

Федеральное государственное автономное научное учреждение  
«Всероссийский научно–исследовательский институт молочной  
промышленности»  
(ФГАНУ «ВНИМИ»)

На правах рукописи

Агаркова Евгения Юрьевна

РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОЙ СТРАТЕГИИ ТРАНСФОРМАЦИИ  
ВТОРИЧНОГО МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ НОВЫХ  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ В МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Специальность: 4.3.3 – Пищевые системы

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора технических наук

Научный консультант  
доктор технических наук  
В. К. Семипятный

Москва, 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ПРОБЛЕМЫ .....	11
1.1 Протеомика. Особенности качественного состава белков молочного сырья.....	11
1.2 Состояние вопроса направленной биотрансформации молочного сырья.....	13
1.3 Виды ферментных препаратов для биокатализа молочного сырья и их эффективность .....	15
1.4 Биологически активные пептиды молочного сырья; инструменты и методы подтверждения антиоксидантных и антигипертензивных свойств .....	22
1.5 Особенности структуры аэрированных эмульсионных молочных продуктов. Механизм действия стабилизаторов структуры .....	50
1.5.1 Пенообразование в белковых системах.....	50
1.6 Рассмотрение научно-практических подходов и решений в области создания устойчивых аэрированных молочных систем. ....	54
1.6.1 Применение ферментативной обработки.....	54
1.6.2 Гидроколлоиды как стабилизаторы эмульсионных белковых систем .....	58
1.7 Заключение по литературному обзору .....	62
Глава 2 Методология исследований.....	64
2.1 Объекты исследования .....	64
2.2 Методы исследования.....	66
Глава 3 Алгоритм проведения протеолиза молочного сырья.....	103
3.1 Исследование белкового профиля технологически дифференцированных сывороток.....	103

3.2 Биоинформационное программирование протеолиза сывороточных белков .....	109
3.3 Разработка программного обеспечения с автоматической выгрузкой данных из пептидной базы .....	138
3.4 Оптимизация условий протеолиза сывороточных белков.....	140
3.5 Разработка равновесной модели протеолиза .....	155
3.6 Исследование пептидных профилей пептидных композиций технологически дифференцированных сывороток .....	157
3.7 Изучение последовательностей идентифицированных пептидов в различных видах сывороток.....	165
Глава 4 Характеристика пептидных гидролизатов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .....	171
4.1 Исследование биофункциональных свойств гидролизатов <i>in vitro</i> ...	171
4.2 Исследование биофункциональных свойств гидролизатов <i>in vivo</i> ....	174
Глава 5 Изучение влияния гидролизатов на свойства базового аэрированного продукта .....	179
5.1 Исследование реологических характеристик аэрированной системы с гидролизатом .....	179
5.3 Разработка стабилизационной системы для базового аэрированного продукта с интегрированным гидролизатом .....	183
5.4 Оптимизация внутрикомпозиционного состава базового аэрированного продукта .....	187
5.5 Исследование технологических режимов получения базового аэрированного продукта .....	193
Глава 6 Проведение тестирования <i>in vivo</i> функциональных свойств базового молочного продукта .....	195
6.1 Исследование антиоксидантных и гепатопротекторных свойств базового молочного продукта с использованием пептидного гидролизата .....	195

6.2 Исследование гипотензивных свойств базового молочного продукта с использованием пептидного гидролизата .....	198
6.3 Установление рекомендованных сроков годности базового аэрированного продукта .....	203
Глава 7 Интегрирование базового продукта в частные технологии обогащенных продуктов .....	217
Заключение .....	222
Список сокращений и условных обозначений .....	225
Список литературы .....	227
Приложение А. Акты проведения опытных выработок .....	263
Приложение Б. Свидетельства о Государственной регистрации программ для ЭВМ .....	270
Приложение В. Титульные листы документов по стандартизации .....	273

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Одной из основных задач Доктрины продовольственной безопасности, утвержденной указом Президента Российской Федерации от 21 января 2020 г. № 20, является формирование принципов здорового образа жизни, включающих в себя формирование рациона здорового питания для всех групп населения, и в этом особая роль отводится продуктам с функциональными свойствами. В настоящий момент индустрия функционального питания узкоспецифична и направлена на коррекцию активных патологий. В то же время существует задача профилактики функциональных расстройств организма и предотвращения заболеваний. Её решение базируется как на создании принципиально новых продуктов, так и разработке унифицированных функциональных ингредиентов, которые с успехом можно интегрировать в существующие матрицы пищевых систем. С учетом глобальных трендов на повышение эффективности использования побочных продуктов молочной промышленности на пищевые цели и большого внимания к экологизации производства, в качестве потенциальных функциональных пищевых ингредиентов могут быть рассмотрены компоненты молочной сыворотки белковой природы. Перспективность их использования в этом аспекте подтверждается масштабными исследованиями биологических свойств пептидов: антиоксидантных, противодиабетических, гипотензивных, иммуномодулирующих, антимикробных и др. Последние, находясь в структуре белка, ограниченно проявляют свои функциональные свойства. Деструкция белка в результате направленного протеолиза способствует получению препаратов с определенными свойствами, предопределяемыми доминирующими пептидами системы.

Несмотря на очевидную перспективу развития биокаталитических технологий, процесс протеолиза является достаточно дорогостоящим, в том числе, из-за значительных трудозатрат. Оптимизация гидролиза возможна с применением *in silico* прогнозирования, позволяющего предсказать наличие биоактивных пептидов в потенциальных гидролизатах конкретного белкового субстрата.

Наличие наполненных баз данных, включающих информацию о пептидах с известными биологическими активностями, делает возможным прогнозирование биологической активности получаемых гидролизатов; выбор биологического сырья, содержащего такие пептиды, и подбор ферментов для селективного расщепления белковых структур.

Ограничением использования функциональных ингредиентов является изменение их свойств в процессе приготовления продуктов и, как следствие, отсутствие доказанных биологических эффектов в составе функциональных продуктов. Поэтому исследование реализации биологической активности функциональных ингредиентов и созданных на их основе функциональных продуктов питания является актуальным направлением.

**Цель диссертационной работы.** Целью работы являлась разработка стратегии трансформации белков молочной сыворотки в ингредиенты с доказанными функциональными свойствами и последующей технологической интеграцией в матрицы пищевых систем.

**Задачи диссертационной работы.** Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие задачи:

1. Осуществить теоретические исследования принципов направленной трансформации молочного сырья и обосновать совместимость пептидно-полисахаридных систем для усиления функционального потенциала продуктов питания с позиции глобальных мировых тенденций.

2. Установить закономерности изменения пептидного профиля технологически дифференцированных подсырных сывороток как сырья для получения функциональных пептидов.

3. Установить рациональный дизайн ферментной композиции для направленного гидролиза белков подсырных сывороток, полученных при производстве сыров с различным способом коагуляции.

4. Разработать алгоритм системного анализа и выбора оптимальных ферментных препаратов для виртуального высвобождения биоактивных пептидов

и программный комплекс на его основе с возможностью автоматической загрузки данных из базы BIOPEP.

5. Разработать прогностическую модель процесса гидролиза белков подсырных сывороток с детализацией температурных, временных и концентрационных особенностей систем.

6. Провести идентификацию белкового профиля биологически активных пептидов, полученных биокаталитической конверсией белков подсырных сывороток, методом *in silico* анализа с использованием баз данных BIOPEP, ACEperDB, ExPASy.

7. Охарактеризовать физико-химические и биофункциональные свойства пептидных гидролизатов на моделях *in vitro* и *in vivo*.

8. Разработать технологию базового аэрированного молочного продукта с использованием пептидных гидролизатов, полученных биокаталитической конверсией белков подсырной сыворотки с внесением стабилизационной системы и оптимизировать его состав.

9. Протестировать и доказать *in vitro* и *in vivo* функциональные свойства базового аэрированного молочного продукта с использованием пептидных гидролизатов с внесением стабилизационной системы

10. Разработать частные технологии группы однородных обогащенных молочных продуктов с использованием пептидных гидролизатов.

**Научная новизна.** Разработана комплексная стратегия исследования пептидных гидролизатов и продуктов на его основе, включающая следующие этапы: биоинформационное программирование, характеристика функциональных свойств *in vitro* с верификацией полученных экспериментальных данных *in vivo*.

Получены закономерности формирования функционального потенциала белков технологически дифференцированных молочных сывороток от пептидного профиля.

Разработан системный подход к ранжированию ферментных препаратов по биологической активности и сенсорному профилю образующихся пептидов, базирующийся на инкорпорировании данных по идентифицированным основным

и минорным монокритериям в интегральный критерий желательности. Доказано, что созданный на его основе алгоритм прогнозирования органолептического профиля, функциональной активности и частоты встречаемости высвобождаемых пептидов возможно использовать для подбора ферментов при гидролизе любых белковых субстратов.

Разработана модель зависимости скорости ферментативного гидролиза от температуры и времени, позволяющая рассчитывать интегральным способом антиоксидантную способность по отношению к кислородному радикалу с учетом температурных вариаций на протяжении всего процесса.

Приведены зависимости величин функциональной активности гидролизатов сывороточных белков от продолжительности протеолиза и фермент-субстратного соотношения.

Получены зависимости органолептических, структурно-механических и функциональных свойств базового аэрированного продукта от дозы внесения гидролизатов.

Установлены закономерности формирования газодисперсной структуры базового аэрированного продукта от технологически-аппаратурных параметров его получения.

Предложена иерархическая схема выбора предпочтительных гидролизатов сывороточных белков по совокупности органолептических, физико-химических и функциональных свойств.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты работы представляют собой концептуальный подход по получению пищевых ингредиентов белковой природы с доказанными функциональными свойствами. Предложенные принципы позволят усовершенствовать традиционную парадигму создания функциональных ингредиентов и расширить область их применения.

Создано программное обеспечение для виртуального высвобождения пептидов, обладающих наибольшей биологической активностью с возможностью автоматической загрузки данных из базы BIOPEP.



Разработанный на примере белков молочной сыворотки алгоритм является унифицированным, и может быть использован для анализа любых белков, находящихся в открытом доступе в пептидных базах.

Результаты определения биофункциональных свойств с подобранными методами и подходами могут быть использованы для тестирования любых видов молочных продуктов с функциональным потенциалом и способны минимизировать затраты и снизить риски при проведении клинических испытаний.

Полученный функциональный ингредиент – пептидный гидролизат (СТО 00419785-044-2019) может быть использован для получения широкой гаммы обогащенных продуктов. О чем свидетельствует успешное внедрение разработанных на его основе шести видов обогащенных продуктов: «Муссы творожные обогащенные» ТУ 10.51.56-060-00419785-2019, «Суфле творожное обогащенное» ТУ 10.51.56-086-00149785-2022, «Пасты творожные обогащенные» ТУ 10.51.56-088-00149785-2022, «Кисели молочные обогащенные» ТУ 10.51.56-090-00149785-2022, «Напитки молочные обогащенные» ТУ 10.51.56-089-00149785-2022.

Технологии разработанных обогащенных продуктов внедрены на 4 молокоперерабатывающих предприятиях, что подтверждается актами о внедрении.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность полученных результатов подтверждается многократной повторностью опытов (не менее 3-5), результаты которых обрабатывались стандартизованными методами и при помощи современного сертифицированного оборудования, компьютерных программ; публикацией результатов исследований в рецензируемых журналах с высоким индексом цитирования.

Основные положения и результаты работы представлены на российских и международных конференциях: г. Москва (2016, 2017 (2), 2021, 2022 (2), 2023 (2)); г. Краснодар (2016); г. Волгоград (2019); г. Углич (2019,2021); г. Красноярск (2021); г. Вологда (2021).

Работа была отмечена золотыми медалями «За разработку технологии производства обогащенных молочных продуктов здорового питания в рамках

ресурсосбережения и импортозамещения» (Агропромышленная выставка “Золотая осень”, г. Москва, 2017 г.); Всероссийский смотр-конкурс лучших пищевых продуктов. Москва, 2017 г.); и «За разработку молочного напитка на основе гидролизатов сывороточных белков» (Всероссийский смотр-конкурс лучших пищевых продуктов, продовольственного сырья и инновационных разработок, Волгоград, 2019 г.).

### **Публикации.**

По материалам диссертационной работы опубликовано 79 печатных работ, из которых 2 монографии; 1 учебник, 10 статей в журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus; 19 статей в журналах, рецензируемых ВАК; 44 публикации в материалах конференций и журналах, индексируемых в РИНЦ.

### **Структура и объем работы.**

Диссертация состоит из введения, 7 глав, заключения и библиографии. Основное содержание изложено на 226 страницах и включает в себя 112 таблиц и 63 рисунка. Библиография включает 285 наименований.

## ГЛАВА 1. АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ПРОБЛЕМЫ

### 1.1 Протеомика. Особенности качественного состава белков молочного сырья

Протеомика (англ. *proteomics*) это наука, исследующая белковый профиль биологических кластеров, а также структурные и функциональные свойства молекул белка [1,2,3]. Задача протеомики - качественное и количественное определение индивидуальных белков, которые содержатся в биологических структурах и их идентификация [1,4]. Общее количество всех белков, находящихся в определенной биологической системе, является ее белковым профилем и называется «протеомом» [4].

Когда произошла расшифровка геномов множества биологических объектов, в том числе и человека стали формироваться и развиваться базы данных о молекулярных структурах всех белков человека и других различных биологических объектов, о структурных конформациях протеолитических фрагментов, которые участвуют в расщеплении белка при стандартных условиях, стала возможной идентификация белков [5-11]. Бурное развитие науки «протеомика» связано с появлением и интегрированием высокоточных и технологичных методов, делающих возможной возможность определить и идентифицировать белок, в том числе его количество, оценить первичную структуру и посттрансляционные модификации [9,12].

Выделяют несколько направлений в протеомике, которые ставят перед собой различные цели, представленные на схеме рисунка 1.1 [13]. Таким образом, протеомика предполагает изучение состава, структуры, функции и взаимодействий белковых молекул отдельной клетки или организма в целом.

Основной задачей протеомики является выявление механизма взаимодействия огромного числа белков и пептидов в одной биосистеме. Протеомика занимается не только всеми белками в любой данной клетке, но также набором всех изоформ и модификаций белков, взаимодействиями между ними, структурным описанием белков и их комплексов более высокого порядка, а также большинством «постгеномных» данных [1,14].



Рисунок 1.1– Основные направления протеомики

Область протеомики возникла с целью разработки и применения методов глобального анализа экспрессии и функции белков. Текущие цели протеомных исследований более разнообразны и направлены на систематическое определение разнообразных свойств белков в различных физиологических и патологических состояниях [14,15].

В первую очередь в протеомном анализе заинтересованы фармакологи и медики, поскольку существует непосредственная связь между изменениями в белковом составе и болезненным состоянием человека [16-18] [1–3]. Однако протеомный анализ приобретает огромное значение и при разработке функциональных продуктов на основе животных и молочных белков и является необходимым с точки зрения анализа белковых последовательностей, имеющих определенные биофункциональные свойства [19-22]. При проведении протеомного анализа с предшествующим биоинформационным исследованием возможно с уверенностью гарантировать наличие у белков тех или иных свойств, а, следовательно, и позиционировать их как функциональные компоненты. Наличие существенной массы различных белков неизбежно вызвало необходимость систематизации информации: стали развиваться и пополняться пептидные «банки» данных или «базы» [21,23,24].

Расчетные методы обеспечивают прогнозирование содержания биоактивных пептидов в гидролизатах белоксодержащего сырья с известной аминокислотной

последовательностью [1,25,26]. Существование баз данных, включающих не одну сотню пептидов с определенными биологическими функциями, делает возможным предсказать выход новых пептидов с улучшенной биологической активностью, выбрать биологическое сырье, содержащее такие пептиды и подобрать ферменты для селективного расщепления белков [27-29].

## 1.2 Состояние вопроса направленной биотрансформации молочного сырья

Благодаря своей универсальной функциональности биологически активные пептиды играют важную роль в сфере функциональных продуктов питания фармацевтике, косметике, нутрицевтике и др. [30-32]. В настоящий момент отмечается рост рынка биологически активных пептидов и растущее количество пищевой, косметической продукции и фармацевтических препаратов, содержащих гидролизаты пищевого сырья, как коммерчески доступные, так и в стадии разработки [27,31,33-37]. Преимущества применения ингредиентов и препаратов на основе биоактивных пептидов представлены на рисунке 1.2.

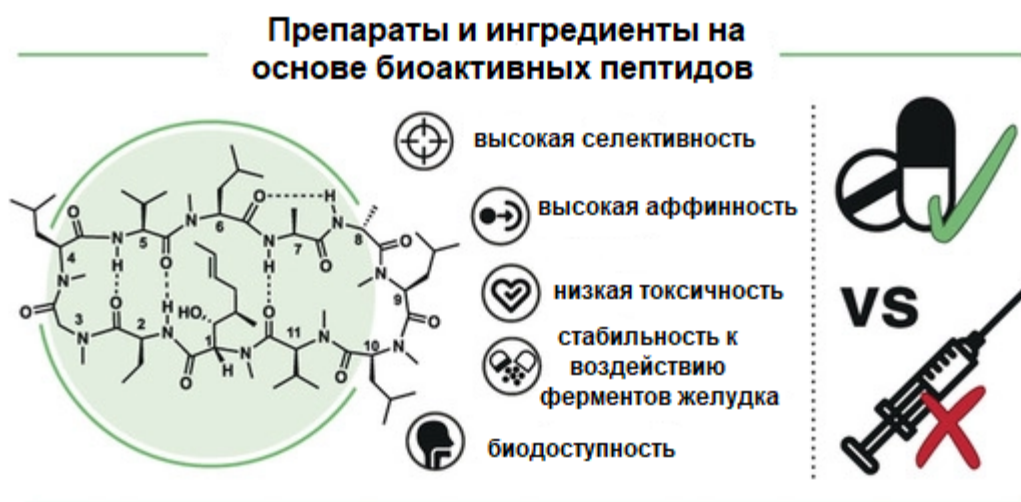


Рисунок 1.2 – Преимущества применения ингредиентов и препаратов на основе биоактивных пептидов

Фудомика - современная научная дисциплина, включающая в себя оценку состава продуктов питания, последствий биотехнологических процессов их получения, а также их влияние на здоровье человека [38]. Внесение биологически активных пептидов в продукты питания является одной из востребованных

стратегий по созданию технологий функциональных продуктов с антиоксидантными и антигипертензивными свойствами, направленными на борьбу с преждевременным старением, диабетом, гипертонией и другими социально значимыми заболеваниями [39]. Это обуславливает объективную необходимость поиска подходящих источников биопептидов среди белковых источников и селективно-направленных способов гидролиза, при которых из белковой последовательности высвобождаются биологически активные фрагменты [27,40,41].

Наиболее востребованным субстратом для извлечения биопептидов является сыворотка подсырная, благодаря значительным объемам, повсеместной доступности и значимому количеству биологически активных фрагментов. Пищевая промышленность в мире ежегодно выпускает свыше 280 млн тонн молока [42]. Молоко, при этом, на 85-95% состоит из сыворотки, содержащей более 50 % питательных веществ, перешедших в нее из молока. Также сыворотка является базовым отходом при производстве различных групп сыров. Биоценные компоненты подсырной сыворотки преимущественно представлены лактозой (от 4,5 до 5 %) и растворимыми сывороточными белками (от 0,6 до 0,8 %). Примерно половина общего объема получаемой сыворотки обрабатывается, превращаясь в различные пищевые компоненты и продукты, вторая половина, к сожалению, утилизируется как отходы производства. Именно незадействованная в технологии молочная сыворотка может рассматриваться как источник белкового сырья и биологически активных пептидов во всем мире [42-46].

Ферментативный катализ белковых субстратов различного происхождения обеспечивает перераспределение фракционного состава пептидов, открывая глобальные перспективы создания инновационных видов пищевой, включая молочную, продукции [47-51].

Стоит отметить, что среди существующих способов получения гидролизатов (кислотного, щелочного и ферментативного) наибольшее предпочтение отдается ферментативному гидролизу, протекающему в мягких технологических условиях (рН, температура), обеспечивающим максимально возможное сохранение

питательной ценности и получение продукта желаемой глубины гидролиза. Этим объясняется большой интерес российских и зарубежных специалистов к процессу протеолиза с точки зрения получения гидролизатов, обладающих функциональным потенциалом [52-61].

### **1.3 Виды ферментных препаратов для биокатализа молочного сырья и их эффективность**

Международный союз биохимиков и молекулярных биологов - NC-IUBM (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) одобрил следующую номенклатуру ферментных препаратов. Согласно ей, существующие и коммерчески доступные ферментные субстраты подразделяются на шесть типовых классов, основное различие состоит в типе катализируемой реакции [62]:

1 класс: *оксидоредуктазы* (реакции биологического окисления, сопровождающиеся переносом электронов с одной молекулы на другую);

2 класс: *трансферазы* (перенос функциональных групп и молекулярных остатков от одной молекулы к другой);

3 класс: гидролазы (гидролиз ковалентной связи);

4 класс: *лиазы* (реакции негидролитического и неокислительного разрыва различных химических связей субстрата, обратимые реакции образования и разрыва двойных связей);

5 класс: *изомеразы* (ферменты, катализирующие структурные превращения изомеров (изомеризация или рацемизация));

6 класс: *лигазы* (ферменты, катализирующие соединение двух молекул с образованием новой химической связи - лигирование) [63,64].

В пищевой промышленности чаще всего применяются ферменты третьего класса - гидролазы, в состав данного класса включены, в свою очередь, тринадцать подклассов [63]. Ферменты, относящиеся к гидролазам осуществляют катализ гидролитических реакций в рамках направленного протеолиза субстратов разнообразного происхождения, то есть как из источников микробиального и животного, так и растительной природы [63-65].

Название из номенклатуры формируется по следующему принципу: «субстрат-фермент», в данном случае гидролаза, отнесение гидролаз на подклассы обусловлено специфичностью их действия при расщеплении определенных химических и молекулярных связей [63,64].

Гидролитические ферменты третьего класса подразделяют на подклассы в зависимости от специфичности их действия при каталитическом расщеплении определенных связей, входящих в соединение [64]:

- 3.1. связей сложных эфиров;
- 3.2. связей O-гликозидов;
- 3.3. простых эфиров;
- 3.4. связей пептидов;
- 3.5. непептидных азот-углеродных связей;
- 3.6. ангидридов кислот;
- 3.7. углерод-углеродных связей;
- 3.8. связей с участием галогена;
- 3.9. связей фосфор-азот;
- 3.10. связей сера-азот;
- 3.11. связей углерод-фосфор.
- 3.12. связей сера-сера;
- 3.13. связей углерод-сера [63].

Первая классификация протеолитических ферментов на основе структурных и последовательных связей, представляющая наибольший интерес у специалистов молочной отрасли, была предложена Нилом Д. Роулингсом и Аланом Дж. Барреттом в 1993 году [66], которая вошла в основу базы данных MEROPS. База данных MEROPS представляет собой информационный ресурс, в котором используется иерархическая классификация пептидаз на основе структуры. В таблице 1.1, представленной ниже, показана динамика обновления базы MEROPS, что позволяет судить об адекватности представленных в ней данных [67].



Таблица 1.1 – Динамика обновления базы MEROPS

Показатель	1993 г.	2019 г.	Степень увеличения, раз
Последовательности пептидов	676	1137158	1682
Генотипы белков	749	4341	5,8
Семейства ферментов	84	272	3,2
Кланы ферментов	7	56	8
Ссылки на литературные данные	-	69126	-
Субстратные расщепления	-	95653	-
Ингибиторные комплексы	-	1830	-

При этом каждая пептидаза относится к семейству на основе статистически значимого сходства в аминокислотной последовательности, а семейства, которые считаются гомологичными, группируются вместе в клан.

Также были включены два других, необязательных, уровня классификации. Клан может быть разделен на подкланы, если в одном или более семействах остатки активного сайта (или металлические лиганды металлопептидазы) отличались от подобных в типовом примере. Семейство, в котором существуют дискретные линии может быть разделено на подсемейства.

В 1998 году Barrett с коллегами ввел в классификацию протеаз более низкий уровень. Этот низший уровень предполагал, что одно семейство включает пептидазные активности, которые можно отличить друг от друга, что они назвали "белок-вид" [68].

В качестве типового примера для каждого клана ферментов была определена и охарактеризована репрезентативная третичная структура, депонированная в базе данных PDB (Protein Data Bank) [69-71]. Если третичная структура пептидазы значительно схожа с типовым примером, она включается в один клан. Чтобы принадлежать к тому же семейству, их последовательность должна быть гомологична типовому примеру с сохранением положения каталитических остатков.

Введение самого низкого уровня в классификации MEROPS позволило использовать номенклатурный стиль для наименования отдельных пептидаз. Пептидазы делятся на экзопептидазы и эндопептидазы [72]. Экзопептидаза

расщепляет только одну из трех N- или C-концевых связей в пептиде или белке, в то время как эндопептидаза может расщеплять связь гораздо дальше от любого из концов [73]. Эндопептидаза может также расщепить связь вблизи N- или C-конца, но для этого не требуется свободная N- или C-концевая часть, образующаяся при расщеплении, в отличие от экзопептидазы [67,72]. По умолчанию пептидаза является эндопептидазой, если она расщепляет связь, удаленную от конца пептида, независимо от того, расщепляет ли она также связь вблизи любого из концов. Эндопептидазы можно классифицировать только по их каталитическому типу. Существуют, однако, эндопептидазы, которые не способны расщеплять белки и могут расщеплять только короткие пептиды. Они известны как "олигопептидазы" [67,72].

Экзопептидазы делятся на категории в зависимости от количества аминокислот, высвобождаемых из пептида или белка, и от того, на каком конце - N или C - это происходит. Аминопептидаза (подкласс EC 3.4.11 Ферментной номенклатуры) высвобождает аминокислоту с N-конца, а карбоксипептидаза (EC 3.4.16, EC 3.4.17 и EC 3.4.18) высвобождает аминокислоту с C-конца. Дипептидаза (EC 3.4.13) расщепляет только дипептид. Экзопептидаза, которая высвобождает дипептид с N-конца пептида или белка, известна как "дипептидилпептидаза" (в литературе ее также ошибочно называют "дипептидиламинопептидазой"), а та, которая высвобождает дипептид с C-конца субстрата, известна как "пептидилдипептидаза" (EC 3.4.15). Трипептидилпептидаза высвобождает трипептид с N-конца субстрата. Трипептидилпептидазы и дипептидилпептидазы включены в подкласс EC 3.4.14 номенклатуры ферментов [74]. На рисунке 1.3 проиллюстрирован механизм расщепления белковых структур различными видами эндопептидаз и экзопептидаз [67].

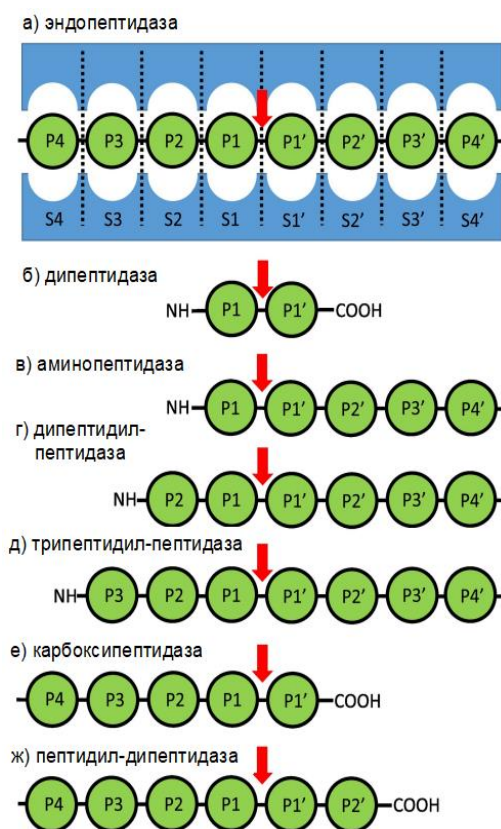


Рисунок 1.3 – Механизм расщепления белковых молекул различными видами пептидаз

Протеазы представляют собой группу больших сложных молекул ферментов, выполняющих узконаправленные функции протеолиза [75]. Значительную долю протеолитических ферментов получают в процессе микробной ферментации, хотя протеазы, как правило, естественным образом присутствуют в растительных и животных клетках. Протеазы активно участвуют в регуляции определенных физиологических функций организма человека, множество каталитических активностей в процессе метаболизма человека напрямую зависят от действия протеаз [75].

Высокоспецифичное и ограниченное расщепление субстрата протеазой является основой метаболических реакций во всех живых организмах, это же свойство применяется и при использовании протеаз в пищевой биотехнологии [64,75].

Как отмечалось выше, микробные протеазы наиболее распространены в различных областях и составляют почти две трети производимых протеаз. Их

широкая распространённость объясняется тем, что рост и поддержание жизнедеятельности микробов-субстратов по сравнению с растениями и животными происходит в более легко регулируемых условиях требует меньше времени. Некоторые микроорганизмы обладают естественной способностью самостоятельно секретировать протеазы без каких-либо индуцированных воздействий [75]. Для извлечения протеазы из микробиального субстрата применяются два способа: ферментация в твердом состоянии и ферментация в погруженном состоянии. Наиболее широко распространённые виды микробных протеаз и их характеристики представлены в таблице 1.2.

Микроорганизмы, продуцирующие протеазу, выделяют из различных источников, таких как почва, растительные отходы, предприятия по переработке молока, почва, загрязненная отходами птицеводства и так далее (таблица 1.2) [88,89]. Каждый микроорганизм нуждается в оптимизированной питательной среде и условиях окружающей среды для секреции фермента протеазы. После секреции необходимо провести серию последующих стадий обработки, чтобы получить чистую фракцию фермента протеазы [75].

Таблица 1.2 – Микробные протеазы и их характеристики

Микроорганизм	Источник	Тип протеазы	Оптимум действия	Применение	Ссылка
<i>Bacillus subtilis</i> <i>RTSBA 6</i>	Кишечник <i>Helicoverpa armigera</i>	Химотрипсиноподобная протеаза	pH 7,8; t = 35 °C	Обработка белковых субстратов	[76]
<i>Bacillus cereus</i> <i>strain AT</i>	Агропромышленные отходы и коровий навоз	Щелочная протеаза	pH 6,0 – 9,0; t = 50 °C	Моющая и кожевенная пром-сть	[77]
<i>Bacillus licheniformis</i>	Солевые отложения	Щелочная протеаза	pH 8,0; t = 37 °C	–	[77]
<i>Bacillus megatarium</i>	Почва	Термостабильная щелочная протеаза	pH 7,5; t = 50 °C	Кожевенная пром-сть	[78]
<i>Bacillus circulans</i> <i>BM15</i>	Мангровые деревья	Щелочные протеазы	pH 7,0; t = 40 °C	Моющая добавка	[79]
<i>Bacillus species</i> <i>JB-99</i>	Отходы гороха вида <i>Cajanus</i>	Термостабильная протеаза без целлюлазы	pH 11,0; t = 70 °C	Пищевая пром-сть	[80]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>strain BC1</i>	Соленые сточные воды кожевенного завода	Солеустойчивая протеаза	pH 9,0; t = 30 °C	Кожевенная пром-сть	[81]

<i>Listeria monocytogenes</i>	Говядина	Щелочная протеаза	pH 9,0 t = 30 °C	Лечебная добавка	[82]
<i>Bacillus cereus strain 146</i>	Почва деревообрабатывающего завода	Щелочная протеаза, устойчивая к органическим растворителям	pH 10,0 t = 37 °C	Смешанные отрасли пром-сти	[83]
<i>Halotolerant alkaliphilic Bacillus cereus CS1</i>	Прибрежные отложения	Металлопротеаза	pH 9,0; t = 37 °C	Удаление пятен	[84]
<i>Geobacillus caldoproteolyticus</i>	Осадок сточных вод	Термоактивная внеклеточная протеаза	pH 8,0 – 9,0; t = 70 °C	–	[85]
<i>Bacillus laterosporus</i>	–	Сериновая протеаза	pH 9,0; t = 75 °C	Удаление пятен крови	[86]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Отходы мясного производства	Щелочная протеаза	pH 9 t = 37 °C	–	[87]

Также субстратом для получения протеаз могут служить различные грибковые микроорганизмы. Мицеловые грибы обладают необычайной способностью секретировать функционально активные белки. *Trichoderma* и *Aspergillus* являются двумя доминирующими штаммами грибов, используемыми для промышленного производства протеазы. Другие виды грибов, продуцирующие протеазы, описаны в таблице 1.3.

Таблица 1.3 – Микробные протеазы грибов и их характеристики.

Микроорганизм	Источник	Тип протеазы	Оптимум действия	Применение	Ссылка
<i>Rhizopus oryzae</i>	–	Аспарагиновая протеаза	pH 3,4; t = 75 °C	Пищевая промышленность	[91]
<i>Lentinus citrinus</i>	Лигноцеллюлозные отходы	Нейтральная протеаза	pH 7,0; t = 50 °C	Пищевая промышленность	[91]
<i>Rhizomucor nainitalensis</i>	Желудок скота	Сычужный фермент	t = 40 °C	Коагуляция молока	[92]
<i>Engyodontium album</i>	Морской осадок	Щелочная протеаза	pH 11,0; t = 60 °C	Моющая промышленность	[93]
<i>Beauveria felina</i>	Изолят соевого белка	Щелочная протеаза	pH 9,0; t = 55 °C	Гидролиз соевого белка	[94]
<i>Penicillium godlewskii SBSS 25</i>	Почва	Щелочная протеаза	pH 8,0; t = 35 °C	Производство моющих средств	[95]

Помимо вышеупомянутых видов грибов существует множество других, продуцирующих протеазы, например, *Aspergillus clavatus*, *Penicillium chrysogenum* и так далее. Протеазы некоторых актиномицетов также относятся к микробным протеазам. Актиномицеты представляют собой группу бактерий, морфологически сходных с грибами. *Streptomyces nogalator* представляет собой актиномицеты, продуцирующие протеазу, выделенную из почвы [96].

Многие востребованные в пищевом производстве протеазы являются ферментами животного происхождения, например, ренин, химотрипсин, трипсин и пепсин, выделяемыми из желудочно-кишечного тракта животных. Чтобы найти альтернативу минимизации убоя животных, для массового производства протеаз животного происхождения может применяться технология рекомбинантной ДНК [97].

#### **1.4 Биологически активные пептиды молочного сырья; инструменты и методы подтверждения антиоксидантных и антигипертензивных свойств**

##### Антиоксидантные пептиды

Хорошо известно, что перекисное окисление липидов в пищевых продуктах может привести к ухудшению их качества и сокращению срока годности. Оно влечет за собой образование свободных радикалов, которые, в свою очередь, могут привести к разложению жирных кислот, что снижает пищевую ценность и безопасность пищевых продуктов из-за образования нежелательного привкуса и токсичных веществ [100].

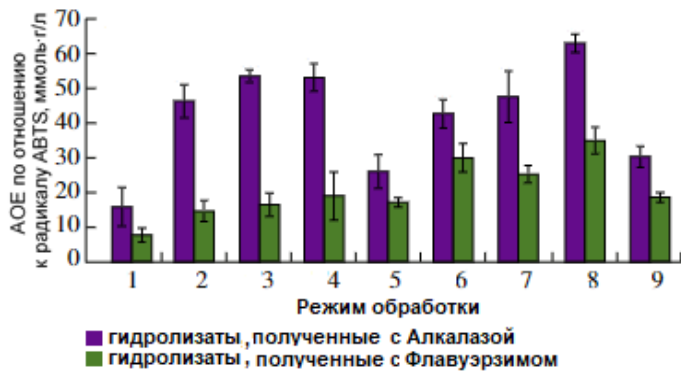
Свободные радикалы также могут модифицировать ДНК, белки и небольшие клеточные молекулы и, как полагают, играют важную роль в возникновении таких заболеваний, как сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, неврологические расстройства и даже болезнь Альцгеймера [101-104]. Следовательно, важно замедлять окисление липидов и образование свободных радикалов в пищевых продуктах [105].

Впервые об антиоксидантных свойствах пептидов, полученных из сывороточных белков путем ферментативного гидролиза было заявлено Hernández-Ledesma с соавторами [106]. Ими была исследована антиоксидантная активность

гидролизатов из сывороточных белков коровьего  $\alpha$ -лактальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина коммерческими протеазами (пепсин, трипсин, химотрипсин, термолизин и Королаза PP), которые синергически действуют на белки, что приводит к активному расщеплению. Гидролизаты, полученные из  $\alpha$ -лактальбумина с помощью Колоразы PP и химотрипсина (2,954 и 2,528 ммоль ТЭ/мг белка, соответственно) и из  $\beta$ -лактоглобулина с помощью Колоразы PP (2,151 мкмоль ТЭ/мг белка), показали самую высокую антиоксидантную активность [106]. Одна из последовательностей WYSLAMAASDI f (19-29) обладала способностью поглощать радикалы (ORAC-FL 2,621 ммоль ТЭ/мг белка) (таблица 1.4) выше, чем у бутилированного гидроксианизола (БГА) (2,43 мкмоль ТЭ / мг БГА). БГА в настоящее время используется в пищевой промышленности в качестве синтетического антиоксиданта [107].

В более позднее время другими исследователями были подтверждены их исследования Hernández-Ledesma, и показано, что пептиды MHIRL f (145-149) и YVEEL f (42-46) также проявили активность по поглощению радикалов (значения ORAC-FL 0,306 и 0,799 ммоль ТЭ/мг белка, соответственно), что было связано с соответствующим присутствием метионина и тирозина [108-110].

Доказано, что пептиды из белковых гидролизатов действуют как антиоксиданты через механизмы инактивации активных форм кислорода (АФК), удаления свободных радикалов, ингибирования перекисного окисления липидов, хелатирования ионов металлов или комбинации этих механизмов [105]. Антиоксидантные пептиды обычно состоят из 5–11 аминокислот, включая гидрофобные аминокислоты, аланин (A), гиститдин (G), пролин (P), валин (V), изолейцин (I), лейцин (L), фенилаланин (F), триптофан (W), тирозин (Y) и метионин (M) [106, 111-114]. В частности, тирозин (Y) и триптофан (W) были описаны разными авторами как основные, ответственные за антиоксидантную активность пептидов в модели ORAC-FL [111]. Хотя антиоксидантные пептиды, полученные из молочных белков, в основном ассоциированы с казеиновыми белками, гидролиз сывороточных белков также может привести к их выработке [112-116].



№	E/S г/100 г	$\tau$ , мин	t, °C	pH
1	1:100	60	42	5,5
2	1:100	180	50	7,0
3	1:100	300	58	8,5
4	2:100	60	50	8,5
5	2:100	180	58	5,5
6	2:100	300	42	7,0
7	3:100	60	58	7,0
8	3:100	180	42	8,5
9	3:100	300	50	5,5

Рисунок 1.4 – Антиоксидантные свойства сывороточных гидролизатов [103]

Последовательности некоторых антиоксидантных пептидов, полученных из  $\alpha$ -лактальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина, суммированы в таблице 1.4 [106,111,117-119].

В исследованиях Contreras с соавторами после гидролиза концентрата сывороточных белков термолизинном активность гидролизатов по поглощению радикалов возрастала в 16 раз, показывая, что значения ORAC-FL находились в диапазоне от 0,832 до 2,572 ммоль ТЭ/мг белка [111]. Авторами было идентифицировано 19 полученных из  $\beta$ -лактоглобулина фрагментов. Данные фрагменты представляли собой небольшие пептиды, содержащие от 3 до 10 аминокислотных остатков. Шесть из этих пептидов, а именно LIVTQT, LKPTREGD, LQKW, ПАЕКTKIP, VRTPE и VDDEA, ранее были обнаружены в пермеатах из коммерческого  $\beta$ -лактоглобулина, гидролизованного термолизинном. Фрагменты LQKW и LDTDYKK содержат эти аминокислоты, что указывает на их важный вклад в антиоксидантные свойства пермеатов из концентратов сывороточных белков, гидролизованных термолизинном. Также отмечено, что пептид LQKW оказывает ингибирующую активность в отношении ангиотензинпревращающего фермента и обладает антигипертензивным действием на спонтанно гипертонических крысах [120]. Некоторые из гидролизатов сывороточных белков, полученных с использованием термолизина, проявляли сильную активность по поглощению радикалов. Наибольшая антиоксидантная активность (2,57 ммоль ТЭ/мг белка) была обнаружена в сывороточных



концентратах, гидролизованных термолизинном через 8 ч при 80 °С и субстрат-ферментном соотношении (E/S) 0,10% [106].

Таблица 1.4 – Антиоксидантные пептиды, полученные из сывороточных белков

Исходный белок	Фермент	Аминокислотная последовательность	Метод определения антиоксидантной активности		Ссылка
			IC <sub>50</sub> , μM (ABTS метод)	ORAC-FL (ммоль ТЭ/мг белка)	
α-лактальбумин	Термолизин	INY f (100-103)	8,0	-	[117]
		INYW f (101-104)	0,6	-	
		LDQW f (115-118)	0,5	-	
β-лактоглобулин	Королаза РР	WYSLAMAASDI f (19-29)	-	2,621	[106]
		MHIRL f (145-49)		0,306	
		VEEL f (42-46)		0,799	
	Термолизин	FNPTQ f (151-155)	-	-	[111]
		LQKW f (58-61)	-	-	
		LDTDYKK f (95-101)	-	-	
	Трипсин	VAGTWY f (15-20)	-	5,63	[118]
Алкалаза	WYSL f (19-22)	-	-	[119]	

В исследованиях Sadat с соавторами после гидролиза молочной сыворотки термолизинном были идентифицированы пептиды из α-лактальбумина с антиоксидантными свойствами. Наиболее эффективную антиоксидантную активность проявляли фрагменты, содержащие по меньшей мере один остаток тирозина или триптофана, расположенный на одном из концов последовательности: INYW и LDQW. Они обладали способностью поглощать радикалы, в 5 и 10 раз соответственно выше, чем у галловой кислоты и Тролокса, испытанных в тех же экспериментальных условиях [117].

Power O. с соавторами исследовали гидролизат молочной сыворотки, полученный с использованием фермента трипсин [118]. Интересно, что из этого гидролизата был идентифицирован фрагмент β-лактоглобулина VAGTWY f (15–20), являющийся многофункциональным биоактивным пептидом, поскольку он

проявляет как значительную антиоксидантную активность (значение ORAC-FL 5,63 ммоль ТЭ/мг белка) (таблица 1.4), так и гипотензивную (таблица 1.5) и антимикробную активности, как было показано в раннем исследовании Pihlanto-Leppälä с соавторами [121].

Российскими и американскими учеными также был исследован биокатализ сывороточных белков различными протеазами, а именно трипсином, пепсином, алкалазой, протамексом, флаворзимом и протеазой N [113,114] (рисунок 1.4).

Гидролизат, вырабатываемый алкалазой 2.4L, показал наивысшую антиоксидантную активность, были выделены семь различных пептидов, демонстрирующих сильную антиоксидантную активность. Антиоксидантный пептид WYSL проявлял наивысшую активность по удалению радикалов DPPH и активность по поглощению супероксидных радикалов со значениями концентраций полумаксимального ингибирования 273,63 мкМ и 558,42 мкМ соответственно [119].

Гидролиз сыворотки также может быть перспективным с точки зрения технологии пищевых продуктов, поскольку ионы переходных металлов способствуют окислению липидов, а их хелатирование помогает замедлить перекисное окисление и впоследствии предотвратить прогорклость пищи. Это особенно актуально при рассмотрении потенциальных рисков для здоровья, связанных с синтетическими антиоксидантами [122].

С этой точки зрения антиоксидантная активность пептидов, присутствующих в продуктах из сыворотки, может удовлетворить растущий спрос на более натуральные антиоксиданты, направленные на здоровье человека и качество пищи.

Проанализировав данные, изложенные в данном разделе, можно заключить, что с точки зрения конверсии сывороточных белков с получением гидролизатов, демонстрирующих сильную антиоксидантную активность, наиболее перспективно использовать ферментные препараты Алкалаза и Термолизин.

### Антигипертензивная активность

Риск развития сердечно-сосудистых заболеваний напрямую связан с уровнем артериального давления (АД) [46]. Оно контролируется рядом взаимодействующих биохимических путей. Контроль артериального давления частично связан с ренин-ангиотензиновой системой. Ангиотензин I-превращающий фермент (АПФ, пептидилдипептидгидролаза, ЕС 3.4.15.1) является многофункциональным эктоэнзимом, который локализуется в различных тканях организма, таких как мозг, сердце, легкие, печень, почки, желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), поджелудочная железа, селезенка, яички, гипофиз, надпочечник, костный мозг и даже плацента и пуповина играют важную роль в регуляции АД [40]. Ренин действует на ангиотензиноген, неактивный предшественник, тем самым высвобождая декапептид ангиотензин I. АПФ дополнительно удаляет С-концевой дипептид НL из ангиотензина I, что приводит к образованию ангиотензина II, мощного вазоконстриктора. АПФ также удаляет С-концевой дипептид из брадикинина (мощного вазодилататора), что приводит к образованию неактивных пептидных фрагментов. Следовательно, ингибирование АПФ в основном приводит к гипотензивному эффекту, но может также влиять на различные регуляторные системы, вовлеченные в иммунную защиту и деятельность нервной системы [123]. Антигипертензивные пептиды представляют собой пептидные молекулы, которые при приеме внутрь в качестве гидролизатов или в составе более крупной молекулы пропептида могут снижать артериальное давление в организме посредством ингибирования фермента или ферментов, связанных с контролем артериального давления, в том числе АПФ [40,46]. Ингибирование АПФ является ключевой клинической целью для контроля артериального давления. Первые конкурентные ингибиторы АПФ были описаны как встречающиеся в природе пептиды, выделенные из яда змеи [124].

Синтетические ингибиторы АПФ, такие как каптоприл, эналаприл, лизиноприл и эналаприл, чрезвычайно эффективны в регуляции артериального давления и используются в качестве клинических антигипертензивных препаратов [125]. В настоящее время многие ингибиторы АПФ коммерчески доступны в

различных странах в качестве монотерапевтических лекарств. Однако эти синтетические препараты продемонстрировали различные побочные эффекты, такие как аллергические реакции, кожные высыпания, кашель и нарушения вкуса [126]. Поэтому для контроля и лечения высокого кровяного давления отдается предпочтение поиску нетоксичных, безопасных, экономичных и инновационных ингибиторов АПФ.

Ингибирующие АПФ пептиды из белков молока получили особое внимание в связи с их потенциальными полезными эффектами при лечении гипертонии и отсутствию нежелательных побочных эффектов как от синтетических антигипертензивных препаратов. Обычно ингибирующие АПФ пептиды содержат от 2 до 20 аминокислотных остатков [46,127]. Данные пептиды можно получить путем ферментативного гидролиза молочных белков или путем ферментации с молочнокислыми бактериями. Наиболее распространенный способ получения биоактивных пептидов - высвобождение их путем ограниченного гидролиза с использованием панкреатических ферментов (трипсина, пепсина, химотрипсина). Выбор подходящего фермента для гидролиза белка является ключевым фактором в получении пептидов, которые демонстрируют более высокие уровни ингибирующего действия АПФ [128,129]. Активность пептида, ингибирующего АПФ, обычно выражают в виде значения  $IC_{50}$ , которое эквивалентно концентрации пептида, обеспечивающей 50% ингибирование активности АПФ. Ингибирующая активность АПФ также может быть выражена в виде индекса ингибирования АПФ или процентного ингибирования, достигаемого определенной концентрацией ингибитора (пептида) [40].

Высокая активность ингибирования АПФ наблюдается, если гидрофобные аминокислоты, включая ароматические аминокислоты, такие как триптофан (W), тирозин (Y), фенилаланин (F) или пролин (P), находятся на карбоксильном конце пептида. Кроме того, положительный заряд от остатков аргинина (R) и / или лизина (K) может увеличивать ингибирующую активность. Считается, что особенно в молочных белках низкомолекулярные пептиды, содержащие остатки пролина, проявляют очень сильную ингибирующую активность в отношении АПФ [46,127].

Для оценки действия антигипертензивных пептидов во многих исследованиях проводились эксперименты на животных со спонтанно-гипертоническими крысами (SHR). Было подтверждено, что некоторые ингибирующие АПФ пептиды *in vitro* проявляют слабую или нулевую антигипертензивную активность в экспериментах *in vivo* с использованием SHR. Поэтому пептиды классифицируют как гипотензивные, когда они снижают кровяное давление после экспериментов SHR [46]. Последовательности некоторых АПФ-ингибирующих и антигипертензивных пептидов, полученных из  $\alpha$ -лактальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина путем ферментативной обработки или ферментации молочнокислыми бактериями, суммированы в 1.5 [118,121,130-134].

D. Pan и Y. Guo в своей работе ферментировали молоко заквасочной культурой *Lactobacillus helveticus* LB10 с целью выработки пептидов, ингибирующих АПФ. Ферментированное молоко приводило к 75,46 % ингибированию активности АПФ. Авторами был идентифицирован АПФ-ингибирующий пептид с последовательностью RLSFNP f (148–153) из гидролизата  $\beta$ -лактоглобулина, и его  $IC_{50}$  при ингибировании активности АПФ составляло 177,39  $\mu$ M (таблица 1.3) [130,135].

