(ГБУСО Свердловская областветлаборатория)**

Адрес: 620063, Россия, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Белинского, 112а, тел. (343)257-11-26,
тел/факс: (343)257-56-62 E-mail: 2571126@mail.ru; сайт: www.govl.ru

Уникальный номер записи в реестре аккредитованных лиц RA.RU.21ПЩ09

Дата внесения в реестр 20.04.2016 года

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель ГБУСО Свердловская областветлаборатория
Н.И. Сюткина
10.02.2023



Протокол испытаний № 1270 от 10.02.2023

Наименование образца испытаний: Мороженое пломбир ванильный "ГОСТОВский" массовая доля жира 15%
нормативный документ по которому произведен продукт: ГОСТ 31457-2012

заказчик: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ХЛАДОКОМБИНАТ № 3", ИНН: 6659059688, 620134, Российская Федерация, Свердловская обл., г. Екатеринбург, Ангарская ул., д. Д. 75

основание для проведения лабораторных исследований: исследование с целью декларирования продукции
место отбора проб: Российская Федерация, Свердловская обл., г. Екатеринбург, ул. Ангарская, д.75, фабрика мороженого, камера 21

акт отбора проб: № б/н от 31.01.2023 г.

дата и время отбора проб: 31.01.2023

отбор проб произвел: заместитель начальника ОКК Минина Е.В.

НД, регламентирующий правила отбора: ГОСТ Р ИСО 707-2010

номер партии: 1083

масса партии: 1850

производство: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ХЛАДОКОМБИНАТ № 3", ИНН: 6659059688, 620134, Российская Федерация, Свердловская обл., г. Екатеринбург, Ангарская ул., д. Д. 75

дата изготовления: 17.10.2022

срок годности: 24 месяца при температуре минус 18 градусов Цельсия

сопроводительный документ: заявка на исследование б/н от 31.01.2023

масса пробы: 2,5 килограмма

дата поступления: 31.01.2023 10:47

даты проведения испытаний: 31.01.2023 - 07.02.2023

фактический адрес места осуществления деятельности: г. Екатеринбург, ул. Белинского, 112а

примечание: Данные, содержащиеся в полях: наименование образца испытаний, нормативный документ по которому произведен продукт, заказчик, основание для проведения лабораторных исследований, место отбора проб, акт отбора проб, дата и время отбора проб, отбор проб произвел, НД, регламентирующий правила отбора, номер партии, масса партии, производство, дата изготовления, срок годности, сопроводительный документ, масса пробы - предоставлены заказчиком.

Результаты испытаний:

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Результат испытаний	Погрешность (неопределенность)	Норматив	НД на метод испытаний
Показатели качества						
1	Массовая доля белка	%	3,52	-	-	ГОСТ 34454-2018 - Продукция молочная. Определение массовой доли белка методом Кьельдаля
2	Массовая доля жира	%	15,5	0,40	-	ГОСТ 5867-90 - Молоко и молочные продукты. Методы определения жира, п.2

Применяемое оборудование:

№ п/п	Наименование оборудования	Дата поверки/калибровки/аттестации	Дата окончания поверки/калибровки/аттестации
1	Автоматизированная установка для разложения по Кьельдалю LIOP LK-100, зав. № 125	Не требуется	Не требуется
2	Весы неавтоматического действия СН-252, зав. № 15111415	18.07.2022	17.07.2023
3	Центрифуга лабораторная ЦК "ОКА", № 279	10.12.2021	10.12.2023

Испытательная лаборатория не несет ответственность за отбор образцов и информацию предоставленную Заказчиком.

Протокол № 1270 от 10.02.2023

Сгенерировано автоматизированной системой «Веста». Идентификатор документа: 0EEE17F6-ED5E-45EF-BEB1-F32D010D2186

Результат распространяется на доставленный образец.
Частичная перепечатка протокола без согласия лаборатории запрещена.

Зам. руководителя по производственной деятельности -

зам. отделом приемки проб

10.02.2023

Конец протокола испытаний.



Е.В. Емельянова

Ответственный за оформление протокола: Сурина Е.А.

УТВЕРЖДАЮ

Директор по производству

ООО «Хладокомбинат 3»

Жалалова В.В.

04 марта 2025 г.



**АКТ
ВНЕДРЕНИЯ МАТЕРИАЛОВ
ДИССЕРТАЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
В ПРОИЗВОДСТВО
МЕРЗЛЯКОВОЙ НАТАЛИИ ВАДИМОВНЫ
«ВЫДЕЛЕНИЕ НАТИВНОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПЕПТИДА
С СИНТЕЗОМ АНАЛОГА И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ
ОБОГАЩЕНИЯ МОРОЖЕНОГО»**

Мы, нижеподписавшиеся, директор по производству Жалалова Валентина Викторовна и главный технолог Инюткина Светлана Александровна составили настоящий акт о том, что результаты исследований Мерзляковой Н.В. по разработке мороженого, обогащенного биопептидами внедрены в производство на предприятии ООО «Хладокомбинат № 3».

Главный технолог

Heep

С.А. Инюткина

УТВЕРЖДАЮ:
Проректор по научной работе и
инновационной деятельности УГЛТУ,
д.б.н., профессор
В.В. Фомин
«_____» _____ 2025г



Акт

внедрения результатов диссертации Мерзляковой Н.В. на тему
«ВЫДЕЛЕНИЕ НАТИВНОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПЕПТИДА
С СИНТЕЗОМ АНАЛОГА И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ
ОБОГАЩЕНИЯ МОРОЖЕНОГО»

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

И.о. зав. кафедрой ХТДБиН

Профессор кафедры ХТДБиН

И.К. Гиндулин

С.Л. Тихонов