В работах Tavares, T. с соавторами концентрат сывороточного белка подвергали ферментативному гидролизу протеазами из цветков *Synara cardunculus*. Гидролизат показал значение  $IC_{50}$  52,9  $\pm$  2,9 мг/мл, тогда как связанная пептидная фракция с молекулярной массой ниже 3 кДа составила 23,6  $\pm$  1,1 мг/мл. В последней фракции были обнаружены три пептида, соответствующих  $\alpha$ -лактальбумину KGYGGVSLPEW f (16-26), DKVGINYW f (97–104) и  $\beta$ -лактоглобулину DAQSAPLRVY f (33–42), с высокой ингибирующей АПФ активностью 0,80  $\pm$  0,1, 25,2  $\pm$  1,0 и 13,0  $\pm$  1,0 мг / мл соответственно (таблица 1.3).

Таблица 1.5 – АПФ-ингибирующие пептиды, полученные из сывороточных белков

Исходный белок	Фермент	Аминокислотная последовательность	IC <sub>50</sub>		Ссылка
			μМ	г/мл	
β-лактоглобулин <sup>a</sup> - Выражается в мкмоль/л	Пепсин и трипсин	GLDIQK f (9 – 14)	580	-	[25]
		VAGTWY f (15–20)	1682	-	
	Протеиназа К	IPA f (78–80)	-	41	[38]
	Трипсин	ПАЕК f (71–75)	63.70	-	[24]
		IPAVFK f (78–83)	144.80	-	
		ALPMHIR f (142–148)	42.60 <sup>a</sup>	-	[40]
		LAMA f (22–25)	1062	-	[7]
		LDAQSAPLR f (32–40)	635	-	
		VFK f (81–83)	1029	-	
	Пепсин, трипсин и химотрипсин	VAGTW f (15–19)	534	-	
		VLDTDYK f (94–100)	946	-	
		CMENSA f (106–111)	788	-	
ALPMH f (142–146)		521	-		
Ферментный препарат из <i>Lactobacillus helveticus</i> LB10	RLSFNP f (148–153)	177.39	-	[35]	
Ферментный препарат из цветков <i>Cynara cardunculus</i>	DAQSAPLRVY f (33–42)	-	13.0	[36,37]	
α-лактальбумин	Пепсин и трипсин	LAHKAL f (105–110)	621	-	[25]
		Трипсин	VGINYWLAHK f (99–108)	327	-
	WLAHK f (104–108)		77	-	
	Пепсин, трипсин и химотрипсин	YGL f (50–52)	409	-	
		Термолизин	VSLPEW f (21-26)	57	-
	GVSLEW f (20-26)		30	-	
	YGGVSLPEW f (18-26)		16	-	
	LKGYGGVSLPEW f (15-26)		83	-	
	Ферментный препарат из цветков <i>Cynara cardunculus</i>	KGYGGVSLPEW f (16-26)	-	0.80	[36,37]
		DKVGINYW f (97-104)	-	5.20	

Costa E.L. с соавторами использовали алкалазу для получения антигипертензивных гидролизатов из белков молочной сыворотки. Этот фермент представляет собой промышленную щелочную протеазу, которая очень стабильна в органических растворителях и служит катализатором для растворения N-защищенных аминокислот в водном растворе и органических растворителях и используется для получения оптически чистых пептидов. В работе авторов изолят сывороточного белка после предварительной денатурации гидролизовали алкалазой. Полученный гидролизат обладал умеренной ингибирующей активностью со значением  $IC_{50}$  0,68 мг/мл. Внутривентрикулярное введение гидролизата показало значительную антигипертензивную активность у спонтанно гипертонических крыс ( $163,8 \pm 5,9$  мм рт.ст), сходную после лечения каптоприлом ( $153,1 \pm 2,9$  мм рт.ст.) [129].

В работе Abubakar A. с соавторами сывороточный белок подвергали гидролизу одной из семи видов протеаз: при  $37^{\circ}C$  (трипсин, протеиназа К, актиназа Е, термолизин, папаин) и при  $25^{\circ}C$  (пепсин, химотрипсин) в течение 24 часов. Расщепленные образцы анализировали на ингибирующую активность АПФ и на изменения систолического артериального давления, вызванные у спонтанно гипертонических крыс после интубации желудка. Наиболее сильный депрессивный эффект на систолическое артериальное давление ( $-55$  мм рт.ст.) наблюдался через 6 ч после желудочной интубации белка молочной сыворотки, который переваривался протеиназой К. Было идентифицировано шесть пептидов из гидролизата, расщепленного протеиназой К. Трипептид IPA f (78–80) из  $\beta$ -лактоглобулина был наиболее активными ингибиторами АПФ с высокой ингибирующей активностью  $IC_{50}$  141,00 мг/мл (таблица 1.35), показавший наибольшую антигипертензивную активность у спонтанно гипертонических крыс [133,135].

В исследовании Otte, J. с соавторами в катализированном термолизином гидролизате  $\alpha$ -лактальбумина было идентифицировано четыре пептида с молекулярной массой менее 1000 Да с высокой АПФ-ингибирующей активностью VSLPEW f (21-26), GVSLPEW f (20-26), YGGVSLPEW f (18-26),

LKGYGGVSLPEW f (15-26) со значениями  $IC_{50}$  57, 30, 16, 83  $\mu$ M соответственно (таблица 1.5). Все пептиды содержали С-концевую последовательность -PEW, соответствующую аминокислотным остаткам 24-26 в  $\alpha$ -лактальбумине [134].

Pihlanto-Leppälä с соавторами сообщили о пептидах с активностью, ингибирующей АПФ, соответствующих последовательностям из  $\alpha$ -лактальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина (таблица 1.5). В одном из их исследований концентрат подсырной сыворотки с содержанием белка 3,6% сначала был ферментирован молочнокислыми микроорганизмами, затем полученный сгусток был подвергнут гидролизу с использованием протеолитических ферментов животного происхождения пепсином и трипсином. По результатам исследования наиболее активными ингибиторами АПФ среди сывороточных гидролизатов были пептиды с молекулярной массой менее 1000 Да. Из  $\alpha$ -лактальбумина был идентифицирован пептид LANKAL f (105–110) со значением  $IC_{50}$  621  $\mu$ M, из  $\beta$ -лактоглобулина были идентифицированы пептиды GLDIQK f (9–14) и VAGTWY f (15–20) со значениями  $IC_{50}$  580  $\mu$ M и 1682  $\mu$ M соответственно [121,135].

В другом исследовании этих же авторов концентрат подсырной сыворотки был подвергнут гидролизу ферментом трипсин и комбинацией из ферментов (пепсин, трипсин, химотрипсин). Выявленные пептиды с ингибирующей АПФ активностью представляли собой фракции  $\alpha$ -лактальбумина YGL f (50-52), VGINYWLANK f (99-108) и WLANK f (104-108) со значениями  $IC_{50}$  409  $\mu$ M, 327  $\mu$ M и 77  $\mu$ M соответственно, и фракции  $\beta$ -лактоглобулина VAGTW f (15–19) ( $IC_{50}$  534  $\mu$ M), LAMA f (22-25) ( $IC_{50}$  1062  $\mu$ M), LDAQSAPLR f (32-40) ( $IC_{50}$  635  $\mu$ M), VFK f (81-83) ( $IC_{50}$  1029  $\mu$ M), VLDTDYK f (94-100) ( $IC_{50}$  946  $\mu$ M), CMENSA f (106-111) ( $IC_{50}$  788  $\mu$ M) и ALPMH f (142-146) ( $IC_{50}$  521  $\mu$ M). По результатам исследования наиболее активным ингибитором АПФ в сыворотке был фрагмент из  $\alpha$ -лактальбумина WLANK f (104–108) со значением  $IC_{50}$  77  $\mu$ M, полученный с помощью фермента трипсин. Данные представлены в таблице 1.5 [121].

В работе Mullally с соавторами также с использованием фермента трипсин был найден пептид из  $\beta$ -лактоглобулина ALPMHIR f (142–148) с высокой ингибирующей активностью  $IC_{50}$  42,6 мкмоль/л (таблица 1.5). Полученный



гидролизат сывороточного белка (ГСБ) не обладал эффективностью каптоприла ( $IC_{50}$  0,006 мкмоль/л), препарата, обычно используемого для лечения гипертонии, однако он показал значительную антигипертензивную активность *in vivo* у спонтанно гипертонических крыс после перорального приема. Идентифицированный пептид также был устойчив к дальнейшему перевариванию пепсином и гидролизовался в очень малой степени химотрипсином [136].

В исследовании Power O. с соавторами при гидролизе коммерческого (Davisco)  $\beta$ -лактоглобулина ферментом трипсин было получено большое количество мощных короткоцепочечных пептидов (от 2 до 10 аминокислот), ингибирующих АПФ, содержащие ароматические или гидрофобные остатки на своем С-конце. В частности, в гидролизате было идентифицировано два новых пептида с АПФ-ингибирующей активностью, а именно ПАЕК f (71–75) и PAVFK f (78–83), имеющие значения  $IC_{50}$   $63,7 \pm 7,22$  и  $144,8 \pm 25,3$   $\mu$ М, соответственно [118,135].

Большинство ингибирующих АПФ пептидов, показанных в таблице 1.5, представляют собой относительно короткие последовательности с низкими молекулярными массами. АПФ предпочитает субстраты или ингибиторы, содержащие гидрофобные (ароматические или разветвленные боковые цепи) аминокислотные остатки в каждом из трех С-концевых положений. Некоторые пептиды, ингибирующие АПФ, содержат лизин (K) или аргинин (R) на С-конце. Удаление остатка аргинина (R) на С-конце может привести к неактивным аналогам, например, ALPMH, полученный гидролизом комплексом ферментных препаратов пепсин, трипсин и химотрипсин, имеет значение  $IC_{50}$  521,00 мкМ и ALPMHIR, полученный гидролизом трипсином, имеет значение  $IC_{50}$  42,60 мкМ (таблица 1.5) [40,121,136].

Таким образом, исходя из совокупности всех вышперечисленных результатов исследований можно заключить, что фермент трипсин является перспективным для высвобождения многофункциональных биоактивных пептидов из нативного белка для получения гидролизатов с высокой АПФ-ингибирующей активностью. Кроме того, фракционирование гидролизатов способствует

повышению ингибирующей АПФ активности, поскольку пептиды с низкой молекулярной массой проявляют повышенный гипотензивный эффект [135].

### Антимикробная активность

Об антимикробных свойствах молока впервые сообщается в 1930 г., когда стало известно, что молоко обладает активными ингибиторами против роста стрептококковых бактерий [137]. Антимикробная активность молока в основном связана с иммуноглобулинами и неиммунными белками, такими как лактоферрин, лактопероксидаза и лизоцим. Биологически активные пептиды, обладающие антимикробным действием, имеют потенциальное применение как в отношении качества пищевых продуктов, так и в отношении безопасности и здоровья человека. Среди сывороточных белков лактоферрин, лизоцим и их протеолитические фрагменты являются наиболее изученными в отношении антимикробной активности. Антимикробный потенциал пептидов, зашифрованных в последовательностях  $\beta$ -лактоглобулина и  $\alpha$ -лактальбумина, исследовался в меньшей степени [138,139]. В этом разделе рассматриваются антимикробные свойства гидролизатов и пептидов, полученных из концентрата и изолята молочной сыворотки, а также очищенных  $\beta$ -лактоглобулина и  $\alpha$ -лактальбумина, которые являются основными сывороточными белками. Известно, что для получения гидролизатов с антимикробными свойствами гидролиз обычно проводят с коммерческими протеазами, такими как трипсин, химотрипсин и пепсин. Антимикробный потенциал гидролизатов и пептидов сывороточного белка в основном оценивают по воздействию *in vitro* на рост микробов. После идентификации пептидов последовательности синтезируют и обычно тестируют на бактериальные штаммы для подтверждения антимикробной активности. Известные антимикробные пептиды, представленные в таблице 1.6, являются мощными ингибиторами роста широкого спектра нежелательных микроорганизмов, представляющих опасность как для здоровья, так и для качества пищевых продуктов (таблица 1.6) [140-143].

Таблица 1.6 – Антимикробные пептиды, полученные из сывороточных белков

Исходный белок	Фермент	Аминокислотная последовательность	Антимикробная активность	Ссылка
β-лактоглобулин	трипсин + химотрипсин	IDALNENK f (84–91)	В основном грамположительные бактерии ( <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>L. monocytogenes</i> )	[140]
		TPEVDDEALEK f (125–135)		
	Свиной пепсин	KVAGT f (14–18)	В основном грамположительные бактерии ( <i>Listeria ivanovii</i> )	[141]
		VRT f (123–125)		
		IRL f (147–149)		
		PEGDL f (50–54)	В основном грамотрицательные бактерии ( <i>Escherichia coli</i> )	
		LPMH f (143–146)	Слабая активность в отношении грамположительных ( <i>Listeria ivanovii</i> ) и грамотрицательных ( <i>Escherichia coli</i> ) бактерий	
	EKF f (134–136)			
	Бычий трипсин	VAGTWY f (15–20)	Только грамположительные бактерии	[142]
		AASDISLLDAQSAPLR f (25–40)		
IPAVFK f (78–83)				
VLVLDTDYK f (92–100)				
α-лактальбумин	Свиной пепсин	KVGIN f (117–121)	В основном грамотрицательные бактерии ( <i>Escherichia coli</i> )	[140]
	Свиной трипсин	EQLTK f (1–5)	В основном грамположительные бактерии	[142]
		GYVSLPEWVCTTF/ALCS EK f (17–31)S-S(109–114)		
Бычий химотрипсин	CKDDQNP/ISCDKF f (61–68)S-S(75–80)			

В работе Demers-Mathieu V. с соавторами после гидролиза молочной сыворотки с использованием коммерческого препарата, содержащего трипсин и химотрипсин, проводили последовательное концентрирование гидролизата сначала через ультрафильтрационную мембрану с отсечкой пор 10 кДа, затем полученный пермеат гидролизата молочной сыворотки подвергали нанофильтрации с отсечкой пор 3 кДа с получением концентрата и пермеата, которые затем тестировали в качестве ингибиторов *Listeria*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Было продемонстрировано, что фракция концентрата обладает более высоким антимикробным потенциалом, чем фракция пермеата. Пептидный

анализ показал, что концентрат был богат анионными пептидами длиной более восьми аминокислотных остатков. Были синтезированы два отрицательно заряженных пептида, идентифицированных из гидролизатов, а именно IDALNENK f (84–91) и TPEVDDEALEK f (125–135) из  $\beta$ -лактоглобулина, и их антибактериальный эффект в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий был намного выше, чем проявленный катионным пептидом SAPLRVY f (36–42) из  $\beta$ -лактоглобулина. Кроме того, было продемонстрировано, что отрицательно заряженные пептиды были в основном активны по отношению к грамположительным бактериям, и что более высокий отрицательный заряд приводил к более выраженному ингибированию грамположительных бактерий [140].

Theolier J. с соавторами в своей работе оценивали антимикробную активность трех ультрафильтрационных гидролизатов молочной сыворотки, полученных с использованием пепсина, трипсина и химо tripsина, в отношении пищевых патогенных микроорганизмов (*Listeria ivanovii* и *Escherichia coli*). Фракции сывороточных белков с молекулярной массой менее 10 кДа, гидролизованные в течение 45–90 мин пепсином, проявляли значительное ингибирование в отношении *Listeria ivanovii* при концентрации 75 мг/мл. При более низких концентрациях активности не наблюдалось. Гидролизаты, полученные с использованием ферментов трипсин и химо tripsин, не проявляли антимикробную активность. Идентификация пептидов из фракций, гидролизованных пепсином, дала шесть последовательностей, проявляющих различные характеристики заряда при нейтральном pH, причем катионные пептиды оказались наиболее активными в отношении грамположительных бактерий, как показано в таблице 1.6. Фракционирование 60-минутного гидролизата давало 5 антибактериальных фракций с минимальными ингибирующими концентрациями, составляющими от 20 до 35 мкг / мл. Эти фракции содержали короткие пептиды, ранее не идентифицированные как антимикробные. Фрагмент KVAGT f (14-18)  $\beta$ -лактоглобулина очень близок к последовательности, ранее идентифицированной как антибактериальная, и обнаружен в антимикробных последовательностях

различного происхождения. Пять других пептидов, полученных из  $\beta$ -лактоглобулина, и один фрагмент из  $\alpha$ -лактальбумина, KVGIN f (117–121) также были идентифицированы как антибактериальные. Идентифицированные пептиды не точно соответствуют действию пепсина, что указывает на модифицированный протеолиз неизвестного происхождения [141].

В работе Pellegrini A. с соавторами сообщается, что протеолитическое расщепление  $\alpha$ -лактальбумина пепсином, трипсином и химотрипсином дало три полипептидных фрагмента с бактерицидными свойствами, представленные в таблице 1.6 [142]. Два фрагмента были получены из триптического расщепления. Один представлял собой пентапептид с последовательностью EQLTK f (1–5), а другой, GYGGVSLPEWVCTTF/ALCSEK f (17–31) S-S (109–114), состоял из двух полипептидных цепей, удерживаемых вместе дисульфидным мостиком. Фрагментация  $\alpha$ -лактальбумина химотрипсином дала CKDDQNPH/ISCDKF f (61–68) S-S (75–80), также полипептид, состоящий из двух полипептидных цепей, удерживаемых вместе дисульфидным мостиком. Пептиды, полученные в результате гидролиза пепсина, не продемонстрировали антимикробной активности [142]. Эти три  $\alpha$ -лактальбумин-фрагмента были синтезированы и, как сообщается, в основном активны против тестируемых грамположительных бактерий, особенно *Bacillus subtilis*. Интересно, что, хотя EQLTK ингибировал *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus lentus*, в отношении *Staphylococcus aureus* ингибирование не наблюдалось. Грамотрицательные бактерии были слабо восприимчивы к бактерицидному действию полипептидов [143]. В последующей работе Pellegrini A. с соавторами указали, что гидролиз  $\beta$ -лактоглобулина трипсином высвобождает четыре антибактериальных пептида VAGTWY f (15-20), AASDISLLDAQSAPLR f (25-40), IPA VFK f (78-83) и VLVLDTDYK f (92-100) (таблица 1.6). Синтез и оценка диапазона их активности показали, что они были активны только против грамположительных бактерий, главным образом *B. subtilis*. Было показано, что ни один из этих пептидов не ингибирует гриб *Candida albicans*. Фактически, определение противогрибковой активности пептидов,

высвобождаемых из основных белков молочной сыворотки, представляется менее эффективным [144].

В работе Viziulevicius, G.A. с соавторами белки молока, в том числе  $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -лактальбумин, гидролизовали трипсином, химотрипсином, пепсином и панкреатином. Сообщается, что полученные гидролизаты обладают антимикробной активностью. Для оценки антимикробной активности использовались высушенные биомассы 19 штаммов бактерий, относящихся к видам *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Methylococcus*, *Proteus* и *Streptomyces*, а также пяти штаммов грибов (дрожжей), относящихся к видам *Candida*, *Rhodotorula* и *Saccharomyces*. Гидролизаты казеина были наиболее активными стимуляторами, за которыми следовали гидролизаты  $\alpha$ -лактальбумина,  $\beta$ -лактоглобулина, сывороточного альбумина и овальбумина (в порядке убывания активности). В порядке убывания влияния используемого протеолитического фермента на антимикробную активность последовательность выглядела следующим образом: триптические гидролизаты, затем пептические гидролизаты, химотриптические гидролизаты и панкреатические гидролизаты [145].

Pihlanto-Leppälä с соавторами сообщили о бактериостатической активности гидролизатов  $\alpha$ -лактальбумина, полученных с пепсином и трипсином, и активности гидролизатов  $\beta$ -лактоглобулина, полученных с алкалазой, пепсином и трипсином, в отношении люминесцентного штамма *E.coli* JM103 [146]. Ультрафильтрация гидролизатов пепсина и трипсина  $\alpha$ -лактальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина позволяет предположить, что пептиды в пределах с молекулярной массой менее 1 кДа были наиболее эффективными в ингибировании этой бактерии. Кроме того, это исследование продемонстрировало, что гидролизаты, полученные с различными ферментами, влияли на рост бактерий противоположными способами, то есть некоторые гидролизаты увеличивали бактериальную активность и рост по сравнению с контролем. Было отмечено, что в присутствии 0,05 г/мл гидролизата  $\alpha$ -лактальбумина, гидролизованного пепсином, бактериальная активность составляла 32% от контрольного эксперимента, и, если добавляли такое же количество триптического гидролизата  $\alpha$ -лактальбумина, активность составляла

38% от контроля. Напротив, в присутствии 0,1 г/мл гидролизатов, полученных алкалазой, пепсином или трипсином, активность была на 11,9, 20,5 или 40,5% ниже, чем у контрольного роста после 6 ч культивирования. Наибольшее ингибирование активности наблюдалось при комбинированном гидролизе. Во всех случаях ингибирование активности наблюдалось во время логарифмической фазы и первых 8 ч роста, после 24 ч роста различий между контрольной и сывороточной пробами не наблюдалось. Некоторые из гидролизатов усиливали активность *E.coli* JM103. Например, в присутствии  $\alpha$ -лактальбумина, гидролизованного алкалазой, активность была выше, чем в случае негидролизованного белка. Фракция пермеата с молекулярной массой менее 1 кДа из  $\alpha$ -лактальбумина, гидролизованного пепсином и трипсином, проявляла антимикробную активность наиболее эффективно и составляла 49,6% от контрольных значений роста через 4 часа и 81,2% через 6 часов. В случае фракций  $\beta$ -лактоглобулина, фракция пермеата с молекулярной массой менее 1 кДа была наиболее эффективной после 4-часового культивирования и составляла 34%, после 8-часового культивирования – 45,7% от контрольных значений роста [146].

Oevermann A. с соавторами в своей работе сообщили, что протеолитическое расщепление альбумина,  $\alpha$ -лактальбумина,  $\beta$ -лактоглобулина и лизоцима трипсином, химотрипсином и пепсином позволило получить несколько пептидных фрагментов с активностью против вируса простого герпеса человека типа 1 (ВПГ-1). Химическая модификация этих пептидных фрагментов 3-гидроксифталевым ангидридом (3-HP) генерировала пептиды с противовирусной активностью, однако это почти всегда сочеталось с цитотоксическим действием на клетки Vero. В целом, результаты исследований авторов показывают, что целевая химическая модификация некоторых натуральных продуктов может обеспечить соединения, эффективные против инфекции HSV-1 [144].

Как представлено в 1.6 большинство антимикробных пептидов от основных белков молочной сыворотки обычно проявляют меньшую активность против грамотрицательных бактерий, что может быть результатом отталкивания между анионными пептидом и отрицательно заряженными липополисахаридами на

наружной мембране этих бактерий [143]. Demers-Mathieu с соавторами указали, что антимикробная активность связана с отрицательно заряженными пептидами, содержащими более 8 аминокислотных остатков, однако положительно заряженный пептид SAPLRVY f (36–42) из  $\beta$ -лактоглобулина показал пониженную антимикробную активность в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий [140]. Точно так же пептид IPA VFK f (78–83) из  $\beta$ -лактоглобулина, который обладает катионными и гидрофобными свойствами, был эффективен только против грамположительных бактерий. Однако Pellegrini с соавторами модифицировали последовательность триптического фрагмента  $\beta$ -лактоглобулина VLVLDTDYK f (92–100), который ингибировал только грамположительные бактерии, с получением пептида VLVLDT R YK K, который показал пониженную активность против *B. subtilis*, но был способен ингибировать *Escherichia coli* и *Bordetella bronchiseptica*, предполагая, что катионный характер может быть важным для пептидов, чтобы проявлять активность против грамотрицательных бактерий. Как сообщают Pellegrini с соавторами, повышенная гидрофобность фрагмента  $\alpha$ -лактальбумина (GYGGVSLPEWVCTTF ALCSEK f ((17–31) SS (109–114)), полученного заменой лейцина на изолейцин (что приводит к последовательности GYGGVSIPEWVCTTF ALCSEK), уменьшил его антимикробную активность, указывая на то, что одна только гидрофобность не является критической детерминантой для антибактериального эффекта этого фрагмента [142].

Попытки объяснить антимикробную активность с помощью анализа свойств отдельных пептидов в большинстве случаев бесплодны. Принимая во внимание разнообразие антимикробных пептидов  $\alpha$ -лактальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина, трудно установить, какой фактор является наиболее важным для наблюдаемых активностей. Вероятно, антимикробный потенциал идентифицированных пептидов является результатом множества характеристик, таких как аминокислотная последовательность, размер и состав, вторичная структура (особенно спиральность), суммарный заряд, изоэлектрическая точка, распределение заряда и амфипатичность, которые могут вносить



дифференциальный вклад к ингибирующему действию, наблюдаемому в отношении бактерий [140,147,148].

С технологической точки зрения как белковый субстрат, так и специфичность фермента, воздействуя на разные пептидные связи в белковом субстрате и приводя к образованию отдельных пептидов, играют значительную роль в антибактериальном профиле гидролизатов [46]. Исходя из результатов описанных выше исследований можно заключить, что наилучшее воздействие на высвобождение из нативных сывороточных белков пептидов с антимикробной активностью оказывают эндопептидазы поджелудочной железы трипсин и химотрипсин.

#### Противодиабетическая активность

Диабет второго типа является метаболическим нарушением, характеризующимся нарушением секреции инсулина  $\beta$ -клетками и резистентностью к инсулину в тканях, состоянием, которое связано с развитием ряда осложнений, включая гипертонию и сердечно-сосудистые заболевания [149]. Учитывая распространенность диабета 2 типа (по оценкам, затрагивающего 370 миллионов человек) и его тенденцию к увеличению, разрабатываются различные стратегии для правильного лечения гипергликемии [149,150].

Сообщается, что пероральное введение сывороточных белков и их гидролизатов положительно влияет на контроль уровня глюкозы в крови и инсулинотропные реакции у людей [151]. Подобные эффекты описаны на животных моделях и  $\beta$ -клетках поджелудочной железы BRIN-BD11 [152]. Nongonierma A. B. с соавторами обнаружили, что гидролизаты сывороточного белка, обогащенные свободными аминокислотами и гидрофильными пептидами, могли быть ответственны за усиление инсулинотропного ответа клеток BRIN-BD11 [153]. Влияние сывороточных белков и их гидролизатов на гликемию, как считают Jakubowicz с соавторами, опосредовано *in vivo* высвобождением или присутствием биологически активных пептидов и аминокислот из сывороточных белков, которые могут стимулировать секрецию гормонов кишечника, а также действовать как ингибиторы дипептидилпептидазы IV (DPP IV) [151].

Роль пептидов, полученных из молочного белка, в качестве противодиабетических агентов вызывает большой интерес. Множество работ посвящено изучению ингибирования дипептидилпептидазы IV (DPP-IV), метаболического фермента, с различными пептидами, полученными из пищевых белков [149]. Во время постпрандиальной фазы DPP-IV способен расщеплять инкретины – гормоны желудочно-кишечного тракта, которые вырабатываются в ответ на прием пищи и вызывают стимуляцию выработки инсулина. К инкретинам относятся два гормона: глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1) и глюкозозависимый инсулиотропный полипептид (ГИП). Расщепление инкретина приводит к их инактивации, которая вызывает потерю их инсулиотропной активности [154]. Ингибиторы DPP-IV и  $\alpha$ -глюкозидазы, которые относятся к классу глиптинов, представляют собой два класса фармакотерапевтических агентов, используемых для лечения диабета 2 типа в качестве средства регулирования уровня глюкозы в сыворотке крови после приема пищи. Сообщалось о незначительных побочных эффектах, связанных с использованием глиптинов [149,155]. В этом контексте может представлять интерес поиск природных диетических соединений, которые не связаны с какими-либо неблагоприятными побочными эффектами. Эффективность большинства пептидов, ингибирующих DPP-IV, полученных из пищевых белков, идентифицированных в литературе, как правило, в 1000 раз меньше, чем у глиптинов [149,156]. В настоящее время наиболее мощным пептидом, ингибирующим DPP-IV, идентифицированным в пищевых белках, является Пе-Pro-Пе (дипротин А) со значением  $IC_{50}$  4,7  $\mu$ М, который присутствует в пищевых белках, таких как к-казеин или овотрансферрин из куриного яйца [149,155].

Разнообразные белки рассматриваются как предшественники пептидов, ингибирующих DPP IV [157]. В различных исследованиях подходы *in silico* выявили несколько пептидов, зашифрованных в аминокислотных последовательностях пищевых белков, которые могут действовать как ингибиторы DPP IV, включая белки молочной сыворотки крупного рогатого скота [149,153,155,156,158]. Последовательности некоторых пептидов, способных

ингибировать активность DPP IV, суммированы в таблице 1.7 [118,149,155,159-162].

В работах Nongonierma с соавторами была исследована ингибирующая DPP-IV активность гидролизата сывороточного белка, полученного с использованием пищевого фермента Королаза PP [149]. Значение ингибирующей концентрации полученного гидролизата  $IC_{50}$  составляло  $1,34 \pm 0,11$  мг/мл. Имитация желудочно-кишечного тракта гидролизата сывороточного белка увеличивала его ингибирующий потенциал DPP IV ( $IC_{50} = 1,02$  мг / мл). Фракционирование гидролизата сывороточных белков через мембрану с размером пор 5 кДа с последующим фракционированием полученного пермеата с использованием мембраны 2 кДа привело к обогащению пептидов, ингибирующих DPP IV. Значение  $IC_{50}$  пермеата 5 кДа ( $0,95 \pm 0,16$  мг/мл) была значительно выше по сравнению с пермеатом 2 кДа ( $0,48 \pm 0,11$  мг/мл). Пермеаты, генерируемые через УФ мембраны с размером пор 5 и 2 кДа, обладали более сильным ингибирующим DPP-IV эффектом, чем концентраты, однако были примерно в 500 раз менее эффективным, чем лекарственный препарат дипротин А ( $IC_{50} = 0,001454 \pm 0.000218$  мг / мл [149,153].

В работе Uchida с соавторами сообщалось, что гидролизат  $\beta$ -лактоглобулина, полученный с использованием фермента трипсин, снижал уровень глюкозы в крови у мышей по сравнению с контрольной группой после перорального теста на толерантность к глюкозе [149]. Этот гидролизат был способен ингибировать DPP IV *in vitro* ( $IC_{50}$  210 мкМ), авторами было предположено, что пептид VAGTWY f (15-20) из  $\beta$ -лактоглобулина является основным соединением, ответственным за этот эффект, демонстрируя  $IC_{50}$  174  $\mu$ М [149,159].

В работе Power O. с соавторами коммерческий (Davisco)  $\beta$ -лактоглобулин был использован в качестве субстрата для приготовления гидролизата с использованием фермента трипсин. Полученный гидролизат ингибировал DPP IV со значением  $IC_{50}$  1,6 мг/мл, также демонстрируя антиоксидантную и ингибирующую АПФ активность [118,149]. Гидролизат фракционировали через мембраны с размером пор 1, 2 и 5 кДа. Диафильтрационные пермеаты,

генерируемые через мембраны с размером пор 5 и 2 кДа, показали повышенное ингибирование DPP IV со значениями  $IC_{50}$  0,58 и 0,53 мг / мл соответственно, хотя концентраты диафильтрации не оказывали влияния на DPP IV, указывая на то, что пептиды с низкой молекулярной массой ответственны за наблюдаемую биологическую активность [149]. Из этого гидролизата авторы также идентифицировали пептид VAGTWY f (15-20) как наиболее сильный ингибитор DPP IV ( $IC_{50}$  74,9  $\mu$ M), и была продемонстрирована ингибирующая активность DPP IV IPA VFK и TPEVDDEALEK (таблица 1.7) [118]. Интересно, что VAGTWY является многофункциональным биоактивным пептидом, поскольку он также проявлял значительную антиоксидантную и АПФ-ингибирующую активность (таблицы 1.5 и 1.6) [149]. Кроме того, ранее сообщалось, что VAGTWY, IPA VFK и TPEVDDEALEK обладают антимикробными свойствами в отношении грамположительных бактерий (таблица 1.7) [143].

В работе Silveira S.T. с соавторами сообщалось, что гидролизат концентрата сывороточного белка, полученного с трипсином, ингибирует активность DPP IV со значением  $IC_{50}$  1,51 мг / мл. Из этого гидролизата было идентифицировано шестнадцать пептидов из  $\beta$ -лактоглобулина, из которых пептиды IPA VF и IPA VFK продемонстрировали наиболее высокое ингибирование DPP IV (таблица 1.7) [160]. Кроме того, ранее было продемонстрировано, что пептид VLVLDTDYK из  $\beta$ -лактоглобулина ( $IC_{50}$  = 424,4  $\mu$ M) также обладает противомикробным действием (таблица 1.6) [143,149].

Lacroix и Li-Chan для оценки ингибирующей активности DPP IV молочных белков провели гидролиз казеината натрия, изолята сывороточных белков (ИСБ), концентрата молочного белка и сухого обезжиренного молока с использованием 12 коммерческих протеаз [158]. Полученные гидролизаты были подвергнуты перевариванию в имитационном желудочно-кишечном тракте с использованием системы пепсин-панкреатин. Гидролизат ИСБ, полученный после 60 мин обработки пепсином, показал более высокое ингибирование DPP IV ( $IC_{50}$  0,075 мг/мл), и дальнейший гидролиз панкреатином уменьшал ингибирующий потенциал DPP IV. Другие 11 коммерческих протеаз также использовались для

гидролиза ИСБ (60-минутная обработка) и, хотя пептические гидролизаты оставались лучшим ингибитором DPP IV (78% ингибирования DPP IV при 0,375 мг/мл), гидролизаты, полученные с использованием термолизина и Umamizyme K, также показали высокий уровень ингибирующей активности DPP IV (63 и 61%, соответственно, при 0,475 мг / мл) [149,158].

Lacroix и Li-Chan в другой работе гидролизовали пепсином в течение 60 минут изолят сывороточного белка, гидролизаты  $\alpha$ -лактальбумина,  $\beta$ -лактоглобулина, сывороточного альбумина и лактоферрина. Полученные гидролизаты были изучены на предмет их способности служить естественными источниками ингибиторов DPP-IV и  $\alpha$ -глюкозидазы. Хотя ингибирование активности DPP-IV наблюдалось во всех изученных пепсином сывороточных белках, гидролизат  $\alpha$ -лактальбумина показал наибольшую эффективность со значением  $IC_{50}$  0,036 мг/мл. И наоборот, только изолят сывороточного белка, гидролизаты  $\beta$ -лактоглобулина и  $\alpha$ -лактальбумина проявляли некоторую ингибирующую активность в отношении  $\alpha$ -глюкозидазы. Это исследование предполагает, что пептиды, вырабатываемые из сывороточных белков, могут оказывать двойное благотворное влияние на регуляцию гликемии и могут использоваться в качестве функциональных пищевых ингредиентов для лечения диабета 2 типа [149,163]. В последующей работе Lacroix и Li-Chan гидролизованный пепсином изолят сывороточного белка и  $\alpha$ -лактальбумин, проявляющие ингибирующую активность DPP-IV, последовательно фракционировали, и полученные активные фракции анализировали на составляющие их пептиды. Две фракции продемонстрировали более высокую ингибирующую активность DPP IV, со значениями  $IC_{50}$  0,216 и 0,081 мг/мл, соответственно, по сравнению с полным (нефракционированным) гидролизатом изолята сывороточного белка ( $IC_{50}$  = 0,075 мг / мл) [149,161]. После фракционирования гидролизатов  $\alpha$ -лактальбумина две фракции имели значения  $IC_{50}$  0,019 и 0,016 мг / мл соответственно, которые были более эффективными, чем нефракционированный гидролизат  $\alpha$ -лактальбумина ( $IC_{50}$  = 0,036 мг / мл [163]. Из этих экспериментов было продемонстрировано более высокое ингибирование DPP

IV фракциями гидролизата, обогащенными неполярными пептидами. Среди идентифицированных последовательностей было синтезировано 24 пептида, полученных из  $\alpha$ -лактальбумина, и 11 из  $\beta$ -лактоглобулина, и было оценено их влияние на активность DPP-IV. Среди синтезированных пептидов LKPTPEGDL и LKPTPEGDLEIL из  $\beta$ -лактоглобулина ( $IC_{50} = 45$  и  $57 \mu M$  соответственно) и WLAHKALCSEKLDQ из  $\alpha$ -лактальбумина ( $IC_{50} = 141 \mu M$ ) продемонстрировали более высокий ингибирующий потенциал к DPP IV (таблица 1.7) [149,161]. Однако эти пептиды были примерно в 10 раз менее эффективны, чем эталонный ингибитор дипротин А ( $4,7 \mu M$ ) [149,161].

Таблица 1.7 – Пептиды, полученные из сывороточных белков и обладающие ингибирующей активностью в отношении дипептидилпептидазы IV (DPP IV)

Исходный белок	Фермент	Аминокислотная последовательность	IC 50, $\mu M$	Ссылка	
$\beta$ -лактоглобулин	Нейтраза 0.8LTM	LKPTPEGDLEIL f (46-57)	74,0	[155]	
	Нейтраза 0.8LTM, затем пепсин	LKPTPEGDL f (46-54)	45,0		
		LKPTPEGDLE f (46-55)	42,0		
	<i>In silico</i>	IPA f (78-80)	49,0	[162]	
	Трипсин		VAGTWY f (15-20)	174,0	[159]
				74,9	[118]
			IPAVF f (78-82)	44,7	[160]
			IPAVFK f (78-83)	149,1	[160]
				143,0	[160]
			TPEVDDEALEK f (125-135)	578,0	[118]
		VLVLDTDYK f (92-100)	424,4	[160]	
	$\alpha$ -лактальбумин	Пепсин	LKPTPEGDL f (46-54)	45,0	[161]
			LKPTPEGDLEIL f (46-57)	57,0	
IPAVFKIDA f (78-86)			191,0		
WLAHKAL f (104-110)			286,0		
WLAHKALCSEKLDQ f (104-117)			141,0		
LAHKALCSEKL f (105-115)			165,0		
LCSEKLDQ f (110-117)			186,0		
TKCEVFRE f (4-11)			166,0		
IVQNNDSTEYGLF f (41-53)			337,0		
ILDKVGINY f (95-103)	263,0				

Дипротин А (IPI) и дипротин В (VPL) являются мощными ингибиторами DPP IV, проявляющими явное конкурентное поведение, действуя в качестве ферментных субстратов. В работе Tulipano G. с соавторами было показано, что *in vitro* оценка синтезированного пептида IPA, полученного из  $\beta$ -лактоглобулина

путем расщепления *in silico*, конкурентным образом ингибирует DPP IV со значением  $IC_{50}$  49  $\mu$ M [149,162]. Аналогично, конкурентное ингибирование DPP IV сообщалось для пептида IPAVFKIDA (из  $\beta$ -лактоглобулина), что может быть результатом его субстратоподобной структуры [161].

В работе Nongonierma A.B. с соавторами был изучен потенциал изолята молочных белков (ИМБ), гидролизованного нейтразой 0.8LTM, в качестве источника пептидов, ингибирующих DPP-IV [149,155]. Было показано, что изменение параметров гидролиза (то есть времени и температуры) может влиять на ингибирующую активность DPP-IV у получающихся гидролизатов ИМБ. Стабильность ингибирующих DPP-IV свойств гидролизатов ИМБ после инкубации с пищеварительными ферментами авторы оценивали с использованием протокола искусственного желудочно-кишечного пищеварения (SGID) *in vitro* с применением пепсина. В отобранных гидролизатах ИМБ авторами были идентифицированы пептид LKPTREGDLEIL f (46-57) из  $\beta$ -лактоглобулина (таблица 1.7) со значением  $IC_{50}$  DPP-IV 74  $\mu$ M, который в ходе SGID распадался на более короткие фрагменты, такие как LKPTREGDL f (46-54) и LKPTREGDLE f (46-55), которые также проявляли высокие ингибирующие свойства к DPP-IV (значения  $IC_{50}$  для DPP-IV 45 и 42  $\mu$ M соответственно) (таблица 1.7) [149,155]. Данные последовательности пептидов были обнаружены ранее в работе Lacroix, где также сообщается об их ингибирующих DPP-IV свойствах [161]. Также после искусственного желудочно-кишечного пищеварения было идентифицировано 2 последовательности пептидов из  $\beta$ -лактоглобулина TPEVDDEALEK f (125-135) и VLVLDTDYK f (92-100) со значениями  $IC_{50}$  для DPP-IV 320 и 424  $\mu$ M соответственно, и пептиды из лактоферрина WK f (268-269) WQ f (22-23) со значениями  $IC_{50}$  для DPP-IV 41 и 120  $\mu$ M соответственно [149,155].

Учитывая разнообразие пептидов и способы их действия, гидролизаты сывороточного белка или смеси в них пептидов могут действовать синергетически, приводя к большему ингибированию DPP IV по сравнению с отдельными пептидами [149,161]. В вышеприведенных работах показано, что стратегии фракционирования являются подходящими и осуществимыми методами,

направленными на избирательное обогащение ингибирующей активности DPP IV гидролизатов. Однако обычные лекарственные средства, используемые в качестве ингибиторов DPP IV, такие как ситаглиптин, являются гораздо более сильнодействующими ( $IC_{50}$  в наномолярном диапазоне), чем гидролизаты и пептиды сывороточного белка [149]. Таким образом, исследования *in vitro* предполагают потенциальное использование гидролизатов и пептидов сывороточного белка в качестве естественных комплементарных подходов, которые могут быть реализованы с помощью диетического вмешательства и пищевой терапии, для лечения диабета 2 типа путем ингибирования активности DPP IV и, следовательно, увеличения периода полувыведения гормонов инкретина [149,155,161].

Из исследований, приведенных выше, можно сделать вывод, что пептиды, ингибирующие DPP IV, идентифицированные из гидролизатов, обычно имеют молекулярные массы ниже 2 кДа, и большинство из них содержат пролиновые и / или гидрофобные аминокислотные остатки в своей последовательности [149,158]. Длина, суммарный заряд и полярность полученных из сыворотки пептидов сами по себе не оказывают предсказуемого влияния на ингибирующее действие или активность. Для ингибирования DPP IV наиболее важную роль играет аминокислотная последовательность пептидов [149]. Исходя из результатов описанных выше исследований можно заключить, что ферментные препараты нейтраза и трипсин продемонстрировали наилучшую специфичность по отношению к расщепляемой пептидной связи сывороточных белков и получение гидролизатов с высокой ингибирующей активностью в отношении DPP IV [149].

#### Методы оценки биофункциональных свойств

Использование *in vitro* методик является ключевым этапом оценки биофункциональных свойств биологически активных ингредиентов (компонентов), поступающих с пищей. Вместе с тем, эксперименты, проводимые в пробирке, позволяют давать количественную характеристику биофункциональных свойств соединений, не учитывая целый ряд факторов, имеющих значение в живых



системах. В связи с этим *in vitro* методики, проводимые в пробирке, все чаще дополняются исследованиями, проводимыми на культивируемых клетках, позволяющими оценивать биологические эффекты непосредственно в живых клетках [164].

*In vitro* тест-модели на основе культивируемых клеток человека и других млекопитающих в последние десятилетия получили широкое распространение для исследования различных биофункциональных свойств пищевых ингредиентов (компонентов): биодоступности, антиоксидантных, цитопротективных, гипотензивных, гипохолестеримических и ряда других эффектов [164,165]. Это обусловлено как этическими ограничениями проведения экспериментов на лабораторных животных, так и возможностью изучения эффектов, возникающих при воздействии биологически активных веществ непосредственно на клеточном уровне, что дает ключ к расшифровке молекулярных механизмов действия препаратов.

Многие пищевые ингредиенты в том числе, обладающие биофункциональными свойствами, могут подвергаться ферментации в кишечнике с потерей биологических свойств. В связи с этим оценка биодоступности играет ключевую роль в характеристике функциональных ингредиентов и продуктов, поступающих с пищей.

Для исследования биодоступности *in vitro* в настоящее время разработаны различные тест-системы, использующие как клетки кишечного происхождения (например, Caco-2, HT-29), так и клетки некишечного происхождения [166]. Среди последних, особо выделяются клетки почки собаки линии MDCK1, которые в ходе культивирования формируют поляризованный монослой с плотными контактами, имитирующими энтероциты. Для создания тест-модели культивируемые клетки в виде монослоя выращивают на специализированных мембранных вставках, создающих модель кишечной стенки. В экспериментах по определению *in vitro* биодоступности белково-пептидных гидролизатов, полученных биокаталитической конверсией белков подсырных сывороток использовалась линия культивируемых клеток MDCK1 (почка собаки), в качестве методики оценки

плотности межклеточных контактов в монослое клеток была проведена оценка трансэпителиального сопротивления с помощью мивольтметра Millicell ERS-2 (Millipore, США). Данный подход был ранее использован Samaranayaka A.G. с соавт. [167] для изучения биодоступности белково-пептидных гидролизатов с функциональными свойствами рыбного происхождения.

## **1.5 Особенности структуры аэрированных эмульсионных молочных продуктов. Механизм действия стабилизаторов структуры**

### **1.5.1 Пенообразование в белковых системах**

В общем виде роль белков в образовании и стабилизации пен на жидкой основе проиллюстрирована на рисунке 1.5.

Сразу после подачи газа образуется межфазная пленка газ-жидкость, стабильность которой зависит от поверхностного натяжения между газом и жидкостью. Уменьшение поверхностного натяжения способствует образованию межфазной пленки, что впоследствии способствует образованию пены [168-170]. Известно, что молочные белки хорошо диспергируются в воде и обладают как гидрофильными, так и гидрофобными группами, а также способностью переориентировать эти группы на границе воздух-вода [171,172].

Эти свойства позволяют им быстро диффундировать и адсорбироваться на межфазных поверхностях во время вспенивания, что приводит к снижению поверхностного натяжения. В межфазных областях белки разворачиваются и перестраивают полярные и неполярные группы в сторону водной и неводной фаз соответственно [170,172,173].

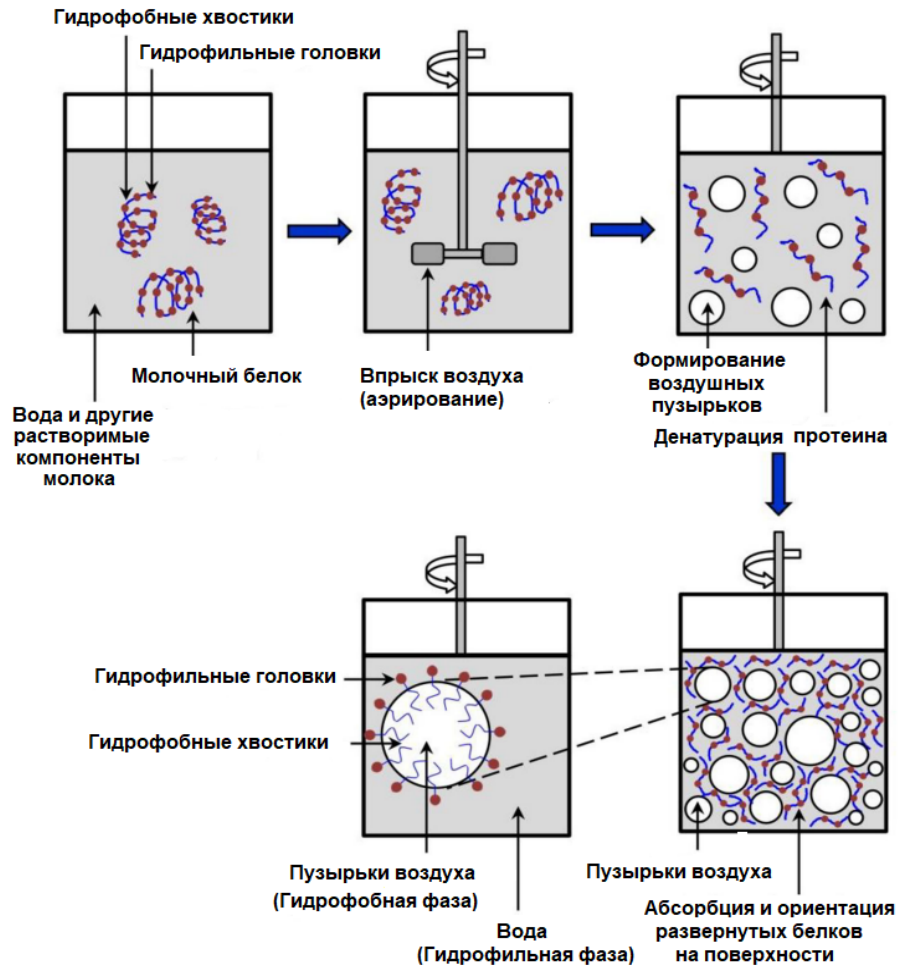


Рисунок 1.5 – Механизм образования и стабилизации жидких белковых пен

За этим следуют взаимодействия между развернутыми белками, в первую очередь электростатические и гидрофобные взаимодействия и водородные связи, что приводит к образованию прочной, высоковязкой и высокоэластичной межфазной пленки, которая помогает стабилизировать пузырьки воздуха [172,174]. Механизм этого процесса показан на рисунке 1.5.

Различия в структуре молочных белков приводят к различиям в скорости адсорбции и поверхностных свойствах адсорбированных слоев, что оказывает значительное влияние на пенообразование [175,176].

На процесс пенообразования в молочных системах оказывают влияние целый ряд факторов, например, концентрация белка в растворе. Помимо концентрации, на способность образовывать стойкие пены влияет структура белка и активная кислотность среды [177]. До определенного уровня увеличение содержания белка положительно влияет на пенообразование, в зависимости от типа белка. Например,

пенообразующая способность (ПС) казеината натрия и ИСБ возрастала с увеличением содержания белка с 0,25 до 8,0% (вес/вес) соответственно, после чего ПС обоих белковых растворов резко снижалась, подобную тенденцию описывали и в более ранних исследованиях [172,178]. Аналогичную тенденцию влияния увеличения содержания белка от 1 до 3% по массе на ПС раствора изолята сывороточного белка и его гидролизата установил Тамм с коллегами [179]. Улучшение стабильности пены при высокой концентрации белка связано с увеличением вязкости системы, которая замедляет коалесценцию пузырьков воздуха, и увеличением количества белка, доступного для образования высоковязкоупругих пленок на границе раздела [169,180]. Таким образом, пены, приготовленные с высокой концентрацией белка, более устойчивы и плотны [181]. Однако увеличение вязкости системы при высоком содержании белка препятствует диффузии белковых молекул к межфазным областям, за счет чего снижается пенообразующая способность молочных белков. Кроме того, при высоком содержании белка за счет быстрой стабилизации пузырьков воздуха в процессе пенообразования, увеличивается время, необходимое для получения определенного объема пены [168,172].

Как правило, рН свежего сырого молока в нормальных условиях составляет примерно 6,5-6,6 [171,182-184], и любые изменения рН приводят к изменению заряда, структуры, поверхностной активности, ионной силы и способности белков к внутри- и межмолекулярному взаимодействию [185], а также скорости диссоциации минералов и казеинов [186,187].

Все эти изменения, в свою очередь, влияют на доступность поверхностно-активных веществ, реологические свойства межфазных пленок и вязкость молока, а впоследствии и на пенообразование [172,188]. Сводка опубликованных результатов исследования влияния рН на ПС и устойчивость пены молока и молочных белков представлена в таблице 1.8.

Таблица 1.8 – Влияние pH на ПС и устойчивость пены молока и молочных белков

Наименование белкового раствора	Массовая доля сух. в-в	pH	Характер изменения ПС	Характер изменения стабильности пены	Ссылка
Восстановленное сухое обезжиренное молоко	9,60	6,6→5,5	Заметно улучшается	Заметно улучшается	[189]
		6,6→7,7	Слегка улучшается	Значительно улучшается	
	10,00	6,6→6,0	Слегка улучшается	Слегка улучшается	[190]
		6,6→7,8	Заметно улучшается	Значительно улучшается	
1,40	3,0→8,0	Заметно улучшается при pH от 4,5 – 8,0 Наивысшая ПС при pH 3,0 Наименьшая при pH 4,5	Не определена	[148]	
Изолят сывороточных белков	0,55	3,0→8,0	Наивысшая ПС при pH 4,0 – 4,5 Наименьшая при pH 3,0		
	5,00	4,0; 5,0; 7,0	Наивысшая ПС при pH 5,0 Наименьшая при pH 4,0	Наивысшая при pH 5,0 Наименьшая при pH 4,0	
Обезжиренное молоко	Нет данных	6,4→7,0	Улучшается	Сопоставима Наивысшая при pH 6,7	[192]
Казеинат натрия	0,10	3,0→6,8	Наименьшая при pH 4,6 Заметно снижается при pH 4,6 – 3,0; pH 4,6 – 6,8	Наименьшая при pH 5,0 Наивысшая при pH 6,8	[193]
КСБ	0,10	3,0→6,8	Наивысшая ПС при pH 4,2 Заметно снижается при pH 4,2 – 3,0; 4,2 – 4,6	Наивысшая при pH 4,5 – 5,0; Отклоняется за пределы pH	[172]
Мицеллярный казеин	10,00	6,0→11,0	Заметно и неуклонно снижается	Наименьшая при pH 6,0 Наивысшая при pH 9,0 Значительно Ухудшается при pH 10,0 – 11,0	[194]

## **1.6 Рассмотрение научно-практических подходов и решений в области создания устойчивых аэрированных молочных систем.**

### **1.6.1 Применение ферментативной обработки**

На сегодняшний день существует несколько направлений по улучшению технологических свойств и стабилизации структуры эмульсионных молочных продуктов, подвергнутых аэрированию. Среди них физические методы обработки компонентов, например, измельчение [195]. Одним из популярных является разработка фитолактатных систем, предусматривающая внесение в рецептуру продукта растительных белков [196]. Наиболее перспективным и востребованным направлением является применение в технологии эмульсионных продуктов модифицированных органических сред, таких как молоко или молочная сыворотка, в том числе подвергнутых биокаталитической конверсии [197].

В исследовании Pein D. с соавторами оценивали пенообразующую способность гидролизованного  $\beta$ -лактоглобулина, фракционированного из изолята сывороточного белка [198]. Общая концентрация  $\beta$ -лактоглобулина в изоляте была выше 98%, а средний выход составил 70%. Авторы работы улучшали межфазные свойства белка посредством частичного гидролиза  $\beta$ -лактоглобулина трипсином, пепсином или алкалазой в условиях рН статирования. В результате гидролиза пепсином было установлено как повышенное пенообразование, так и наилучшая стабильность пены, в то время как дренаж пены уменьшился более чем на 50% по отношению к пенам, полученным гидролизатами, обработанными трипсином и алкалазой [198].

Другой пример регулирования функционально-технологических свойств при помощи протеолиза описан в работе индийских ученых при разработке напитков, предназначенных для взбивания, состоящих из гидролизованного КСБ, сухого обезжиренного молока, какао, жидкой глюкозы, сахара и растительного жира. Гидролиз 10 %-ных растворов КСБ проводили с использованием грибковой протеазы и папаина с временными интервалами 20, 40 и 60 мин. Для получения гидролизата при помощи грибковой протеазы рН доводили до 7,6 с помощью 1 Н

NaOH, процесс происходил при 45 °С; в случае папаина рН составил 6,2, регулировку осуществляли при помощи 1 Н НСl, температура составила 55 °С для папаина.

После инактивации ферментов гидролизаты центрифугировали при 6000 RCF в течение 20 мин, супернатант собирали и лиофилизировали. Авторами зафиксировано возрастание влагоудерживающей способности с увеличением времени протеолиза в случае обоих ферментов, по сравнению с контролем более чем в 3 раза [199]. Это можно объяснить диссоциацией белков на более мелкие субъединицы, имеющих большее количество сайтов связывания воды [200]. Что касается эмульгирующей способности, то она, напротив снижалась с увеличением продолжительности процесса. Эмульгирующая способность белков связана с их способностью снижать поверхностное натяжение между гидрофобными и гидрофильными компонентами пищевых систем [201,202].

Ферментативная обработка привела к увеличению пенообразующей способности при продолжительности гидролиза до 40 мин при использовании грибковой протеазы, и при 20 мин при использовании папаина, но при этом стабильность пены снизилась во всех образцах, что говорит о необходимости использования дополнительных стабилизирующих компонентов [199,203,204].

Интересный способ получения стабильных пенных масс на основе гидролизованных сывороточных белков был предложен Moayedzadeh S. и Madadlou A. Перед проведением протеолиза 4 %-ный раствор ИСБ перемешивали при 20°С в течение 2 ч и хранили при 4°С в течение 12 часов для полной гидратации. Сам процесс проводили при 55°С и рН 7,7 в течение 5 ч с использованием Королазы Н при соотношении фермент-белковый субстрат 1:100. Раствор постоянно перемешивали при 100 RCF во время гидролиза, после чего фермент инактивировали нагреванием до 85°С в течение 10 мин. Далее на основе гидролизатов были сформированы волокна по методу, разработанному Loveday [206]. Для этого рН раствора ИСБ и ГСБ доводили до 2,0 с помощью 8 М НСl с последующим нагреванием при 85°С в течение 5 ч при постоянной скорости перемешивания ( $\geq 100$  RCF). Для остановки процесса фибрилляции образцы быстро

охлаждали до 30°C холодной водопроводной водой со скоростью примерно 10°C в минуту и подвергали сублимационной сушке [206]. Исследование пенообразующих свойств проводили по методике, изложенной в работе Oboroceanu с соавторами [207].

Было установлено, что фибриллированные белки на основе КСБ отличались самыми высокими, в 10 раз выше, значениями стабильности пены по сравнению с исходным раствором КСБ. При этом ГСБ, как фибриллированные, так и нет имели самые высокие значения пенообразующей способности. Это связано с тем, что пептиды гидролизатов более взбиваются интенсивнее из-за более высокой межфазной активности, а агрегаты сывороточного белка, находящиеся в КСБ, способствуют уменьшению дренажа пены и повышению стабильности пены [206,208].

Специалисты Департамента безопасности и качества молока и рыбных продуктов, Германия, проводили исследования пенообразующих свойств изолированного  $\beta$ -лактоглобулина, подвергнутого протеолизу. Растворы изолята сывороточного белка от 20 до 30 доводили до pH 3,8 1 моль/л соляной кислотой при 56°C в течение 30 мин для осаждения всех сывороточных белков, кроме  $\beta$ -лактоглобулина. После центрифугирования при 5000 RCF, 25°C в течение 60 мин, после чего получали лиофилизированный концентрат с содержанием  $\beta$ -лактоглобулина 98% в сухом веществе [198].

Для протеолиза 3,4 %-ных растворов  $\beta$ -лактоглобулина использовались алкалаза, трипсин и пепсин, наиболее часто используемых для протеолиза этого белка [48,57,198,209-212]. Процесс проходил в условиях pH-статирования при 7,5 ед. и 60 °C в течение 5, 15, 30 и 60 мин, инактивацию ферментов проводили при 90 °C 10 мин.

Вспенивание растворов  $\beta$ -лактоглобулина и гидролизатов, и определение характеристик пены (взбитость, дренаж, плотность) проводили, как описано в работе Borcharding et al. Под показателем «дренаж» понимается отношение массы слитой через воронку жидкости пенной системы к общему весу пенной массы, умноженное на 100 [192]. Было установлено, что плотность пен, полученных из



гидролизатов, ниже, чем плотность пен раствора  $\beta$ -лактоглобулина. Пены, полученные с использованием трипсина или алкалазы, демонстрируют увеличение плотности с увеличением времени протеолиза, а плотность пен пептических гидролизатов снижается [198].

Также было показано, что средний диаметр пузырьков пены сильно различается в зависимости от используемой ферментной системы и времени гидролиза. Средний диаметр пен пузырьков триптических, пепсиновых и алкалазных гидролизатов, выдержанных в течение 1 мин составил 0,38–0,24, 0,17–0,15 и 0,18–0,17 мм соответственно. С увеличением продолжительности гидролиза диаметр пузырьков пен триптических и пептических гидролизатов начинает незначительно укрупняться, в то время как пены гидролизатов, обработанных алкалазой свыше 15 мин разрушаются сразу после приготовления (рисунок 1.6) [198].

Показатель дренажа пен (%) варьировал незначительно (от 88,3 до 97,7 %), за исключением пены, полученной после 5 мин обработки пепсином, и составил ( $41,8 \pm 4,96$ ) %, следовательно, такая обработка в данном исследовании позволила получить самые стабильные пены [198].

В то же время в обзоре Thao с соавт. изложено, при незначительной степени гидролиза от 2,5 до 3,0% при протеолизе раствора ИСБ алкалазой, химотрипсином и трипсином увеличивалась как пенообразующая способность, так и стабильность пены [172].

Изложенные выше данные позволяют говорить о перспективности использования приемов протеолиза для улучшения пенообразующих свойств, особенно в части ПС. Однако пены при этом получаются менее стабильными, решить эту проблему можно использованием стабилизирующих компонентов.

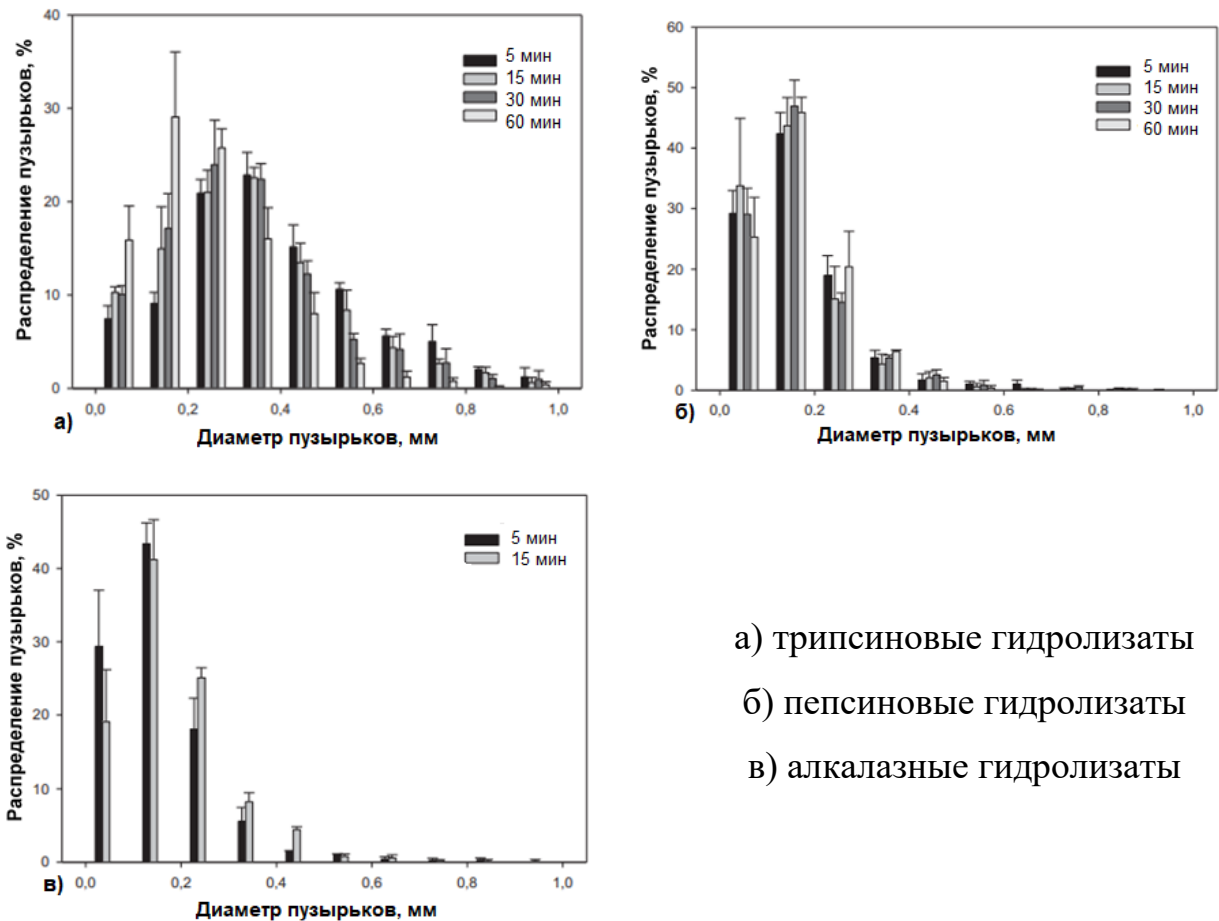


Рисунок 1.6 – Распределение размеров пузырьков пен гидролизатов с различной продолжительностью протеолиза после 1 мин взбивания

### 1.6.2 Гидроколлоиды как стабилизаторы эмульсионных белковых систем

Процесс пенообразования в молоке ассоциирован непосредственно с белками [213]. По мнению Ду к числу макромолекулярных анионов, соединяющихся с белками, относятся анионы кислых полисахаридов, например, альгиновой кислоты и полисахаридов растительных камедей и пектинов. Анионные полисахариды образуют с белками устойчивые комплексы электростатической природы [214-216].

Основными технологическими свойствами стабилизатора структуры при получении взбитых продуктов является улучшение диспергирования, в частности эмульгирования и пенообразования, взаимодействия с белками, вязкости, взаимодействия с водой и жиром [216,217].

Сарафанова Л.А. одним из самых распространенных и доступных компонентов считает желатин [218,219]. Благодаря нейтральному вкусу и цвету

добавление желатина не влияет на органолептические свойства готового продукта [220]. Для получения стойкого в хранении прозрачного геля желатин подвергают набуханию в холодной воде, а затем растворяют при температуре 40 °С [221]. Описанные Сарафановой Л.А. свойства желатина делают возможным его использование в сочетании с другими гидроколлоидами в качестве загустителя и пенообразователя при создании аэрированных продуктов, о чем свидетельствуют и данные других исследователей [217,218,220,222-224].

В последнее время широкое распространение в пищевой промышленности получили камеди, представляющие собой структурно сложные полисахариды, получаемые из кустарников и деревьев, растущих в тропиках и субтропиках, в частности гуаровая камедь [225-234]. Thombare N. с соавт. описывает ее как галактоманнаны как гетерогликаны, содержащиеся в семенах стручковых растений и выполняющие функцию предотвращения обезвоживания семян [228].

В книге «Пищевые добавки» Булдаков А.С. приводит данные о том, что по своим физическим свойствам гуаровая камедь представляет собой порошок от бежевого до светло-коричневого цвета, содержащий около 80% гидроколлоидов, растворимый в холодной воде [221]. Наибольшую вязкость она имеет в холодной воде, с повышением температуры воды вязкость снижается. 1%-ный раствор имеет вязкость 2500 – 5500 сПз, стабилен при рН 3,5 – 6,0 [221].

Нечаев А.П. подробно описывает химическое строение сахара-мономера гуара; он представляет собой галактозу и маннозу [221]. По пространственной структуре молекула гуара – длинная, сильно разветвленная цепь с основной структурой D-маннозы, связанной с 1,4 структурами ветвей D-галактозы в этой цепи посредством связей 1,6 [225,236]. Соотношение галактозы и маннозы в цепи – 1:2. Ответвления небольшие, но многочисленные; имеют один галактозный фрагмент и могут рассматриваться как объемистый заместитель линейной цепи [221,237]. Помимо свойств загустителя, гуар может использоваться в составе композиций стабилизаторов при разработке аэрированных продуктов благодаря выраженным пенообразующим свойствам [236,238].

Еще одним видом гидроколлоидов, на сегодняшний день активно используемым в производстве различных продуктов питания, является агар [235,239] [5][6]. Агар - это распространенный представитель класса загустителей, стабилизаторов и желеобразующих веществ [225,237]. Его получают из морских водорослей, обитающих в Белом, Черном морях и Тихом океане, в частности из водоросли *Macrocystes purifera* [235,237]. Благодаря способности агара к пенообразованию, он широко используется в кондитерском производстве [236,240-242]. Помимо кондитерского, он применяется и в молочной промышленности, например, при получении мороженого [243-247].

Другим наиболее широко используемым гидроколлоидом является пектин. Пектины представляют собой высокомолекулярные гетерополисахариды, совместно с другими соединениями входящие в состав клеточных стенок и межклеточных образований высших растений [235,248-250].

Пектиновые вещества, получаемые из различных растительных источников, различаются по молекулярной массе, химическому составу согласно трудам Булдакова А.С. и Голубева В.Н. и др [237,248].

Одной из наиболее важных характеристик пектинов, представляющих интерес с технологической точки зрения, является степень этерификации (СЭ) [251,252]. Конфигурация молекул пектинов, как считает Голубев В.Н. и его зарубежные коллеги, в значительной степени влияет на физико-химические и технологические свойства: желеобразование, растворимость, способность к агрегации [248,251]. Образование 3D конфигурации геля происходит за счет взаимодействия пектиновых молекул между собой по двум направлениям: при активной кислотности ниже пяти с добавлением дисахаров или с участием ионов поливалентных металлов [251,252]. Артемова Е.Н. считает, что именно пектин с высокой СЭ целесообразно применять в качестве стабилизатора во взбитых продуктах при умеренно кислой реакции среды и высокой температуре [253].

Торковой А.А и ее коллегами были исследованы физико-химические (молекулярная масса, углеводный состав, вязкость, степень этерификации экспериментального образца тыквенного пектина в сравнении с коммерческими

образцами пектинов (яблочного и цитрусового) (таблица 1.9) [164]. Поскольку известно, что пектиновые вещества обладают биофункциональными свойствами [254-257], авторами были также исследованы антиоксидантные, цитопротекторные и бифидогенные свойства [164].

Таблица 1.9 – Физико-химические характеристики исследованных пектинов

Характеристики	Образцы пектина			
	Тыквенный	Цитрусовый АРС 105	Яблочный АРА 103	Яблочный АРА 104
Содержание полигалактуроновой кислоты, %	75,1±4,5	54,2±3,6	58,1±4,3	70,5±5,0
Степень этерификации, %	71,9±0,7	58,9±0,4	64,0±0,5	70,6±0,3
Характеристическая вязкость [η] (мл/г)	631,8	265,2	340,6	247,15
Mr, кДа	141,2	68,6	115,6	65,9
Распределение молекулярных масс (кДа)	26–96	47–50	64– 88	46–48
Степень разветвленности цепи	4,0	3,1	2,3	1,1

По сравнению, с коммерческими цитрусовым и яблочным пектинами, тыквенный пектин имел самую высокую вязкость 4,5-6,3 децилитр/г и самую высокую степень разветвленности молекулы пектина (Gal+Ara)/Rha). В составе нейтральных сахаров у тыквенного пектина обнаружено максимальное количество арабинозы и галактозы, при этом отсутствует ксилоза и, наоборот, присутствует фукоза, в отличие от коммерческих образцов пектинов. Структурные области макромолекулы тыквенного пектина представлены рамногалактуронаном-I и II, что подтверждается данными ИК-спектроскопии [164].

На клеточных линиях эпителия почек собаки MDCK1 показано цитопротективное действие тыквенного пектина в отношении ионов тяжелых металлов Cd<sup>2+</sup> и Hg<sup>2+</sup>[164]. Причем цитопротекторный эффект был достоверно ниже, чем у других видов пектина [258,259]. При введении в лабораторный рацион 4% тыквенного пектина у животных в сыворотке крови отмечалось статистически достоверное снижение концентраций общего холестерина и триглицеридов, а также наблюдалась тенденция к снижению концентрации атерогенной фракции липопротеидов ЛПНП [164]. Показано увеличение антиоксидантной емкости

сыворотки крови животных, получавших пектин на фоне индукции свободнорадикальной патологии печени, на 9,62% ( $p < 0,08$ ) на фоне снижения концентрации ТБК-реактивных продуктов на 80,27% ( $p < 0,001$ ) [164].

Тыквенный пектин также обладал пребиотической активностью в отношении штамма *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, увеличивая рост клеток бактерий примерно в 2 при его добавлении в ростовую среду в количестве 0,25 мг/мл [164].

Тыквенный пектин имеет довольно разветвленное строение боковых цепей полигалактуроновой цепи, представленных в основном арабиногалактанами [164,260-262]. Строение полигалактуроновой молекулы тыквенного пектина во многом обуславливает его физико-химические свойства, в том числе достаточно большую молекулярную массу и вязкость, степень этерификации, способность образовывать гели в относительно низких концентрациях, а также его разнообразное биологическое действие [164,263,264]. Тыквенный пектин, таким образом, является перспективным функциональным ингредиентом, который может быть использован для разработки функциональных продуктов питания [164,262].

### **1.7 Заключение по литературному обзору**

Наибольший интерес для ученых и исследователей в области биотехнологии молока представляет такой подкласс ферментов, как протеазы, так как с помощью них возможно катализировать гидролиз белковых веществ. В основной массе они имеют высокую избирательную способность взаимодействия с белковым субстратом и высокой специфичностью по отношению к катализируемым реакциям. С точки зрения конверсии сывороточных белков с получением гидролизатов, демонстрирующих сильную антиоксидантную активность, наиболее перспективно использовать ферментные препараты Алкалаза (субтилизин) и Термолизин, а для высвобождения многофункциональных биоактивных пептидов из нативного белка для получения гидролизатов с высокой АПФ- и DPP IV - ингибирующей активностью – трипсин, при этом пептиды с низкой молекулярной массой проявляют повышенный гипотензивный эффект. Наилучшее воздействие на высвобождение из нативных сывороточных белков пептидов с антимикробной

активностью оказывают эндопептидазы поджелудочной железы трипсин и химотрипсин.

Что касается пенообразования, то образовавшиеся пептиды с низкой молекулярной массой диффундируют к межфазным областям для создания пены быстрее, чем белки, но конкурируют с белками и/или мешают им в формировании высоковязкоупругой пленки для стабилизации пены. Таким образом, протеолиз молока может улучшить пенообразование, но снизить стабильность пены.

Исходя из анализа характеристик вышеперечисленных гидроколлоидов можно заключить, что все гидроколлоиды в той или иной степени обладают физико-химическими свойствами, способными стабилизировать структуру эмульсионного аэрированного продукта, при этом большой интерес представляет более детальное изучение их пенообразующих свойств как в отдельности, так и в комбинациях, а используя в составе стабилизирующей добавки тыквенного пектина позволит дополнительно придать продукту функциональный потенциал.

## ГЛАВА 2 МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходя из цели и задач, поставленных в работе, использовался комплексный подход к получению функциональных ингредиентов на основе вторичного молочного сырья с учетом специфики их состава.

Общая схема проведения экспериментов приведена на рисунке 2.1.

Основным принципом, определяющим постановку расчетной и экспериментальной части работы, является выявление среди белково-пептидных гидролизатов, полученных биокаталитической конверсией белков подсырных сывороток пептидов с предсказанными биологическими активностями и установление биофункциональных свойств полученных белково-пептидных гидролизатов в системах *in vitro* и *in vivo*.

На основе полученных данных созданы обогащенные молочные продукты питания с использованием биологически активных ингредиентов – белковых гидролизатов подсырных сывороток и проведено тестирование предсказанных функциональных свойств продуктов на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Экспериментальные исследования проводили в соответствии с поставленными задачами в лаборатории технологии молочно-белковых концентратов, пищевых добавок и производства продуктов на их основе; лаборатории теххимического контроля ФГАНУ «ВНИМИ», лаборатории молекулярных основ биотрансформаций ФИЦ Биотехнологии РАН.

### 2.1 Объекты исследования

В соответствии с поставленной целью объектами исследований являлись:

- сыворотка, полученная при производстве полутвердых сыров (1);
- сыворотка, полученная при производстве мягких молодых сыров (2);
- сыворотка, полученная при производстве твердых сыров (3);
- сыворотка, полученная при производстве мягких плесневых сыров (4);
- сыворотка, полученная при производстве мягких сыров без созревания (5);
- концентраты сывороточных белков, полученные из образцов сывороток (1) - (5);
- гидролизаты сывороточных белков, полученные из образцов сывороток (1) - (5);
- пектин тыквенный высокоэтерифицированный ООО НПО «Пектин по-русски»;



## Аналитический этап

Исследование состояния вопроса биотрансформации молочного сырья

Систематизация инструментов и методов идентификации подтверждения функциональных свойств пептидов

Разработка принципиальной схемы алгоритма получения обогащенных функциональных продуктов

## Экспериментальный этап

Проведение характеристики белкового профиля технологически дифференцированных подсырных сывороток

Рациональный дизайн ферментной композиции для направленного гидролиза (*in silico*)

Разработка программы системного анализа и выбора оптимальных ферментов с автоматической загрузкой данных из базы BIOPEP

Оптимизация процесса гидролиза белков подсырных сывороток

Исследование физико-химических и биофункциональных свойств пептидных гидролизатов (*in vitro* и *in vivo*)

Идентификация белкового профиля биоактивных пептидов (*in silico*)

### Базовый аэрированный продукт

Разработка рецептуры на основе пептидных гидролизатов с внесением стабилизационной системы

Тестирование функциональных свойств (*in vitro* и *in vivo*)

Оптимизация состава

Исследование структурно-механических свойств

## Практический этап

Разработка технологического процесса и комплекта технической документации аэрированного продукта на основе базового

Разработка частных технологий обогащенных молочных продуктов с функциональным ингредиентом

Продукты молочные обогащенные

Продукты творожные обогащенные



Рисунок 2.1 – Схема организации проведения экспериментальных работ

- пектин яблочный высокоэтерифицированный «АРА 103», DSM Andre Pectin (Китай);
- пектин яблочный высокоэтерифицированный «АРА 104», DSM Andre Pectin (Китай);
- пектин цитрусовый высокоэтерифицированный «АРА 103», DSM Andre Pectin (Китай);
- мусс творожный, выработанный по ТУ 9222-021-00419785-2016;
- базовые продукты с заменой молока на концентраты сывороточных белков, полученные из образцов сывороток (1) - (5);
- базовые продукты с заменой молока на концентраты сывороточных белков, полученные из образцов сывороток (1) - (5);
- муссы творожные экспериментальные с заменой молока на гидролизаты сывороточных белков (ГСБ), полученные из образцов сывороток (1) - (5).
- муссы творожные экспериментальные с заменой молока на ГСБ, полученные из образцов сывороток (1) - (5).

## **2.2 Методы исследования**

При выполнении работы применялись стандартизованные методы, используемые при контроле физико–химических, микробиологических и органолептических характеристик молока и молочной продукции. Определение массовой доли жира проводили по ГОСТ 5867-90, массовой доли белка методом Кьельдаля по ГОСТ 23327-98, активной кислотности по ГОСТ 32892-2014, определение массовой доли сухих веществ по ГОСТ Р 54668-2011, определение массовой доли углеводов по ГОСТ Р 54667-2011. Плотность базового аэрированных продуктов измеряли в соответствие с ГОСТ Р 54758-2011.

Органолептические показатели оценивали по ГОСТ Р ИСО 22935-2-2011 с построением профиллограмм. Суть анализа заключается в том, что сложные составляющие каждой органолептической характеристики (вкус, консистенция и т.д.) представляют в виде обобщения отдельных составляющих (дескрипторов), которые оцениваются дегустаторами по интенсивности появления и качеству.

Пенообразующую способность (ПС) определяли по формуле 1.

$$\text{ПС} = \frac{V_1 - V_0}{V_1} * 100, \% \quad (1),$$

где  $V_0$  – объём образца до взбивания, мл;  $V_1$  – объём образца после взбивания, мл.

### *Исследование белкового состава подсырных сывороток*

Для изучения качественного и количественного состава белки из сывороток осаждали сульфатом аммония (на 100 мл сыворотки вносили 70 г. сухого кристаллического сульфата аммония и тщательно перемешивали до его полного растворения). Осажденные белки отфильтровывали через складчатый бумажный фильтр, осадок с фильтра перерастворяли в минимальном объеме дистиллированной воды и проводили диализ полученного белкового раствора против дистиллированной воды. После проведения диализа белковые растворы отфильтровывали через мембрану 0,45 мкм. Белок определяли с использованием коммерческого набора BCA Protein assay kit (Pierce, США) в соответствии с инструкцией производителя. Затем проводили электрофорез по стандартным методикам белкового ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях (все образцы наносились на дорожки в одинаковом количестве – 10 мкг белка/дорожка) с последующей идентификацией белковых полос методом MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии. Для получения белковых карт использовали систему гель документирования Infinity1000/26MX (VilberLourmat, Франция).

*Анализ белковых карт* и денситометрическое определение массовой доли определяемого белка к общему содержанию идентифицированных белков проводили при помощи ПО ImageMaster 2D Platinum, v.7 («GE Healthcare», США). Обработка масс-спектров осуществлялась с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия), а идентификация белков – при помощи программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

Для анализа *пептидного профиля* белково-пептидных гидролизатов, пептидные концентраты, полученные в результате ферментативного гидролиза подсырных сывороток, подвергали фракционированию методом гель-фильтрации на полупрепаративной хроматографической колонке HiLoad 26/60 Superdex 75 (GE Healthcare, США) с последующим анализом пептидного профиля фракций

гидролизатов методом высокоэффективной обращено-фазовой хроматографии с электроспреей ионизацией и идентификацией компонентов методом масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье.

*Оптимизация условий проведения ферментативной конверсии белков подсырных сывороток*

Рациональный дизайн мультиферментных композиций для получения белково-пептидных гидролизатов, содержащих биологически активные пептиды проводился с использованием *in silico* анализа на портале бионформационных ресурсов PeptideCutter ([web.expasy.org](http://web.expasy.org)) по подбору протеаз для ферментативного гидролиза белков сыворотки с учетом необходимости исключения потенциально горьких пептидов, а также нежелательного содержания большого количества свободных аминокислотных остатков.

Оптимизация условий проведения ферментативной конверсии белков подсырных сывороток с целью получения функционального пищевого ингредиента (белково-пептидных гидролизатов) с комплексом биологически активных пептидов проводилась по методике полнофакторного эксперимента. Изменяемыми параметрами являлись доза вносимой ферментной композиции, продолжительность и температура проведения ферментативного гидролиза. В качестве контролируемых параметров определялись степень гидролиза сырья, содержание свободных аминокислот и органолептические показатели (отсутствие горького и соленого вкусов).

*Определение степени гидролиза*

Ферментативный гидролиз проводили в колбах с притертыми пробками объемом 250 мл на многопозиционной магнитной мешалке с подогревом IKA RT5 Power (IKA Werke, Германия) при скорости перемешивания 66 об./мин и температуре 50 град. С для ферментной композиции Protamex и Alcalase; и 60 град. С для ферментной композиции Thermolysin и Alcalase, исходя из значений термооптимумов входящих в композицию ферментов.

Точность поддержания температуры ( $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ) в процессе ферментативного гидролиза контролировали с помощью термоконтантного термометра ETS-D5 (IKA

Werke, Германия). В раствор подсырной сыворотки, подогретый до требуемой температуры с рН 7,0 (доводили добавлением 5М раствора гидроксида натрия), вносили необходимое количество концентрированного ( $\times 100$ ) раствора ферментного препарата.

Степень гидролиза определяли спектрофотометрическим методом согласно [265] [7]. Перед отбором пробы образцы ГСБ и сырья для получения ГСБ (УФ-концентрата подсырной сыворотки) гомогенизировали в течение 3 мин на гомогенизаторе Silent Crusher S (Heidolph, Германия) снабженном насадкой 7F (Heidolph, Германия), при скорости вращения рабочего вала 60000 об/мин. Для удаления пузырьков воздуха ГСБ или сырье для получения ГСБ после гомогенизации переносили в колбу Бунзена объемом 100 см<sup>3</sup>, колбу закрывали резиновой пробкой со стеклянным предохранительным капилляром и подключали на 10 мин к диафрагменному лабораторному насосу N86KT.18 (KNF, Германия). Отбирали 2 мл гомогенизированного ГСБ в пластиковый фалькон объемом мл и приливали 10 мл 1% водного раствора додецилсульфата натрия. Полученную реакционную смесь инкубировали на водяной бане при температуре  $75 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 15 мин.

В качестве стандарта для определения степени гидролиза используют L-лейцин. Из базового раствора лейцина с концентрацией 3,0 ммоль/дм<sup>3</sup> в 1% растворе додецилсульфата натрия приготавливали серию разведений в 1% водном растворе додецилсульфата натрия с концентрациями L-лейцина 0,15-3,0 ммоль/дм<sup>3</sup>.

Реакцию взаимодействия аминокрупп с 2,4,6-тринитробензолсульфоной кислотой проводили в пластиковых фальконах объемом 15 мл с винтовой пробкой. В фалькон последовательно вносили по 2 мл 0,2125 М натрий-фосфатного буфера, рН 8,20, 200 мкл 1% раствора додецилсульфата натрия, 50 мкл пробы ГСБ, приготовленной как описано выше в настоящем разделе отчета о НИР, и 2 мл свежеприготовленного 0,1% водного раствора 2,4,6-тринитробензолсульфоной кислоты. В случае сырья для получения ГСБ в фалькон последовательно вносили по 2 мл 0,2125 М натрий-фосфатного буфера, рН 8,20, 250 мкл пробы сырья для

получения ГСБ и 2 мл свежеприготовленного 0,1% раствора 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты. В фалькон с холостой пробой вносили 2 мл 0,2125 М натрий-фосфатного буфера, рН 8,20, 250 мкл 1% раствора додецилсульфата натрия, и 2 мл свежеприготовленного 0,1% раствора 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты. В фальконы с различными концентрациями стандарта вносили 2 мл 0,2125 М натрий-фосфатного буфера, рН 8,20, 250 мкл раствора стандарта, и 2 мл свежеприготовленного 0,1% раствора 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты. Фальконы плотно закрывали винтовыми пробками и встряхивали на вортексе PV1 (Grant Bio, Великобритания) в течение 10 с. Полученные пробы инкубировали на водяной бане GFL (Германия) с непрозрачной крышкой при температуре 50°C в течение 1 ч. По завершении инкубации для остановки реакции в каждый фалькон вносили по 4,0 мл раствора соляной кислоты с концентрацией 0,1 М. Фальконы плотно закрывали винтовыми пробками, встряхивали на вортексе PV1 (Grant Bio, Великобритания) в течение 10 с, и инкубировали 30 мин при комнатной температуре для охлаждения.

Для определения оптической плотности по 200 мкл раствора из каждого фалькона (в 3 параллелях) переносили в лунки 96-луночных несорбирующих УФ-прозрачных планшетов с плоским профилем дна UV-Star (Greiner BioOne, Германия). Оптическую плотность растворов при длине волны 340 нм определяли на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy2 (Bio Tek, США).

Для определения количества лейциновых эквивалентов в ГСБ со 100% степенью гидролиза отбирали 0,75 мл гомогенизированного ГСБ переносили в толстостенный микрореакционный сосуд с емкостью 5,0 мл с винтовой пробкой. Затем в сосуд добавляли 0,75 мл дистиллированной воды и 2,4 мл концентрированной соляной кислоты (массовая доля соляной кислоты 37%). Сосуд плотно завинчивали пробкой и инкубировали в сушильном шкафу КС-65 при температуре 120±2°C в течение 23ч. По завершении инкубации пробы охлаждали при комнатной температуре в течение 1 ч.

Содержимое микрореакционного сосуда фильтровали под вакуумом на воронке со стеклянным фильтром с пористостью 2, в которую дополнительно

вкладывали соответствующий диаметру воронки бумажный фильтр из кислотоустойчивой фильтровальной бумаги. Содержимое микрореакционного сосуда количественно переносили на фильтр, смывая дистиллированной водой. Водородный показатель промывных вод, поступающих в колбу Бунзена, контролировали с помощью универсальной индикаторной бумаги Lach-Ner. Декантацию осадка осуществляли до прекращения покраснения индикаторной бумаги. Содержимое колбы Бунзена количественно переносили в стеклянный стакан емкостью 100 мл. рН фильтрата доводили до  $7,00 \pm 0,02$  добавлением 40% водного раствора гидроксида натрия. Нейтрализованный фильтрат количественно переносили в мерную колбу объемом 100 мл и доводили объем до метки 1% водным раствором додецилсульфата натрия. Содержимое колбы тщательно перемешивали.

После оседания пены из мерной колбы отбирали пробу объемом 0,25 мл и проводили анализ как описано выше в настоящем разделе отчета о НИР. Степень гидролиза (DH) белка в ГСБ рассчитывали согласно уравнению 2:

$$DH = \frac{\left( \frac{(D_{\text{ФПИ}}^{340} - D_{\text{хол.проба}}^{340}) \times 30}{F} - \frac{(D_{\text{сырье}}^{340} - D_{\text{хол.проба}}^{340}) \times 6}{F} \right)}{\left( \frac{(D_{\text{КГ-ФПИ}}^{340} - D_{\text{хол.проба}}^{340}) \times 133,33}{F} - \frac{(D_{\text{сырье}}^{340} - D_{\text{хол.проба}}^{340}) \times 6}{F} \right)} \times 100\% \quad (2),$$

где:  $D_{\text{ФПИ}}^{340}$  - величина оптической плотности в образце ГСБ при 340 нм;  $D_{\text{хол.проба}}^{340}$  - величина оптической плотности в холостой пробе при 340 нм;  $D_{\text{сырье}}^{340}$  - величина оптической плотности при 340 нм в пробе сырья для получения ГСБ; 30 - фактор разбавления ГСБ; 6- фактор разбавления сырья для получения ГСБ;  $F = 0,1914$  л/моль – тангенс угла наклона калибровочного графика зависимости оптической плотности раствора при 340 нм от концентрации стандарта в пробе;  $D_{\text{КГ-ФПИ}}^{340}$  - величина оптической плотности в образце кислотного гидролизата ГСБ (100% степень гидролиза) при 340 нм; 133,33 - фактор разбавления кислотного гидролизата ГСБ.

#### *Определение содержания свободных аминокислот*

Общее содержание свободных аминокислот в гидролизатах определяли

спектрофотометрическим методом согласно [266]. Перед отбором пробы образец ГСБ гомогенизировали и вакуумировали как описано выше в настоящем разделе отчета о НИР. Отбирали 100 мкл гомогенизированного ГСБ и переносили в пластиковый фалькон объемом 15 мл и приливали 900 мкл дистиллированной воды. Полученную пробу инкубировали на водяной бане при температуре  $(85\pm 1)$  °С в течение 30 мин.

В качестве стандарта для определения содержания свободных аминокислот использовали L-глутаминовую кислоту. Из базового раствора глутаминовой кислоты с концентрацией 1 мг/мл приготавливали серию разведений с концентрациями 0,05-1,0 мг/мл. 1% раствор 2,4-динитрофторбензола в 1,4-диоксане готовили непосредственно перед применением.

В фалькон с пробой последовательно вносили по 1 мл 0,2 М раствора гидрокарбоната натрия и 1 мл свежеприготовленного 1% раствора 2,4-динитрофторбензола. В фалькон с холостой пробой вносили 1 мл дистиллированной воды, 1 мл 0,2 М раствора гидрокарбоната натрия и 1 мл свежеприготовленного 1% раствора 2,4-динитрофторбензола. Фальконы плотно закрывали винтовыми пробками и встряхивали на вортексе PV1 (Grant Bio, Великобритания) в течение 10 с. Полученные пробы инкубировали на водяной бане GFL (Германия) с непрозрачной крышкой при температуре 60°С в течение 40 мин. По завершении инкубации для остановки реакции в каждый фалькон вносили по 0,5 мл раствора соляной кислоты с концентрацией 1,0 М. Фальконы плотно закрывали винтовыми пробками, встряхивали на вортексе PV1 (Grant Bio, Великобритания) в течение 10 с, и инкубировали 30 мин при комнатной температуре для охлаждения.

После охлаждения из каждого фалькона отбирали пробу объемом 1 мл и переносили в пластиковый фалькон объемом 15 мл с винтовой пробкой. К полученным пробам добавляли по 5 мл этилацетата HPLC-grade. Фальконы плотно закрывали винтовыми пробками, встряхивали на вортексе PV1 (Grant Bio, Великобритания) в течение 15 с, и центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 мин на центрифуге 5702R (Eppendorf, Германия) при 4400 об/мин.



Для определения оптической плотности по 200 мкл верхнего органического слоя жидкости из каждого фалькона (в 3 параллелях) переносили в лунки 96-луночных несорбирующих УФ-прозрачных планшетов с плоским профилем дна UV-Star (Greiner BioOne, Германия). Оптическую плотность растворов при длине волны 420 нм определяли на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy2 (Bio Tek, США). Содержания свободных аминокислот (САК) в ГСБ в мг/мл эквивалентов глютаминовой кислоты рассчитывали согласно уравнению 3:

$$САК = \frac{(D_{420}^{образец} - D_{420}^{контроль}) \times 10}{F} \quad (3),$$

где: –  $D_{420}^{контроль}$  величина оптической плотности при 420 нм в контроле;  $D_{420}^{образец}$  – величина оптической плотности при 420 нм в исследуемом образце; 10 – фактор разбавления исходного образца;  $F = 0,3582$  – тангенс угла наклона калибровочного графика зависимости оптической плотности от концентрации стандарта в пробе, мг/мл

#### *Расчетно-аналитические методы in silico*

Идентификация биологически активных пептидов проводилась *in silico* с помощью баз данных BIOPEP, ACSEPePDB, ExPASy.

Методы исследований включали *in silico* оценку белков молока как биоактивных предшественников пептидов и их протеолитическое высвобождение на основе базы данных BIOPEP-UWM™ по следующим критериям:

Частота встречаемости фрагментов с заданной активностью в полипептидной цепи (A), которая описывается следующим уравнением:

$$A = \frac{a}{N}, \quad (4) \text{ где:}$$

a – количество пептидов с заданной активностью,

N – количество аминокислотных остатков в белке.

Потенциальная биологическая активность белка (B) [ $\mu\text{M}^{-1}$ ], которая описывается следующим уравнением:

$$B = \frac{\sum_{i=1}^k \frac{a_i}{EC_{50i}}}{N}, \quad (5) \text{ где:}$$

$a_i$  – количество повторов  $i$ -го биоактивного фрагмента в последовательности белка,

$EC_{50i}$  – концентрация  $i$ -го биоактивного пептида, соответствующая его полумаксимальной активности [мкМ] или полумаксимальному ингибированию ( $IC_{50}$ ) в случае пептидов с ингибирующей активностью,

$k$  – количество различных фрагментов с заданной активностью,

$N$  – количество аминокислотных остатков.

Данные параметры рассчитывались для всех биоактивных пептидов, присутствующих в запрашиваемой последовательности белка путем выбора типа активности на панели инструментов.

Профиль потенциальной биологической активности, который определяется как тип и расположение биоактивного фрагмента в последовательности белка.

Профиль сенсорной активности белка, который определяется как тип и расположение вкусо-ароматического фрагмента в последовательности белка.

Расщепление пептидной связи моделировали в соответствии со специфичностью ферментных препаратов с использованием ВІОРЕР «Действия фермента». Сгенерированные профили пептидов были идентифицированы на основе информации, записанной в базе данных ВІОРЕР.

В зависимости от поставленной задачи для начала необходимо выбрать блок программ, представленных на сайте ВІОРЕР. В данном случае работа начиналась во вкладке «Proteins», содержащей более 700 животных и растительных белков (рисунок 2.2).

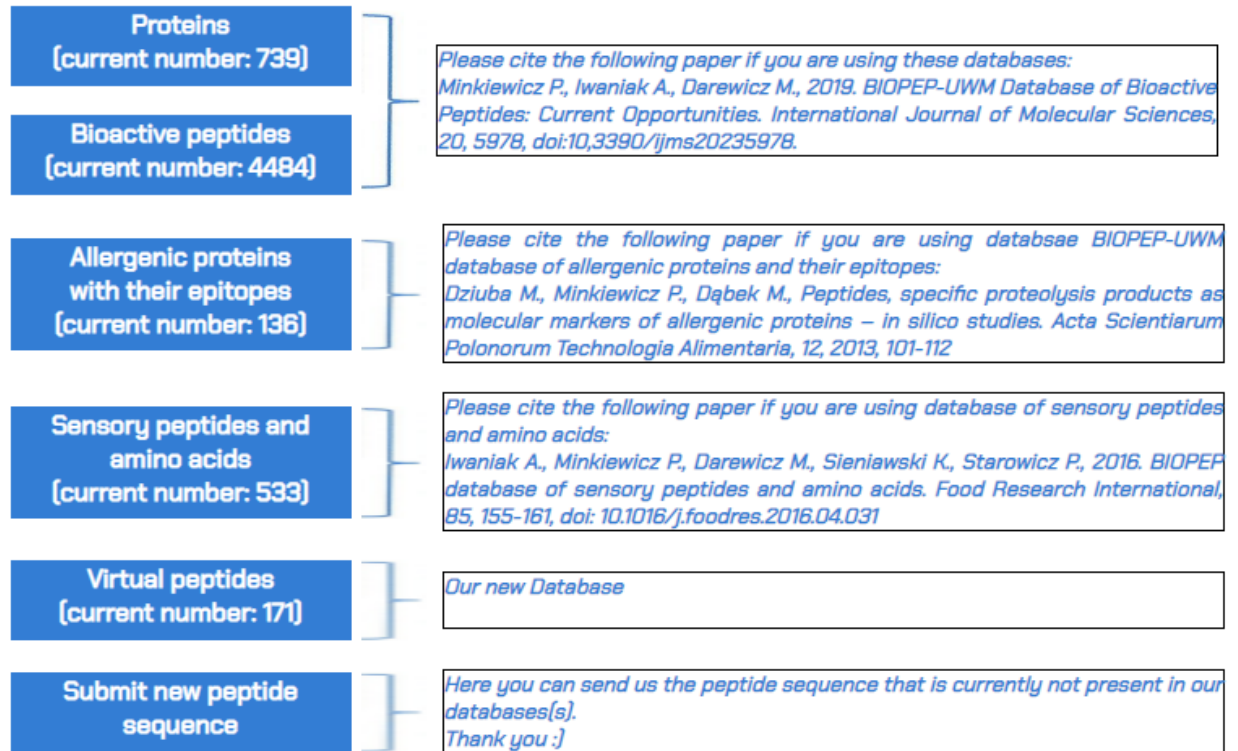


Рисунок 2.2 – Программные блоки базы данных BIOPEP

По каждой из исследуемой биологической активности был проведен детальный поиск, для начала во вкладке «Профили потенциальной биологической активности» выбиралась конкретная (рисунок 2.3). Несмотря на то, что поиск можно проводить, выбрав все активности, в данной работе такой цели не преследовалось, и проводя поиск по отдельным активностям удобнее обрабатывать данные.

**BIOPEP-UWM: ANALYSIS**

**PROFILES OF POTENTIAL BIOLOGICAL ACTIVITY**

Select Activity:  
\* - all activities

ACE inhibitor | ah ▼

**PROTEIN DATABASE**

**FOR YOUR SEQUENCE**

Рисунок 2.3 – Выбор потенциальной активности белка

Далее осуществлялся выбор сывороточного белка (рисунок 2.4), по каждому из которых осуществлялся анализ.

## BIOPEP-UWM: Select protein from database

Protein:

Рисунок 2.4 – Выбор исследуемого сывороточного белка

## BIOPEP-UWM: Profiles of proteins potential biological activity

ID of protein:1821 Name:beta-lactoglobulin, gen. var. A, fragment (17-177), bovine (Bos taurus)

Protein sequence:

LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVELKPTPEGDLLEILLQKWENDECAQKKIAEKTIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYK

ID	Name of peptide	Activity	Number	Sequence	Location
3255	beta-lactorphin (102-105)	ACE inhibitor	1	YLLF	[101-104]
3257	beta-lactokinin	ACE inhibitor	1	RL	[147-148]
3258	beta-lactokinin	ACE inhibitor	1	IR	[146-147]
3259	beta-lactokinin	ACE inhibitor	1	HIRL	[145-148]
3261	beta-lactokinin (fr. of beta-lactoglobulin: 142-148)	ACE inhibitor	1	ALPMHIR	[141-147]
3384	ACE inhibitor	ACE inhibitor	1	VF	[80-81]
3386	ACE inhibitor	ACE inhibitor	1	KW	[59-60]
3421	ACE inhibitor	ACE inhibitor	1	LVL	[92-94]
3463	ACE inhibitor	ACE inhibitor	1	HIR	[145-147]
3492	ACE inhibitor from sake	ACE inhibitor	1	VY	[41-42]
3507	ACE inhibitor (beta-LG fr. 78-80)	ACE inhibitor	1	IPA	[77-79]
3508	ACE inhibitor (b-Lg 9-14)	ACE inhibitor	1	GLDIQK	[9-14]
3509	ACE inhibitor (beta-Lg 15-20)	ACE inhibitor	1	VAGTWY	[15-20]
3528	ACE inhibitor	ACE inhibitor	1	LVR	[121-123]
3550	ACE inhibitor (from bovine beta-Lg)	ACE inhibitor	1	YL	[101-102]
3551	ACE inhibitor (from bovine beta-Lg)	ACE inhibitor	1	LF	[103-104]
3976	ACE inhibitor	ACE inhibitor	1	LAMA	[22-25]
3977	ACE inhibitor	ACE inhibitor	1	LDAQSAPLR	[32-40]
3978	ACE inhibitor	ACE inhibitor	1	CMENSA	[105-110]
3979	ACE inhibitor	ACE inhibitor	1	VLDTDYK	[93-99]
3980	ACE inhibitor	ACE inhibitor	1	VAGTW	[15-19]
7070	b-Lg fragment (10-14)	ACE inhibitor	1	LDIQK	[10-14]
7488	ACE inhibitor (fragment of bovine b-LG)	ACE inhibitor	1	VFK	[80-82]
7489	b-lactokinin (fr. of b-lactoglobulin: 142-146)	ACE inhibitor	1	ALPMH	[141-145]
7490	ACE inhibitor	ACE inhibitor	1	GTW	[17-19]

Рисунок 2.5 – Антигипертензивные последовательности пептидов β-лактоглобулина

На рисунке 2.5 приведен пример поиска АПФ-ингибирующей активности, зашифрованной в последовательности β-лактоглобулина. Показаны как сами фрагменты пептидов, так и их место расположения в полипептидной цепи.

Далее для каждого исследованного сывороточного белка был осуществлен подбор ферментной композиции для получения максимально возможного количества биопептидов (рисунок 2.6). На рисунке 2.7 проиллюстрирован выбор ферментного препарата для протеолиза β-лактоглобулина.

## BIOPEP-UWM: ANALYSIS

### ENZYME(S) ACTION

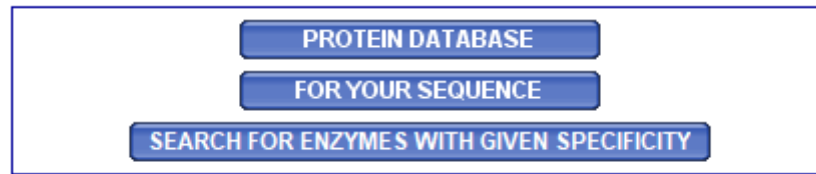


Рисунок 2.6 – Прогнозирование действия ферментов

**BIOPEP-UWM: Enzymes action**

---

**Select data for enzymes action:**

Select protein  
 Protein id:

Select enzymes

Enzyme id:	<input type="text" value="41   subtilisin   EC 3.4.21.62"/>	<input type="button" value="View enzyme"/>
Enzyme id:	<input type="text"/>	<input type="button" value="View enzyme"/>
Enzyme id:	<input type="text"/>	<input type="button" value="View enzyme"/>

Рисунок 2.7 – Выбор белка и фермента для протеолиза  $\beta$ -лактоглобулина

На первом этапе появляется возможность спрогнозировать какие аминокислотные последовательности получатся в результате протеолиза исследуемого белка ферментным препаратом субтилизин и место их расположения (рисунок 2.8).

**BIOPEP-UWM: Report of enzyme action**

---

**Results of enzyme action**

L - I - VTQTMKGL - DIQK - VAGTW - Y - S - L - AMAAS - DIS - L - L - DAQS - APL - R - VY - VEL - KPTPEGDL - EIL - L - QKW - ENDECAQKKIIAEKTKIPA - VF - KIDAL - NENK - VL - VL - DTDY - KKY - L - L - F - CMENS - AEPEQS - L - VCQCL - VRTPE - VDDEAL - EKf - DKAL - KAL - PMHRL - S - F - NPTQL - EEQCHI

**Location of released peptides**

[1-1],[2-2],[3-10],[11-14],[15-19],[20-20],[21-21],[22-22],[23-27],[28-30],[31-31],[32-32],[33-36],[37-39],[40-40],[41-42],[43-45],[46-53],[54-56],[57-57],[58-60],[61-79],[80-81],[82-86],[87-90],[91-92],[93-94],[95-98],[99-101],[102-102],[103-103],[104-104],[105-109],[110-115],[116-116],[117-121],[122-126],[127-132],[133-135],[136-139],[140-142],[143-148],[149-149],[150-150],[151-155],[156-161]

Рисунок 2.8 – Аминокислотные последовательности в результате протеолиза  $\beta$ -лактоглобулина ферментным препаратом субтилизин

Далее программа осуществляет поиск биоактивных фрагментов, в случае  $\beta$ -лактоглобулина при гидролизе субтилизином большинство пептидов имеют противодиабетическую и АПФ – ингибирующую активность (рисунок 2.9). Также мы получаем информацию о месте их расположения, молекулярной массе и функциям.

**BIOPEP-UWM: Search for active fragments**

No	Peptide ID	Sequence	Location	Name	Function	Activity	Monoisotopic mass	Chemical mass
1	3384	VF	[80-81]	ACE inhibitor	Inhibitor of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) (EC 3.4.15.1) (MEROPS ID: M02-001)	ACE inhibitor	264.1360	264.3100
2	3492	VY	[41-42]	ACE inhibitor from sake	Inhibitor of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) (EC 3.4.15.1) (MEROPS ID: M02-001)	ACE inhibitor	280.1310	280.3030
3	3980	VAGTW	[15-19]	ACE inhibitor		ACE inhibitor	532.2520	532.5820
4	8224	VY	[41-42]	antioxidative peptide	free radical scavenging	antioxidative	280.1310	280.3030
5	8320	VL	[91-92]	Glucose uptake stimulating peptide	Stimulation of glucose uptake	stimulating	230.1520	230.2930
6	8320	VL	[93-94]	Glucose uptake stimulating peptide	Stimulation of glucose uptake	stimulating	230.1520	230.2930
7	8917	VF	[80-81]	dipeptidyl peptidase IV inhibitor (DPP IV inhibitor)	Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase IV (EC 3.4.14.5) (MEROPS ID: S09.003)	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	264.1360	264.3100
8	8922	VL	[91-92]	dipeptidyl peptidase IV inhibitor (DPP IV inhibitor)	Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase IV (EC 3.4.14.5) (MEROPS ID: S09.003)	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	230.1520	230.2930
9	8922	VL	[93-94]	dipeptidyl peptidase IV inhibitor (DPP IV inhibitor)	Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase IV (EC 3.4.14.5) (MEROPS ID: S09.003)	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	230.1520	230.2930
10	8929	VY	[41-42]	dipeptidyl peptidase IV inhibitor (DPP IV inhibitor)	Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase IV (EC 3.4.14.5) (MEROPS ID: S09.003)	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	280.1310	280.3030
11	9166	QKW	[58-60]	Antioxidative peptide	Antioxidative	antioxidative	460.2310	460.5180
12	9365	KKY	[99-101]	Antioxidative peptide	Antioxidative	antioxidative	437.2510	437.5180
13	9509	VY	[41-42]	DPP-III inhibitor	Inhibitor of Dipeptidyl peptidase-III (DPP-III) (EC 3.4.14.4) (MEROPS ID: M49.001)	dipeptidyl peptidase III inhibitor	280.1310	280.3030

Рисунок 2.9 – Биоактивные пептиды, полученные при протеолизе  $\beta$ -лактоглобулина ферментным препаратом субтилизин

На рисунке 2.10 представлена максимально возможная степень гидролиза  $\beta$ -лактоглобулина ферментным препаратом субтилизин, что важно при прогнозировании количества биопептидов и коэффициенты, используемые при расчетах каждой активности.

Помимо функций, места расположения пептидов, мы получаем информацию, какой именно величиной биоактивности обладает каждый конкретный пептид (рисунок 2.11).

С точки зрения получения функциональных ингредиентов на основе гидролизованных сывороточных белков, используемых в пищевых продуктах, большое значение имеет органолептический профиль. Анализ сенсорного профиля  $\beta$ -лактоглобулина представлен на рисунке 2.12

#### BIOPEP-UWM: CALCULATE $A_E$ , $DH_t$ , $W$ , $B_E$ and $V$

DH <sub>t</sub> [%]					
28.1250					
No	Activity	$A_E$	$W$	$B_E$	$V$
1	ACE inhibitor	0.0186	0.0336	0.0015615737998291	0.015676206565326
2	antioxidative	0.0186	0.0730	0	NAN
3	stimulating	0.0124	0.1425	0	NAN
4	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0.0248	0.0380	0.00016786973308712	0.16704283064899
5	dipeptidyl peptidase III inhibitor	0.0062	0.0768	0	NAN

Рисунок 2.10 – Коэффициенты расчета и степень гидролиза при протеолизе  $\beta$ -лактоглобулина ферментным препаратом субтилизин

#### BIOPEP-UWM: Peptide Data

ID	<input type="text" value="3386"/>	Name	<input type="text" value="ACE inhibitor"/>		
Sequence	<input type="text" value="KW"/>				
Chemical Mass		<input type="text" value="332.3870"/>	Number of amino acid residues		<input type="text" value="2"/>
Monoisotopic Mass		<input type="text" value="332.1730"/>	EC50 <input type="text" value="1.63"/>	<input type="text" value="µM"/>	
Function Information	<input type="text"/>				

[activity](#)

[references](#)

[additional information](#)

[database references](#)

[screen and print peptide data](#)

[list of peptides](#)

Рисунок 2.11 – Пример информации о активности биопептидов

Как известно, при протеолизе белка могут высвобождаться пептиды, имеющие горький вкус [267-270]. Поэтому прогнозирование появления горьких пептидов при протеолизе является необходимым. Из данных рисунка 2.12 видно,

что в последовательности  $\beta$ -лактоглобулина зашифровано достаточное количество горьких пептидов.

На рисунке 2.13 представлен пример анализа протеолиза  $\beta$ -лактоглобулина ферментным препаратом субтилизин с точки зрения обнаружения горьких пептидов.

**BIOPEP-UWM: Profiles of proteins potential sensory activity**

ID of protein:1821 Name:beta-lactoglobulin, gen. var. A, fragment (17-177), bovine (Bos taurus)  
 Protein sequence:LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVELKPTPEGDLEILLQKWENDECAQKKIIAEKTKIPAVFKIDAL

ID	Name of sensory peptide/amino acid	Activity	Number	Sequence	Location
226	Umami amino acid	umami	11	D	[11-11],[28-28],[33-33],[52-52],[63-63],[84-84],[95-95],[97-97],[128-128],[129-129],[136-136]
229	Umami amino acid	umami	15	E	[44-44],[50-50],[54-54],[61-61],[64-64],[73-73],[88-88],[107-107],[111-111],[113-113],[126-126],[130-130],[133-133],[156-156],[157-157]
239	Umami peptide	umami	1	DD	[128-129]
246	Umami peptide	umami	2	DE	[63-64],[129-130]
248	Umami peptide	umami	1	EE	[156-157]
262	Umami peptide	umami	1	VE	[43-44]
264	Umami peptide	umami	1	VD	[127-128]
277	Umami peptide	umami	1	DDE	[128-130]
309	Umami peptide	umami	1	EV	[126-127]
349	Umami peptide	umami	2	AE	[72-73],[110-111]
350	Umami peptide	umami	2	DA	[33-34],[84-85]
356	Umami peptide	umami	1	EL	[44-45]
358	Umami peptide	umami	1	EG	[50-51]
362	Umami peptide	umami	1	EA	[130-131]
364	Umami peptide	umami	2	EK	[73-74],[133-134]
365	Umami peptide	umami	1	KG	[8-9]
493	Umami peptide	umami	1	VE	[43-44]
530	Umami peptide	umami	1	NP	[151-152]
1	bitter amino acid	bitter	3	R	[40-40],[123-123],[147-147]
4	bitter amino acid	bitter	8	P	[38-38],[47-47],[49-49],[78-78],[112-112],[125-125],[143-143],[152-152]
7	bitter amino acid	bitter	4	F	[81-81],[104-104],[135-135],[150-150]
14	bitter peptide	bitter	1	KP	[46-47]
51	bitter peptide	bitter	1	VF	[80-81]
53	bitter peptide	bitter	1	LF	[102-103]

Рисунок 2.12 – Сенсорный профиль  $\beta$ -лактоглобулина

**BIOPEP-UWM: Sensory peptides and amino acids**

ANALYSIS

Number of sensory peptides/amino acids in a database: 533

	ID	Name	Sequence	Chem. mass	Monois. mass
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	1	bitter amino acid	R	174.1880	174.1010
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	2	bitter peptide	RR	330.3760	330.2020
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	3	bitter peptide	RRR	486.5640	486.3030
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	4	bitter amino acid	P	115.1170	115.0520
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	5	bitter peptide	PP	212.2340	212.1040
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	6	bitter peptide	PPP	309.3510	309.1560
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	7	bitter amino acid	F	165.1770	165.0680
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	8	bitter peptide	RG	231.2400	231.1220
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	9	bitter peptide	FF	312.3540	312.1360
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	10	bitter peptide	FFF	459.5310	459.2040
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	11	bitter peptide	RP	271.3050	271.1530
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	12	bitter peptide	PR	271.3050	271.1530
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	13	bitter peptide	RF	321.3650	321.1690
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	14	bitter peptide	KP	243.2910	243.1460
<a href="#">Sensory_peptide/amino_acid_data</a>	15	bitter peptide	PK	243.2910	243.1460

First Previous Page:  OK Next Last  
 Page 1 / 36



Рисунок 2.13 – Горькие пептиды при гидролизе  $\beta$ -лактоглобулина ферментным препаратом субтилизин

Также программа BIOPEP позволяет идентифицировать конкретный пептид и определить его сенсорный профиль (рисунок 2.14).

**BIOPEP-UWM: Sensory peptide/amino acid data**

ID	103	Name	bitter peptide		
Sequence	VY				
Chemical Mass	280.3030	Number of amino acid residues	2		
Monoisotopic Mass	280.1310	EC50	0.00 $\mu$ M		
Authors	Ishibashi N., Sadamori K., Yamamoto O., Kanehisa H., Kouge K., Kikuchi E., Okai H., Fukui S.				
Title	Bitterness of phenylalanine- and tyrosine-containing peptides. Agric. Biol. Chem., 51, 3309-3313, 1987				
Year	1987	Editor	Journal <input type="text"/>		

Рисунок 2.14 – Оценка сенсорного профиля конкретного пептида

Описанные выше шаги позволили определить общий алгоритм проведения протеолиза сывороточных белков *in silico*, представленный в виде блок-схемы на рисунке 2.15.



Рисунок 2.15 – Блок-схема модели биокаталитического расщепления сывороточных белков молока с функциональным потенциалом

*Тестирование продуктов и гидролизатов in vitro*

Антиоксидантная активность in vitro в пробирке определялась флуоресцентным методом ORAC с генерацией пероксильного радикала в реакционной среде с помощью микропланшетного фотометра-флуориметра BioTek Synergy 2 (США) [271]. Стратегия по определению антиоксидантной активности *in vitro* в культуральной тест-модели включала инкубацию клеток линии MDCK1 в присутствии потенциального антиоксидантного агента, дальнейшее воздействие инициатора свободно-радикального окисления и методику детекции активности радикалов в клетке [272]. Детекция свободных радикалов непосредственно в культивируемых клетках проводилась флуориметрически по интенсивности свечения флуорохрома дихлородигидро-флуоресцеина диацетата (DCFH-DA), который проникает в живые клетки, где под действием клеточных ферментативных систем образуется нефлуоресцирующее соединение, которое, в свою очередь, при воздействии свободных радикалов превращается в флуорохром [273]. Данный метод получил широкое распространение в связи с относительной простотой, достаточно высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов.

Антигипертензивная (гипотензивная) активность in vitro белково-пептидных гидролизатов белков подсырных сывороток и функциональных молочных продуктов на их основе определялась в пробирке по их способности ингибировать ангиотензин-1 превращающий фермент (АПФ) – ключевое звено ренин-ангиотензиновой системы, регулирующей кровеносное давление у человека. Наиболее чувствительным методом определения АПФ-ингибирующей активности вещества является метод с использованием АПФ-субстратов с внутренним тушением флуоресценции. В качестве субстрата с внутренним тушением флуоресценции был использован о-аминобензоил-фенилаланил-аргинил-лизил(динитрофенил)-пролин, измерение проводилось с помощью микропланшетного фотометра-флуориметра BioTek Synergy 2 (США) [274].

Антимикробные свойства *in vitro* белково-пептидных гидролизатов белков подсырных сывороток и функциональных молочных продуктов на их основе определялись в отношении роста условно-патогенных и патогенных тест-штаммов микроорганизмов. В качестве условно-патогенных и патогенных тест-штаммов микроорганизмов были использованы следующие *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Proteus vulgaris*.

Бифидогенная активность (способность функциональных пищевых продуктов или их компонентов избирательно стимулировать рост и/или биологическую активность защитных популяций бифидобактерий) *in vitro* белково-пептидных гидролизатов белков подсырных сывороток, пектина и функциональных молочных продуктов на их основе определялась в отношении тест-штамма *Bifidobacterium adolescentis* MC 42. При проведении исследований были использованы питательные среды MRS и Bios 2000 с внесением гидролизатов в количестве 10%, 15%, 20%, 25% и 30%. Культивирование *Bifidobacterium adolescentis* MC-42 проводили в ферментерах фирмы Das Gip на 400 мл при температуре 39 град. С и рН 6,8, при постоянном перемешивании. Инокулят клеток готовили на среде ГМК-2 и вносили в количестве 5%. Количество клеток *Bifidobacterium adolescentis* MC-42 определяли методом предельных разведений в среде ГМК-1 посевом в пробирки по 1 мл соответствующего разведения с высоким столбиком питательной среды (20 мл) в анаэробных условиях и термостатировании в течение 3-5 дней при температуре 37 град. С. Для подсчета использовали пробирки, на которых выросло от 10 до 300 колоний. Если колонии имели гетерогенный вид, делали микроскопические препараты нескольких колоний для подтверждения их принадлежности к бифидобактериям.

#### *Тестирование белковых гидролизатов in vivo*

Проведено тестирование *in vivo* функциональных свойств (антиоксидантные и гепатопротекторные свойства, гипотензивные свойства и оценка влияния на микробиоценоз кишечника) двух типов пептидных гидролизатов. Тестирование *in vivo* антиоксидантной активности и гепатопротекторных свойств двух типов гидролизатов проводили на самцах крыс линии Wistar на модели индуцированного

окислительного стресса путем введения животным через хлористого углерода (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Дизайн эксперимента при тестировании антиоксидантных и гепатопротекторных свойств пептидных гидролизатов *in vivo*

Группа, №	Живой вес, г M±SD	Масса, г / (индекс массы печени, %)	Внутрибрюшинное введение 1 день эксперимента	1-30 дни эксперимента
1 (n=5)	366±21	12,6±1,3 (3,4)	Интактная группа	<i>Ad libitum</i> Общевиварный рацион
2 (n=10)	288±28	10,5±0,7 (3,6)	0,5 мл/кг стерильного рафинированного и дезодорированного подсолнечного масла	<i>Ad libitum</i> Общевиварный рацион 2 мл Внутрижелудочно вода
3 (n=10)	281±15	10,6±1,6 (3,8)	0,5 мл/кг раствора четырёххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированного подсолнечного масле (2:5 об./об.)	<i>Ad libitum</i> Общевиварный рацион 2 мл Внутрижелудочно вода
4 (n=10)	274,1±13	10,1±3,5 (3,6)		<i>Ad libitum</i> Общевиварный рацион 2 мл Внутрижелудочно КСБЗ
5 (n=10)	284,1±16	9,7±1,2 (3,4)		<i>Ad libitum</i> Общевиварный рацион 2 мл Внутрижелудочно ГСБЗ
6 (n=10)	278,9±27	9,5±1,0 (3,4)		<i>Ad libitum</i> Общевиварный рацион 2 мл Внутрижелудочно КСБ5
7 (n=10)	285,2±16	9,6±1,4 (3,3)		<i>Ad libitum</i> Общевиварный рацион 2 мл Внутрижелудочно ГСБ5

В эксперименте участвовали самцы крыс линии Wistar с начальной массой 150±12 г. В эксперименте участвовало 65 животных. До начала эксперимента всех животных содержали на стандартном общевиварном корме для разведения и содержания лабораторных животных (ООО Лабораторкорм). Корм и питьевую воду животным предоставляют *ad libitum*. Животных содержали в вентилируемых клетках IsoCage (Techniplast, Италия). Смену подстилки, корма и питьевой воды проводили ежедневно. Перед началом эксперимента животных случайным образом распределили на 7 групп: (1) интактная группа №1; (2) контрольная группа №2,

животным которой в 1 день эксперимента внутривнутрибрюшинно вводили 0,5 мл/кг стерильного рафинированного и дезодорированного подсолнечного масла; (3) контрольная группа №3, животным которой в 1 день эксперимента внутривнутрибрюшинно вводили 0,5 мл/кг раствора четыреххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированном подсолнечном масле (2:5 об./об.); (4) опытная группа №4, животным которой в 1 день эксперимента внутривнутрибрюшинно вводили 0,5 мл/кг раствора четыреххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированном подсолнечном масле (2:5 об./об.) и затем ежедневно внутривнутрижелудочно вводили 2 мл концентрата белков сыворотки, содержащего ЛА и ЛГ); (5) опытная группа №5, животным которой в 1 день эксперимента внутривнутрибрюшинно вводили 0,5 мл/кг раствора четыреххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированном подсолнечном масле (2:5 об./об.) и затем ежедневно внутривнутрижелудочно вводили 2 мл гидролизата белков сыворотки, содержащего ЛА и ЛГ; (6) опытная группа №6, животным которой в 1 день эксперимента внутривнутрибрюшинно вводили 0,5 мл/кг раствора четыреххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированном подсолнечном масле (2:5 об./об.) и затем ежедневно внутривнутрижелудочно вводили 2 мл концентрата белков сыворотки, содержащего фракции казеина; (7) опытная группа №7, животным которой в 1 день эксперимента внутривнутрибрюшинно вводили 0,5 мл/кг раствора четыреххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированном подсолнечном масле (2:5 об./об.) и затем ежедневно внутривнутрижелудочно вводили 2 мл гидролизата белков сыворотки, содержащего фракции казеина. Стерильное рафинированное и дезодорированное подсолнечное масло получали методом стерильной фильтрации через шприцевые фильтры с PTFE-мембраной с размером пор 0,22 мкм (Carl Roth, Германия). Для приготовления инъекционного раствора использовали свежеперегнанный четыреххлористый углерод. Перед внутривнутрибрюшинным введением животных контрольных и опытной групп анестезировали путем ингаляции паров диэтилового эфира. По окончании эксперимента (30 дней) экспериментальных животных усыпляли эвтаназией углекислым газом. Животных

по очереди помещали в камеру для углекислотной эвтаназии. Скорость потока углекислого газа устанавливали ротаметром на уровне 3,5 дм<sup>3</sup>/мин. Окончание времени экспозиции животного в камере для углекислотной эвтаназии устанавливали визуально по прекращению дыхательных движений. Сыворотку крови отделяли центрифугированием в течение 10 мин на центрифуге 5702R (Eppendorf, Германия) при 4 град.С и 2500 об/мин. Для анализа антиоксидантной емкости (АОЕ) и активности печеночных ферментов (аланиновой аминотрансферазы – АЛТ, аспарагиновой аминотрансферазы – АСТ и лактатдегидрогеназы – ЛДГ) отбирали по 100 и 300 мкл сыворотки крови соответственно и замораживали в жидком азоте. Для анализа содержания ТБК-реактивных продуктов отбирали 0,6 мл сыворотки крови, к которым в качестве стабилизатора добавляли 10 мкл раствора ионола в метаноле с концентрацией 100 мг/мл. Из брюшной полости осуществляли забор печени. Печень промывали изотоническим раствором хлорида натрия с температурой 0 – 4 град.С. Излишки жидкости удаляли фильтровальной бумагой и замораживали печень в жидком азоте. До проведения анализов все пробы сыворотки крови и печени хранились в низкотемпературной (минус 86 град.С) морозильной камере. В качестве параметров, характеризующих антиоксидантный статус и функциональное состояние печени контролировали: активность ЛДГ и печеночных трансаминаз (АСТ, АЛТ); антиоксидантную емкость сыворотки крови по отношению к пероксильному радикалу; содержание ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови и печени. Для определения активности ЛДГ, АСТ и АЛТ использовали наборы для клинической биохимии (ДиаконМ, Россия). Анализ проводили в 1-см пластиковых кюветах на биохимическом анализаторе Stat Fax 3300 (Awareness Technology Inc., США). Анализ АОЕ сыворотки крови по отношению к пероксильному радикалу проводили по методике аналогичной описанной выше при тестировании антиоксидантной активности гидролизатов [272]. Перед проведением анализа образцы сыворотки крови размораживали на льду и готовили рабочие разведения в 75 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,40 в 150 раз. Антиоксидантную емкость сыворотки крови по отношению к пероксильному

радикалу выражали в мМ ТЭ. Содержание ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови и гомогенатах печени определяли спектрофотометрическим методом. В качестве стандарта для построения калибровочной зависимости использовали малоновый диальдегид (МДА). Реакцию конденсации МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой проводили в микропробирках объемом 2 мл с винтовыми пробками с резиновым кольцом-уплотнителем. Реакционная среда содержала 200 мкл раствора стандарта (МДА), 30 мкл ионола в метаноле с концентрацией 54 мМ, 200 мкл раствора ортофосфорной кислоты с концентрацией 200 мМ и 200 мкл рабочего раствора 2-тиобарбитуровой кислоты. Реакционные смеси инкубировали на водяной бане в течение 45 мин при температуре 90 град.С и охлаждали до комнатной температуры. Для экстракции окрашенных продуктов реакции в реакционную среду добавляли 500 мкл бутанола-1 и 50 мкл насыщенного раствора хлорида натрия. Смесь тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали на центрифуге Mini Spin (Eppendorf, Германия) при 7000 об/мин в течение 10 мин. Для анализа отбирали 200 мкл верхнего окрашенного бутанольного слоя. Оптическую плотность бутанольных экстрактов определяли в 96-луночных несорбирующих микропланшетах на фотометре-флуориметре Synergy 2 (BioTek, США) при 2-х длинах волн – 535 и 572 нм. Строили зависимость разности оптических плотностей при 535 и 572 нм от концентрации стандарта (МДА) в пробе. При анализе содержания ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови реакционная среда содержала 200 мкл сыворотки крови, 30 мкл ионола в метаноле с концентрацией 54 мМ, 200 мкл раствора ортофосфорной кислоты с концентрацией 200 мМ и 200 мкл рабочего раствора 2-тиобарбитуровой кислоты. Контроль содержал вместо сыворотки крови 200 мкл дистиллированной воды. Реакционные смеси инкубировали на водяной бане в течение 45 мин при температуре 90 град.С и охлаждали до комнатной температуры. Для экстракции окрашенных продуктов реакции в реакционную среду добавляли 500 мкл бутанола-1 и 50 мкл насыщенного раствора хлорида натрия. Смесь тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали при 7000 об/мин в течение 10 мин. Для анализа отбирали 200 мкл верхнего окрашенного бутанольного слоя. Оптическую

плотность бутанольных экстрактов определяли в 96-луночных несорбирующих микропланшетах на фотометре-флуориметре Synergy 2 (BioTek, США) при 2-х длинах волн – 535 и 572 нм. Концентрацию ТБК-реактивных продуктов (TBARS) в исследуемых образцах сыворотки крови (мкМ эквивалентов МДА) рассчитывали согласно уравнению 6. При анализе содержания ТБК-реактивных продуктов в печени 100 мг ткани помещали в пластиковую микропробирку объемом 1,5 мл и добавляли 900 мкл буфера для гомогенизации (1,15% раствор хлорида калия, содержащий 2,0 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты - ЭДТА и 2,5 мМ этиленгликоль-бис (2-аминоэтиловый эфир) - N, N, N',N'-тетрауксусной кислоты ЭГТА, pH 7,40). Гомогенизацию тканей проводили в течение 3 мин при температуре плюс 4 град.С в гомогенизаторе Silent Crusher S, снабженном насадкой 3F (Heildolph, Германия) при скорости вращения рабочего ножа 75000 об./мин. Реакционная смесь содержала 80 мкл гомогената или стандарта, 200 мкл 200 мМ раствора ортофосфорной кислоты, 20 мкл 54 мМ раствора ионола в метаноле, 40 мкл 8,1% раствора додецилсульфата натрия, 90 мкл деионизированной воды и 200 мкл тиобарбитурового реагента. Ход дальнейшего анализа полностью аналогичен для тестирования содержания ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови. Калибровочная кривая зависимости разности оптических плотностей при 535 и 572 нм от концентрации МДА в пробе, характеризовалась величиной тангенса угла наклона 0,0205 л/мкмоль и позволяла определять концентрацию ТБК-реактивных продуктов в диапазоне концентраций МДА в пробе - 0,125-15,000 мкМ. Содержание ТБК-реактивных продуктов выражали в нмоль МДА/г ткани.

Оценка *in vivo* гипотензивных свойств пептидных гидролизатов белков подсырных сывороток и функционального молочного продукта на их основе проводилось на крысах линии SHR со спонтанной гипертензией (Spontaneously hypertensive rats).





Рисунок 2.16 – Система измерения артериального давления у лабораторных животных в эксперименте по тестированию гипотензивных свойств *in vivo*

В процессе проведения эксперимента проводилось измерение показателей артериального давления (пульс, систолическое  $P_{\text{сис}}$ , диастолическое  $P_{\text{диаст}}$  и  $P_{\text{ср}}$  артериальное давление, рисунок 2.16) у экспериментальных животных с помощью монитора Coda Monitor (Kent Scientific, США) с набором манжет и датчиков RAT-CUFFKIT (Kent Scientific, США) и 8-ми канального тонометра Kent Scientific Coda-NT8 (США). По окончании эксперимента животные усыплялись методом углекислотной эвтаназии и определялся уровень электролитов в крови (Na, K, ионизированный Ca), определялась активность ангиотензин I-превращающего фермента (АПФ) в плазме крови и тканях головного мозга, аорты, почек, легких с использованием субстрата с внутренним тушением флуоресценции [275]; а также определялась концентрация компонентов ренин-ангиотензиновой системы в плазме крови: ренина, альдостерона, ангиотензинов I и II, АПФ методом ИФА с использованием коммерческих наборов.

При оценке активности АПФ животные случайным образом были распределены на 5 групп по 10 особей каждая: (1) контрольная группа – ежедневно внутрижелудочно с помощью зонда вводили по 2 мл дистиллированной воды; (2) опытная группа №1 – ежедневно внутрижелудочно с помощью зонда вводили по 2 мл концентрата белков сыворотки, содержащего ЛА и ЛГ; (3) опытная группа №2 – ежедневно внутрижелудочно с помощью зонда вводили по 2 мл гидролизата белков сыворотки, содержащего ЛА и ЛГ; (4) опытная группа №3 – ежедневно внутрижелудочно с помощью зонда вводили по 2 мл концентрата белков сыворотки, содержащего фракции казеина; (5) опытная группа №4 – ежедневно внутрижелудочно с помощью зонда вводили по 2 мл гидролизата белков сыворотки, содержащего фракции казеина. В процессе проведения эксперимента проводили измерение показателей артериального давления (пульс, систолическое  $P_{\text{сист}}$ , диастолическое  $P_{\text{диаст}}$  и среднее  $P_{\text{ср}}$  артериальное давление) у экспериментальных животных с помощью монитора Coda Monitor (Kent Scientific, США) с набором манжет и датчиков RAT-CUFFKIT (Kent Scientific, США) и тонометра Kent Scientific Coda-HT8 (США). По окончании эксперимента (через 30 дней) животных усыпляли методом углекислотной эвтаназии и определяли в сыворотке крови концентрацию компонентов ренин-ангиотензиновой системы: ангиотензинов I и II методом ИФА с использованием коммерческих наборов (Enzo, США).

Оценка *in vivo* влияния на *микробиоценоз кишечника* двух типов гидролизатов проводили на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза, путем ежедневного внутрижелудочного введения крысам линии Wistar антибиотика. Перед началом эксперимента животные случайным образом были распределены на опытную и контрольные группы по 10 животных каждая и содержались в вентилируемых клетках IsoCage (Techniplast, Италия) на общевиварном рационе, при этом контрольной группе животных ежедневно внутрижелудочно с помощью зонда вводили по 2 мл дистиллированной воды, а животным опытных групп ежедневно внутрижелудочно с помощью зонда вводили по 2 мл соответствующего гидролизата за 30 мин до введения антибиотика. У всех

групп животных через 10 дней эксперимента были отобраны образцы фекалий, из которых были выделены образцы тотальной ДНК и выполнен анализ микробиального состава. Для ПЦР-амплификации использовали флуоресцентно-меченные праймеры: 63F (Cy5- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 1087 rev (CCGTCAATTCCTTTRAGTTT). Ферментативную обработку амплификата проводили с использованием рестриктаз Msp, Hha и Hae (Promega, Madison, Wis.). Разделение полученных в результате рестрикции фрагментов ДНК проводили в условиях капиллярного электрофореза при помощи секвенатора CEQ8000 (Beckman Coulter, США) вместе с флуоресцентно-меченым ДНК-маркером. Определение филогенетической принадлежности микроорганизмов проводили с помощью программ и баз данных «Arlequin», «FragSort», «TRAMPR» и «T-REX». Содержание микроорганизмов в образцах кала выражали в условных единицах (УЕ). За УЕ принимали количество рестрикционных фрагментов, принадлежащих к определенной таксономической группе микроорганизмов, соотнесенное с общим количеством полученных фрагментов всех микроорганизмов. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ «Microsoft Excel» и «Биостатистика» версия 4.03. Статистически значимыми по двустороннему критерию Стьюдента считали отличия при  $p < 0,05$ . После окончания эксперимента у лабораторных животных также проводили забор образцов стенки кишечника, с последующим гистологическим анализом окрашенных гематоксилином и эозином препаратов для оценки изменений в слизистой оболочке кишечника.

#### *Тестирование продуктов in vivo*

Тестирование *in vivo* антиоксидантной активности и гепатопротекторных свойств исследуемых продуктов проводили на самцах крыс линии Wistar на модели индуцированного окислительного стресса путем введения животным четыреххлористого углерода (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Дизайн эксперимента при тестировании антиоксидантных и гепатопротекторных свойств функциональных продуктов *in vivo*

№ гр.	Живой вес, г M±SD	Масса, г / (индекс массы печени, %)	Внутрибрюшинное введение 1 день эксперимента	1-28 дни эксперимента
1 (n=5)	253±25	8,3±1,5 (3,3)	Интактная группа	<i>Ad libitum</i> Общевиварный рацион
2 (n=5)	263±21	10,0±1,8 (3,8)	0,5 мл/кг раствора четыреххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированного подсолнечного масле (2:5 об./об.)	<i>Ad libitum</i> Общевиварный рацион 2 мл внутрижелудочно вода
3 (n=5)	269±23	9,9±2,3 (3,7)		<i>Ad libitum</i> Общевиварный Рацион 2 мл внутрижелудочно 2 мл контрольного образца и базового молочного продукта с использованием ГСБ
4 (n=5)	265±18	9,0±1,6 (3,4)		<i>Ad libitum</i> Общевиварный рацион 2 мл внутрижелудочно 2 мл базового молочного продукта с использованием ГСБ

В эксперименте участвовали самцы крыс линии Wistar с начальной массой 250-270 г. До начала эксперимента всех животных содержали на стандартном общевиварном корме для разведения и содержания лабораторных животных (ООО Лабораторкорм). Корм и питьевую воду животным предоставляют *ad libitum*. Смену подстилки, корма и питьевой воды проводили ежедневно. Перед началом эксперимента животных случайным образом распределили на 4 группы: (1) интактная группа №1 ежедневно внутрижелудочно вводили 2 мл питьевой воды; (2) контрольная группа №2, животным которой в 1 день эксперимента внутрибрюшинно вводили 0,5 мл/кг раствора четыреххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированного подсолнечного масле (2:5 об./об.) и далее ежедневно внутрижелудочно вводили 2 мл питьевой воды; (3) опытная группа №3, животным которой в 1 день эксперимента внутрибрюшинно вводили 0,5 мл/кг раствора четыреххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированного подсолнечного масле (2:5 об./об.) и затем ежедневно внутрижелудочно вводили (5) опытная группа №3, животным которой в 1 день эксперимента внутрибрюшинно вводили 0,5 мл/кг раствора

четырёххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированного подсолнечного масле (2:5 об./об.) и затем ежедневно внутривентриально вводили 2 мл контрольного образца творожного мусса, выработанного в соответствии с ТУ 9222-021-00419785-2016; (6) опытная группа №4, животным которой в 1 день эксперимента внутривентриально вводили 0,5 мл/кг раствора четырёххлористого углерода в стерильном рафинированном и дезодорированного подсолнечного масле (2:5 об./об.) и затем ежедневно внутривентриально вводили 2 мл базового молочного продукта с использованием ГСБ. Стерильное рафинированное и дезодорированное подсолнечное масло получали методом стерильной фильтрации через шприцевые фильтры с PTFE-мембраной с размером пор 0,22 мкм (Carl Roth, Германия). Для приготовления инъекционного раствора использовали свежеперегнанный четырёххлористый углерод. Перед внутривентриальным введением животных контрольных и опытной групп анестезировали путем ингаляции паров диэтилового эфира. По окончании эксперимента (28 дней) экспериментальных животных усыпляли эвтаназией углекислым газом. Животных по очереди помещали в камеру для углекислотной эвтаназии. Скорость потока углекислого газа устанавливали ротаметром на уровне 3,5 дм<sup>3</sup>/мин. Окончание времени экспозиции животного в камере для углекислотной эвтаназии устанавливали визуально по прекращению дыхательных движений. Сыворотку крови отделяли центрифугированием в течение 10 мин на центрифуге 5702R (Eppendorf, Германия) при 4 град. Цельсия и 2500 об/мин.

Для анализа *антиоксидантной* емкости (АОЕ) и активности печеночных ферментов (аланиновой аминотрансферазы – АЛТ, аспарагиновой аминотрансферазы – АСТ и лактатдегидрогеназы – ЛДГ) отбирали по 100 и 300 мкл сыворотки крови соответственно и замораживали в жидком азоте. Для анализа содержания ТБК-реактивных продуктов отбирали 0,6 мл сыворотки крови, к которым в качестве стабилизатора добавляли 10 мкл раствора ионола в метаноле с концентрацией 100 мг/мл. Из брюшной полости осуществляли забор печени. Печень промывали изотоническим раствором хлорида натрия с температурой 0 – 4 град. Цельсия. Излишки жидкости удаляли фильтровальной бумагой и

замораживали печень в жидком азоте. До проведения анализов все пробы сыворотки крови и печени хранились в низкотемпературной (минус 86 град. Цельсия) морозильной камере. В качестве параметров, характеризующих антиоксидантный статус и функциональное состояние печени контролировали: активность ЛДГ и печеночных трансаминаз (АСТ, АЛТ); антиоксидантную емкость сыворотки крови по отношению к пероксильному радикалу; содержание ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови и печени. Для определения активности ЛДГ, АСТ и АЛТ использовали наборы для клинической биохимии (Диакон-М, Россия). Анализ проводили в 1-см пластиковых кюветах на биохимическом анализаторе Stat Fax 3300 (Awareness Technology Inc., США). Анализ АОЕ сыворотки крови по отношению к пероксильному радикалу проводили по методике аналогичной описанной выше при тестировании антиоксидантной активности гидролизатов. Перед проведением анализа образцы сыворотки крови размораживали на льду и готовили рабочие разведения в 75 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,40 в 150 раз. Антиоксидантную емкость сыворотки крови по отношению к пероксильному радикалу выражали в мМ ТЭ. Содержание ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови и гомогенатах печени определяли спектрофотометрическим методом. В качестве стандарта для построения калибровочной зависимости использовали малоновый диальдегид (МДА). Реакцию конденсации МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой проводили в микропробирках объемом 2 мл с винтовыми пробками с резиновым кольцом-уплотнителем. Реакционная среда содержала 200 мкл раствора стандарта (МДА), 30 мкл ионола в метаноле с концентрацией 54 мМ, 200 мкл раствора ортофосфорной кислоты с концентрацией 200 мМ и 200 мкл рабочего раствора 2-тиобарбитуровой кислоты. Реакционные смеси инкубировали на водяной бане в течение 45 мин при температуре 90 град.С и охлаждали до комнатной температуры. Для экстракции окрашенных продуктов реакции в реакционную среду добавляли 500 мкл бутанола-1 и 50 мкл насыщенного раствора хлорида натрия. Смесь тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали на центрифуге Mini Spin (Eppendorf, Германия) при 7000 об/мин в течение 10 мин. Для анализа

отбирали 200 мкл верхнего окрашенного бутанольного слоя. Оптическую плотность бутанольных экстрактов определяли в 96-луночных несорбирующих микропланшетах на фотометре-флуориметре Synergy 2 (BioTek, США) при 2-х длинах волн – 535 и 572 нм. Строили зависимость разности оптических плотностей при 535 и 572 нм от концентрации стандарта (МДА) в пробе. При анализе содержания ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови реакционная среда содержала 200 мкл сыворотки крови, 30 мкл ионола в метаноле с концентрацией 54 мМ, 200 мкл раствора ортофосфорной кислоты с концентрацией 200 мМ и 200 мкл рабочего раствора 2-тиобарбитуровой кислоты. Контроль содержал вместо сыворотки крови 200 мкл дистиллированной воды. Реакционные смеси инкубировали на водяной бане в течение 45 мин при температуре 90 град. Цельсия и охлаждали до комнатной температуры. Для экстракции окрашенных продуктов реакции в реакционную среду добавляли 500 мкл бутанола-1 и 50 мкл насыщенного раствора хлорида натрия. Смесь тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали при 7000 об/мин в течение 10 мин. Для анализа отбирали 200 мкл верхнего окрашенного бутанольного слоя. Оптическую плотность бутанольных экстрактов определяли в 96-луночных несорбирующих микропланшетах на фотометре-флуориметре Synergy 2 (BioTek, США) при 2-х длинах волн – 535 и 572 нм. Концентрацию ТБК-реактивных продуктов (ТВАРС) в исследуемых образцах сыворотки крови (мкМ эквивалентов МДА) рассчитывали согласно уравнению (6).

При анализе содержания ТБК-реактивных продуктов в печени 100 мг ткани помещали в пластиковую микропробирку объемом 1,5 мл и добавляли 900 мкл буфера для гомогенизации (1,15% раствор хлорида калия, содержащий 2,0 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты - ЭДТА и 2,5 мМ этиленгликоль-бис (2-аминоэтиловый эфир)- N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты ЭГТА, pH 7,40). Гомогенизацию тканей проводили в течение 3 мин при температуре плюс 4 град.С в гомогенизаторе Silent Crusher S, снабженном насадкой 3F (Heildolph, Германия) при скорости вращения рабочего ножа 75000 об./мин. Реакционная смесь содержала 80 мкл гомогената или стандарта, 200 мкл 200 мМ раствора

ортофосфорной кислоты, 20 мкл 54 мМ раствора ионола в метаноле, 40 мкл 8,1% раствора додецилсульфата натрия, 90 мкл деионизированной воды и 200 мкл тиобарбитурового реагента. Ход дальнейшего анализа полностью аналогичен для тестирования содержания ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови. Калибровочная кривая зависимости разности оптических плотностей при 535 и 572 нм от концентрации МДА в пробе, характеризовалась величиной тангенса угла наклона 0,0205 л/мкмоль и позволяла определять концентрацию ТБК-реактивных продуктов в диапазоне концентраций МДА в пробе - 0,125-15,000 мкМ. Содержание ТБК-реактивных продуктов выражали в нмоль МДА/г ткани. Содержание ТБК-реактивных продуктов в печени рассчитывали согласно уравнению (7).

$$TBARS = \frac{(D_{535} - D_{572})_{\text{образец}} - (D_{535} - D_{572})_{\text{контроль}}}{0,0281} \quad (6),$$

$$TBARS = \frac{((D_{535} - D_{572})_{\text{образец}} - (D_{535} - D_{572})_{\text{контроль}}) \times 2,125}{0,0205 \times m} \quad (7),$$

где  $(D_{535} - D_{572})_{\text{образец}}$  – разность величин оптических плотностей в исследуемом образце сыворотки крови 535 и 572 нм;

$(D_{535} - D_{572})_{\text{контроль}}$  – разность величин оптических плотностей в контроле 535 и 572 нм;

0,0205 и 0,0281 л/мкмоль – тангенсы угла наклона калибровочной зависимости разности оптических плотностей при 535 и 572 нм от концентрации МДА в пробе;

2,125 – фактор разбавления образца гомогената;

$m$  – масса навески ткани, г

Оценку *in vivo* гипотензивных свойств разработанного продукта проводили на крысах линии SHR со спонтанной гипертензией (Spontaneously hypertensive rats). Для чего животные случайным образом были распределены на 5 групп по 5 особей каждая: (1) контрольная группа – ежедневно внутривенно с помощью зонда вводили по 2 мл дистиллированной воды; (2) опытная группа №3 – ежедневно внутривенно с помощью зонда вводили по 2 мл контрольного образца



творожного мусса, выработанного в соответствии с ТУ 9222-021-00419785-2016; (5) опытная группа №4 – ежедневно внутривентрикулярно с помощью зонда вводили по 2 мл разработанного продукта. В процессе проведения эксперимента проводили измерение показателей артериального давления (пульс, систолическое  $P_{\text{сист}}$ , диастолическое  $P_{\text{диаст}}$  и  $P_{\text{ср}}$  артериальное давление) у экспериментальных животных с помощью монитора Coda Monitor (Kent Scientific, США) с набором манжет и датчиков RAT-CUFFKIT (Kent Scientific, США) и тонометра Kent Scientific Coda-NT8 (США) (рис. 2). По окончании эксперимента (через 30 дней) животных усыпляли методом углекислотной эвтаназии и определяли в сыворотке крови концентрацию компонентов ренин-ангиотензиновой системы: ангиотензинов I и II методом ИФА с использованием коммерческих наборов (Enzo, США) (рис. 2.17 и 2.18).



Рисунок 2.17 – Схематическое изображение работы и взаимодействия компонентов ренин-ангиотензиновой системы

Оценку *in vivo* влияния на микробиоценоз кишечника разработанных продуктов проводили на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза, путем ежедневного внутривентрикулярного введения крысам линии Wistar антибиотика. Перед началом эксперимента животные случайным образом были распределены на

опытные и контрольные группы по 5 животных каждая, при этом контрольной группе животных ежедневно внутривенно с помощью зонда вводили по 2 мл дистиллированной воды, а животным опытных групп ежедневно внутривенно с помощью зонда вводили по 2 мл соответствующего продукта за 30 мин до введения антибиотика.

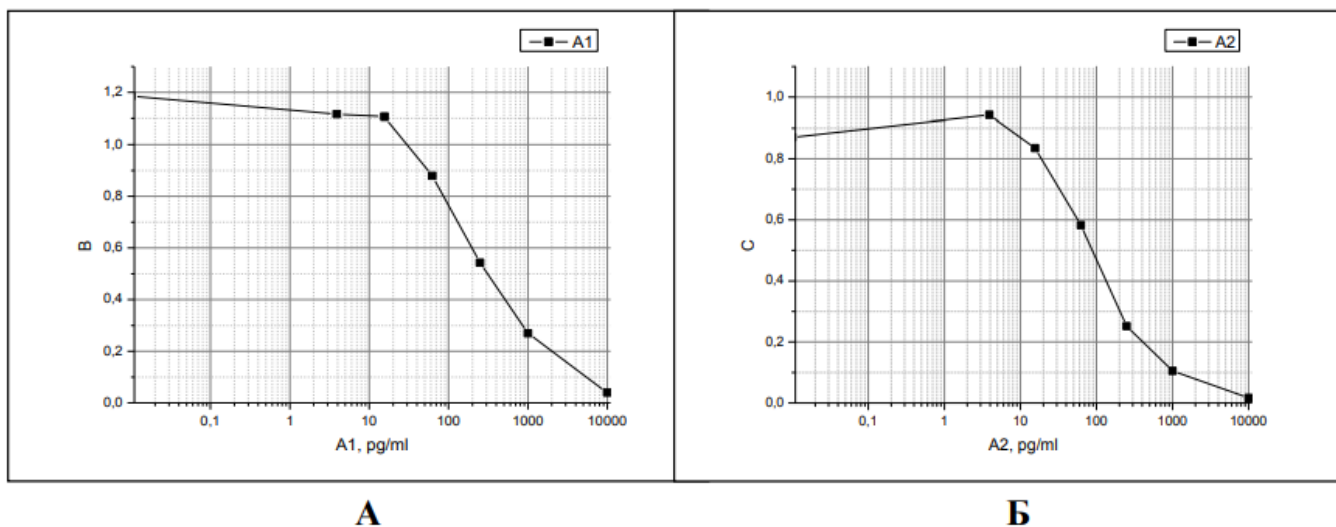


Рисунок 2.18 – Калибровочная кривая для определения компонентов ренин-ангиотензиновой системы в сыворотке крови: (А) ангиотензина I (A1) и (Б) ангиотензина II (A2) методом ИФА

У всех групп животных через 14 дней эксперимента были отобраны образцы фекалий. Для количественного учета групп микроорганизмов навеску из фекалий крыс массой 1 г вносили в регенерированный агаризованный (0,1%) тиогликолево-фосфатный буфер, в соотношении 1:10. Из этой суспензии готовили последовательные 10-кратные разведения, которые вносили в соответствующие питательные среды (таблица 2.3).

Бифидобактерии в фекальных массах животных определяли на среде TOS-MUP агар (TOS пропионатный агар с мупироцином лития); лактобациллы – на среде MPC (MRS). Учет и обработку результатов проводили по числу выросших колоний в посевах из двух последних разведений, с изучением культуральных, (окраска по Граму) и морфологических (микроскопия) свойств (таблица 2.3). Подсчет проводился на чашках с числом выросших колоний от 5 до 30, с расчетом среднего арифметического показателя. Количество микроорганизмов

определяемых групп (лактобактерии и бифидобактерии) КОЕ в 1 г фекалий, вычисляли по формуле (8). Содержание микроорганизмов выражали в КОЕ/г сырой массы фекалий.

$$K = \text{число выросших колоний на чашке} \times 20 \times P \quad (8),$$

где P – разведение суспензии фекалий;

20 – коэффициент пересчета на 1 см<sup>3</sup> суспензии фекалий при посеве 0,05 см<sup>3</sup>

Таблица 2.3 – Определение лактобактерий и бифидобактерий в фекальных массах крыс

Микроорганизм	Среда	Разведение	Температура и время инкубации	Форма колоний
Бактерии рода <i>Lactobacillus</i>	Среда MRS агаризованная	10 <sup>3</sup> 10 <sup>5</sup> 10 <sup>7</sup>	72 ч, 37°C	Колонии мелкие, диаметром 1- 3 мм, гладкие или зернистые, плоские или слегка выпуклые, бесцветные или слабо пигментированные
Бактерии рода <i>Bifidobacterium</i>	TOS-MUP агар	10 <sup>6</sup> -10 <sup>10</sup>	3-5 суток в анаэробных или микроаэрофильных условиях	Колонии от белого и серого до темно-коричневого цвета, в виде крупинок, гречишного зерна или дисков, иногда комето- или гвоздикообразные

Тестирование *гипохолестеринемических свойств* опытного образца базового молочного продукта с использованием ГСБ, по сравнению с контрольным образцом, выработанным по контрольной рецептуре, проводили на модели с повышенной алиментарной липидной нагрузкой на самцах крыс линии Wistar.

Полусинтетические кормовые рационы готовили в соответствии с рецептурами. Сначала приготавливали предсмесь, содержащую сахарозу, смесь витаминов AIN-93-VX, L-цистеин, холестерин и холина битатрат. Затем взвешивали и количественно переносили в рабочую камеру смесителя для порошкообразных продуктов Inversina 2 L (BioComponents, Швейцария) навески сахарозы, смеси витаминов AIN-93-VX, L-цистеина, холестерина и холина битатрата.

Рабочую камеру закрепляли резиновыми кольцами в смесителе и проводили смешивание компонентов со скоростью вращения рабочей камеры смесителя 60 об./мин в течение 15 мин. Далее необходимые навески казеина, смеси минеральных солей АIN-93М, декстринизированного крахмала и микрокристаллической целлюлозы взвешивали и количественно переносили в рабочую камеру смесителя для порошкообразных продуктов Inversina 2 L (BioComponents, Швейцария), содержащую ранее полученную предсмесь. Смешивание компонентов проводили при скорости вращения рабочей камеры смесителя 60 об./мин. в течение 10 мин. Вначале взвешивали навеску кукурузного крахмала и количественно переносили ее в рабочую камеру смесителя для порошкообразных продуктов Inversina 2 L (BioComponents, Швейцария), содержащую смесь ранее перечисленных компонентов, и продолжали смешивание в течение 15 мин со скоростью вращения рабочей камеры смесителя 60 об./мин. Полученную смесь переносили в рабочую камеру гомогенизатора 2094 (Foss Tecator, Швеция). В рабочую камеру гомогенизатора также добавляли навеску топленого масла массой 90,0 г и 10,0 г раствора 2-трет-бутил-гидрохинона в соевом масле с концентрацией 8,0 мг/г. Для получения кормовых рационов порошкообразные и жировые компоненты гомогенизировали в течение 10 мин. Полученные кормовые смеси хранили в плотно закрывающихся пластиковых контейнерах при температуре плюс 4-8 °С не более 5 дней. Самцов крыс линии Wistar случайным образом распределяли на 4 экспериментальные группы численностью 10 животных каждая (таблица 2.4).

До начала и в ходе проведения эксперимента всех животных содержали по 5 шт. в стандартных клетках для крыс с верхним проволочным каркасом при температуре  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , относительной влажности 60%, продолжительности цикла освещения 12 ч/сут. Корм и питьевую воду животным предоставляли *ad libitum*. Смену подстилки, корма и питьевой воды проводили ежедневно. Животных опытных групп содержали в течение 40 дней на полусинтетическом рационе с повышенной алиментарной липидной нагрузкой, животных контрольной группы – на полусинтетическом рационе (таблица 2.4).

Таблица 2.4 – Дизайн эксперимента при тестировании гипохолестеринемических свойств базового молочного продукта с использованием ГСБ *in vivo*

№	Начальный живой вес, г M±SD	Рацион	в/ж введение 1-40 дни эксперимента
1	258,9±31,9	Контрольный рацион (2,2% насыщенных жирных кислот, без добавки холестерина)	2 мл питьевой воды
2	255,8±18,5	Рацион с повышенной алиментарной липидной нагрузкой (6,2% насыщенных жирных кислот; 0,2% холестерина)	2 мл питьевой воды
3	257,8±25,9		2 мл контрольного образца творожного мусса
4	256,7±33,7		2 мл опытного образца базового молочного продукта с использованием ГСБ

Корм и питьевую воду животным предоставляли *ad libitum*. Ежедневно проводили смену подстилки, воды и корма (по 20 г каждому животному в сутки). Животных 1 группы содержали на контрольном полусинтетическом рационе, в состав которого в качестве жирового компонента входило 10% соевого масла. Животных 2-4 групп содержали на полусинтетическом рационе с повышенной алиментарной липидной нагрузкой, который содержал 0,2% холестерина, 9% топленого масла и 1% соевого масла. По 2 мл контрольного и опытного образцов вводили животным ежедневно внутривентрикулярно без предварительной седации с помощью зондов для внутривентрикулярного введения диаметром 1,02 мм (18 Gauge, Kent Scientific, США). На 41 день эксперимента экспериментальных животных усыпляли эвтаназией углекислым газом. Животных по очереди помещали в камеру для углекислотной эвтаназии. Скорость потока углекислого газа устанавливали ротаметром на уровне 3,5 дм<sup>3</sup>/мин. Окончание времени экспозиции животного в камере для углекислотной эвтаназии устанавливали визуально по прекращению дыхательных движений. Сыворотку крови отделяли центрифугированием в течение 10 мин на центрифуге 5702R (Eppendorf, Германия) при +4°C и 2500 об/мин. Для анализа общего содержания холестерина, липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и триглицеридов (ТГ) отбирали 300 мкл сыворотки крови. Пробы сыворотки замораживали в

жидком азоте и до проведения анализов хранили в низкотемпературной (-86°C) морозильной камере. В качестве параметров, характеризующих гиполипидемические свойства, контролировали: концентрацию общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови; концентрацию ЛПВП и ЛПНВ в сыворотке крови. Для определения общей концентрации холестерина, ТГ, ЛПВП, ЛПНП использовали наборы для клинической биохимии (Диакон-М, Россия). Анализ проводили в 1-см пластиковых кюветах на биохимическом анализаторе Stat Fax 3300 (Awareness Technology Inc., США).

## ГЛАВА 3 АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОТЕОЛИЗА МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ

### 3.1 Исследование белкового профиля технологически дифференцированных сыворолок

Иерархическая схема выбора предпочтительных гидролизатов  
сывороточных белков представлена на рисунке 3.1.



Рисунок 3.1 – Иерархическая схема выбора предпочтительных гидролизатов  
сывороточных белков

Для проведения запланированных работ были использованы опытные образцы средних проб технологически дифференцированных подсырных сыворолок (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Виды подсырных сыворолок, использованных в работе

№ п/п*	Наименование группы сыра	Способ коагуляции	Коагулирующие агенты
1	полутвердые	Кислотно-сычужная	Сычужный фермент, закваска
2	мягкие молодые	Кислотно-сычужная	Сычужный фермент, закваска
3	твердые	Кислотно-сычужная	Сычужный фермент, закваска
4	мягкие плесневые	Кислотно-сычужная	Сычужный фермент, закваска
5	мягкие без созревания	Кислотная	Кислая сыворожка (86-100) °Т

\*здесь и далее по тексту – нумерация образцов в соответствии с таблицей 3.1

По имеющимся данным, способ коагуляции оказывает влияние на белковый состав сгустка [276,277]. Основные физико-химические показатели, в том числе массовая доля казеиновых и сывороточных белков представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Физико-химические показатели исследуемых подсырных сывороток

Наименование показателя	$\pm \Delta$	Наименование сыворотки				
		1	2	3	4	5
Массовая доля жира, %	$\pm 0,01$	0,70	1,00	0,20	1,10	0,1
Массовая доля общего белка, %	$\pm 0,08$	0,97	0,96	0,96	1,05	0,29
Содержание общего азота, %	$\pm 0,006$	0,154	0,153	0,153	0,167	0,047
Содержание небелкового азота, %	$\pm 0,004$	0,0379	0,0379	0,0346	0,0345	0,0311
Содержание сывороточных белков, %	$\pm 0,20$	0,90	0,93	0,90	0,960	> 0,1
Содержание казеиновых белков, %	$\pm 0,35$	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	0,22
Массовая доля лактозы, %	$\pm 0,35$	4,90	5,10	4,40	5,50	5,55
Массовая доля золы, %	$\pm 0,06$	0,409	0,56	0,45	0,558	0,345
Активная кислотность, ед. рН	$\pm 0,02$	6,56	6,15	6,65	6,22	5,44

Далее был изучен качественный и количественный состав сывороточных белков. Белковые карты, полученные при помощи системы гель документирования представлены на рисунке 3.2.

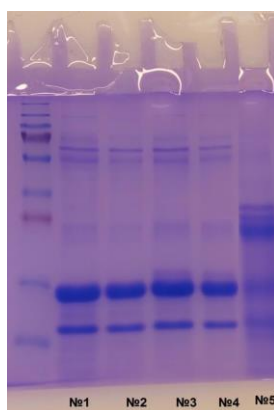


Рисунок 3.2 – ПААГ-электрофорез белковых фракций сывороток



Пример обработки данных по анализу белковых карт и денситометрическому определению массовой доли определяемого белка к общему содержанию идентифицированных белков представлен на рисунке 3.3 и в таблицах 3.3 и 3.4.

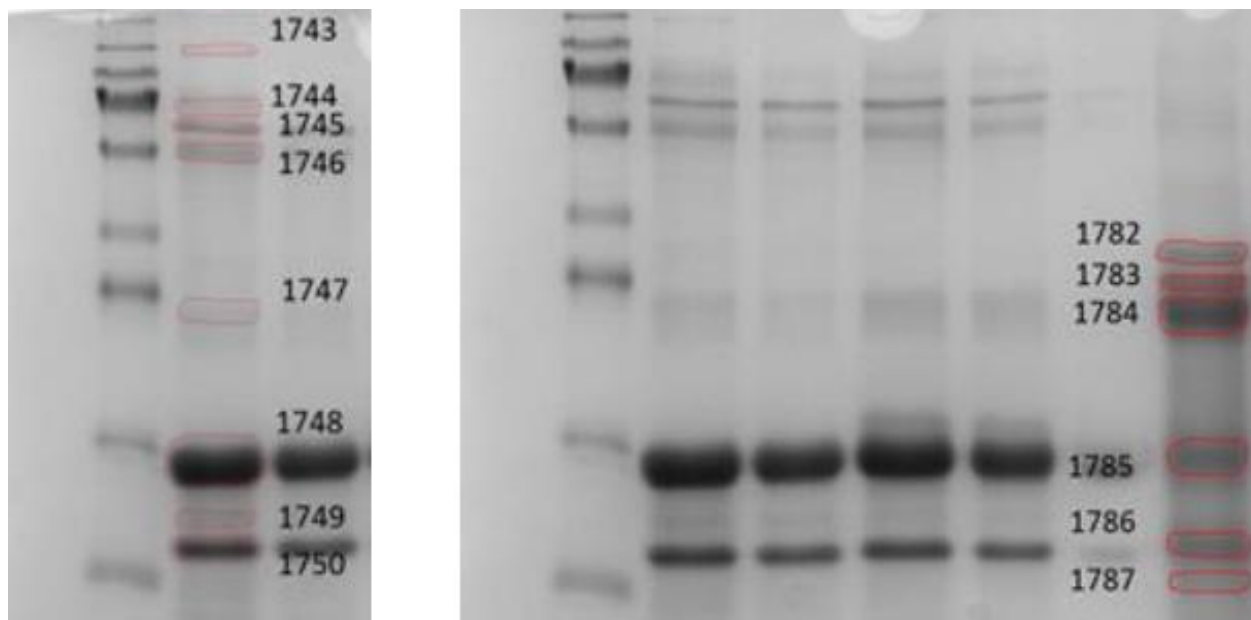


Рисунок 3.3 – Пример анализ белковых карт

Таблица 3.3 – Результаты расчета по дорожке №2

SpotID	Protein	MW, kDa	Intensity	Area	Vol	% Vol*
1750	Alpha-Lactalbumin [Bos taurus]	14	12778	388427	3,30242e9	20,1027
1749	Beta-Lactoglobulin, partial [Bos taurus]	16	4422	217519	671665088	4,08859
1748	Beta-Lactoglobulin [Bos taurus]	18	16050	832528	8,60051e9	52,3534
1747	Casein para kappa [Bos taurus]	25	3638	313978	687394752	4,18434
1746	IgG1 heavy chain [Bos taurus]	55	7011	268015	1,34165e9	8,16698
1745	Bovine Serum Albumin	66	7763	175440	767408768	4,67141
1744	Lactoperoxidase [Bos taurus]	71	5516	255067	785642112	4,7824
1743	Xanthine dehydrogenase/oxidase [Bos taurus]	147	5031	137892	271088960	1,65019

Таблица 3.4 – Результаты расчета по дорожке №5

SpotID	Protein	MW, kDa	Intensity	Area	Vol	%Vol
1787	Ipha S1 casein, partial [Bos taurus]	11	6212	241472	1,02477e9	11,4105
1786	Ipha-Lactalbumin+ alpha S1 casein, partial [Bos taurus]	14	5487	295852	1,11217e9	12,3837
1785	eta-Lactoglobulin [Bos taurus]	18	4633	387132	1,10844e9	12,3422
1784	eta-casein + kappa- casein, partial [Bos taurus]	25	10836	429859	3,63341e9	40,4572
1783	eta-casein + kappa- casein, partial [Bos taurus]	28	6339	179971	787940352	8,77352
1782	Ipha S1 casein [Bos taurus]	31	7923	279020	1,31416e9	14,6328

\* за 100%Vol принимаются все выделенные пятна на одной дорожке

Сводные данные по исследованию качественного и количественного состава белков различных сывороток показаны в таблице 3.5.

Основное различие в белковом составе сывороток можно проследить между группой сычужных сыров и сыром группы мягких сыров без созревания, обусловленное технологическим дифференцированием по способу коагуляции, в последнем случае – это кислотная коагуляция с подвариванием сгустка, без использования закваски и сычужного фермента.

Таблица 3.5 – Фракционный состав белков различных видов сывороток

Белок	Массовая доля в сыворотке, %				
	1	2	3	4	5
$\alpha$ -лактальбумин	20	20	19	20	12
$\beta$ -лактоглобулин	50	56	56	63	12
Бычий сывороточный альбумин	8	5	6	6	~0
$\alpha$ -s1-казеин	-	-	-	-	26
$\alpha$ -s2-казеин	~0	~0	~0	~0	
$\beta$ -казеин	-	-	-	-	50
$\kappa$ -казеин	9	4	11	5	
Имуноглобулин G1, тяжелая цепь	8	8	5	4	~0
Лактопероксидаза	3	5	2	1,4	
Ксантинооксидаза	2	2	1	0,6	

Содержание казеиновых белков в образцах сывороток №1-4 было менее 0,1%; в то время как содержание  $\alpha$ -лактальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина составляло 0,9%, а в сыворотке №5 (группе мягких сыров без созревания), наоборот, содержание казеиновых белков составляло 0,22% при общем содержании белка – 0,29%. Основное отличие в технологическом аспекте состоит в способе коагуляции казеина, в случае мягкого сыра без созревания - это кислотная коагуляция с подвариванием сгустка, без использования сычужного фермента и закваски, как в случае всех остальных исследованных сывороток. Высокое значение рН и температуры приводит к тому, что основные сывороточные белки коровьего молока ( $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -лактальбумин) денатурируют и осаждаются вместе с казеиновым сгустком при производстве сыра. Действительно анализ белковых профилей показал, что в состав сывороток из-под твердых, полутвердых и мягких сыров, полученных сычужной коагуляцией с добавлением молочнокислой закваски, входит от 50 до 63 %  $\beta$ -лактоглобулина, 19-20 %  $\alpha$ -лактальбумина, и до 11 %  $\kappa$ -казеина. В то время как белковый профиль сыворотки из-под мягких сыров без созревания представлен на 76% фракциями казеина (50% приходится на  $\beta$  и  $\kappa$ -казеин, 26 % на  $\alpha$ -казеин) и содержит по 12 %  $\beta$ -лактоглобулина и  $\alpha$ -лактальбумина (таблица 3.5).

Далее была изучена возможность протеолиза данных белков с получением биологически активных гидролизатов, не обладающих горьким вкусом. Для этого аминокислотные последовательности были проанализированы на наличие в них аминокислотных дескрипторов горького вкуса и биологической активности.

В таблице 3.6 представлено суммарное количество аминокислот, содержащихся в исследуемых белках и детерминирующих горький вкус потенциальных продуктов протеолиза и их антиоксидантную (АОЕ), антигипертензивную (АГА) и противомикробную (АМА) активность. В целом аминокислотные профили  $\alpha$ -лактальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина (ЛГ) схожи с аминокислотным профилем смеси  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов, существенно отличается только содержание пролина, который практически отсутствует в фракциях  $\beta$ - и  $\kappa$ - казеина. Согласно литературным данным, высокое содержание пролина является

дескриптором противомикробной активности пептидов [278]. Таким образом, использование протеаз, специфичных к пролину, будет уменьшать вероятность образования противомикробных пептидов при гидролизе. При этом аланин и изолейцин, присутствующие среди описанных дескрипторов горького вкуса, практически не встречаются в литературе в качестве дескрипторов биологической активности.

Таблица 3.6 – Содержание горьких аминокислот и биологическая активность сывороточных белков

АК	Количество АК	Горький вкус	Наименование активности
Сывороточная фракция ( $\alpha$ -лактальбумин, $\beta$ -лактоглобулин)			
P	55	+	АМА
L	40	+	АОЕ, АГА
Y	13	+	АОЕ, АГА
F	16	+	АОЕ, АГА
A	25	+	–
W	2	+	АОЕ, АГА
I	24	+	–
M	11	–	АОЕ, АГА
АК	Количество АК	Горький вкус	Наименование активности
T	26	–	АОЕ, АГА
C	3	–	АОЕ, АГА
H	9	–	АМА
R	9	–	АМА
Казеиновая фракция $\beta$ -казеин, $\kappa$ -казеин			
P	10	+	АМА
L	44	+	АОЕ, АГА
Y	8	+	АОЕ, АГА
F	10	+	АОЕ, АГА
A	24	+	–
W	6	+	АОЕ, АГА
I	19	+	–
M	8	–	АОЕ, АГА
T	17	–	АОЕ, АГА
C	15	–	АОЕ, АГА
H	6	–	АМА
R	4	–	АМА

### 3.2 Биоинформационное программирование протеолиза сывороточных белков

Всего в пептидной базе BИОPEP содержится 34 протеолитических фермента, из них для протеолиза белков молочной сыворотки подходят химотрипсин А ЕС 3.4.21.1, трипсин ЕС 3.4.21.4, протеиназа К ЕС.3.4.21.67, химотрипсин С ЕС 3.4.21.2, папаин ЕС 3.4.22.2, термолизин ЕС 3.4.24.27, кокколизин ЕС 3.4.24.30, субтилизин ЕС 3.4.21.62, пепсин ЕС3.4.21.4, пролилוליгопептидаза ЕС 3.4.21.26, клостирипаин ЕС 3.4.22.8, олигопептидаза В, ЕС 3.4.21.83, протеиназа Р1 ЕС 3.4.21.96, глицилэндопептидаза ЕС 3.4.22.25 и олигопептидаза F.

На первом этапе были проанализированы данные о наличии в последовательности основного белка молочной сыворотки -  $\beta$ -лактоглобулина (56 % от общего содержания всех фракций) биоактивных пептидов (таблицы 3.7 -3.18).

Таблица 3.7 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе **химотрипсином А** (\*- M – моноизотопная масса)

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M*	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	7685	SF	[149-150]	АПФ-ингибирование	252,10	130,20	-
2	8320	VL	[93-94]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
3	8560	SL	[21-22]	ДПП IV-ингибирование	218,12	-	2517,08
4	8859	PM	[143-144]	ДПП IV-ингибирование	246,09	-	0
5	8891	SF	[149-150]	ДПП IV-ингибирование	252,10	-	0
6	8922	VL	[93-94]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74
7	9030	RVY	[40-42]	АПФ-ингибирование	436,23	205,60	-
8	9166	QKW	[58-60]	Антиоксидантная	460,23	-	-
9	9365	KKY	[99-101]	Антиоксидантная	437,25	-	-
10	9432	SF	[149-150]	Ингибирование ренина	252,10	-	-
11	9955	SL	[21-22]	Регуляторная	218,12	-	-

Таблица 3.8 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе **трипсином**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3261	ALPMHIR	[141-147]	АПФ-ингибирование	836,5	43,00	-
2	3508	GLDIQK	[9-14]	АПФ-ингибирование	672,4	580,00	-
3	8196	IPAVFK	[77-82]	Антибактериальная	673,4	-	-
4	8198	VLVLDTDYK	[91-99]	Антибактериальная	1064,5	-	-
5	8619	TREVDDEALEK	[124-134]	ДПП IV-ингибирование	1244,6	-	319,50
6	8621	IPAVFK	[77-82]	ДПП IV-ингибирование	673,4	-	143,00
7	8622	VLVLDTDYK	[91-99]	ДПП IV-ингибирование	1064,6	--	424,4
8	8904	TK	[75-76]	ДПП IV-ингибирование	247,1	-	0
9	9049	FDK	[135-137]	АПФ-ингибирование	408,2	389,00	-
10	9230	ПАЕК	[70-74]	АПФ-ингибирование	572,4	63,70	-
11	9232	IPAVFK	[77-82]	АПФ-ингибирование	673,4	144,80	-
12	9621	ПАЕК	[70-74]	Гипохолестеринемическая	572,3	-	-

Таблица 3.9 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе **протеиназой К**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3257	RL	[147-148]	АПФ-ингибирование	287,19	2439,00	-
2	7685	SF	[149-150]	АПФ-ингибирование	252,10	130,20	-
3	7810	KP	[46-47]	АПФ-ингибирование	243,14	22,00	-
4	7826	EI	[54-55]	АПФ-ингибирование	260,12	0	-
5	7828	EV	[126-127]	АПФ-ингибирование	246,11	0	-
6	7888	EL	[44-45]	Антиоксидантная	260,13	-	-
7	8218	KP	[46-47]	Антиоксидантная	243,15	-	-
8	8503	TP	[48-49]	ДПП IV-ингибирование	216,10	-	2370,0
9	8519	KP	[46-47]	ДПП IV-ингибирование	243,15	-	2540,0
10	8530	NP	[151-152]	ДПП IV-ингибирование	229,09	-	0
11	8560	SL	[21-22]	ДПП IV-ингибирование	218,12	-	2517,0
12	8560	SL	[30-31]	ДПП IV-ингибирование	218,12	-	2517,0
13	8764	AV	[79-80]	ДПП IV-ингибирование	188,11	-	0
14	8772	EI	[54-55]	ДПП IV-ингибирование	260,13	-	0
15	8775	EV	[126-127]	ДПП IV-ингибирование	246,11	-	0
16	8793	HI	[145-146]	ДПП IV-ингибирование	268,14	-	0

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
17	8812	KI	[82-83]	ДПП IV-ингибирование	259,18	-	0
18	8886	RL	[147-148]	ДПП IV-ингибирование	287,19	-	0
19	8891	SF	[149-150]	ДПП IV-ингибирование	252,10	-	0
20	8951	AV	[79-80]	АПФ-ингибирование	188,11	956,28	-
21	9073	TP	[48-49]	АПФ-ингибирование	216,10	288,40	-
22	9166	QKW	[58-60]	Антиоксидантная	460,23	-	-
23	9365	KKY	[99-101]	Антиоксидантная	437,25	-	-
24	9432	SF	[149-150]	Ингибирование ренина	252,10	-	-
25	9491	RV	[40-41]	ДПП III - ингибирование	273,17	-	-
26	9955	SL	[21-22]	Регулирующая активность ФГК*	218,12	-	-
27	9955	SL	[30-31]	Регулирующая активность ФГК*	218,12	-	-

\*-фосфоглицераткиназа

Таблица 3.10 – Биоактивные пептиды β- лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе термолизином

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	2842	LR	[39-40]	Ингибирование ренина	287,85	-	-
2	3177	AP	[37-38]	ДПП IV-ингибирование	186,09	7950,00	-
3	3258	IR	[146-147]	АПФ-ингибирование	287,18	695,00	-
4	7581	IP	[77-78]	АПФ-ингибирование	228,14	130,00	-
5	7584	AP	[37-38]	АПФ-ингибирование	186,09	230,00	-
6	7829	VE	[43-44]	АПФ-ингибирование	246,11	0	-
7	8215	IR	[146-147]	Антиоксидантная	287,19	-	-
8	8217	LK	[139-140]	Антиоксидантная	259,18	-	-
9	8246	IR	[146-147]	Ингибирование ренина	287,19	-	-
10	8247	IR	[146-147]	Ингибирование CaMPDE	287,19	-	-
11	8501	IP	[77-78]	ДПП IV-ингибирование	228,14	-	410,00
12	8806	IR	[146-147]	ДПП IV-ингибирование	287,19	-	0
13	8916	VE	[43-44]	ДПП IV-ингибирование	246,11	-	0
14	8945	YS	[20-21]	ДПП IV-ингибирование	268,10	-	0
15	9049	FDK	[135-137]	АПФ-ингибирование	408,19	389,00	-
16	9064	LEK	[132-134]	АПФ-ингибирование	388,22	794,40	-
17	9213	LR	[39-40]	АПФ-ингибирование	287,19	158,00	-
18	9478	LR	[39-40]	ДПП III - ингибирование	287,19	-	-
19	9693	VE	[43-44]	Ингибирование α-глюкозидазы	246,11	-	-

Таблица 3.11 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе химотрипсином С

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3259	HIRL	[145-148]	АПФ-ингибирование	537,32	1153	-
2	3386	KW	[59-60]	АПФ-ингибирование	332,17	1,63	-
3	7615	GE	[63-64]	АПФ-ингибирование	204,06	5400	-
4	7810	KP	[46-47]	АПФ-ингибирование	243,15	22	-
5	7829	VE	[43-44]	АПФ-ингибирование	246,11	0	-
6	7834	TQ	[153-154]	АПФ-ингибирование	247,11	0	-
7	8218	KP	[46-47]	Антиоксидантная	243,15	-	-
8	8320	VL	[93-94]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
9	8323	IL	[55-56]	Стимулирующая всасывание глюкозы	244,17	-	-
10	8503	TP	[48-49]	ДПП IV-ингибирование	216,10	-	2370
11	8519	KP	[46-47]	ДПП IV-ингибирование	243,15	-	2540
12	8559	AL	[131-132]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
13	8560	SL	[21-22]	ДПП IV-ингибирование	218,20	-	2517,08
14	8560	SL	[115-116]	ДПП IV-ингибирование	218,20	-	2517,08
15	8781	GE	[63-64]	ДПП IV-ингибирование	204,06	-	0
16	8802	IL	[55-56]	ДПП IV-ингибирование	244,17	-	0
17	8818	KW	[59-60]	ДПП IV-ингибирование	332,17	-	0
18	8906	TM	[6-7]	ДПП IV-ингибирование	250,09	-	0
19	8908	TQ	[153-154]	ДПП IV-ингибирование	247,11	-	0
20	8916	VE	[43-44]	ДПП IV-ингибирование	246,11	-	0
21	8922	VL	[93-94]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74
22	9030	RVY	[40-42]	АПФ-ингибирование	436,23	-	205,6
23	9073	TP	[48-49]	АПФ-ингибирование	216,10	-	288,4
24	9079	IL	[55-56]	АПФ-ингибирование	244,17	-	54,95
25	9348	CAQ	[65-67]	Антиоксидантная	337,10	-	-
26	9353	FCM	[104-106]	Антиоксидантная	416,11	-	-
27	9356	ACQ	[117-119]	Антиоксидантная	337,10	-	-
28	9365	KKY	[99-101]	Антиоксидантная	437,25	-	-
29	9369	CHI	[159-161]	Антиоксидантная	388,14	-	-
30	9487	GE	[63-64]	ДПП III - ингибирование	204,06	-	-
31	9693	VE	[43-44]	Ингибирование $\alpha$ -глюкозидазы	246,11	-	-
32	9955	SL	[21-22]	Регулирующая активность ФГК*	218,12	-	-
33	9955	SL	[115-116]	Регулирующая активность ФГК	218,12	-	-
34	10022	HIRL	[145-148]	Нейропептидная	537,33	-	-



Таблица 3.12 – Биоактивные пептиды  $\beta$ - лактоглобулина и их активности,  
полученные при гидролизе **папаином**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3760	KPT	[46-48]	Нейропептидная	344,19		
2	7600	AG	[16-17]	АПФ-ингибирование	146,06	2500,00	-
3	7628	VR	[122-123]	АПФ-ингибирование	273,17	52,80	
4	7632	MKG	[7-9]	АПФ-ингибирование	334,16	71,85	-
5	7685	SF	[149-150]	АПФ-ингибирование	252,10	130,20	-
6	7901	WYSL	[19-22]	Антиоксидантная	567,26	-	-
7	8320	VL	[93-94]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
8	8329	EE	[156-157]	Стимулирующая всасывание глюкозы	276,08	-	-
9	8559	AL	[85-86]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
10	8559	AL	[131-132]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
11	8559	AL	[138-139]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
12	8559	AL	[141-142]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
13	8594	VR	[122-123]	ДПП IV-ингибирование	273,17	-	826,10
14	8760	AG	[16-17]	ДПП IV-ингибирование	146,06	-	0
15	8874	QL	[154-155]	ДПП IV-ингибирование	259,14	-	0
16	8877	QS	[35-36]	ДПП IV-ингибирование	233,09	-	0
17	8878	QT	[5-6]	ДПП IV-ингибирование	247,10	-	0
18	8891	SF	[149-150]	ДПП IV-ингибирование	252,10	-	0
19	8922	VL	[93-94]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
20	9358	QCL	[119-121]	Антиоксидантная	379,14	-	-
21	9432	SF	[149-150]	Ингибирование ренина	252,10	-	-
22	10112	MKG	[7-9]	Нейропептидная	334,16	-	-

Таблица 3.13 – Биоактивные пептиды  $\beta$ - лактоглобулина и их активности,  
полученные при гидролизе **кокколизином**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3177	AP	[37-38]	ДПП IV-ингибирование	186,09	-	7950,00
2	3258	IR	[146-147]	АПФ-ингибирование	287,19	695,00	-
3	7581	IP	[77-78]	АПФ-ингибирование	228,14	130,00	410,00
4	7584	AP	[37-38]	АПФ-ингибирование	186,10	230,00	-
5	8215	IR	[146-147]	Антиоксидантная	287,19	-	-
6	8217	LK	[139-140]	Антиоксидантная	259,18	-	-
7	8246	IR	[146-147]	Ингибирование ренина	287,19	-	-
8	8247	IR	[146-147]	Ингибирование CaMPDE	287,19	-	-
9	8321	LV	[92-93]	Стимулирующая всасывание глюкозы всасывание глюкозы	230,15	-	-
10	8501	IP	[77-78]	ДПП IV-ингибирование	228,14	130,00	410,00

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
11	8764	AV	[79-80]	ДПП IV-ингибирование	188,10	-	0
12	8806	IR	[146-147]	ДПП IV-ингибирование	287,19	-	0
13	8825	LV	[92-93]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	-
14	8945	YS	[20-21]	ДПП IV-ингибирование	268,10	-	0
15	8951	AV	[79-80]	АПФ-ингибирование	188,10	956,28	-
16	9049	FDK	[135-137]	АПФ-ингибирование	408,19	389,00	-
17	9064	LEK	[132-134]	АПФ-ингибирование	388,22	794,40	-
18	9362	YVE	[42-44]	Антиоксидантная	409,17	-	-
19	10172	LVRTPE VDDE	[121-130]	Са-связывающая	1171,5 6	-	-

Таблица 3.14 – Биоактивные пептиды β- лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе субтилизином

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3384	VF	[80-81]	АПФ-ингибирование	264,14	9,20	-
2	3492	VY	[41-42]	АПФ-ингибирование	280,13	7,10	-
3	3980	VAGTW	[15-19]	АПФ-ингибирование	532,25	534,00	-
4	8224	VY	[41-42]	Антиоксидантная	280,13	-	-
5	8320	VL	[91-92]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
6	8320	VL	[93-94]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
7	8917	VF	[80-81]	ДПП IV-ингибирование	264,14	-	0
8	8922	VL	[91-92]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
9	8922	VL	[93-94]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
10	8929	VY	[41-42]	ДПП IV-ингибирование	280,13	-	-
11	9166	QKW	[58-60]	Антиоксидантная	460,23	-	-
12	9365	KKY	[99-101]	Антиоксидантная	437,25	-	-
13	9509	VY	[41-42]	ДПП III-ингибирование	280,13	-	-

Таблица 3.15 – Биоактивные пептиды β- лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе пепсином

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	7685	SF	[149-150]	АПФ-ингибирование	252,10	130,20	-
2	8320	VL	[93-94]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
3	8891	SF	[149-150]	ДПП IV-ингибирование	252,10	-	0
4	8922	VL	[93-94]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
5	9432	SF	[149-150]	Ингибирование ренина	252,10	-	-

Таблица 3.16 – Биоактивные пептиды  $\beta$ - лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе **пролилолигопептидазой**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	8503	TP	[48-49]	ДПП IV-ингибирование	216,09	288,40	-
2	9073	TP	[48-49]	АПФ-ингибирование	216,09	-	2370,00

Таблица 3.17 – Биоактивные пептиды  $\beta$ - лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе **кlostрипаином**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	Моноизотопная масса
Нет данных					

Таблица 3.18 – Биоактивные пептиды  $\beta$ - лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе **олигопептидазой В**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	Моноизотопная масса
Нет данных					

Таблица 3.19 – Биоактивные пептиды  $\beta$ - лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе **протеиназой P1**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	Моноизотопная масса
Нет данных					

Таблица 3.20 – Биоактивные пептиды  $\beta$ - лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе **глицилэндопептидазой**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	2882	YG	[18-19]	Иммуномодулирующая	238,04	-	-
2	3553	YG	[18-19]	ДПП IV-ингибирование	238,04	-	0
3	8936	YG	[18-19]	АПФ-ингибирование	238,04	1523,00	-

Таблица 3.21 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -лактоглобулина и их активности, полученные при гидролизе олигопептидазой F

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	8139	PEL	[24-26]	Антиоксидантная	357,17	-	-

Таблица 3.22 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе химотрипсином A

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3492	VY	[59-60]	АПФ-ингибирование	280,13	7,1	-
2	8224	VY	[59-60]	Антиоксидантная	280,13	-	-
3	8560	SL	[69-70]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	2517,08
4	8560	SL	[164-165]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	2517,08
5	8652	PPL	[136-138]	ДПП IV-ингибирование	325,18	-	390,14
6	8854	PF	[51-52]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	0
7	8854	PF	[61-62]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	0
8	8854	PF	[110-111]	ДПП IV-ингибирование	262,12	--	0
9	8905	TL	[126-127]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
10	8929	VY	[59-60]	ДПП IV-ингибирование	280,13	-	0
11	9505	PF	[51-52]	ДПП III ингибирование	262,12	-	--
12	9505	PF	[61-62]	ДПП III ингибирование	262,12	-	-
13	9505	PF	[110-111]	ДПП III ингибирование	262,12	-	-
14	9509	VY	[59-60]	ДПП III ингибирование	280,13	-	-
15	9908	PPL	[136-138]	АПФ-ингибирование	325,18	427,15	-
16	9955	SL	[69-70]	Регулирующая активность ФГК	218,11	-	-
17	9955	SL	[164-165]	Регулирующая активность ФГК	218,11	-	-

Далее были проанализированы данные о наличии в последовательности  $\kappa$ -казеина и  $\beta$ -казеина биоактивных пептидов (таблицы 3.19 -3.48).

Таблица 3.23 – Биоактивные пептиды  $\kappa$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе химотрипсином A

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	7559	PSY	[57-59]	АПФ-ингибирование	365,14	16,00	-
2	7599	GL	[60-61]	АПФ-ингибирование	188,10	25,00	-
3	7685	SF	[125-126]	АПФ-ингибирование	252,10	130,20	-
4	7843	PH	[120-121]	АПФ-ингибирование	252,11	0	-

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
5	7843	RH	[122-123]	АПФ-ингибирование	252,11	0	-
6	8320	VL	[52-53]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
7	8559	AL	[13-14]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
8	8561	GL	[60-61]	ДПП IV-ингибирование	188,10	-	2615,03
9	8613	PIQY	[47-51]	ДПП IV-ингибирование	632,34	-	35,20
10	8804	IN	[72-73]	ДПП IV-ингибирование	245,12	-	0
11	8854	PF	[17-18]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	0
12	8856	RH	[120-121]	ДПП IV-ингибирование	252,11	-	0
13	8856	RH	[122-123]	ДПП IV-ингибирование	252,11	-	0
14	8866	PY	[78-79]	ДПП IV-ингибирование	278,11	-	0
15	8866	PY	[80-81]	ДПП IV-ингибирование	278,11	-	0
16	8870	QF	[75-76]	ДПП IV-ингибирование	293,12	-	0
17	8880	QW	[96-97]	ДПП IV-ингибирование	332,13	-	0
18	8891	SF	[125-126]	ДПП IV-ингибирование	252,10	-	0
19	8905	TL	[15-16]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
20	8922	VL	[52-53]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
21	9431	QF	[75-76]	Ингибирование ренина	293,12	-	-
22	9432	SF	[125-126]	Ингибирование ренина	252,10	-	-
23	9505	PF	[17-18]	ДПП III ингибирование	262,12	-	-
24	9856	PY	[78-79]	Противовоспалительная	278,11	-	-
25	9856	PY	[80-81]	Противовоспалительная	278,12	-	-

Таблица 3.24 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе трипсином

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3480	AVPYR QR	[177-183]	АПФ-ингибирование	829,43	15,00	-
2	3511	EMPFK K	[108-113]	АПФ-ингибирование	747,34	423,00	-
3	7558	VK	[98-99]	АПФ-ингибирование	245,16	13,00	-
4	7844	HK	[106-107]	АПФ-ингибирование	283,15	0	-
5	7875	AVPYR QR	[177-183]	Антиоксидантная	829,43	-	-
6	8159	GRFPIV	[203-209]	АПФ-ингибирование	741,42	0	-
7	8921	VK	[98-99]	ДПП IV-ингибирование	245,16	0	-
8	9494	HK	[106-107]	ДПП III ингибирование	283,15	-	-
9	9745	EMPFK K	[108-113]	Стимулирующая всасывание глюкозы	747,34	-	-
10	9771	EMPFK K	[108-113]	Антибактериальная	747,34	-	-
11	10079	AVPYR	[177-183]	Ca-связывающая	829,43	-	-

Таблица 3.25 – Биоактивные пептиды  $\kappa$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе трипсином

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3215	YIPIQY VLSR	[46-55]	Сокращение подвздошной кишки	1250,6	-	-
2	3216	YIPIQY VLSR	[46-55]	Опиоидный антагонист	1250,7	-	-
3	3291	NQDK	[134-137]	Антимикробная	503,23	-	-
4	7626	IAK	[43-45]	АПФ-ингибирование	330,22	15,70	-
5	10105	IAK	[43-45]	Антибактериальная	330,22	-	-
6	10106	IAK	[43-45]	Гипотензивная	330,21	-	-

Таблица 3.26 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе протеиназой К

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	2753	GP	[64-65]	Регулирование активности ФГК	172,07	-	-
2	2753	GP	[199-200]	Регулирование активности ФГК	172,07	-	--
3	3169	GP	[64-65]	ДПП IV-ингибирование	172,07	-	9690,00
4	3169	GP	[199-200]	ДПП IV-ингибирование	172,07	-	9690,00
5	3177	AP	[103-104]	ДПП IV-ингибирование	186,08	-	7950,00
6	3283	GP	[64-65]	Антитромбическая	172,07	-	-
7	3283	GP	[199-200]	Антитромбическая	172,07	-	-
8	3317	HL	[134-135]	Антиоксидантная	268,14	-	-
9	3461	GP	[64-65]	Антиамнестическая	172,07	-	-
10	3461	GP	[199-200]	Антиамнестическая	172,07	-	-
11	7512	GP	[64-65]	АПФ-ингибирование	172,07	252,63	-
12	7512	GP	[199-200]	АПФ-ингибирование	172,07	252,63	-
13	7584	AP	[103-104]	АПФ-ингибирование	186,08	230,00	-
14	7602	HL	[134-135]	АПФ-ингибирование	268,14	3200,00	-
15	7608	GV	[94-95]	АПФ-ингибирование	174,08	4600,00	-
16	7691	KY	[113-114]	АПФ-ингибирование	309,15	13,00	-
17	7828	EV	[91-92]	АПФ-ингибирование	246,11	0	-
18	7842	HP	[50-51]	АПФ-ингибирование	252,11	0	-
19	8520	HP	[50-51]	ДПП IV-ингибирование	252,11	-	40000,00
20	8532	QP	[89-90]	ДПП IV-ингибирование	243,11	-	0
21	8532	QP	[117-118]	ДПП IV-ингибирование	243,11	-	0
22	8557	HL	[134-135]	ДПП IV-ингибирование	268,14	-	143,19
23	8560	SL	[164-165]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	2517,08
24	8775	EV	[91-92]	ДПП IV-ингибирование	246,11	-	0
25	8786	GV	[94-95]	ДПП IV-ингибирование	174,08	-	0
26	8819	KY	[113-114]	ДПП IV-ингибирование	309,15	-	0

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
27	8851	NV	[7-8]	ДПП IV-ингибирование	231,11	-	0
28	8905	TL	[126-127]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
29	8912	TV	[154-155]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	0
30	9493	HL	[134-135]	ДПП III-ингибирование	268,14	-	-
31	9496	HP	[50-51]	ДПП III-ингибирование	252,11	-	-
32	9566	QP	[89-90]	АПФ-ингибирование	243,11	598,1	-
33	9566	QP	[117-118]	АПФ-ингибирование	243,11	598,1	-
34	9955	SL	[164-165]	Регулирование активности ФГК	218,11	-	-

Таблица 3.27 – Биоактивные пептиды к-казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе протеиназой К

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3317	HL	[123-124]	Антиоксидантная	268,14	-	-
2	7599	GL	[60-61]	АПФ-ингибирование	188,10	2500,00	-
3	7602	HL	[123-124]	АПФ-ингибирование	268,14	3200,00	-
4	8193	AI	[128-129]	АПФ-ингибирование	202,12	3,41	-
5	7682	NY	[62-63]	АПФ-ингибирование	295,10	32,60	-
6	7684	SY	[58-59]	АПФ-ингибирование	268,09	66,30	-
7	7685	SF	[125-126]	АПФ-ингибирование	252,10	130,20	-
8	7826	EI	[179-180]	АПФ-ингибирование	260,12	0	-
9	7828	EV	[172-173]	АПФ-ингибирование	246,11	0	-
10	7842	HP	[121-122]	АПФ-ингибирование	252,11	0	-
11	8520	HP	[121-122]	ДПП IV-ингибирование	252,11	-	40000,00
12	8557	HL	[123-124]	ДПП IV-ингибирование	268,14	-	143,19
13	8559	AL	[13-14]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
14	8559	AL	[70-71]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
15	8561	GL	[60-61]	ДПП IV-ингибирование	188,10	-	2615,03
16	8772	EI	[179-180]	ДПП IV-ингибирование	260,12	-	0
17	8775	EV	[172-173]	ДПП IV-ингибирование	246,11	-	0
18	8853	NY	[62-63]	ДПП IV-ингибирование	295,10	-	0
19	8879	QV	[98-99]	ДПП IV-ингибирование	245,12	-	0
20	8879	QV	[184-185]	ДПП IV-ингибирование	245,12	-	0
21	8880	QW	[96-97]	ДПП IV-ингибирование	332,13	-	0
22	8881	QY	[50-51]	ДПП IV-ингибирование	309,12	-	0
23	8891	SF	[125-126]	ДПП IV-ингибирование	252,10	-	0
24	8897	SY	[58-59]	ДПП IV-ингибирование	268,09	-	0
25	8903	TI	[10-11]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
26	8903	TI	[142-143]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
27	8905	TL	[15-16]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
28	9432	SF	[125-126]	Ингибитор ренина	252,10	-	-
29	9493	HL	[123-124]	ДПП III-ингибирование	268,14	-	-
30	9496	HP	[121-122]	ДПП III-ингибирование	252,11	-	-

Таблица 3.28 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе термолизином

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3180	LP	[171-172]	ДПП IV-ингибирование	228,13	-	2370,00
2	3181	VP	[178-179]	ДПП IV-ингибирование	214,12	-	880,00
3	3305	LH	[133-134]	Антиоксидантная	268,14	-	-
4	3391	LPP	[135-137]	АПФ-ингибирование	325,18	9,60	-
5	3502	FP	[205-206]	АПФ-ингибирование	262,12	315,00	-
6	3522	IPP	[74-76]	АПФ-ингибирование	325,18	5,00	-
7	3524	VPP	[84-86]	АПФ-ингибирование	311,17	9,00	-
8	3666	YP	[60-61]	АПФ-ингибирование	278,11	720,00	-
9	3666	YP	[114-115]	АПФ-ингибирование	278,11	720,00	-
10	7508	LGP	[198-200]	АПФ-ингибирование	285,15	0,72	-
11	7587	VP	[178-179]	АПФ-ингибирование	214,12	420,00	-
12	7832	LN	[6-7]	АПФ-ингибирование	245,12	0	-
13	8506	FP	[205-206]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	363,00
14	8521	YP	[60-61]	ДПП IV-ингибирование	278,11	-	3170,00
15	8521	YP	[114-115]	ДПП IV-ингибирование	278,11	-	3170,00
16	8805	IQ	[187-188]	ДПП IV-ингибирование	259,14	-	0
17	8820	LH	[133-134]	ДПП IV-ингибирование	268,14	-	0
18	8823	LN	[6-7]	ДПП IV-ингибирование	245,12	-	0
19	8824	LT	[125-126]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
20	8923	VM	[155-156]	ДПП IV-ингибирование	248,10	-	0
21	9031	LEE	[3-5]	АПФ-ингибирование	389,16	100	--
22	9378	FPPQS	[157-161]	АПФ-ингибирование	574,26	0	-
23	9537	IPP	[74-76]	Противовоспалительная	325,18	-	-
24	9538	VPP	[84-86]	Противовоспалительная	311,17	-	-
25	9548	YP	[60-61]	Ингибирование $\alpha$ -глюкозидазы	278,11	-	-
26	9548	YP	[114-115]	Ингибирование $\alpha$ -глюкозидазы	278,11	-	-
27	9564	VRGP	[201-204]	АПФ-ингибирование	427,24	120,90	-
28	9882	VM	[155-156]	АПФ-ингибирование	248,10	0	-
29	10092	LP	[171-172]	АПФ-ингибирование	228,10	117,80	-

Таблица 3.29 – Биоактивные пептиды  $\kappa$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе термолизином

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	2882	YG	[59-60]	Иммуномодулирующая	238,08	-	-
2	3180	LP	[16-17]	ДПП IV-ингибирование	228,13	-	2370,00
3	3180	LP	[77-78]	ДПП IV-ингибирование	228,13	-	2370,00
4	3553	YG	[59-60]	АПФ-ингибирование	238,08	1523,00	-
5	3666	YP	[79-80]	АПФ-ингибирование	278,11	720,00	-



№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
6	7581	IP	[47-48]	АПФ-ингибирование	228,13	130,00	-
7	7619	LG	[19-20]	АПФ-ингибирование	188,10	8800,00	-
8	7832	LN	[61-62]	АПФ-ингибирование	245,12	0	-
9	8501	IP	[47-48]	ДПП IV-ингибирование	228,13	-	410,00
10	8521	YP	[79-80]	ДПП IV-ингибирование	278,11	-	3170,00
11	8763	AT	[165-166]	ДПП IV-ингибирование	190,08	-	0
12	8764	AV	[189-190]	ДПП IV-ингибирование	188,10	-	0
13	8805	IQ	[49-50]	ДПП IV-ингибирование	259,14	-	0
14	8823	LN	[61-62]	ДПП IV-ингибирование	245,12	-	0
15	8824	LT	[14-15]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
16	8936	YG	[59-60]	ДПП IV-ингибирование	238,08	-	0
17	8946	YV	[51-52]	ДПП IV-ингибирование	280,13	-	0
18	8951	AV	[189-190]	АПФ-ингибирование	188,10	956,28	-
19	9077	YV	[51-52]	АПФ-ингибирование	280,13	575,40	-
20	9503	FM	[126-127]	ДПП III-ингибирование	296,10	-	-
21	9508	YG	[59-60]	ДПП III-ингибирование	238,08	-	-
22	9548	YP	[79-80]	Ингибирование $\alpha$ -глюкозидазы	278,11	-	-
23	10092	LP	[16-17]	АПФ-ингибирование	228,13	117,80	-
24	10092	LP	[77-78]	АПФ-ингибирование	228,13	117,8	-

Таблица 3.30 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе химоотрипсином С

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	2753	GP	[64-65]	Регулирование активности ФГК	172,07	-	-
2	2753	GP	[199-200]	Регулирование активности ФГК	172,07	-	-
3	3169	GP	[64-65]	ДПП IV-ингибирование	172,07	-	9690,00
4	3169	GP	[199-200]	ДПП IV-ингибирование	172,07	-	9690,00
5	3177	AP	[103-104]	ДПП IV-ингибирование	186,08	-	7950,00
6	3181	VP	[8-9]	ДПП IV-ингибирование	214,12	-	880,00
7	3181	VP	[173-174]	ДПП IV-ингибирование	214,12	-	880,00
8	3283	GP	[64-65]	Антитромбическая	172,07	-	-
9	3283	GP	[199-200]	Антитромбическая	172,07	-	-
10	3317	HL	[134-135]	Антиоксидантная	268,14	-	-
11	3461	GP	[64-65]	Антиамнестическая	172,07	-	-
12	3461	GP	[199-200]	Антиамнестическая	172,07	-	-
13	3492	VY	[59-60]	АПФ-ингибирование	280,13	7,10	-
14	3502	FP	[62-63]	АПФ-ингибирование	262,12	315,00	-
15	3502	FP	[111-112]	АПФ-ингибирование	262,12	315,00	-

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
16	3502	FP	[157-158]	АПФ-ингибирование	262,12	315,00	-
17	3502	FP	[205-206]	АПФ-ингибирование	262,12	315,00	-
18	7512	GP	[64-65]	АПФ-ингибирование	172,07	252,63	-
19	7512	GP	[199-200]	АПФ-ингибирование	172,07	252,63	-
20	7581	IP	[74-75]	АПФ-ингибирование	228,13	130,00	-
21	7584	AP	[103-104]	АПФ-ингибирование	186,08	230,00	-
22	7587	VP	[8-9]	АПФ-ингибирование	214,12	420,00	-
23	7587	VP	[173-174]	АПФ-ингибирование	214,12	420,00	-
24	7602	HL	[134-135]	АПФ-ингибирование	268,14	3200,00	-
25	7615	GE	[10-11]	АПФ-ингибирование	204,06	5400,00	-
26	7691	KY	[113-114]	АПФ-ингибирование	309,15	13,00	-
27	7830	TE	[41-42]	АПФ-ингибирование	248,08	0	-
28	7834	TQ	[55-56]	АПФ-ингибирование	247,10	0	-
29	7834	TQ	[78-79]	АПФ-ингибирование	247,10	0	-
30	8224	VY	[59-60]	Антиоксидантная	280,13	-	-
31	8320	VL	[197-198]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
32	8330	SE	[35-36]	Стимулирующая всасывание глюкозы	234,07	-	-
33	8501	IP	[74-75]	ДПП IV-ингибирование	228,13	-	410,00
34	8503	TP	[80-81]	ДПП IV-ингибирование	216,09	-	2370,00
35	8506	FP	[62-63]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	363,00
36	8506	FP	[111-112]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	363,00
37	8506	FP	[157-158]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	363,00
38	8506	FP	[205-206]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	363,00
39	8555	FL	[87-88]	ДПП IV-ингибирование	278,15	-	399,58
40	8557	HL	[134-135]	ДПП IV-ингибирование	268,14	-	143,19
41	8560	SL	[15-16]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	2517,08
42	8560	SL	[57-58]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	2517,08
43	8560	SL	[69-70]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	2517,08
44	8560	SL	[124-125]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	2517,08
45	8560	SL	[164-165]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	2517,08
46	8781	GE	[10-11]	ДПП IV-ингибирование	204,06	-	0
47	8805	IQ	[187-188]	ДПП IV-ингибирование	259,14	-	0
48	8819	KY	[113-114]	ДПП IV-ингибирование	309,15	-	0
49	8896	SW	[142-143]	ДПП IV-ингибирование	291,11	-	0
50	8899	TE	[41-42]	ДПП IV-ингибирование	248,0	-	0
51	8905	TL	[126-127]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
52	8908	TQ	[55-56]	ДПП IV-ингибирование	247,10	-	0
53	8908	TQ	[78-79]	ДПП IV-ингибирование	247,10	-	0
54	8922	VL	[197-198]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
55	8923	VM	[92-93]	ДПП IV-ингибирование	248,10	-	0
56	8925	VQ	[116-117]	ДПП IV-ингибирование	245,12	-	0
57	8929	VY	[59-60]	ДПП IV-ингибирование	280,13	-	-

58	9042	AFL	[189-191]	АПФ-ингибирование	349,18	63,10	-
59	9073	TP	[80-81]	АПФ-ингибирование	216,09	288,40	-
60	9487	GE	[10-11]	ДПП III-ингибирование	204,06	-	-
61	9493	HL	[134-135]	ДПП III-ингибирование	268,14	-	-
62	9502	FL	[87-88]	ДПП III-ингибирование	278,15	-	-
63	9509	VY	[59-60]	ДПП III-ингибирование	280,13	-	-
64	9560	DKHP	[47-51]	АПФ-ингибирование	608,31	0	-
65	9564	VRGP	[201-204]	АПФ-ингибирование	427,24	120,90	-
66	9879	SVL	[161-163]	Антиоксидантная	317,18	-	-
67	9882	VM	[92-93]	АПФ-ингибирование	248,10	0	-
68	9955	SL	[15-16]	Регулирование активности ФГК	218,11	-	-
69	9955	SL	[57-58]	Регулирование активности ФГК	218,11	-	-
70	9955	SL	[69-70]	Регулирование активности ФГК	218,11	-	-
71	9955	SL	[124-125]	Регулирование активности ФГК	218,11	-	-
72	9955	SL	[164-165]	Регулирование активности ФГК	218,11	-	-

Таблица 3.31 – Биоактивные пептиды к-казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе химотрипсином С

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3317	HL	[123-124]	Антиоксидантная	268,14	-	-
2	3597	APR	[128-130]	АПФ-ингибирование	299,17	670,00	-
3	7481	VTSTAV	[185-190]	АПФ-ингибирование	576,29	52,00	-
4	7581	IP	[47-48]	АПФ-ингибирование	228,13	130,00	-
5	7581	IP	[140-141]	АПФ-ингибирование	228,13	130,00	-
6	7599	GL	[60-61]	АПФ-ингибирование	188,10	2500,00	-
7	7602	HL	[123-124]	АПФ-ингибирование	268,14	3200,00	-
8	7684	SY	[58-59]	АПФ-ингибирование	268,09	66,30	-
9	7810	KP	[67-68]	АПФ-ингибирование	243,14	22,00	-
10	7842	HP	[121-122]	АПФ-ингибирование	252,11	0	-
11	8218	KP	[67-68]	Антиоксидантная	243,14	-	-
12	8265	STVATL	[162-167]	Антибактериальная	590,31	-	-
13	8320	VL	[52-53]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
14	8320	VL	[99-100]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
15	8323	IL	[94-95]	Стимулирующая всасывание глюкозы	244,16	-	-

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
16	8501	IP	[47-48]	ДПП IV-ингибирование	228,13	-	410,00
17	8501	IP	[140-141]	ДПП IV-ингибирование	228,13	-	410,00
18	8505	SP	[176-177]	ДПП IV-ингибирование	202,08	-	5980,00
19	8519	KP	[67-68]	ДПП IV-ингибирование	243,14	-	2540,00
20	8520	HP	[121-122]	ДПП IV-ингибирование	252,11	-	40000,00
21	8555	FL	[18-19]	ДПП IV-ингибирование	278,15	-	399,58
22	8555	FL	[76-77]	ДПП IV-ингибирование	278,15	-	399,58
23	8557	HL	[123-124]	ДПП IV-ингибирование	268,14	-	143,19
24	8559	AL	[13-14]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
25	8561	GL	[60-61]	ДПП IV-ингибирование	188,10	-	2615,03
26	8802	IL	[94-95]	ДПП IV-ингибирование	244,16	-	0
27	8804	IN	[72-73]	ДПП IV-ингибирование	245,12	-	0
28	8804	IN	[180-181]	ДПП IV-ингибирование	245,12	-	0
29	8805	IQ	[49-50]	ДПП IV-ингибирование	259,14	-	0
30	8897	SY	[58-59]	ДПП IV-ингибирование	268,09	-	0
31	8905	TL	[15-16]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
32	8922	VL	[52-53]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
33	8922	VL	[99-100]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
34	9079	IL	[94-95]	АПФ-ингибирование	244,16	54,95	-
35	9493	HL	[123-124]	ДПП III-ингибирование	268,14	-	-
36	9496	HP	[121-122]	ДПП III-ингибирование	252,11	-	-
37	9502	FL	[18-19]	ДПП III-ингибирование	278,15	-	-
38	9502	FL	[76-77]	ДПП III-ингибирование	278,15	-	-

Таблица 3.32 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе папайном

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	2754	PG	[63-64]	Регулирование активности ФГК	172,07	-	--
2	3170	PP	[158-159]	ДПП IV-ингибирование	212,10	-	5860,00
3	3285	PG	[63-64]	Антитромбическая	172,07	-	-
4	3317	HL	[134-135]	Антиоксидантная	268,14	-	-
5	3371	AVPYP	[177-181]	АПФ-ингибирование	545,27	80,00	-
6	3460	PG	[63-64]	Антиамнестическая	172,07	-	-
7	7583	AF	[189-190]	АПФ-ингибирование	236,10	190,00	-
8	7602	HL	[134-135]	АПФ-ингибирование	268,14	3200,00	-
9	7625	PG	[63-64]	АПФ-ингибирование	172,07	17000,00	-
10	7836	PP	[158-159]	АПФ-ингибирование	212,10	0	-
11	7888	EL	[2-3]	Антиоксидантная	260,12	-	-
12	8557	HL	[134-135]	ДПП IV-ингибирование	268,14	-	143,19
13	8560	SL	[164-165]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	2517,08
14	8652	PPL	[136-138]	ДПП IV-ингибирование	325,18	-	390,14

## Продолжение таблицы 3.32

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
15	8759	AF	[189-190]	ДПП IV-ингибирование	236,10	-	0
16	8773	ES	[121-122]	ДПП IV-ингибирование	234,07	-	0
17	8854	PF	[204-205]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	0
18	8855	PG	[63-64]	ДПП IV-ингибирование	172,07	-	0
19	8878	QT	[40-41]	ДПП IV-ингибирование	247,10	-	
20	8878	QT	[54-55]	ДПП IV-ингибирование	247,10	-	0
21	8878	QT	[79-80]	ДПП IV-ингибирование	247,10	-	0
22	9493	HL	[134-135]	ДПП III-ингибирование	268,14	-	-
23	9505	PF	[204-205]	ДПП III-ингибирование	262,12	-	-
24	9651	PP	[158-159]	Ингибирование α-глюкозидазы	212,10	-	-
25	9908	PPL	[136-138]	АПФ-ингибирование	325,18	427,15	-
26	9955	SL	[164-165]	Регулирование активности ФГК	218,11	-	-

Таблица 3.33 – Биоактивные пептиды к-казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе папаином

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3181	VP	[104-105]	ДПП IV-ингибирование	214,12	-	880,00
2	7587	VP	[104-105]	АПФ-ингибирование	214,12	420,00	-
3	7685	SF	[125-126]	АПФ-ингибирование	252,10	130,20	-
4	7742	AR	[117-118]	АПФ-ингибирование	245,13	95,50	-
5	7833	PT	[155-156]	АПФ-ингибирование	216,09	0	-
6	7965	NYU	[62-64]	Антиоксидантная	458,16	-	-
7	8269	EPT	[139-142]	Антибактериальная	458,22	-	-
8	8323	IL	[11-12]	Стимулирующая всасывание глюкозы	244,16	-	-
9	8505	SP	[90-91]	ДПП IV-ингибирование	202,08	-	5980,00
10	8559	AL	[13-14]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
11	8559	AL	[70-71]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
12	8763	AT	[165-166]	ДПП IV-ингибирование	190,08	-	0
13	8764	AV	[189-190]	ДПП IV-ингибирование	188,10	-	0
14	8802	IL	[11-12]	ДПП IV-ингибирование	244,16	-	0
15	8854	PF	[17-18]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	0
16	8863	PT	[155-156]	ДПП IV-ингибирование	216,09	-	0
17	8869	QE	[22-23]	ДПП IV-ингибирование	275,10	-	0
18	8869	QE	[26-27]	ДПП IV-ингибирование	275,10	-	0
19	8870	QF	[75-76]	ДПП IV-ингибирование	293,12	-	0
20	8875	QN	[24-25]	ДПП IV-ингибирование	260,10	-	0
21	8880	QW	[96-97]	ДПП IV-ингибирование	332,11	-	0

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
22	8891	SF	[125-126]	ДПП IV-ингибирование	252,10	-	0
23	8951	AV	[189-190]	АПФ-ингибирование	188,10	956,28	-
24	9079	IL	[11-12]	АПФ-ингибирование	244,16	54,95	-
25	9184	ST	[153-154]	АПФ-ингибирование	206,07	4,03	-
26	9184	ST	[187-188]	АПФ-ингибирование	206,07	4,03	-
27	9431	QF	[75-76]	Ингибитор ренина	293,12	-	-
28	9432	SF	[125-126]	Ингибитор ренина	252,10	-	-
29	9505	PF	[17-18]	ДПП III-ингибирование	262,12	-	-

Таблица 3.34 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе **КОККОЛИЗИНОМ**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3305	LH	[133-134]	Антиоксидантная	268,14	-	-
2	3370	AVP	[177-179]	АПФ-ингибирование	285,15	340,00	-
3	3391	LPP	[135-137]	АПФ-ингибирование	325,18	9,60	-
4	3502	FP	[205-206]	АПФ-ингибирование	262,12	315,00	-
5	3522	IPP	[74-76]	АПФ-ингибирование	325,18	5,00	-
6	3666	YP	[60-61]	АПФ-ингибирование	278,11	720,00	-
7	8321	LV	[58-59]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
8	8322	IV	[208-209]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
9	8506	FP	[205-206]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	363,00
10	8521	YP	[60-61]	ДПП IV-ингибирование	278,11	-	3170,00
11	8805	IQ	[187-188]	ДПП IV-ингибирование	259,14	-	0
12	8820	LH	[133-134]	ДПП IV-ингибирование	268,14	-	0
13	8824	LT	[125-126]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
14	8825	LV	[58-59]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	0
15	9031	LEE	[3-5]	АПФ-ингибирование	389,16	100,00	-
16	9537	IPP	[74-76]	Противовоспалительная	325,18	-	-
17	9548	YP	[60-61]	Ингибирование $\alpha$ -глюкозидазы	278,11	-	-

Таблица 3.35 – Биоактивные пептиды  $\kappa$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе **КОККОЛИЗИНОМ**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	2882	YG	[59-60]	Иммуномодулирующая	238,08	-	-
2	3180	LP	[16-17]	ДПП IV-ингибирование	228,13	-	2370

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
3	3180	LP	[77-78]	ДПП IV-ингибирование	228,13	-	2370
4	3553	YG	[59-60]	АПФ-ингибирование	238,08	1523	-
5	3666	YP	[79-80]	АПФ-ингибирование	278,11	720	-
6	7581	IP	[47-48]	АПФ-ингибирование	228,13	130	-
7	7619	LG	[19-20]	АПФ-ингибирование	188,10	8800	-
8	7832	LN	[61-62]	АПФ-ингибирование	245,12	0	-
9	8501	IP	[47-48]	ДПП IV-ингибирование	228,13	-	410
10	8521	YP	[79-80]	ДПП IV-ингибирование	278,11	-	3170
11	8763	AT	[165-166]	ДПП IV-ингибирование	190,08	-	0
12	8764	AV	[189-190]	ДПП IV-ингибирование	188,10	-	0
13	8805	IQ	[49-50]	ДПП IV-ингибирование	259,14	-	0
14	8823	LN	[61-62]	ДПП IV-ингибирование	245,12	-	0
15	8824	LT	[14-15]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
16	8936	YG	[59-60]	ДПП IV-ингибирование	238,08	-	0
17	8946	YV	[51-52]	ДПП IV-ингибирование	280,13	-	0
18	8951	AV	[189-190]	АПФ-ингибирование	188,10	956,28	-
19	9077	YV	[51-52]	АПФ-ингибирование	280,13	575,4	-
20	9503	FM	[126-127]	ДПП III-ингибирование	296,10	-	-
21	9508	YG	[59-60]	ДПП III-ингибирование	238,08	-	-
22	9548	YP	[79-80]	Ингибирование $\alpha$ -глюкозидазы	278,11	-	-
23	10092	LP	[16-17]	АПФ-ингибирование	228,13	117,8	-
24	10092	LP	[77-78]	АПФ-ингибирование	228,13	117,8	-

Таблица 3.36 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе субтилизином

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	2753	GP	[199-200]	Регулирование активности ФГК	172,03	-	-
2	3169	GP	[199-200]	ДПП IV-ингибирование	172,07	-	9690,00
3	3283	GP	[199-200]	Антитромбическая	172,07	-	-
4	3317	HL	[134-135]	Антиоксидантная	268,14	-	-
5	3461	GP	[199-200]	Антиамнестическая	172,07	-	-
6	3492	VY	[59-60]	АПФ-ингибирование	280,13	7,10	-
7	7512	GP	[199-200]	АПФ-ингибирование	172,07	252,63	-
8	7602	HL	[134-135]	АПФ-ингибирование	268,14	3200,00	-
9	8224	VY	[59-60]	Антиоксидантная	280,13	-	-
10	8320	VL	[162-163]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
11	8320	VL	[170-171]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
12	8320	VL	[197-198]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
13	8557	HL	[134-135]	ДПП IV-ингибирование	268,14	-	143,19
14	8652	PPL	[136-138]	ДПП IV-ингибирование	325,18	-	390,14
15	8854	PF	[61-62]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	0
16	8877	QS	[34-35]	ДПП IV-ингибирование	233,09	-	0
17	8877	QS	[123-124]	ДПП IV-ингибирование	233,09	-	0
18	8877	QS	[141-142]	ДПП IV-ингибирование	233,09	-	0
19	8877	QS	[167-168]	ДПП IV-ингибирование	233,09	-	0
20	8898	TD	[128-129]	ДПП IV-ингибирование	234,07	-	-
21	8905	TL	[126-127]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	-
22	8922	VL	[162-163]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
23	8922	VL	[170-171]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
24	8922	VL	[197-198]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
25	8926	VS	[95-96]	ДПП IV-ингибирование	204,10	-	0
26	8929	VY	[59-60]	ДПП IV-ингибирование	280,13	-	0
27	9058	PQNIPPL	[71-77]	ДПП IV-ингибирование	777,42	-	1500,00
28	9493	HL	[134-135]	ДПП III-ингибирование	268,14	-	-
29	9505	PF	[61-62]	ДПП III-ингибирование	262,12	-	-
30	9509	VY	[59-60]	ДПП III-ингибирование	280,13	-	-
31	9908	PPL	[136-138]	АПФ-ингибирование	325,18	427,15	-
29	9505	PF	[61-62]	ДПП III-ингибирование	262,12	-	-
30	9509	VY	[59-60]	ДПП III-ингибирование	280,13	-	-
31	9908	PPL	[136-138]	АПФ-ингибирование	325,18	427,15	-

Таблица 3.37 – Биоактивные пептиды к-казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе **субтилизином**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3380	RY	[55-56]	АПФ-ингибирование	337,16	10,50	-
2	7599	GL	[60-61]	АПФ-ингибирование	188,10	2500,00	-
3	7682	NY	[62-63]	АПФ-ингибирование	295,10	32,60	-
4	8320	VL	[52-53]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
-5	8320	VL	[99-100]	Стимулирующая всасывание глюкозы	230,15	-	-
6	8531	TA	[188-189]	ДПП IV-ингибирование	190,08	-	0
7	8559	AL	[13-14]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
8	8561	GL	[60-61]	ДПП IV-ингибирование	188,10	-	2615,03
9	8613	IPIQY	[47-51]	ДПП IV-ингибирование	632,34	-	35,20
10	8850	NT	[102-103]	ДПП IV-ингибирование	233,08	-	0
11	8853	NY	[62-63]	ДПП IV-ингибирование	295,10	-	0



№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
12	8854	PF	[17-18]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	0
13	8862	PS	[57-58]	ДПП IV-ингибирование	202,08	-	0
14	8866	PY	[78-79]	ДПП IV-ингибирование	278,11	-	0
15	8866	PY	[80-81]	ДПП IV-ингибирование	278,11	-	0
16	8880	QW	[96-97]	ДПП IV-ингибирование	332,13	-	0
17	8905	TL	[15-16]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
18	8922	VL	[52-53]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
19	8922	VL	[99-100]	ДПП IV-ингибирование	230,15	-	74,00
20	8925	VQ	[183-184]	ДПП IV-ингибирование	245,12	-	0
21	9504	PE	[171-172]	ДПП III-ингибирование	244,09	-	-
22	9505	PF	[17-18]	ДПП III-ингибирование	262,12	-	-
23	9694	PE	[171-172]	Ингибирование α-глюкозидазы	244,09	-	-
24	9856	PY	[78-79]	Противовоспалительная	278,11	-	-
25	9856	PY	[80-81]	Противовоспалительная	278,11	-	-
26	10051	RY	[55-56]	Антиоксидантная	337,16	-	-

Таблица 3.38 – Биоактивные пептиды β-казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе пепсином

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3317	HL	[134-135]	Антиоксидантная	268,14	-	--
2	3510	YQQPV L	[193-198]	АПФ-ингибирование	746,38	280,00	-
3	7602	HL	[134-135]	АПФ-ингибирование	268,14	3200,00	-
4	8557	HL	[134-135]	ДПП IV-ингибирование	268,14	-	143,19
5	8560	SL	[164-165]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	2517,08
6	8652	PPL	[136-138]	ДПП IV-ингибирование	325,18	-	390,14
7	8905	TL	[126-127]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
8	9058	PQNIPP L	[71-77]	ДПП IV-ингибирование	777,42	-	1500,00
9	9493	HL	[134-135]	ДПП III-ингибирование	268,14	-	-
10	9908	PPL	[136-138]	АПФ-ингибирование	325,18	427,15	-

Таблица 3.39 – Биоактивные пептиды κ-казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе пепсином

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	7685	SF	[125-126]	АПФ-ингибирование	252,10	130,20	-
2	8559	AL	[13-14]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
3	8854	PF	[17-18]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	0

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
4	8891	SF	[125-126]	ДПП IV-ингибирование	252,10	-	0
5	8905	TL	[15-16]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
6	9432	SF	[125-126]	Ингибитор ренина	252,10	-	-
7	9505	PF	[17-18]	ДПП III-ингибирование	262,12	-	-
5	8905	TL	[15-16]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	-
6	9432	SF	[125-126]	Ингибитор ренина	252,10	-	-
7	9505	PF	[17-18]	ДПП III-ингибирование	262,12	-	-

Таблица 3.40 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе пролилолигопептидазой

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	2753	GP	[64-65]	Регулирование активности ФГК	172,07	-	-
2	3169	GP	[64-65]	ДПП IV-ингибирование	172,07	-	9690,00
3	3180	LP	[151-152]	ДПП IV-ингибирование	228,13	-	2370,00
4	3181	VP	[173-174]	ДПП IV-ингибирование	214,12	-	880,00
5	3283	GP	[64-65]	Антитромбическая	172,07	-	-
6	3336	FAQTQ SLVYP	[52-61]	АПФ-ингибирование	1152,5 6	25,00	-
7	3461	GP	[64-65]	Антиамнестическая	172,07	-	-
8	3502	FP	[62-63]	АПФ-ингибирование	262,12	315,00	-
9	3502	FP	[111-112]	АПФ-ингибирование	262,12	315,00	-
10	3502	FP	[205-206]	АПФ-ингибирование	262,12	315,00	-
11	3666	YP	[180-181]	АПФ-ингибирование	278,11	720,00	-
12	7512	GP	[64-65]	АПФ-ингибирование	172,07	252,63	-
13	7587	VP	[173-174]	АПФ-ингибирование	214,12	420,00	-
14	8506	FP	[62-63]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	363,00
15	8506	FP	[111-112]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	363,00
16	8506	FP	[205-206]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	363,00
17	8521	YP	[180-181]	ДПП IV-ингибирование	278,11	-	3170,00
18	8591	FLQP	[87-90]	ДПП IV-ингибирование	503,26	-	65,30
19	8593	VLGP	[197-200]	ДПП IV-ингибирование	384,22	-	580,40
20	9548	YP	[180-181]	Ингибирование $\alpha$ -глюкозидазы	278,11	-	-
21	9564	VRGP	[201-204]	АПФ-ингибирование	427,24	120,90	-
22	10092	LP	[151-152]	АПФ-ингибирование	228,13	117,80	-

Таблица 3.41 – Биоактивные пептиды  $\kappa$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе **пролилолигопептидазой**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3666	YR	[79-80]	АПФ-ингибирование	278,11	720,00	-
2	7842	HR	[121-122]	АПФ-ингибирование	252,11	0	-
3	8520	HR	[121-122]	ДПП IV-ингибирование	252,11	-	40000,00
4	8521	YR	[79-80]	ДПП IV-ингибирование	278,13	-	3170,00
5	9496	HR	[121-122]	ДПП III-ингибирование	252,11	-	-
6	9548	YR	[79-80]	Ингибирование $\alpha$ -глюкозидазы	278,12	-	-

Таблица 3.42 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе **кlostрипаином**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	8159	GRFPIIV	[203-209]	АПФ-ингибирование	741,42	0	-

Таблица 3.43 – Биоактивные пептиды  $\kappa$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе **кlostрипаином**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	Моноизотопная масса
Нет данных					

Таблица 3.44 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе **олигопептидазой В**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3480	AVPYRQR	[177-183]	АПФ-ингибирование	829,43	15	-
2	3511	EMPFPK	[108-113]	АПФ-ингибирование	747,34	423	-
3	7558	VK	[98-99]	АПФ-ингибирование	245,16	13	-
4	7844	NK	[106-107]	АПФ-ингибирование	283,15	0	-
5	7875	AVPYRQR	[177-183]	Антиоксидантная	829,43	-	-
6	8159	GRFPIIV	[203-209]	АПФ-ингибирование	741,42	0	-
7	8921	VK	[98-99]	ДПП IV-ингибирование	245,16	-	0
8	9494	NK	[106-107]	ДПП III-ингибирование	283,15	-	-
9	9745	EMPFPK	[108-113]	Стимулирующая всасывание глюкозы	747,34	-	-

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
10	9771	EMPFPK	[108-113]	Антибактериальная	747,34	-	-
11	10079	AVPYRQR	[177-183]	Са-связывающая	829,43	-	-

Таблица 3.45 – Биоактивные пептиды к-казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе олигопептидазой В

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3215	YIPIQY VLSR	[46-55]	Сокращение подвздошной кишки	1250,68	-	-
2	3216	YIPIQY VLSR	[46-55]	Опиоидный антагонист	1250,68	-	-
3	3291	NQDK	[134-137]	Антитромбическая	503,22	-	-
4	7626	IAK	[43-45]	АПФ-ингибирование	330,21	15,70	-
5	10105	IAK	[43-45]	Антибактериальная	330,21	-	-
6	10106	IAK	[43-45]	Гипотензивная	330,21	-	-

Таблица 3.46 – Биоактивные пептиды β -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе протеиназой P1

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3176	FA	[52-53]	ДПП IV-ингибирование	236,10	-	0
2	3385	MF	[156-157]	АПФ-ингибирование	296,10	45,00	-
3	7583	AF	[189-190]	АПФ-ингибирование	236,10	190,00	-
4	7691	KY	[113-114]	АПФ-ингибирование	309,15	13,00	-
5	7828	EV	[91-92]	АПФ-ингибирование	246,11	0	-
6	8329	EE	[4-5]	Стимулирующая всасывание глюкозы	276,08	-	-
7	8759	AF	[189-190]	ДПП IV-ингибирование	236,10	-	0
8	8775	EV	[91-92]	ДПП IV-ингибирование	246,11	-	0
9	8819	KY	[113-114]	ДПП IV-ингибирование	309,15	-	0
10	8827	MF	[156-157]	ДПП IV-ингибирование	296,10	-	0
11	8851	NV	[7-8]	ДПП IV-ингибирование	231,11	-	0
12	8882	RG	[202-203]	ДПП IV-ингибирование	231,12	-	-
13	8895	SV	[161-162]	ДПП IV-ингибирование	204,10	-	-
14	8912	TV	[154-155]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	-
15	9173	RG	[202-203]	АПФ-ингибирование	231,12	1200,00	-
16	9500	FA	[52-53]	ДПП III-ингибирование	236,10	-	-

Таблица 3.47 – Биоактивные пептиды  $\kappa$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе **протеиназой P1**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	7598	GA	[20-21]	АПФ-ингибирование	146,05	2000,00	-
2	7827	IE	[174-175]	АПФ-ингибирование	260,12	0	-
3	7828	EV	[172-173]	АПФ-ингибирование	246,11	0	-
4	7965	NYU	[62-64]	Антиоксидантная	458,16	-	-
5	8524	GA	[20-21]	ДПП IV-ингибирование	146,05	-	-
6	8763	AT	[165-166]	ДПП IV-ингибирование	190,08	-	0
7	8775	EV	[172-173]	ДПП IV-ингибирование	246,11	-	-
8	8903	TI	[10-11]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	--
9	8946	YV	[51-52]	ДПП IV-ингибирование	280,13	-	0
10	9077	YV	[51-52]	АПФ-ингибирование	280,13	575,40	-
11	9184	ST	[153-154]	АПФ-ингибирование	206,07	4,03	-

Таблица 3.48 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе **глицилэндопептидазой**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	Моноизотопная масса
Нет данных					

Таблица 3.49 – Биоактивные пептиды  $\kappa$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе **глицилэндопептидазой**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	Моноизотопная масса
Нет данных					

Таблица 3.50 – Биоактивные пептиды  $\beta$ -казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе **олигопептидазой F**

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	M	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	3317	HL	[134-135]	Антиоксидантная	268,14	-	-
2	3510	YQQPV L	[193-198]	АПФ-ингибирование	746,38	280,00	-
3	7602	HL	[134-135]	АПФ-ингибирование	268,14	3200,00	-
4	8557	HL	[134-135]	ДПП IV-ингибирование	268,14	-	143,19
5	8560	SL	[164-165]	ДПП IV-ингибирование	218,11	-	2517,08
6	8652	PPL	[136-138]	ДПП IV-ингибирование	325,18	-	390,14
7	8905	TL	[126-127]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
8	9058	PQNIPP L	[71-77]	ДПП IV-ингибирование	777,42	-	1500,00

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
9	9493	HL	[134-135]	ДПП III-ингибирование	268,14	-	-
10	9908	PPL	[136-138]	АПФ-ингибирование	325,18	427,15	-
11	9955	SL	[164-165]	Регулирование активности ФГК	218,11	-	-
9	9493	HL	[134-135]	ДПП III-ингибирование	268,14	-	-
10	9908	PPL	[136-138]	АПФ-ингибирование	325,18	427,15	-
11	9955	SL	[164-165]	Регулирование активности ФГК	218,11	-	-

Таблица 3.51 – Биоактивные пептиды к-казеина gen var A1 и их активности, полученные при гидролизе олигопептидазой F

№	ID	Последовательность	Расположение	Активность	М	АПФ IC <sub>50</sub> , мкМ	ДПП IV IC <sub>50</sub> , мкМ
1	7685	SF	[125-126]	АПФ-ингибирование	252,10	130,2	-
2	8559	AL	[13-14]	ДПП IV-ингибирование	202,12	-	882,13
3	8854	PF	[17-18]	ДПП IV-ингибирование	262,12	-	0
4	8891	SF	[125-126]	ДПП IV-ингибирование	252,10	-	0
5	8905	TL	[15-16]	ДПП IV-ингибирование	232,13	-	0
6	9432	SF	[125-126]	Ингибирование ренина	252,10	-	-
7	9505	PF	[17-18]	ДПП III-ингибирование	262,12 00	-	-

На первом этапе виртуального скрининга было установлено, что для проведения протеолиза  $\beta$ -лактоглобулина с точки зрения получения биоактивных пептидов гипотетически подходят 8 ферментов химотрипсин А, трипсин, протеиназа К, химотрипсин С, папаин, термолизин, кокколизин и субтилизин. По остальным ферментам либо отсутствуют достоверные данные, либо количество биоактивных пептидных центров было значительно ниже, чем в вышеперечисленных.

Результаты анализа частоты встречаемости обнаруженных биоактивных и горьких пептидов (A<sub>E</sub>) представлены в таблице 3.52.

Из таблицы 3.52 видно, что при использовании всех восьми ферментов для гидролиза  $\beta$ -глобулина в большей части будет происходить высвобождение АПФ и - ДПП ингибирующих пептидов, наиболее часто встречающихся в

термолизиновых, кокколизиновых, папаиновых и химотрипсиновых гидролизатах. Помимо частоты встречаемости большое значение имеет величина обнаруженных активностей, представленная в таблицах 3.7-3.51.

Таблица 3.52 – Коэффициенты частоты встречаемости обнаруженных биоактивных и горьких пептидов

Наименование активности	Гидролизат химотрипсина А	Гидролизат трипсина	Гидролизат протеиназы К	Гидролизат термолизина	Гидролизат химотрипсина С	Гидролизат папаина	Гидролизат кокколизина	Гидролизат субтилизина
АПФ-ингибирование	0,0124	0,0311	0,0435	0,0435	0,0488	0,0248	0,0407	0,0186
Стимуляция всасывания глюкозы	0,0062					0,0124		0,0124
ДПП IV-ингибирование	0,0248	0,0248	0,0745	0,0311	0,0244	0,0683	0,0244	0,0248
Антиоксидантная	0,0124		0,0248	0,0124		0,0124	0,0081	0,0186
Ингибирование ренина	0,0062	-	0,0062	0,0124	-	0,0062	-	-
Регулирование активности ФГК*	0,0062	-	0,0124	-	-	-	-	-
Антибактериальная	-	0,0124	-	-	-	-	-	-
Гипохолестеримическая	-	0,0062	-	-	-	-	-	-
Иммуномодулирующая	-	-	-	-	-	-	0,0163	-
Противовоспалительная	-	-	-	-	-	-	0,0081	-
Са-связывающая								
Потенциально горькие пептиды	0,0497	0,0124	0,1429	0,1180	0,1180	0,0807	0,0807	0,0932

\*-фосфоглицераткиназа

Пептиды с наиболее высокой антигипертензивной активностью были обнаружены при применении химотрипсина С (KW) IC<sub>50</sub> 1,63 мМ (и субтилизина 7,1 и 9,2 мМ (VF и VY). Наилучшей противодиабетической активностью обладал пептид VL с концентрацией полумаксимального ингибирования 74 мМ, идентифицированный в химотрипсиновых, термолизиновых, папаиновых и субтилизинных гидролизатах.

При прогнозировании свойств гидролизатов немаловажное значение имеют органолептические показатели. При анализе сенсорного профиля наибольшее внимание было уделено наличию в гидролизатах горьких пептидов и свободных аминокислот, частота встречаемости которых представлена в таблице 3.52. Наименьшее количество горьких пептидов ( $A_E=0,0124$ ) зафиксировано в трипсиновых гидролизатах, наибольшее ( $A_E=0,1429$ ) – в гидролизатах, полученных с протеиназой К. Помимо наличия горьких пептидов, горечь гидролизата может быть усилена присутствием большого количества лейцина, изолейцина и фенилаланина. Наибольшее количество L и F (6 из 8) по отношению к общему количеству горьких пептидов идентифицировано в гидролизате химотрипсина А, наименьшее в гидролизате химотрипсина С (8 из 45). Также в гидролизатах папаина, субтилизина и трипсина обнаружены аминокислоты аргинин и лизин, способные нивелировать горечь, а также пептид EE.

Самые высокие величины биологической активности имели пептиды в составе гидролизата химотрипсина С, самой низкой частотой встречаемости горьких пептидов отличались гидролизаты химотрипсина С, трипсина, папаина и кокколизина.

Но при этом в них обнаружены аллергенные эпитопы – ККIIAE (гидролизат химотрипсина С); TPEVDDEALEK, LSFNPTQLEEQCHI (гидролизат трипсина); DAQSAP, AEKTKI (гидролизаты папаина) и LNENK, FCMENS, AEPEQS, LVRTPEVDDE (гидролизаты кокколизина) и т.д. (таблица 3.53, выделено жирным шрифтом).

Таблица 3.53 – Аллергенные эпитопы в виртуальных гидролизатах

Гидролизаты химотрипсина А
L - IVTQTM - KGL - DIQKVAGTW - Y - SL - AM - AASDISL - L - DAQSAPL - RVY - VEL - KPTPEGDL - EIL - L - QKW - EN - GECAQKKIIAEKTKIPAVF - KIDAL - N - EN - KVL - VL - DTDY - KKY - L - L - F - CM - EN - SAEPEQSL - ACQCL - VRTPEVDDEAL - EKF - DKAL - KAL - PM - H - IRL - SF - N - PTQL - EEQCH - I



Гидролизаты трипсина
<b>LIVTQTMK - GLDIQK - VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR - VYVELK - PTPEGDLEILLQK - WENGECQK - K - IIAEK - TK - IPAVFK - IDALNENK - VLVLDTDYK - K - YLLFCMENSAEPEQSLACQCLVR - TPEVDDEALEK - FDK - ALK - ALPMHIR - LSFNPTQLEEQCHI</b>
Гидролизаты протеиназы К
<b>MKCL - L - L - AL - AL - TCGAQAL - I - V - TQTMKGL - DI - QKV - AGTW - Y - SL - AMAASDI - SL - L - DAQSAP - L - RV - Y - V - EEL - KP - TP - EGDL - EI - L - L - QKW - ENDECAQKKI - I - AEKTKI - P - AV - F - KI - DAL - NENKV - L - V - L - DTDY - KKY - L - L - F - CMENSAEP - EQSL - ACQCL - V - RTP - EV - DDEAL - EKF - DKAL - KAL - P - MHI - RL - SF - NP - TQL - EEQCHI</b>
Гидролизаты термолизина
<b>L - I - VTQTMKG - LD - IQK - V - AGTW - YS - L - AM - A - ASD - IS - L - LD - AQS - AP - LR - V - Y - VE - LKPTPEGD - LE - I - L - LQKWENGEC - AQKK - I - I - AEKTK - IP - A - V - FK - ID - A - LNENK - V - L - V - LDTD - YKK - Y - L - L - FCMENS - AEPEQS - L - ACQC - L - VRTPE - VDDE - A - LEK - FDK - A - LK - A - LPMH - IR - LS - FNPTQ - LEEQCH - I</b>
Гидролизаты химотрипсина С
<b>L - IVTQ - TM - KGL - DIQ - KVAGTW - Y - SL - AM - AASDISL - L - DAQ - SAP - L - RVY - VE - L - KP - TP - E - GDL - E - IL - L - Q - KW - E - N - GE - CAQ - KIIAE - KTKIP - AVFKIDAL - N - E - N - KVL - VL - DTDY - KKY - L - L - FCM - E - N - SAE - P - E - Q - SL - ACQ - CL - VRTP - E - VDDE - AL - E - KFDKAL - KAL - P - M - HIRL - SFN - P - TQ - L - E - E - Q - CHI</b>
Гидролизаты папаина
<b>L - I - V - TQTM - KGL - DI - QKV - AGTW - Y - SL - AM - AASDI - SL - L - DAQSAP - L - RV - Y - V - EL - KP - TP - EGDL - EI - L - L - QKW - ENGECQKKI - I - AEKTKI - P - AV - F - KI - DAL - NENKV - L - V - L - DTDY - KKY - L - L - F - CM - ENSAEP - EQSL - ACQCL - V - RTP - EV - DDEAL - EKF - DKAL - KAL - P - M - HI - RL - SF - NP - TQL - EEQCHI</b>
Гидролизаты кокколизина
<b>L - IVTQTMKG - LD - IQKV - AGTW - YS - L - AM - A - ASD - IS - L - LD - AQS - AP - LRV - YVE - LKPTPEGD - LE - I - L - LQKWENGEC - AQKK - I - I - AEKTK - IP - AV - FK - ID - A - LNENKV - LV - LDTD - YKK - Y - L - L - FCMENS - AEPEQS - L - ACQC - LVRTPEVDDE - A - LEK - FDK - A - LK - A - LPMH - IR - LS - FNPTQ - LEEQCH - I</b>
Гидролизаты субтилизина
<b>L - I - VTQTMKGL - DIQK - VAGTW - Y - S - L - AMAAS - DIS - L - L - DAQS - APL - R - VY - VEL - KPTPEGDL - EIL - L - QKW - ENGECQKKIIAEKTKIPA - VF - KIDAL - NENK - VL - VL - DTDY - KKY - L - L - F - CMENS - AEPEQS - L - ACQCL - VRTPE - VDDEAL - EKF - DKAL - KAL - PMHIRL - S - F - NPTQL - EEQCHI</b>

### 3.3 Разработка программного обеспечения с автоматической выгрузкой данных из пептидной базы

Значительная вычислительная нагрузка при сопоставлении большого числа показателей в процессе выбора оптимального ферментного препарата для протеолиза сывороточных белков привела к необходимости создания программных решений, способных учесть и систематизировать всю совокупность факторов.

Для выбора оптимального фермента было разработано программное обеспечение, рассчитывающее оценку каждого фермента, интегрирующую различные показатели работы фермента, такие как ингибирование АПФ, ингибирование дипептилпептидазы (ДПП IV), антиоксидантная активность и т. д. Дополнительно, в программе учтено количество свободных аминокислот, образующихся в процессе работы фермента, и количество пептидов, отвечающих за горький привкус продукта, как факторы, негативно влияющие на финальную оценку фермента. Расчет производился с помощью функции Харрингтона, граничные показатели которой определялись ранговым методом относительно показателей активности выбранных ферментов. Общая оценка фермента рассчитывалась по формуле 9:

$$C_j = \sqrt{\sum w_i \prod_{i=1}^n d_{ij}^{w_i}} \quad (9)$$

где  $C_j$  – интегральная оценка  $j$ -го фермента,  $d_{ij}$  – значение функции Харрингтона  $j$ -го фермента по  $i$ -му показателю,  $w_i$  – вес  $i$ -го показателя (для основных показателей  $w_i = 1$ , для дополнительных показателей  $w_i = 0,5$ ).

Результаты работы программы для бета-лактоглобулина представлены на рисунке 3.4.

**Выбор белка**  
 Бета-лактоглобулин  Казеин

**Основные показатели**  
 АПФ ингибитор (ACE)  
 Ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP IV)  
 Иммуномодулятор (IMM)  
 Ингибитор ренина (RI)  
 Антиоксидантная активность (AO)

**Дополнительные показатели**  
 Свободные аминокислоты (Free AA)  
 Горечь (Bitter)  
 Сладкий вкус (Sweet)  
 Ингибитор горечи (Bitter I)  
 Усилитель вкуса (Enhancer)

**Расчет**

**Загруженные ферментные препараты**

chymotrypsin (A) EC 3.4.21.1	L-IVTQTM-KGL-DIQKVAGTW-Y-SL-AM-AASDISL-L-DAQSAPL-RVY-VEL-KPTPEGDL-EIL-L-QKW-EN-GECAQKIIAEKTKIPAVF-KIDAL-N-EN-KVL-VL-DTDY-KKY-L-L-F-CM-EN-SAEPEQSL-ACQCL-VRTPEVDDEAL-EKF-DKAL-KAL-PM-H-IRL-SF-N-PTQL-EEQCH-I
trypsin EC 3.4.21.4	LIVTQTMK-GLDIQK-VAGTWYSLAMAASDISLDAQSAPLR-VYVELK-PTPEGDLLEILQK-WENGECAQK-K-IIA EK-TK-IPAVFK-IDALNENK-VLVLDTDYK-K-YLLFCMENSAPPEQSLACQCLVR-TPEVDDEALEK-FDK-ALK-A LPMHIR-LSFNPTQLEEQCHI
Proteinase K (Endopeptidase So) EC.3.4.21.67	L-I-V-TQTM-KGL-DI-QKV-AGTW-Y-SL-AM-AASDI-SL-L-DAQSAP-L-RV-Y-V-EL-KP-TP-EGDL-EI-L-L-QKW-ENGECAQKII-I-AEKTKI-P-AV-F-KI-DAL-NENKV-L-V-L-DTDY-KKY-L-L-F-CM-ENSAEP-EQSL-ACQCL-V-RTP-EV-DDEAL-EKF-DKAL-KAL-P-M-HI-RL-SF-NP-TQL-EEQCHI
thermolysin EC 3.4.24.27	L-I-VTQTMKG-LD-IQK-V-AGTW-YS-L-AM-A-ASD-IS-L-LD-AQS-AP-LR-V-Y-VE-LKPTPEGD-LE-I-L-LQKWENGEC-AQK-I-I-AEKTK-IP-A-V-FK-ID-A-LNENK-V-L-V-LD-LD-YKK-Y-L-L-FCMENS-AEP EQS-L-ACQC-L-VRTPE-VDD-E-A-LEK-FDK-A-LK-A-LPMH-IR-LS-FNPTQ-LEEQCH-I
chymotrypsin C EC 3.4.21.2	L-IVTQ-TM-KGL-DIQ-KVAGTW-Y-SL-AM-AASDISL-L-DAQ-SAP-L-RVY-VE-L-KP-TP-E-GDL-E-IL-L-Q-KW-E-N-GE-CAQ-KKIIAE-KTKIP-AVFKIDAL-N-E-N-KVL-VL-DTDY-KKY-L-L-FCM-E-N-SAE-P-E-Q-SL-ACQ-CL-VRTPE-E-VDD-E-AL-E-KFDKAL-KAL-P-M-HIRL-SFN-P-TQ-L-E-E-Q-CHI
papain EC 3.4.22.2	L-IVT-QT-MKG-L-DI-QKV-AG-T-WYSL-AM-A-ASDISL-L-D-A-QS-APL-R-VYVEL-KPT-PEG-DL-EIL-L-QKWENG-EC-A-QKKII-AEKT-KIP-AV-F-KID-AL-NENKVL-VL-DT-DYKKYL-L-F-CMENS-AEPE-QSL-AC-QCL-VR-T-PEVDDE-AL-EKF-DK-AL-K-AL-PMHIR-L-SF-NPT-QL-EE-QCHI
coccolysin EC 3.4.24.30	L-IVTQTMKG-LD-IQKV-AGTW-YS-L-AM-A-ASD-IS-L-LD-AQS-AP-LRV-YVE-LKPTPEGD-LE-I-L-LQ KWENGEC-AQK-I-I-AEKTK-IP-AV-FK-ID-A-LNENKV-LV-LD-LD-YKK-Y-L-L-FCMENS-AEPEQS-L-A CQC-LVRTPEVDDE-A-LEK-FDK-A-LK-A-LPMH-IR-LS-FNPTQ-LEEQCH-I
subtilisin EC 3.4.21.62	L-I-VTQTMKGL-DIQK-VAGTW-Y-S-L-AMAAS-DIS-L-L-DAQS-APL-R-VY-VEL-KPTPEGDL-EIL-L-QK W-ENGECAQKIIAEKTKIPA-VF-KIDAL-NENK-VL-VL-DTDY-KKY-L-L-F-CMENS-AEPEQS-L-ACQCL-V RTPE-VDDDEAL-EKF-DKAL-KAL-PMHIRL-S-F-NPTQL-EEQCHI

**Расчетные показатели активности**

Тип расчета ->	ACE	DPP IV	AO	Bitter	Bitter I	Free AA	Граничные значения функции Харрингтона
	BE	BE	AE	AE	AE	##	
chymotrypsin	0.0000779149	0.0000864024	0.0124 <sup>*</sup>	0.0497 <sup>*</sup>	0. <sup>*</sup>	11. <sup>*</sup>	0.2 <sup>*</sup> 0.66 <sup>*</sup>
trypsin	0.0003115236	0.00007751034	0. <sup>*</sup>	0.0124 <sup>*</sup>	0.0124 <sup>*</sup>	2. <sup>*</sup>	ACE 0.000186 0.000666
proteinase K	0.000360609	0.00001000132	0.0248 <sup>*</sup>	0.1429 <sup>*</sup>	0. <sup>*</sup>	22. <sup>*</sup>	DPP IV 0.000031 0.000084
thermolysin	0.003486916	0. <sup>*</sup>	0.0081 <sup>*</sup>	0.118 <sup>*</sup>	0. <sup>*</sup>	27. <sup>*</sup>	AO 0.0081 0.0124 <sup>*</sup>
chymotrypsin C	0.000666982	0.00001234771	0. <sup>*</sup>	0.1118 <sup>*</sup>	0. <sup>*</sup>	30. <sup>*</sup>	Bitter 0.081 <sup>*</sup> 0.118 <sup>*</sup>
papain	0.000186963	0.00001843284	0.0163 <sup>*</sup>	0.0807 <sup>*</sup>	0.0186 <sup>*</sup>	15. <sup>*</sup>	Bitter I 0. <sup>*</sup> 0.0062 <sup>*</sup>
coccolysin	0.003486916	0. <sup>*</sup>	0.0081 <sup>*</sup>	0.0807 <sup>*</sup>	0. <sup>*</sup>	17. <sup>*</sup>	Free AA 22. <sup>*</sup> 15. <sup>*</sup>
subtilisin	0.000134353	3.1089820387 <sup>*</sup> -6	0.0081 <sup>*</sup>	0.0932 <sup>*</sup>	0.0062 <sup>*</sup>	15. <sup>*</sup>	

**Результирующие показатели критериев**

{chymotrypsin (A) EC 3.4.21.1, 0.3415392880076199 <sup>*</sup> }	{trypsin EC 3.4.21.4, 0.002005561329018035 <sup>*</sup> }
{Proteinase K (Endopeptidase So) EC.3.4.21.67, 0.1742278030874221 <sup>*</sup> }	{thermolysin EC 3.4.24.27, 0.03302978683518737 <sup>*</sup> }
{chymotrypsin C EC 3.4.21.2, 0.0017404249036004921 <sup>*</sup> }	{papain EC 3.4.22.2, 0.194434343422 <sup>*</sup> }
{coccolysin EC 3.4.24.30, 0.19862364735958543 <sup>*</sup> }	{subtilisin EC 3.4.21.62, 0.2844740920550893 <sup>*</sup> }

Рисунок 3.4 – Интерфейс программы по подбору оптимального фермента

При ранжировании по интегральному показателю наилучшими значениями среди 8 ферментов обладали химотрипсин С (0,314) и субтилизин (0,284). По аналогичному принципу для бета- и каппа-казеина были выбраны термолизин (0,434) и субтилизин (0,371).

По результатам обработки в полученной программе данных *in silico* моделирования для гидролиза сывороток №1-4 будут использоваться ферментные препараты на основе субтилизина, (из-за содержания в гидролизате химотрипсина С аллергенных эпитопов); сыворотки №5 – на основе субтилизина и термолизина.

Среди коммерчески доступных протеаз на основе субтилизина на рынке наиболее широко представлены Alc и Prot. Согласно литературным данным по специфичности и рекомендациям производителей этих протеаз использование

данной комбинации позволяет без потери биологической активности уменьшить вероятность образования горьких пептидов.

### 3.4 Оптимизация условий протеолиза сывороточных белков

Перед проведением гидролиза все сыворотки сепарировали с использованием лабораторного сепаратора, после чего получали концентрат белков подсырных сывороток. Нарботку концентратов для последующего гидролиза осуществляли до массовой доли сухих веществ в белковых концентратах – 8-11% и содержания общего белка – 3,2-3,8% для сывороток сычужных; сыворотку, полученную от мягкого сыра без созревания концентрировали до содержания сухих веществ около 7,0 % и белка 0,7-0,8%.

Основными факторами, влияющими на степень ферментативной конверсии сырья, являются: доза вносимых ферментных препаратов; длительность процесса гидролиза; pH, при котором проводится гидролиз; температура, при которой проводится гидролиз. pH и температура процесса обычно подбираются исходя из данных по pH- и термо-оптимумам используемых ферментов, а также данных по их pH и термостабильности.

В таблице 3.54 представлены данные производителей по физико-химическим характеристикам ферментных препаратов протеолитического действия, выбранных *in silico* и обработанных в полученной программе для гидролиза белков подсырных сывороток.

Таблица 3.54 – Физико-химические характеристики ферментных препаратов

Ферментный препарат	Продуцент	макс. СГ, %	Оптимум		Инактивация	
			pH	t, °C	t, °C	τ, мин
Alc	<i>Bacillus licheniformis</i>	15-25	7,0-8,0	50-60	80-85	10
Prot	линии <i>Bacillus</i>	10-20	7,0-8,0	45-50	85	10
Therm	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	30-45	8,0	60-70	85-90	30

Как видно из представленных данных (таблица 3.54), ферментные препараты характеризуются рН оптимумом в диапазоне нейтральных или слабощелочных значений рН (7,0-8,0), термооптимумы лежат в диапазоне температур от 45 до 60°C.

Оптимизацию условий ферментативного гидролиза сывороточных белков проводили по методологии многофакторного эксперимента. Вариабельными параметрами были продолжительность ферментативного гидролиза и весовое соотношение ферментного препарата и субстрата – белка. В качестве контролируемых параметров в ходе многофакторных экспериментов исследовали: степень гидролиза (СГ), общее содержание свободных аминокислот (САК) и органолептические показатели полученных белковых гидролизатов (отсутствие горького и соленого вкусов), однако, в ходе исследования была выявлена неадекватность предложенной математической модели для описания влияния вариабельных переменных на органолептические свойства продуктов. В качестве третьего контролируемого параметра исследовали антиоксидантную емкость гидролизатов по отношению к пероксильному радикалу. Органолептические показатели полученных гидролизатов оценивали отдельно по наличию или отсутствию горького и соленого привкусов.

Для оптимизации условий ферментативного гидролиза подсырных сывороток сычужных сыров ФП Protamex и его комбинацией с ФП Alcalase был проведен полнофакторный эксперимент с 2 вариабельными параметрами: продолжительность гидролиза (X1) и соотношение ФП Protamex и Alcalase (X2). Последнее выражали через концентрацию ФП Alcalase (таблица 3.51), так как общее фермент/субстратное соотношение для ферментной композиции было постоянным (4%), и концентрация ФП Protamex, тем самым, зависела от концентрации ФП Alcalase.

Предварительные эксперименты показали, что оптимальное E/S для ФП Protamex при ферментативном гидролизе подсырных сывороток равно 4%. Независимые переменные варьировали на трех уровнях (таблица 3.55).

Таблица 3.55 – Уровни вариации независимых параметров при многофакторных экспериментах по оптимизации условий гидролиза белков подсырных сывороток сычужных сыров

Параметр	Переменная	Уровень варьирования		
		-1	0	1
Продолжительность, мин	X1	60	90	120
Доза ФП Alc, % от содержания белка	X2	0	0,5	1,0
Доза ФП Prot, % от содержания белка	Зависимая	4,0	3,5	3,0

Композиционная матрица плана многофакторного эксперимента состояла из 1 блока и девяти экспериментов (таблица 3.52).

Таблица 3.56 – Композиционная матрица и значения контролируемых параметров при гидролизе белков сывороток от сычужных сыров

Вариабельные параметры		Контролируемые параметры		
Время, мин.	Е/S Prot/Alc, % к массе белкового субстрата	Степень гидролиза, %	ORAC, мкМоль ТЭ/ г	Содержание свободных аминокислот, %
60	4,00/0,00	10,44 ± 0,35	376,22 ± 25,19	6,31 ± 0,1
60	3,50/0,50	15,88 ± 0,14	370,9 ± 20,11	8,58 ± 0,13
60	3,00/1,00	16,72 ± 0,33	404,43 ± 22,66	9,31 ± 0,13
90	4,00/0,00	14,38 ± 0,57	390,55 ± 34,84	8,07 ± 0,65
90	3,50/0,50	17,17 ± 0,55	408,63 ± 19,03	11,44 ± 1
90	3,00/1,00	17,66 ± 0,77	467,33 ± 22,12	11,91 ± 0,87
120	4,00/0,00	18,65 ± 0,37	479,46 ± 21,82	12,89 ± 1,04
120	3,50/0,50	19,69 ± 0,52	502,89 ± 27,14	14,11 ± 1,14
120	3,00/1,00	15,54 ± 0,76	440,29 ± 22,44	9,21 ± 0,44

Для оптимизации условий ферментативного гидролиза подсырной сыворотки №5 использовали комбинацию ФП Therm и Alc. Так как данные об оптимальном фермент/субстратном соотношении для гидролиза молочных белков ферментным препаратом Thermolysin в литературе отсутствуют, концентрации обоих ферментов варьировали независимо. Полнофакторный эксперимент был

проведен с 3 переменными параметрами, включающими продолжительность гидролиза (X1), фермент/субстратное соотношение ФП Thermolysin (X2) и фермент/субстратное соотношение Alcalase (X3). Независимые переменные варьировали на трех уровнях. Так как в результате пробного предварительного эксперимента выяснилось, что оптимальное время гидролиза находится в области 120 мин., для уточнения этого параметра уровни варьирования длительности гидролиза были смещены на 30 мин относительно эксперимента с сычужными подсырными сыворотками (таблица 3.57).

Таблица 3.57 – Уровни вариации независимых параметров при многофакторном эксперименте по оптимизации условий гидролиза белков подсырной сыворотки мягких сыров без созревания

Параметр	Переменная	Уровень варьирования		
		-1	0	1
Время, мин	X1	90	120	150
Доза ФП Alc, % от содержания белка	X2	0	0,5	1,0
Доза ФП Therm, % от содержания белка	X3	1,5	2,0	2,5

Композиционная матрица плана многофакторного эксперимента состояла из 1 блока и была расширена до 27 экспериментов (Табл. 3.54).

Таблица 3.58 – Композиционная матрица и значения контролируемых параметров при гидролизе белков подсырной сыворотки мягких сыров без созревания

Вариабельные параметры			Контролируемые параметры		
Время, мин	Доза ФП Thermolysin, % к массе белкового субстрата	Доза ФП Alcalase, % к массе белкового субстрата	Степень гидролиза, %	ORAC, мкМоль ТЭ/ г	Содержание свободных аминокислот, %
90	1,5	0	9,9 ± 0,53	440,16 ± 47,33	2,94 ± 0,04
90	1,5	0,5	14,98 ± 0,66	455,67 ± 22,52	3,08 ± 0,06
90	1,5	1	15,42 ± 0,75	443,86 ± 77,09	3,18 ± 0
90	2	0	11,83 ± 0,15	439,08 ± 19,76	2,71 ± 0,06
90	2	0,5	17,56 ± 0	428,67 ± 50,55	2,88 ± 0

90	2	1	19,02 ± 1,17	427,99 ± 17,86	3,11 ± 0,03
90	2,5	0	10,91 ± 1,33	376,23 ± 24,46	2,58 ± 0,04
90	2,5	0,5	15,36 ± 0,82	467,41 ± 21,79	2,93 ± 0,08
90	2,5	1	19,07 ± 1,07	328,71 ± 26,01	3,83 ± 0,04
120	1,5	0	14,96 ± 1,18	454,9 ± 36,82	2,48 ± 0,07
120	1,5	0,5	15,44 ± 0,87	327,27 ± 26,61	2,97 ± 0,07
120	1,5	1	20,26 ± 0,68	329,64 ± 38,32	2,72 ± 0,04
120	2	0	16,43 ± 1,23	443,84 ± 55,92	2,62 ± 0,03
120	2	0,5	17,88 ± 0,51	563,49 ± 22,97	3,04 ± 0,03
120	2	1	20,81 ± 1,6	496,77 ± 39,09	3,13 ± 0,03
120	2,5	0	16,92 ± 1,54	504,88 ± 34,77	2,7 ± 0,02
120	2,5	0,5	18,28 ± 0,77	528,53 ± 69,18	3,11 ± 0,04
120	2,5	1	20,44 ± 0,6	503,76 ± 35,82	3,27 ± 0,03
150	1,5	0	13,43 ± 0,64	501,67 ± 62,45	2,86 ± 0,07
150	1,5	0,5	20,56 ± 0,73	539,87 ± 37,34	3,17 ± 0,13
150	1,5	1	16,12 ± 0,22	433,28 ± 43,2	4,26 ± 0,1
150	2	0	14,4 ± 0,89	426,81 ± 35,38	2,84 ± 0,06
150	2	0,5	20,47 ± 0,73	473,12 ± 53,95	3,1 ± 0,05
150	2	1	22,59 ± 1,41	433,66 ± 17,05	2,47 ± 0,25
150	2,5	0	16,63 ± 0,61	478,28 ± 27,58	2,96 ± 0,03
150	2,5	0,5	15,84 ± 0,37	497,14 ± 62,98	4,2 ± 0,03
150	2,5	1	23,08 ± 0	427,24 ± 23,07	3,67 ± 0,19

Композиционная матрица плана многофакторного эксперимента состояла из 1 блока и была расширена до 27 экспериментов (таблица 3.58). Полученные результаты многофакторных экспериментов были подвергнуты статистической обработке с использованием блока DOE программы пакета программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007, США) (таблицы 3.59–3.64).

Таблица 3.59 – Статистический анализ зависимости степени гидролиза белков подсырных сывороток сычужных сыров от переменных параметров гидролиза

Фактор	Эффект.	Ст. откл.	t(3)	P	-95,%	+95,%
Mean/Interc,	11,80000	0,183023	64,47266	0,000008	11,21754	12,38246
(1) X <sub>1</sub> (L)	1,99333	0,448314	4,44629	0,021162	0,56660	3,42007
X <sub>1</sub> (Q)	-0,53000	0,388251	-1,36510	0,265581	-1,76559	0,70559
(2) X <sub>2</sub> (L)	2,80000	0,448314	6,24563	0,008280	1,37327	4,22673
X <sub>2</sub> (Q)	0,52000	0,388251	1,33934	0,272890	-0,71559	1,75559
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	0,39000	0,549070	0,71029	0,528760	-1,35739	2,13739



Таблица 3.60 – Статистический анализ зависимости антиоксидантной емкости белков подсырных сывороток сычужных сыров от переменных параметров гидролиза

Фактор	Эффект.	Ст. откл.	t(3)	P	-95,%	+95,%
Mean/Interc,	499,3622	6,61042	75,54166	0,000005	478,3249	520,3995
(1) X1 (L)	10,4133	16,19216	0,64311	0,565930	-41,1173	61,9440
X1 (Q)	36,8967	14,02282	2,63119	0,078245	-7,7302	81,5235
(2) X2 (L)	107,5233	16,19216	6,64046	0,006958	55,9927	159,0540
X2 (Q)	4,7917	14,02282	0,34170	0,755108	-39,8352	49,4185
X1 * X2	46,2850	19,83127	2,33394	0,101782	-16,8269	109,3969

Таблица 3.61 – Статистический анализ зависимости содержания свободных аминокислот в белковых гидролизатах подсырных сывороток сычужных сыров от переменных параметров гидролиза

Фактор	Эффект.	Ст. откл.	t(3)	P	-95,%	+95,%
Mean/Interc,	11,64889	0,073109	159,3369	0,000001	11,41622	11,88155
(1) X1 (L)	1,23333	0,179079	6,8871	0,006271	0,66343	1,80324
X1 (Q)	-0,33333	0,155087	-2,1493	0,120783	-0,82689	0,16022
(2) X2 (L)	2,20000	0,179079	12,2851	0,001162	1,63009	2,76991
X2 (Q)	-0,02333	0,155087	-0,1505	0,889953	-0,51689	0,47022
X1 * X2	0,72000	0,219326	3,2828	0,046328	0,02201	1,41799

Таблица 3.62 – Статистический анализ зависимости степени гидролиза белков сыворотки мягких сыров без созревания от переменных параметров гидролиза

Фактор	Эффект.	Ст. откл.	t(17)	P	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	16,98481	0,355706	47,74959	0,000000	16,23434	17,73529
(1) X1 (L)	3,23000	0,871298	3,70711	0,001751	1,39172	5,06828
X1 (Q)	1,42611	0,754566	1,88997	0,075936	-0,16588	3,01811
(2) X2 (L)	1,71778	0,871298	1,97152	0,065165	-0,12050	3,55606
X2 (Q)	1,35444	0,754566	1,79500	0,090454	-0,23755	2,94644
(3) X3 (L)	5,71111	0,871298	6,55471	0,000005	3,87283	7,54939
X3 (Q)	0,58444	0,754566	0,77454	0,449249	-1,00755	2,17644
X1 * X2	0,06667	1,067118	0,06247	0,950914	-2,18476	2,31809
X1 * X3	-0,59000	1,067118	-0,55289	0,587535	-2,84142	1,66142
X2 * X3	0,77000	1,067118	0,72157	0,480367	-1,48142	3,02142

Таблица 3.63 – Статистический анализ зависимости антиоксидантной емкости гидролизата белков сыворотки мягких сыров без созревания от переменных параметров гидролиза

Фактор	Эффект.	Ст. откл.	t(17)	P	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	450.8126	12.13381	37.15343	0.000000	425.2125	476.4127
(1)X1 (L)	44.8107	29.72164	1.50768	0.149995	-17.8965	107.5179
X1 (Q)	15.9609	25.73970	0.62009	0.543423	-38.3451	70.2669
(2)X2 (L)	20.6487	29.72164	0.69474	0.496606	-42.0584	83.3559
X2 (Q)	12.6869	25.73970	0.49289	0.628393	-41.6191	66.9930
(3)X3 (L)	-26.7700	29.72164	-0.90069	0.380336	-89.4772	35.9372
X3 (Q)	37.3116	25.73970	1.44958	0.165375	-16.9944	91.6176
X1 * X2	15.8652	36.40143	0.43584	0.668438	-60.9351	92.6655
X1 * X3	-9.6117	36.40143	-0.26405	0.794917	-86.4120	67.1885
X2 * X3	15.0446	36.40143	0.41330	0.684556	-61.7557	91.8449

Таблица 3.64 – Статистический анализ зависимости содержания свободных аминокислот в белковом гидролизате сыворотки мягких сыров без созревания от переменных параметров гидролиза

Фактор	Эффект.	Ст. откл.	t(3)	P	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	3.067037	0.074829	40.98721	0.000000	2.909161	3.224913
(1)X1 (L)	0.254444	0.183293	1.38818	0.183006	-0.132270	0.641159
X1 (Q)	-0.260556	0.158737	-1.64143	0.119076	-0.595460	0.074349
(2)X2 (L)	0.176667	0.183293	0.96385	0.348634	-0.210048	0.563381
X2 (Q)	-0.283889	0.158737	-1.78843	0.091543	-0.618794	0.051016
(3)X3 (L)	0.550000	0.183293	3.00066	0.008043	0.163285	0.936715
X3 (Q)	0.146111	0.158737	0.92046	0.370209	-0.188794	0.481016
X1 * X2	0.066667	0.224487	0.29697	0.770085	-0.406960	0.540294
X1 * X3	-0.025000	0.224487	-0.11136	0.912631	-0.498627	0.448627
X2 * X3	0.108333	0.224487	0.48258	0.635549	-0.365294	0.581960

Результаты статистической оценки эффектов переменных факторов на степень гидролиза подсырной сыворотки мягких сыров без созревания (таблица 3.59) показали, что значимое влияние на степень гидролиза оказывают все три исследуемых линейных переменных фактора ( $p < 0,1$ ) и квадратичные факторы времени гидролиза (X1) и концентрации ФП Thermolysin (X2) ( $p < 0,1$ ), что говорит

о наличии локальных максимумов и коррелируется с ранее полученными данными [279]. Регрессионный анализ полученных данных позволил получить регрессионные уравнения (9-11), описывающие взаимосвязи степени гидролиза с переменными факторами (рисунок 3.5).

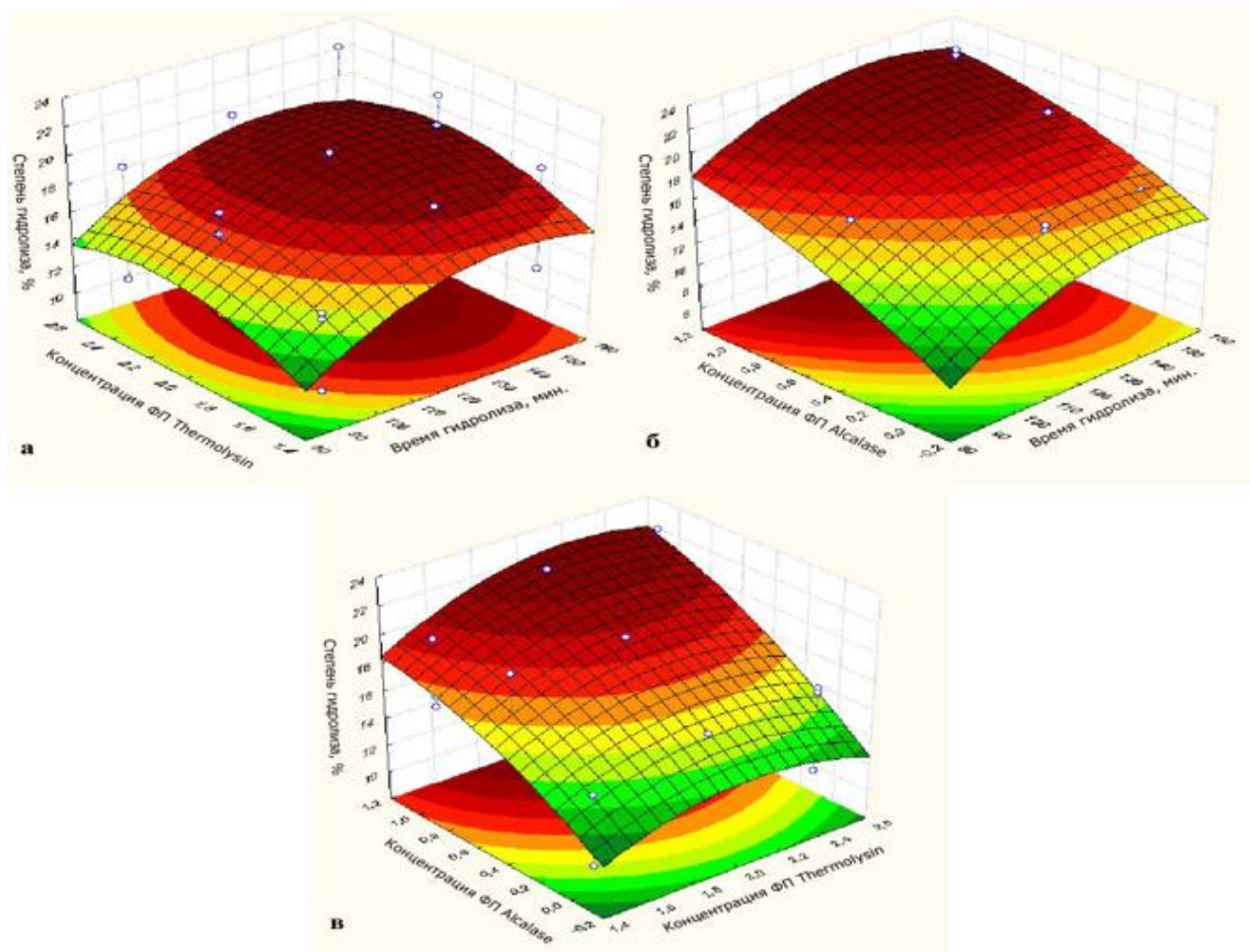


Рисунок 3.5 – Зависимость СГ белков подсырной сыворотки мягких сыров без созревания от времени гидролиза и E/S ФП Therm и Alc

$$DH = -34,623 + 0,4297 \cdot X_1 - 0,001585 \cdot X_1^2 + 23,1222 \cdot X_2 - 5,4178 \cdot X_2^2 + 0,0022 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (9),$$

$$DH = -14,3696 + 0,4439 \cdot X_1 - 0,001585 \cdot X_1^2 + 10,4089 \cdot X_3 - 2,3378 \cdot X_3^2 - 0,01967 \cdot X_1 \cdot X_3 \quad (10),$$

$$DH = -7,778 + 22,6188 \cdot X_2 - 5,4178 \cdot X_2^2 + 4,965 \cdot X_3 - 2,3378 \cdot X_3^2 + 1,54 \cdot X_2 \cdot X_3, \quad (11),$$

где DH - степень гидролиза

При статистической обработке эффектов переменных факторов на антиоксидантную емкость гидролизата подсырной сыворотки №5 по отношению к пероксильному радикалу не было выявлено статистически значимых ( $p < 0,1$ ) факторов (таблица 3.60), что свидетельствует о неадекватности данной модели для оптимизации АОЕ сыворотки мягких сыров без созревания по выбранным параметрам. В случае свободных аминокислот значимое влияние оказывают только квадратичный фактор ( $p < 0,1$ ) дозы ФП Thermolysin и линейный фактор ФП Alcalase (таблица 3.61). Причем квадратичный фактор дозы ФП Thermolysin является отрицательным, что говорит о наличии локального минимума содержания свободных аминокислот (уравнения 12-14). Зависимость содержания САК в гидролизате сыворотки мягких сыров без созревания от переменных параметров и профили желательности при оптимизации условий гидролиза по времени гидролиза и дозировке ФП Alcalase представлены на рисунках 3.6 и 3.7.

$$\text{САК} = 11.1836 - 0.0697 \cdot X_1 + 0.000286 \cdot X_{12} - 4.63256 \cdot X_2 + 1.1356 \cdot X_{22} + 0.0022 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (12),$$

$$\text{САК} = 5.99 - 0.06482 \cdot X_1 + 0.000286 \cdot X_{12} + 1.3344 \cdot X_3 - 0.5844 \cdot X_{32} - 0.0008333 \cdot X_1 \cdot X_3 \quad (13),$$

$$\text{САК} = 6.786 - 4.4739 \cdot X_2 + 1.1356 \cdot X_{22} + 0.7 \cdot X_3 - 0.5844 \cdot X_{32} + 0.2167 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (14),$$

где: САК - свободные аминокислоты

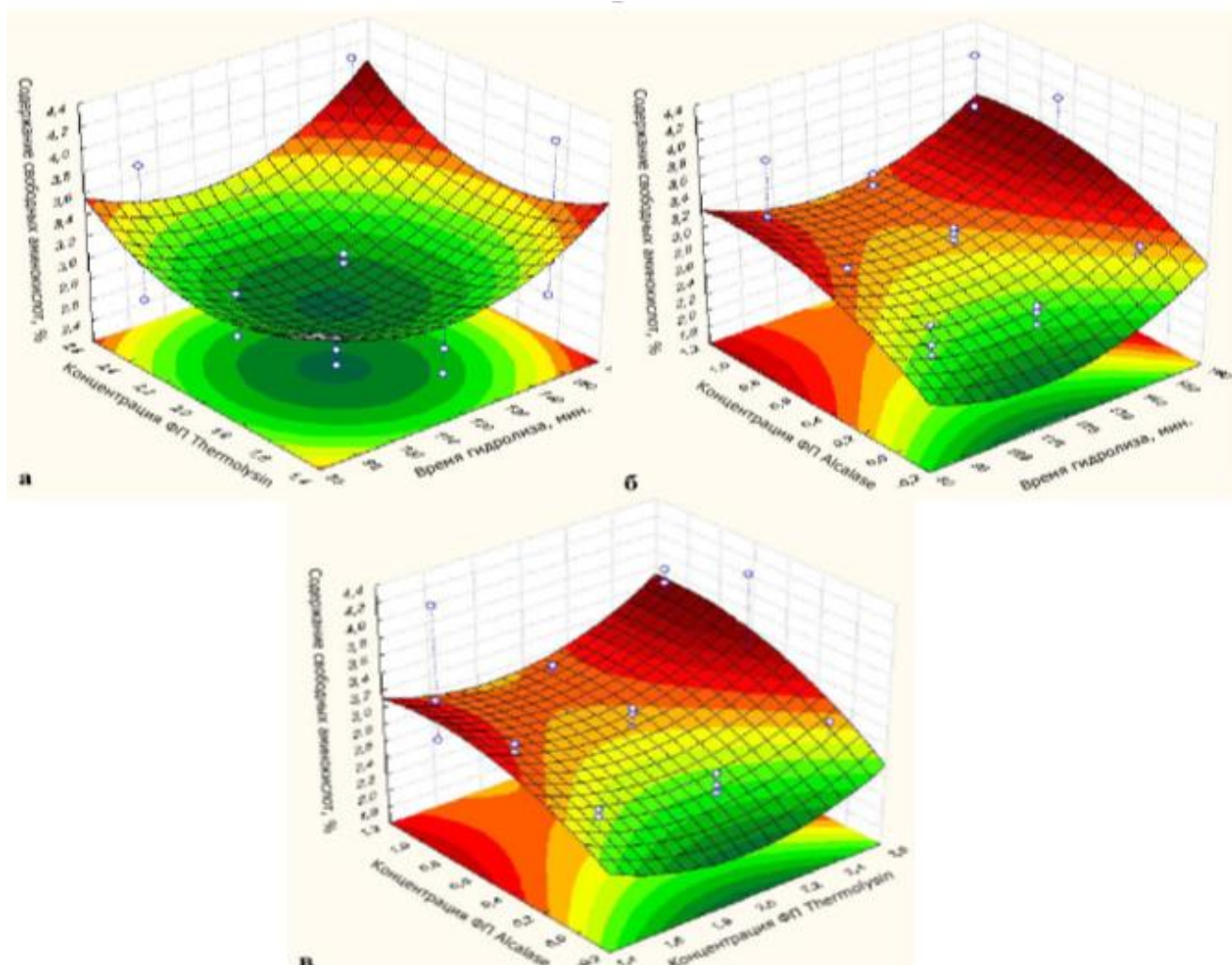


Рисунок 3.6 – Зависимость САК в гидролизате подсырной сыворотки мягких сыров без созревания от времени гидролиза и дозы ферментов

Оптимальные значения переменных параметров, выявленные при помощи профиля желательности для гидролизата подсырной сыворотки №5, составляют 121,2 мин и соотношение ферментных препаратов Thermolysin и Alcalase 2.0: 1.0 (рисунок 3.7).

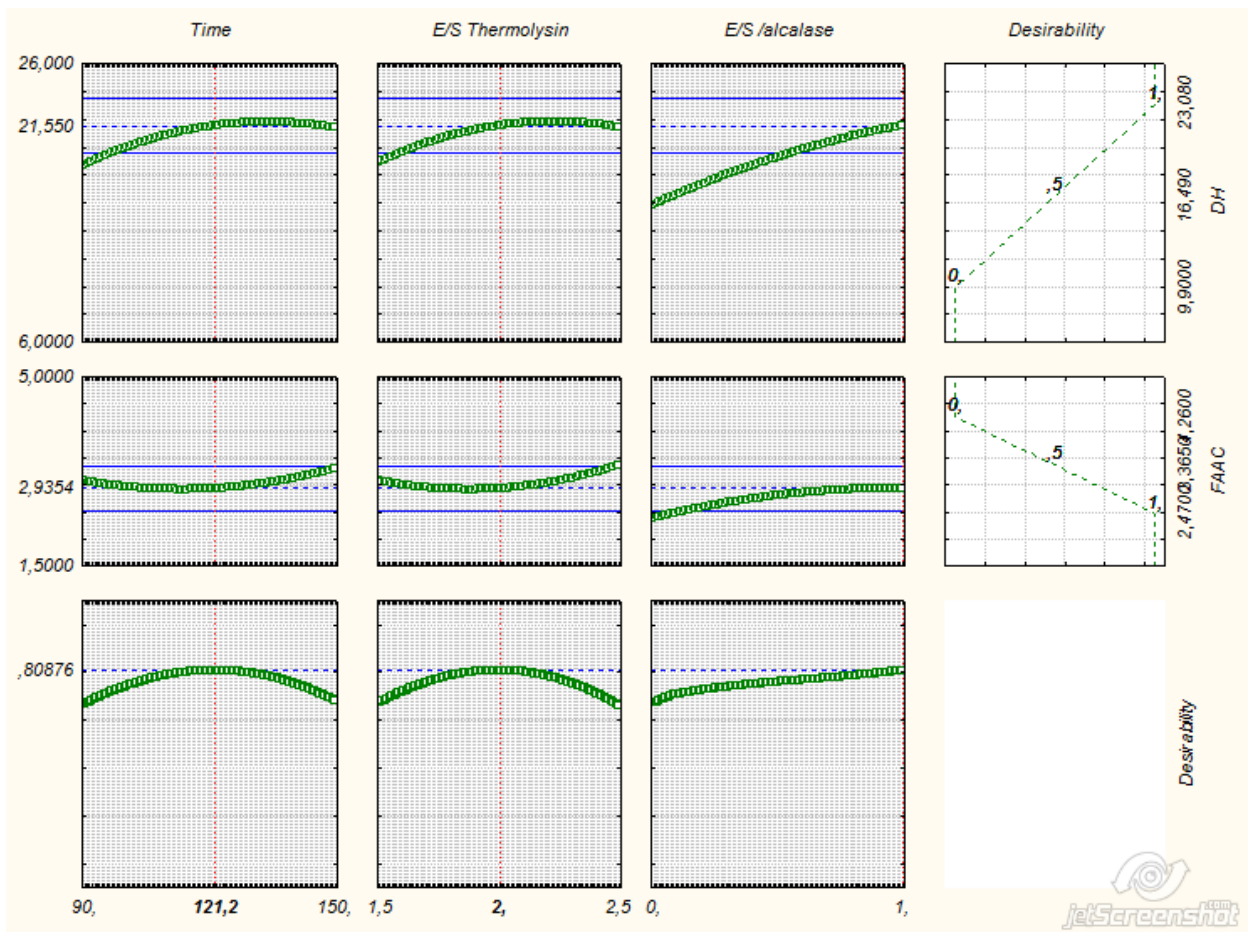


Рисунок 3.7 – Профили желательности для контролируемых параметров гидролиза подсырной сыворотки мягких сыров без созревания: FAAC - содержание свободных аминокислот в гидролизате

В случае статистической оценки эффектов переменных факторов на степень гидролиза белков подсырной сыворотки мягких молодых сыров значимое влияние оказывают только линейные переменные факторы ( $p < 0,05$ ), что говорит об отсутствии локальных экстремумов (таблица 3.59). Регрессионное уравнение 15 описывает зависимость степени гидролиза подсырной сыворотки №2 от переменных факторов.

$$DH = 12,2383 - 0,07928 \cdot X_1 + 0,000589 \cdot X_{12} + 3,71 \cdot X_2 - 2,08 \cdot X_2^2 + 0,013 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (15)$$

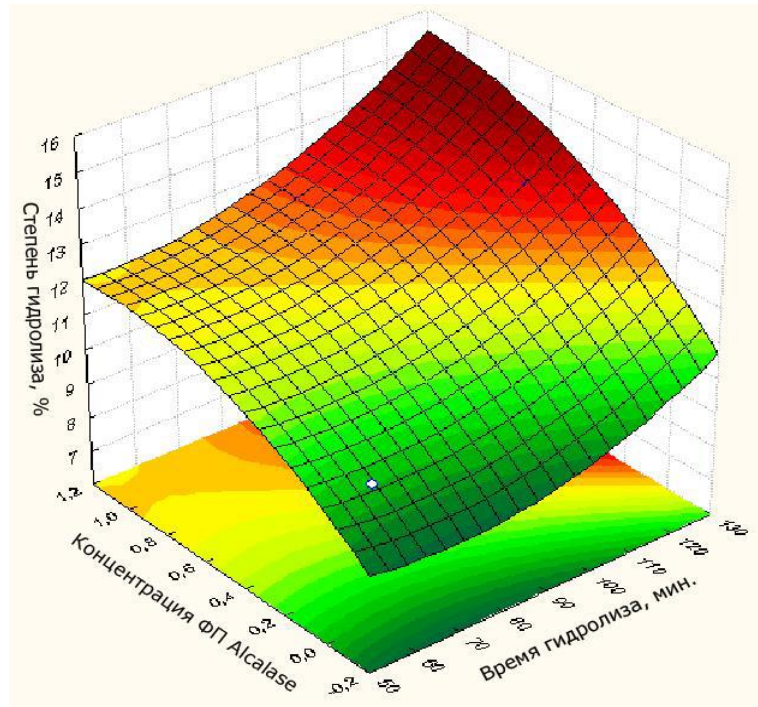


Рисунок 3.8 – Зависимость СГ подсырной сыворотки мягких молодых сыров ФП Prot/Alc от времени гидролиза и соотношения ферментов (последнее выражено как доза ФП Alcalase при общей дозе ферментов 4% от массы белка)

В исследуемом диапазоне концентраций ФП Alcalase и времени гидролиза возрастание степени гидролиза является непрерывным, и для достижения максимальной степени гидролиза протеолиз белков подсырной сыворотки мягких молодых сыров должен проводиться в течение 120 мин при соотношении ферментных препаратов Protamex и Alcalase 3,0 :1,0 (рисунок 3.8).

При исследовании влияния переменных факторов на антиоксидантную емкость гидролизата подсырной сыворотки №2 по отношению к пероксильному радикалу (таблица 3.60) обнаружилось, что линейный фактор времени гидролиза не является значимым, а квадратичный фактор времени ( $p < 0,1$ ) и линейный фактор дозы ФП Alcalase ( $p < 0,05$ ) оказывают значимое влияние на антиоксидантную емкость (уравнение 16, рисунок 3.9).

$$AOE = 190,3386 + 6,7815 \cdot X_1 - 0,041 \cdot X_1^2 - 12,165 \cdot X_2 - 19,167 \cdot X_2^2 + 1,5428 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (16)$$

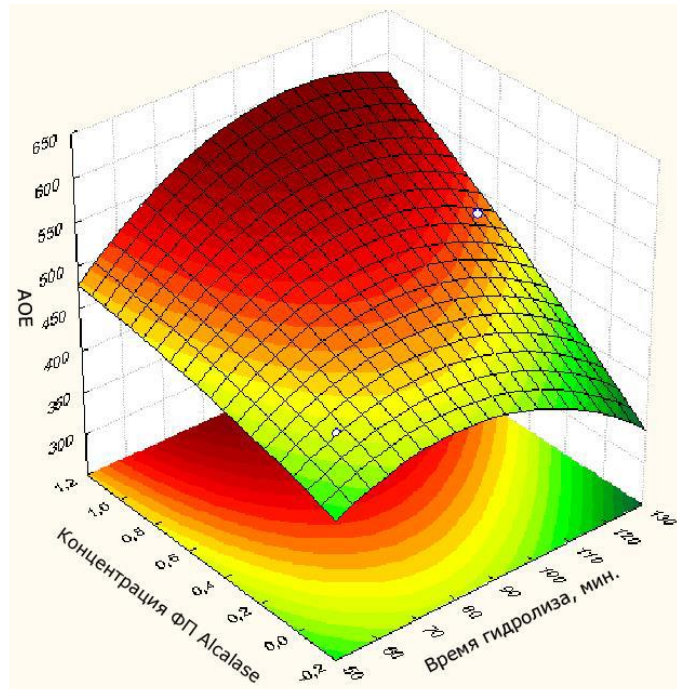


Рисунок 3.9 – Зависимость АОЕ гидролизата белков подсырной сыворотки мягких молодых сыров по отношению к пероксильному радикалу от времени гидролиза и соотношения ферментов (последнее выражено как доза ФП Alcalase при общей дозе ферментов 4% от массы белка)

Статистическая обработка влияния переменных факторов на содержание свободных аминокислот в гидролизате подсырной сыворотки сыра №2 (таблица 3.61), показала, что в случае свободных аминокислот значимое влияние оказывают оба линейных переменных фактора и фактор их взаимодействия, что указывает на синергизм между влиянием продолжительности гидролиза и дозой ферментного препарата Alcalase на содержание свободных аминокислот в гидролизате (уравнение 17, рисунок 3.10).

$$\text{САК} = 12,564 - 0,0581 \cdot X_1 + 0,00037 \cdot X_{12} - 0,0533 \cdot X_2 + 0,0933 \cdot X_{22} + 0,024 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (17)$$



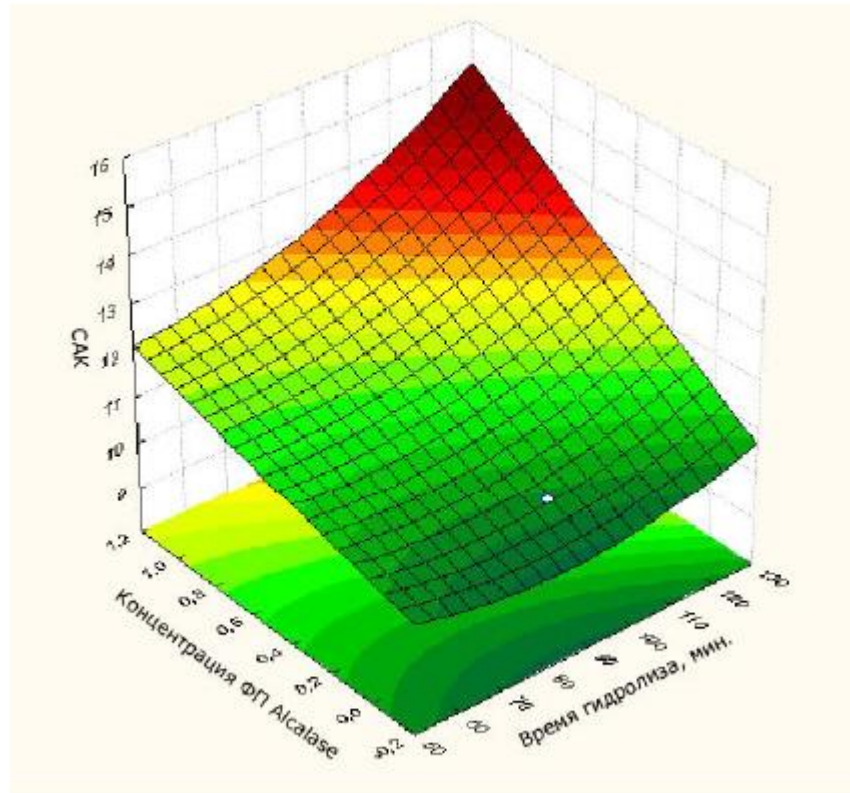


Рисунок 3.10 – Зависимость содержания свободных аминокислот (%) в гидролизате подсырной сыворотки мягких молодых сыров от времени гидролиза и соотношения ферментов. Соотношение ферментных препаратов выражено как доза ФП Alcalase при общей дозе ферментов 4% от массы белка

Повышенное содержание САК является нежелательным для гидролизатов молочной сыворотки, поэтому оптимальным является достижение минимального содержания свободных аминокислот. Для сыворотки №2 минимизация содержания свободных аминокислот входит в разрез с оптимизацией остальных двух контролируемых параметров, для которых оптимумы переменных параметров близки. Поиск оптимальных условий гидролиза по всем трем контролируемым параметрам осуществляли с помощью профилей желательности: время гидролиза 94,8 минут, а соотношение ферментов – 3,25 :0,75 (рисунок 3.11).

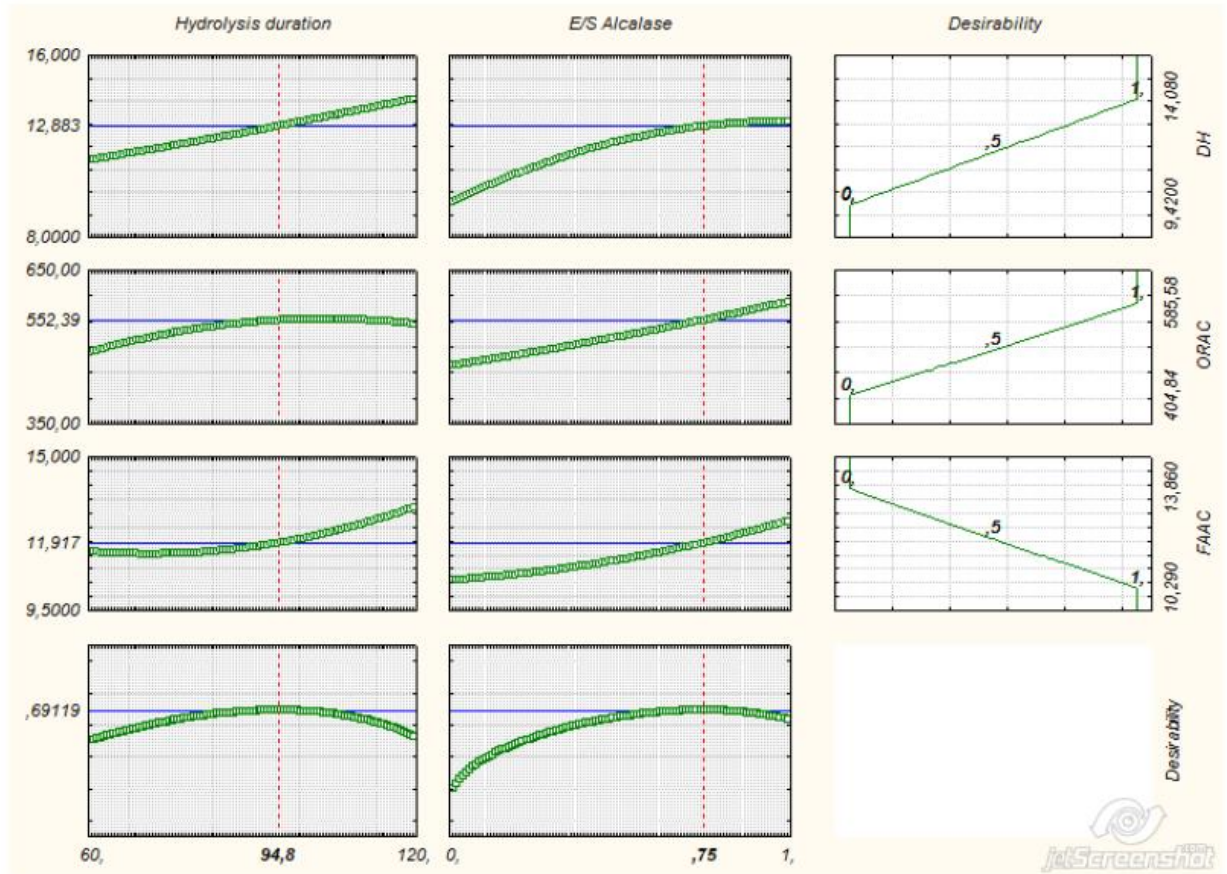


Рисунок 3.11 – Профили желательности для всех трех контролируемых параметров для подсырной сыворотки мягких молодых сыров

Аналогичным образом были проведены многофакторные эксперименты по оптимизации условий гидролиза остальных подсырных сывороток, полученных от сычужных сыров и получены оптимальные условия для их гидролиза (таблица 3.65).

Таблица 3.65 – Оптимальные параметры процесса гидролиза и критерии оценки эффективности

№ образца сыворотки	Оптимумы переменных параметров				Контролируемые параметры		
	$\tau$ , мин.	E/S, %			СГ, %	ORAC, мкМ ТЭ*/г	САК, %
		Prot	Therm	Alc			
1	94,8	3,25	-	0,75	12,88	552,39	11,92
2	90	3,00	-	1,00	14,40	417,22	10,78
3	120	3,88	-	0,12	16,48	451,13	10,32
4	90	3,00	-	1,00	6,00	424,70	9,05
5	121,2	2,00	1,00	1,00	21,55	-	2,94

\* Тролокс эквивалент

В качестве контролируемых параметров исследовали степень гидролиза (СГ), антиоксидантную активность по отношению к поглощению свободных кислородных радикалов (ORAC) и САК.

### 3.5 Разработка равновесной модели протеолиза

С помощью модели равновесия – модифицированного уравнения Михаэлиса-Мэнтен, учитывающего баланс между активной, неактивной и инактивированной формами фермента, удалось осуществить прогнозирование антиоксидантной активности гидролизатов подсырных сывороток с учетом вариабельности параметров процесса гидролиза, неизбежно возникающих в условиях промышленного производства.

Уравнение скорости ферментативного гидролиза в зависимости от температуры и времени процесса в равновесной модели имеет вид (18):

$$V(T, t) = \frac{k_{cat} E_0 e^{-\frac{k_{inact} S t}{1+S}}}{1+S} \quad (18),$$

$$S = e^{k_{eq} \left( \frac{1}{T_{eq}} - \frac{1}{T} \right)}$$

$$k_{cat} = \frac{k_B T}{h} e^{-\left( \frac{\Delta G_{cat}}{RT} \right)}, k_{inact} = \frac{k_B T}{h} e^{-\left( \frac{\Delta G_{inact}}{RT} \right)}$$

где  $E_0$  – концентрация фермента;  $k_{cat}$  – каталитическая константа фермента;  $k_{inact}$  – константа скорости тепловой инактивации;  $k_{eq}$  – константа равновесности, равная отношению изменения энтальпии системы, при переходе фермента в неактивную фазу, к универсальной газовой постоянной ( $R$ );  $T_{eq}$  – температура равенства активной и неактивной фазы;  $k_B$  – постоянная Больцмана;  $h$  – постоянная Планка;  $\Delta G_{cat}$  – энергия активации каталитической реакции;  $\Delta G_{inact}$  – энергия активации процесса денатурации.

Для анализируемых ферментных препаратов экспериментальным путем с последующим статистическим приближением были получены ключевые параметры равновесной модели, представленные в таблице 3.66.

Таблица 3.66 – Ключевые параметры равновесной модели протеолиза

Ферментный препарат	$\Delta G_{cat}$ , кДж/моль	$\Delta G_{inact}$ , кДж/моль	$k_{eq}$ , кК	$T_{eq}$ , К
Alc	78±5,3	94±5,3	21±1,9	65±4,8
Prot	62±3,9	93±6,1	47±2,2	57±4,1
Therm	75±4,7	101±6,7	18±2,1	78±5,5

Так как в производственных условиях невозможно добиться точной термостатичности процесса было разработано программное обеспечение, интегрирующее уравнение 18 во времени в зависимости от температурных колебаний.

Также программное обеспечение позволяет удобно рассчитывать скорость реакции для комбинаций ферментных препаратов с различными параметрами модели. На рисунке 3.12 продемонстрирован график зависимости скорости реакции от температурного режима во времени.

Для расчета прогнозируемой антиоксидантной активности по отношению к кислородному радикалу в зависимости от температурных колебаний требуется проинтегрировать функцию вдоль пути изменения температуры, на примере обозначенного синими точками.

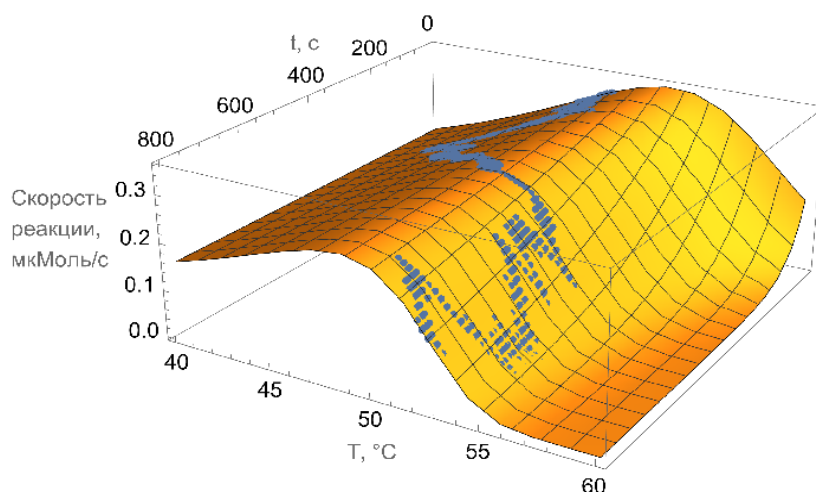


Рисунок 3.12 – Функция скорости реакции гидролиза от температурно-временных характеристик на примере препарата Prot по модели равновесия

### 3.6 Исследование пептидных профилей пептидных композиций технологически дифференцированных сывороток

По указанным в таблице 3.65 оптимальным условиям были выработаны и исследованы гидролизаты белков всех пяти видов сыворотки (ГСБ 1-5).

Перед проведением гидролиза все сыворотки сепарировали с использованием лабораторного сепаратора, после чего получали концентрат белков подсырных сывороток, далее проводили концентрирование до массовой доли сухих веществ 8–11 % и содержания общего белка 3,2–3,8%.

На рисунке 3.13 представлено молекулярно-массовое распределение образцов подсырных сывороток и их ферментативных гидролизатов. Показано, что в результате гидролиза подсырных сывороток №№1 – 4 (ГСБ 1-4) происходит значительное снижение доли высокомолекулярной фракции (>10 кДа) в сторону средне (3-10 кДа) и низкомолекулярной (<3 кДа) фракций, с преобладанием среднемолекулярной фракции (от 47% до 58%) (рисунок 3). В то время, как в гидролизате подсырной сыворотки №5 (ГСБ 5), практически отсутствует высокомолекулярная фракция (>10 кДа), при этом доля средне- и низкомолекулярной фракции составляет 40,87% и 55,08% (рисунок 3.13).

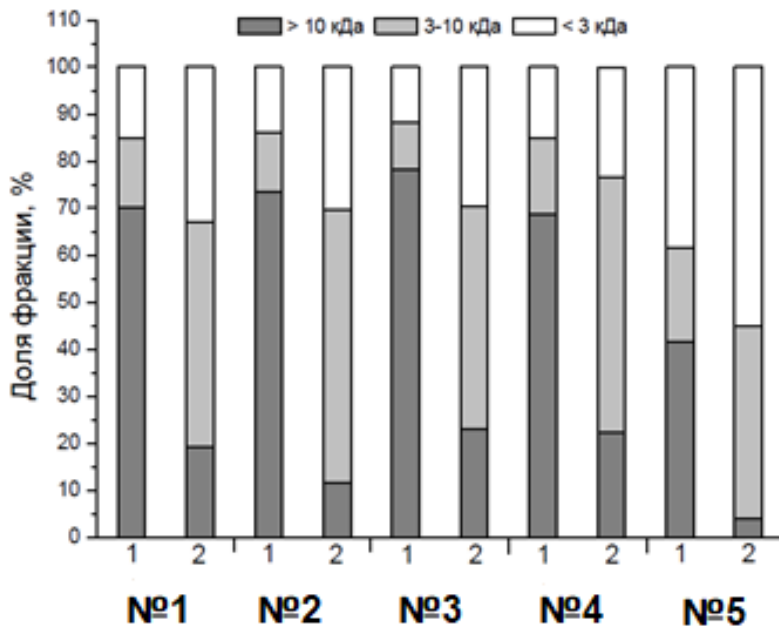


Рисунок 3.13 – Соотношение пептидных фракций с различным диапазоном молекулярных масс в образцах исходных подсырных сывороток (1) и их ферментативных гидролизатах (2)

Профили элюции подсырных сывороток и их белковых гидролизатов представлены на рисунке 3.14.

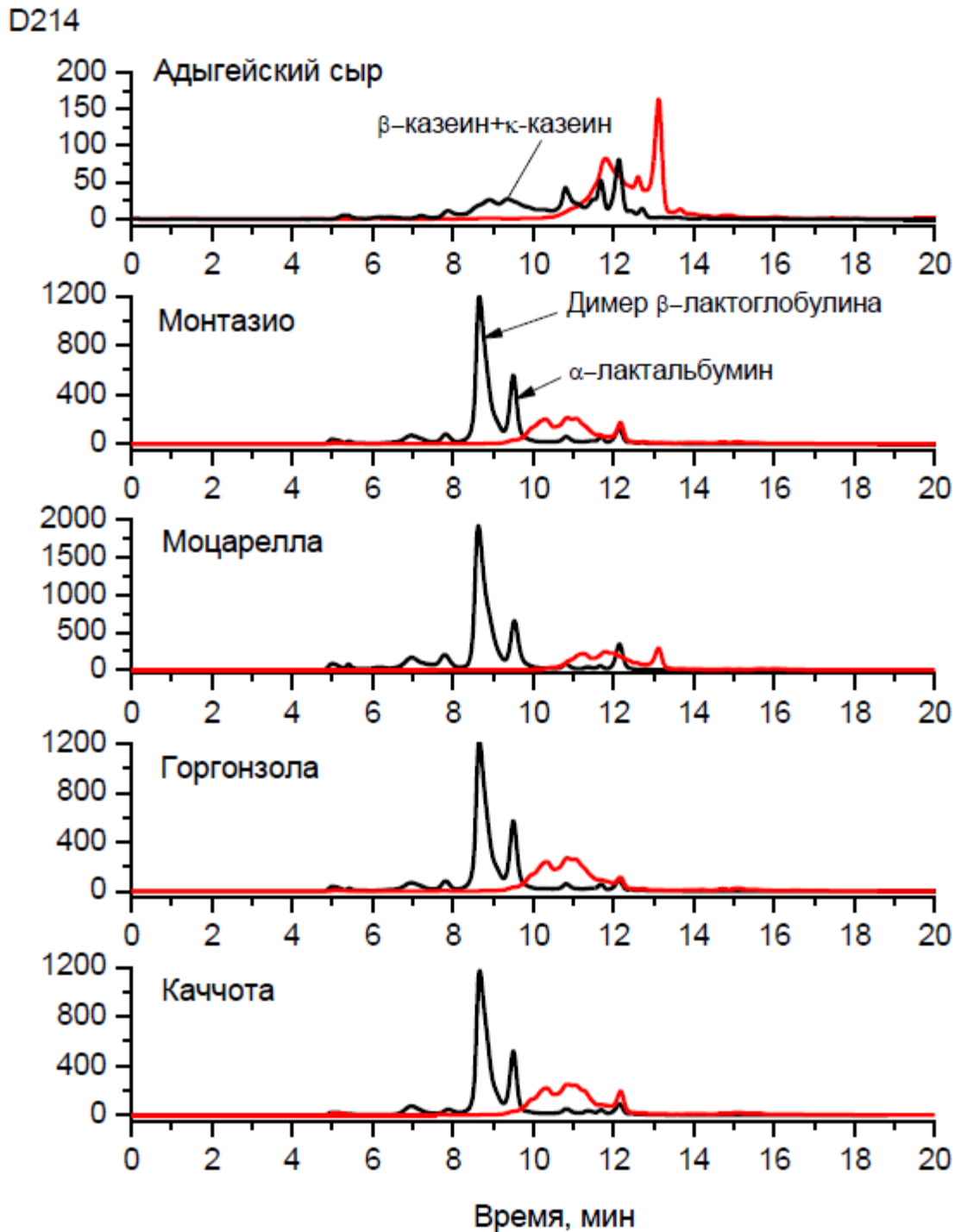


Рисунок 3.14 – Профили элюции подсырных сывороток (-----) и их белковых гидролизатов (-----)

В образцах, белковых гидролизатов сывороток №№1–4 идентифицировано от 83 до 102 пептидов размером от 8 до 26 аминокислотных остатков. В пептидном

гидролизате подсырной сыворотки № 5 идентифицировано 85 пептидов длиной 5-14 аминокислотных остатков, при этом, средняя молекулярная масса пептидов составляла  $(925 \pm 65)$  Да.

При помощи масс-спектрометра с фрагментацией были измерены точные массы пептидов и их фрагментов, далее по результатам хромато-масс-спектрометрического анализа проб и биоинформационного анализа с использованием поисковых программ Mascot и MaxQuant были идентифицированы пептиды, находящиеся в гидролизатах.

Молекулярно-массовое распределение образцов подсырных сывороток и их ферментативных гидролизатов, полученных в оптимальных условиях гидролиза (таблица 3.65) показало, что в результате гидролиза подсырных сывороток №1-№4 происходит значительное снижение доли высокомолекулярной фракции ( $>10$  кДа) в сторону средне ( $3-10$  кДа) и низкомолекулярной ( $<3$  кДа) фракций, с преобладанием среднемолекулярной фракции (от 47% до 58%) (Рис. 3.18). В то время, как в гидролизате подсырной сыворотки %5, практически отсутствует высокомолекулярная фракция ( $>10$  кДа), при этом доля средне- и низкомолекулярной фракции составляет 40,87% и 55,08% (рисунки 3.13 и 3.14). В образцах, белковых гидролизатов сывороток полутвердых, мягких молодых, твердых и мягких плесневых сыров идентифицировано от 83 до 102 пептидов размером от 8 до 26 аминокислотных остатков (таблица 3.67).

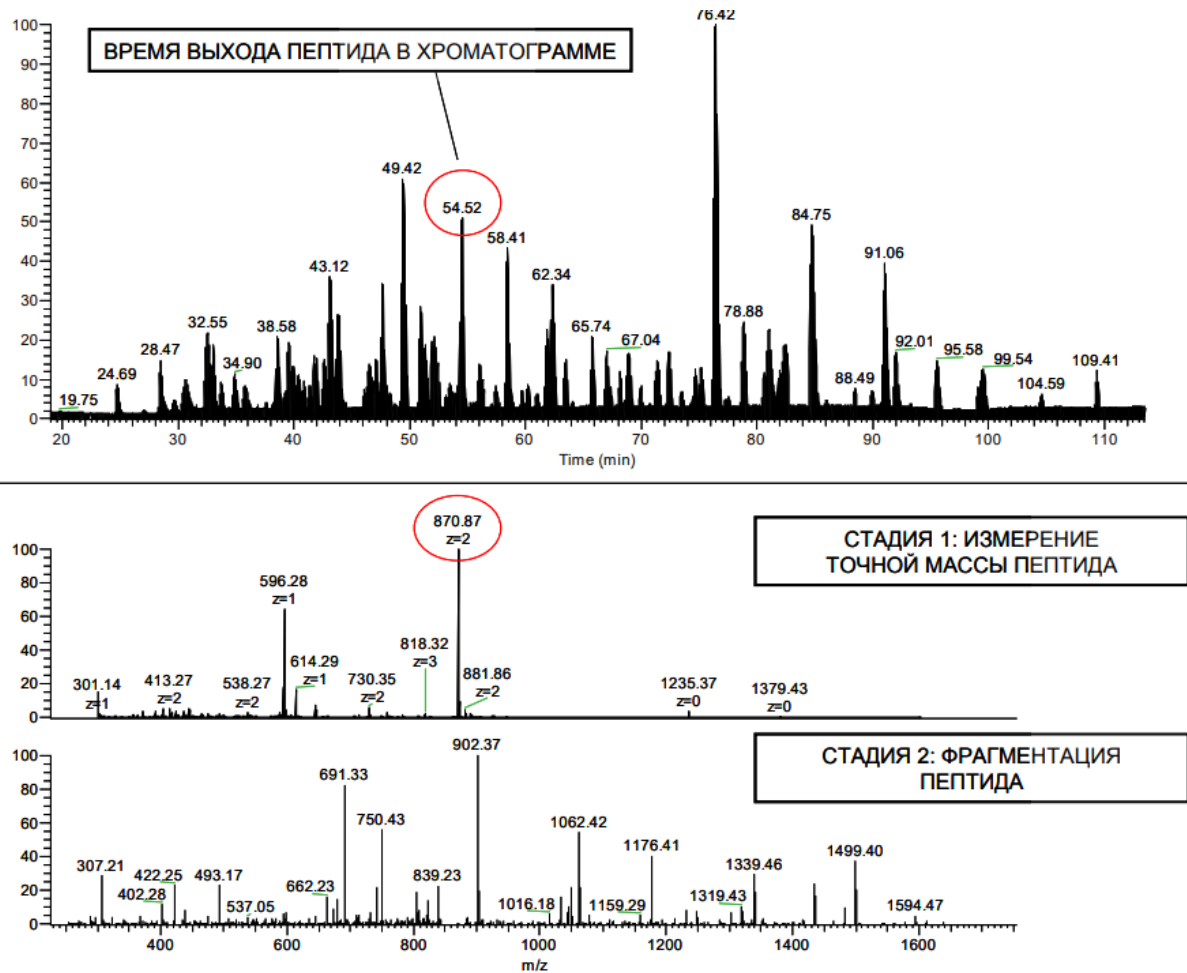


Рисунок 3.15 – Схема автоматизации хромото-масс-спектрометрического анализа пробы. Вверху: хроматограмма, в центре - масс-спектра в момент времени, выделенный на хроматограмме, внизу: масс-спектр столкновительно фрагментация (CID) пика, выделенного в масс-спектре

На первой стадии в масс-спектрометре ИЦР ПФ измерялись точные массы пептидов в диапазоне  $m/z$  100-1600 с разрешением  $R=50000$  для  $m/z$  400 (число ионов в ячейке ИЦР  $5 \times 10^6$ ). На второй стадии из ИЦР масс-спектра выбирались три максимальных пика, для которых производилась столкновительно-индуцированная фрагментация (CID). Фрагментация CID и измерение спектров CID фрагментов происходили в линейной квадрупольной ионной ловушке (число ионов  $3 \times 10^4$ ). В режиме автоматического 2-х стадийного анализа пептиды, для которых фрагментация уже была проведена, исключались из рассмотрения на 30 секунд. Список из точных масс пептидов и масс их фрагментов использовался для поиска и идентификации белков по базе данных при помощи программы Mascot



(Matrix Science, Лондон, Великобритания; version 2.0.04). Для идентификации белков использовалась база данных Uniprot Bostaurus. Для идентификации белков использовались следующие параметры поиска: фермент - None; точность масс для родительского иона - 20ppm; точность масс для MS/MS фрагментов – 0.50 Да; модификации - окисление метионина. Автоматическая фильтрация и валидация списка белков и пептидов осуществлялась с использованием программы Scaffold 4.0 (version Scaffold-01\_07\_00, Proteome SoftwareInc., Portland, OR). Считалось, что пептид идентифицирован верно, если вероятность его определения была более 95.0% согласно алгоритму PeptideProphet. Для белков, считалось, что в случае надежной идентификации вероятность определения белка должна быть более 99.0% согласно алгоритму PeptideProphet. По результатам хромато-масс-спектрометрического анализа проб, биоинформационного анализа полученных данных с использованием поисковых программ Mascot и MaxQuant, были идентифицированы пептиды из гидролизатов, полученных ферментативным гидролизом подсырных сывороток (твердых, полутвердых, мягких и мягких сыров без созревания) (рисунок 3.15).

Таблица 3.67 – Характеристика пептидных профилей пептидных композиций, полученных при гидролизе подсырных сывороток из-под различных типов сыров

№ образца	Число идентифицированных пептидов	Размер идентифицированных пептидов	Распределение пептидов по фракциям		
			№ фракции*	Число идентифицированных пептидов	Средняя молекулярная масса идентифицированных пептидов, Да
1	102	8-20	1	53	1381±66
			2	35	1279±66
			3	20	1286±60
			24	18	1240±50
			5	22	1199±46
2	100	8-26	1	45	1460±71
			2	48	1300±77
			3	22	1331±81
			4	20	1227±50
			5	34	1278±47
			6	29	1256±42

3	83	8-19	1	40	1510±69
			2	44	1383±66
			3	14	1386±64
			4	16	1294±64
			5-6	14	1381±67
4	97	8-22	1	43	1436±67
			2	35	1330±77
			3	30	1362±62
			4	30	1261±68
			5	29	1210±45
			6	25	1202±43
5	85	5-14	Не фракционирован**	85	925±65

\* В соответствии с обозначениями на профилях элюции (рисунок 3.14)

\*\* В связи с низким содержанием белка в полученном белково-пептидном гидролизате, анализ и идентификацию пептидного профиля проводили в общем гидролизате, а не в отдельных его фракциях, полученных методом гельфильтрации

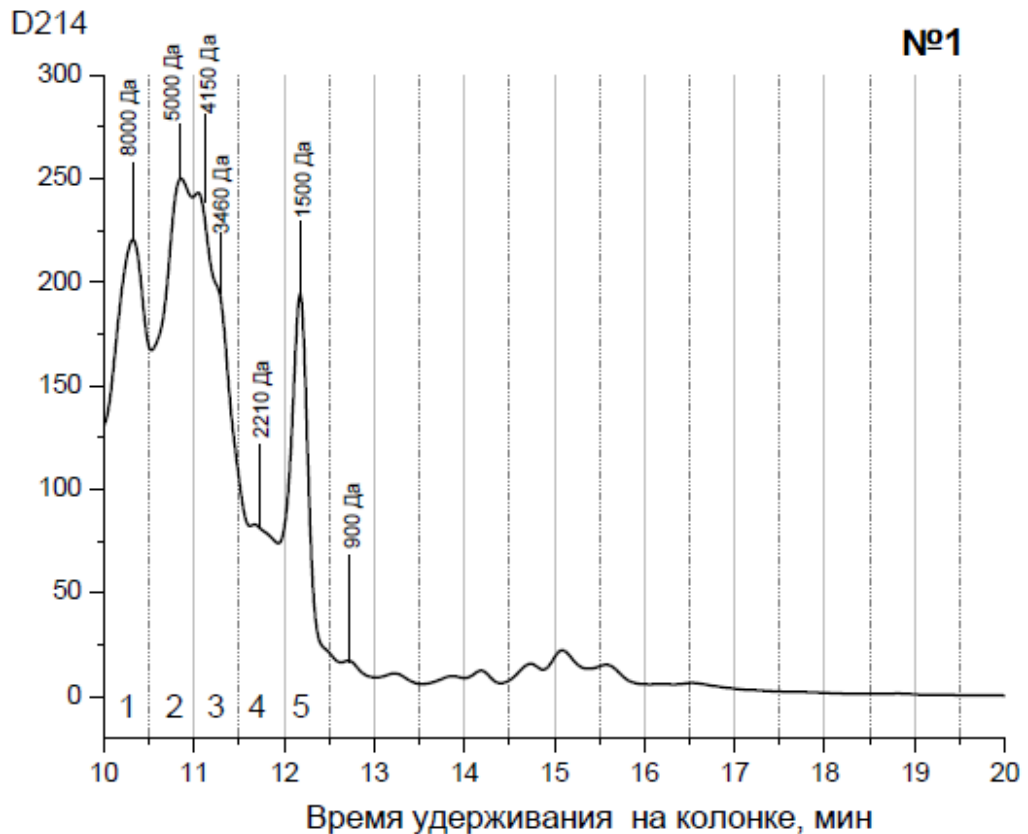


Рисунок 3.16 – Хроматограмма образца №1

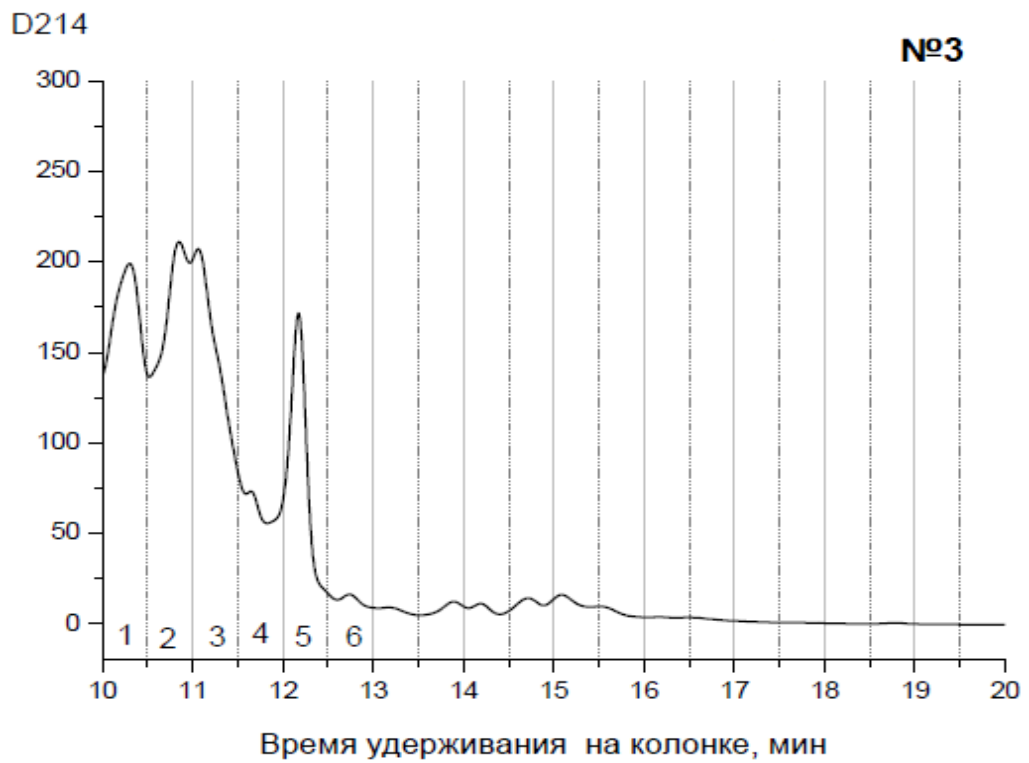
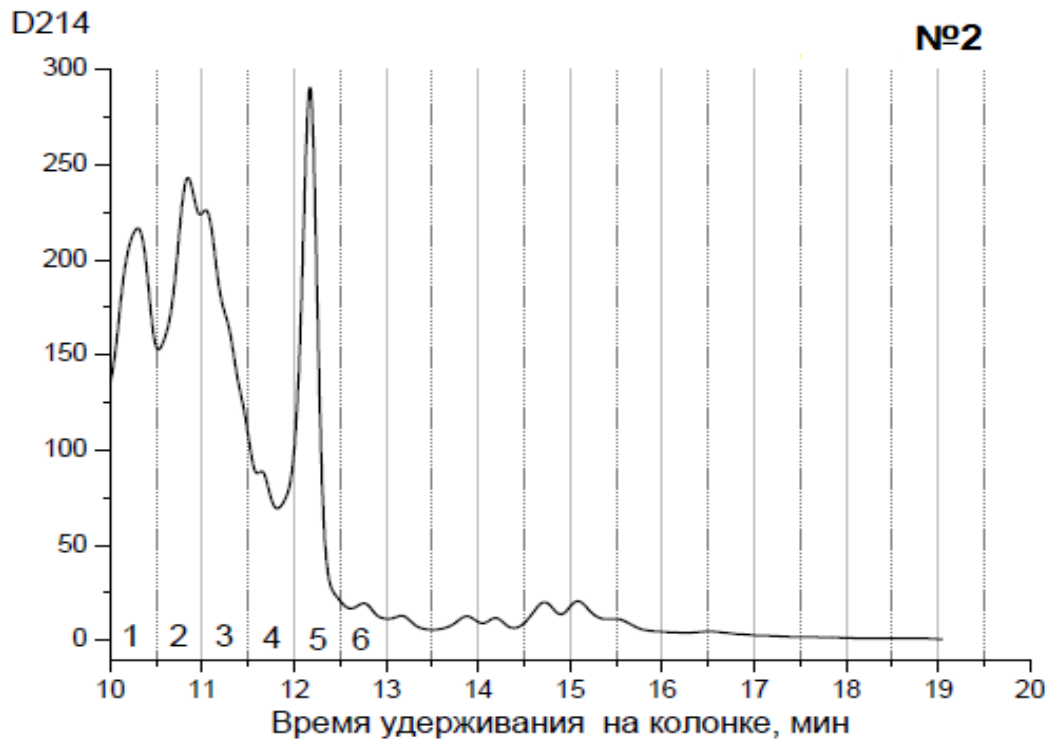


Рисунок 3.17 – Хроматограммы образцов №2 и №3

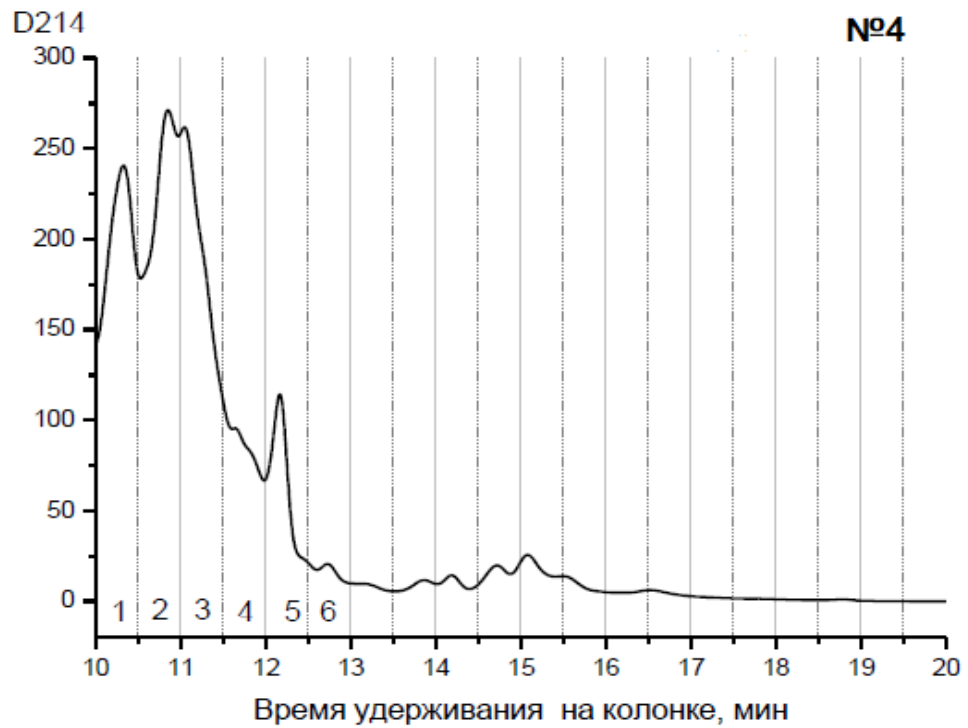


Рисунок 3.18 – Хроматограммы образцов №4 и №5

В белковом гидролизате подсырной сыворотки мягких сыров без созревания идентифицировано 85 пептидов длиной 5-14 аминокислотных остатков (таблица 3.67), при этом, средняя молекулярная масса пептидов составляла  $925 \pm 65$  Да. Из общего количества идентифицированных пептидов около 61% образованы при

гидролизе бетта- и каппа-казеинов, что согласуется с преобладанием фракций казеиновых белков в составе подсырной сыворотки мягких сыров без созревания (таблица 3.68).

Из общего количества идентифицированных пептидов около 61% образованы при гидролизе  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов, что согласуется с преобладанием фракций казеиновых белков в составе подсырной сыворотки мягких сыров без созревания [27] (таблица 3.68).

Таблица 3.68 – Белки-предшественники пептидов, идентифицированных в составе белковых гидролизатов подсырных сывороток [22]

Белок-предшественник	Количество идентифицированных пептидов, шт.				
	№1	№2	№3	№4	№5
$\alpha$ -лактальбумин	13	8	5	10	6
$\beta$ -казеин	10	8	6	20	33
$\beta$ -лактоглобулин	42	36	38	35	2
Неохарактеризованный протеин	16	19	8	8	10
$\kappa$ -казеин	7	8	8	8	19
Z- $\alpha$ -2-гликопротеин	3	5	2	4	-
GLYCAM1*	4	5	7	5	10
Сывороточный альбумин	3	3	2	1	-
Полимерный рецептор иммуноглобулина	-	3	-	-	4
Лактоферрин	-	1	2	-	-
Лактопероксидаза	-	3	2	4	-
Гликопротеин тромбоцитов	-	1	-	-	-
Na-зависимый фосфатный белок-транспортер	-	-	1	-	-
Активирующий фактор транскрипции	-	-	1	-	-
Ксантиндегидрогеназа	-	-	1	-	-
$\beta$ -2-микроглобулин	-	-	-	-	1
Нуклеобиндин-1	-	-	-	-	2
Эпификан	-	-	-	-	2

\* – зависимая от гликозилирования молекула клеточной адгезии

### 3.7 Изучение последовательностей идентифицированных пептидов в различных видах сывороток

Анализ последовательностей идентифицированных пептидов с помощью базы данных BIOPEP позволил установить присутствие в составе всех

гидролизатов пептиды, содержащих антиоксидантные и гипотензивные фрагменты с аннотированной ранее активностью. Стоит отметить, что все пептиды, идентифицированные в гидролизатах и содержащие фрагмент VVPP, несут на С-конце пептида фенилаланин (таблица 3.69), что может значительно усилить АПФ-ингибирующую способность данных пептидов [27,280].

Таблица 3.69 – Гипотензивные пептиды, идентифицированные в составе белковых гидролизатов подсырных сывороток

Белок-предшественник	Идентифицированный пептид	№ сыв. *	АПФ-ингибирующий пептид	IC <sub>50</sub> , мкМ	
1	2	3	4	5	
α-лактальбумин	NNDSTEY	1	YGLF	733	
	IVQNNDSTEYg	2			
	AIVQNNDSTEY	1,2,4			
β-лактоглобулин	RTPEVDDE	1-4	LVRT	1000	
	RTPEVDDEAL	1-4			
	TPEVDDEALE	1-5			
	TPEVDDEALEK	1-4			
	VLDTDYKK	2	VLDTDYK	946	
	LVLDTDYKKY	1,2,4			
	KKY	1-5			
	KKYL	1-4			
	KKYLL	3			
	DTDYKKY	4			
	DIQKVAGTWYS	4	VAGTWY	1682	
	KVAGTWYSL	4			
	κ-казеин	AIPPKKN	5	AIPP	900
		AIPPKKNQDKTEIPT	2,3,5		
MAIPPKKNQDKTEIPT		2,3,4			
MAIPPKKN		1-4			
AIPPKKNQDKTEIPTINT		1,3			
MAIPPKKNQDKTEIPTINT		3			
SRYPS		5	SRYPS		
FLPYPY		5	LPYPY	28,90	
MARHPHPH	5	ARHPHP			
β-казеин	VVPPF	5	VVPP	258,21	
	TPVVVPPF	1-5			
	IPPLTQTPVVVPPF	2			
	NIPPLTQTPVVVPPF	1,2	NIPPLTQTPV, VVPP	173	
	SLPQNIPPLTQTPVVI F	1-4			
	FL	1			

Продолжение таблицы 3.69

Белок-предшественник	Идентифицированный пептид	№ сыв. *	АПФ-ингибирующий пептид	IC <sub>50</sub> , мкМ	
β-казеин	VYFPFGPIP	5	VYFPFG, VYFPFGPI, YFPFGPIP, YFPFGPI, LVYP	VYFPFG, 221	
	VYFPFGPI	4,5		VYFPFGPI,500	
	GP	5		YFPFGPIP,500	
	PIHN	1,2,4		YFPFGPI, 500	
	VYFPFGPIPNS	5			
	LVYFPFGPIHN	1,2,4		LVYP, 170	
	LVYFPFGPIPNS	1,5			
	LVYFPFGPI	4,5			
	QSEEQQTEDELQDKIHPF	4,5		DKIHPF	257
	QQQTEDELQDK	3		YQEPVL	280
	YQEPVLGPVRGPF	4			
	YQEPVLGPVRGPFPI	4	EMPFK	423	
	EMPFKYVPEPF	4			
	QK	4,5	KVLPVPQ	1000	
	YPQ	5	AVYP	80	
	KAVYPQ	5			
	RDMP	5	AVYPQR	15	
	LHLPLP	5	LHLPLP	2,90	
LHLPLPL	5	LHLPLPL	432,7		

\* Обозначение в соответствии с таблицей 3.67

Практически во всех образцах гидролизатов встречаются пептиды LVRTPEVDDE, LVRTPEVDDEAL, LVRTPEVDDEALE, LVRTPEVDDEALEK, содержащие фрагмент LVRT (IC<sub>50</sub> 1000 мкМ). Однако, так как данный фрагмент расположен с N-конца пептидов, его влияние на АПФ-ингибирующую способность пептида скорее всего будет несущественной. Подобная картина может наблюдаться в пептидах AIPPKKN, AIPPKKNQDKTEIPT, MAIPPKKNQDKTEIPT, MAIPPKKN, AIPPKKNQDKTEIPTINT, MAIPPKKNQDKTEIPTINT, содержащих либо с N-конца, либо в середине АПФ-ингибирующий фрагмент AIPP (IC<sub>50</sub> 900 мкМ) [27] (таблица 3.69).

АПФ-ингибирующий фрагмент VLDTDYK (IC<sub>50</sub> 946 мкМ) также является одним из наиболее часто встречающихся фрагментов. Наибольшее количество фрагментов с аннотированной ранее АПФ-ингибирующей активностью представлено в гидролизате белков сыворотки мягких сыров без созревания,

характеризующимся так же наименьшим размером идентифицированных пептидов (5-14 аминокислотных остатков) и максимальной АПФ-ингибирующей активностью гидролизата (таблица 3.70).

Таблица 3.70 – Уровень биологической активности белково-пептидных гидролизатов подсырных сывороток

№ сыв.	Антиоксидантная активность, мкМ ТЕ/г белка	АПФ-ингибирующая активность, IC <sub>50</sub> , мг белка/л
№ 1	417,22±22,09	2563,89±32,12
№ 2	517,82±57,20	1572,89±28,23
№ 3	511,43±25,19	2242,33±41,6
№ 4	424,70±14,31	1681,51±34,11
№ 5	497,14±62,98	1347,72±25,19

Наибольшее число пептидов, содержащих остатки редокс-активных аминокислот (тирозина, триптофана, метионина, цистеина и гистидина, фенилаланина) обнаружено в гидролизате сыворотки мягкого плесневого сыра, составившее около 75% от общего числа идентифицированных пептидов. Для гидролизатов сывороток сыров №1- №3 и №5 содержание пептидов, в состав которых входят редокс-активные аминокислоты составило 58%, 63%, 70% и 66% соответственно. Наиболее часто-встречаемым антиоксидантным фрагментом в составе идентифицированных пептидов является фрагмент YVEEL. Антиоксидантная активность пептида YVEEL полученного при гидролизе бетта-лактоглобулина составляет 0,799 мкМ ТЕ/мкМ пептида по отношению к пероксильному радикалу (таблица 3.71) [27].

Среди пептидов, идентифицированных в гидролизате мягкого плесневого сыра, так же были обнаружены пептиды, содержащие антиоксидантные фрагменты WYSL (4,51 мкМ ТЕ/мкМ) - в составе пептида KVAGTWYSL; YQEP (0,102 ± 0,10 мМ ТЕАС) и YQEPVLGP (0,124 ± 0,11 мМ ТЕАС) - в составе пептидов YQEPVLGPVRGPFPI и YQEPVLGPVRGPFPI, фрагмент KVLPVPQ, способный



ингибировать липоксигеназную активность - в составе пептида KVLVPVPQK казеинового происхождения.

Таблица 3.71 – Антиоксидантные пептиды, идентифицированные в составе белково-пептидных гидролизатов подсырных сывороток [22]

Белок-предшественник	Идентифицированный пептид	№ образца, в котором был идентифицирован пептид	Антиоксидантный пептид	Уровень антиоксидантной активности
β-лактоглобулин	VYVEELKPTPE	2,3	YVEEL	0,799 мкМ TE/мкМ, ORAC
	VYVEELKPTPEGDLEIL	2,3,4		
	VYVEELKPTPEGDLEIL	1		
	VYVEELKPTPEGDLE	4-4		
	KVAGTWYSL	4	WYSL	4,51 мкМ TE/мкМ,
κ-казеин	SRYPSS	5	SRYPSS	-
	MARHPHPH	5	ARHPHP	-
β-казеин	YQEPVLGPVRGPF	4	YQEP, YQEPVLGP	0,102 ± 0.10
	YQEPVLGPVRGPFPI	4		0124 ± 0.11 mM TEAC
	KVLVPVPQK	4	KVLVPVPQ, VLPVPQK	-
	VLPVPQK	5		
	AVPYRQ	5	VPYRQ	2450 pM/ mM, ORAC
	KAVPYRQ	5		
	AVPYRQRDMP	5		

Среди пептидов, идентифицированных в гидролизате сыворотки мягких сыров без созревания, был идентифицирован антиоксидантный пептид SRYPSS, чья активность была доказана в системе, ингибирующей свободно радикальную реакцию с участием АБТС-катион радикала, а также пептиды, содержащие антиоксидантный фрагмент VLPVPQ - в составе пептида VLPVPQK; ARHPHP - в составе пептида MARHPHPH и антиоксидантные фрагменты AVPYRQR, VPYRQ (2450 мкМ/мМ, ORAC) - в составе пептидов AVPYRQ, KAVPYRQ, AVPYRQRDMP. Практически все пептиды, идентифицированные в гидролизатах сывороток мягких молодых и твердых сыров, за исключением пептидов KFDKALKALPMH, NDECAQKK, ENDECAQKK (бетта-лактоглобулин), AIRPKKNQDKTEIPT, IPPKKNQDKTEIPT (каппа-казеин), KFGERALKAW (сывороточный альбумин), QQQTEDELQDKIHP, QQQTEDELQDKIHPF (бетта-казеин), LENTVKETIKY (Glycosylation-dependent cell adhesion molecule)

встречаются в гидролизатах сывороток полутвердых и мягких плесневых сыров, характеризующихся более низкой антиоксидантной активностью (таблица 3.71). Относительно высокая антиоксидантная активность гидролизата сыворотки мягких сыров без созревания может быть связана с присутствием уникальных для данного образца пептидов SLPEW, VSLPEW, GVSLPEW – бета-лактоглобулинового происхождения, VRSPAQ, YQQKP, TVPAKS, SNTVPAK, LSNTVPAK-каппа-казеинового происхождения и пептиды MNQRHQPLPPT, MNQRHQR, AMAPK, INKKI, LNVPGE, VLPVPQ, VMFPPQ, MPFPKYR, НКЕМРФРKYР, MAPKHКЕМРФРKYР, VMFPPQS, FPGPIPН- β-казеинового происхождения, содержащие остатки гидрофобных и ароматических аминокислот [27].

Таким образом, с использованием биоинформатического подхода получены белковые гидролизаты из подсырных сывороток, обладающие предсказанной антиоксидантной и антигипертензивной активностями, для подтверждения их наличия будут проведены исследования *in vitro* и *in vivo*.

## ГЛАВА 4 ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕПТИДНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

### 4.1 Исследование биофункциональных свойств гидролизатов *in vitro*

На следующем этапе выполнения работы по аналогии с предыдущими исследованиями были [279] исследованы биофункциональные свойства *in vitro* двух типов белково-пептидных гидролизатов (антиоксидантная, гипотензивная, антимикробная и бифидогенная активности). В качестве сигнальных активностей при тестировании гидролизатов *in vitro* выбраны антиоксидантная, антигипертензивная, антимикробная и бифидогенная. Результаты тестирования АОЕ и АГА представлены в таблице 4.1.

Антиоксидантная активность гидролизатов обоих типов была сравнима и составляла в среднем 400-600 мкМоль ТЭ/г белка. Значительные отличия обнаружены в гипотензивной активности белково-пептидных гидролизатов.

Таблица 4.1 – Уровень биологической активности белков КСБ и ГСБ

Образец	Антиоксидантная активность, мкМ ТЭ/ г белка	АПФ-ингибирующая активность, IC <sub>50</sub> , мг белка/мл
КСБ 1	39,5±13,0	33,5±1,1
ГСБ 1	417,2±22,0	2,5±0,03
КСБ 2	170,8±14,0	16,2±0,5
ГСБ 2	517,8±57,2	1,5±0,03
КСБ 3	97,2±7,9	25,7±1,2
ГСБ 3	511,4±25,1	2,2±0,1
КСБ 4	124,2±11,1	22,6±1,6
ГСБ 4	424,7±14,3	1,6±0,04
КСБ 5	154,3±7,4	3,5±0,1
ГСБ 5	497,1±62,9	0,5±0,02

Так ГСБ 5 имел более высокую гипотензивную активность (IC<sub>50</sub> 0,5 мг белка/мл), по сравнению с ГСБ (IC<sub>50</sub> 1,5-2,5 мг белка/мл). Полученные результаты коррелируют с количеством идентифицированных в гидролизатах антигипертензивных и антиоксидантных пептидов.

Таким образом, использованный в работе биоинформатический подход позволил получить белково-пептидные гидролизаты с приемлемыми органолептическими свойствами, обладающие предсказанными антиоксидантной

(400–500 мкМ ТЕ/г белка) и антигипертензивной (IC<sub>50</sub> 0,5–2,5 мг белка/мл) активностями (таблица 4.1).

Также оба типа гидролизата обладали бифидогенной активностью в отношении штамма *Bifidobacterium adolescentis* MC-42.

Показано, что гидролизаты при добавлении в ростовую среду значительно стимулирует рост клеток бифидобактерий. Статистически достоверных отличий при использовании разных типов гидролизатов не обнаружено, увеличение роста клеток бифидобактерий в 2-3 раза зафиксировано при добавлении в ростовую среду в количестве 0,3 г/мл.

Анализ последовательностей идентифицированных пептидов с помощью базы данных BioPer позволил установить присутствие в составе гидролизата фракций казеина (ГСБ 5) пептидов, содержащих антимикробные фрагменты с аннотированной ранее активностью (фрагменты VRSPAQ и YQQKP в составе пептидов PAAVRSPAQILQ и YYQQKPVA, белок-предшественник κ-казеин), а также в составе данного гидролизата обнаружено максимальное количество пептидов с предсказанной антимикробной активностью (наличие таких аминокислотных дескрипторов, как R, K, P, W, L) (таблица 4.2).

Таблица 4.2 - Аминокислотные дескрипторы антимикробной активности в пептидах, идентифицированных в гидролизатах различных подсырных сывороток

Пептиды	1 *	2	3	4	5
Alpha-lactalbumin					
KILDKVGIN	+	+	+	+	–
KILDKVGINY	+	+	+	+	–
KILDKVGINYW	–	+	+	–	–
KALCSEKL	+	–	–	–	–
Major allergen beta-lactoglobulin					
KFDKALKALPMH	–	+	+	–	–
AEKTKIPA	+	+	+	–	–
IIAEKTKIPA	+	+	+	+	–
IIAEKTKIPAVF	+	–	+		–
KVAGTWYSL	–	–	–	+	–
DKALKALPM	+	+	–	–	–

KFDKALKALPM	+	+	+	-	-
Kappa casein					
PPKKNQDKTEIPT (MAIPPCKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATL EDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV)	+	+	+	+	
IPPKKNQDKTEIPT	-	-	+	-	-
AIPPKKN	-	-	-	-	+
AIPPKKNQDKTEIPT	-	+	+	-	+
MAIPPKKNQDKTEIPT	-	+	+	+	-
MAIPPKKN	+	+	+	+	-
AIPPKKNQDKTEIPTINT	+	-	+	-	-
MAIPPKKNQDKTEIPTINT	-	-	+	-	-
SRYP	-	-	-	-	+
VRSPAQ (PAAVRSPAQILQ)	-	-	-	-	+
YQQKP (YYQQKPVA)	-	-	-	-	+
TVPAKS	-	-	-	-	+
SNTVPAK	-	-	-	-	+
LSNTVPAK	-	-	-	-	+
MARHPHPH	-	-	-	-	+
Glycosylation-dependent cell adhesion molecule					
LGHKI	-	-	-	-	+
SQNPCLP	-	-	-	-	+
RQPQSQNPCLP	-	-	-	-	+
SRQPQSQNPCLP	-	-	-	-	+
SSRQPQSQNPCLP	-	-	-	-	+
Uncharacterized protein					
NVETTRASKQ	+	-	-	-	-

Антимикробные свойства *in vitro* белково-пептидных гидролизатов определяли в отношении роста условно-патогенных и патогенных тест-штаммов микроорганизмов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Показано, что наиболее выраженной антимикробной активностью обладал гидролизат белков сыворотки мягких сыров без созревания (содержащий фракций бета-, каппа- и альфа-казеина), что коррелирует с данными *in silico* анализа.

Для дальнейших исследований по совокупности анализа всех биологических активностей были определены ГСБ 3 и ГСБ 5.

#### 4.2 Исследование биофункциональных свойств гидролизатов *in vivo*

Проведено тестирование на моделях *in vivo* функциональных свойств белково-пептидных гидролизатов, полученных биокаталитической конверсией белков двух типов подсырных сывороток. На *in vivo* модели индуцированного окислительного стресса путем введения животным черехлористого углерода (CCl<sub>4</sub>) показаны антиоксидантные и гепатопротекторные свойства гидролизатов. На фоне интоксикации тетрахлоридом углерода у экспериментальных животных контрольной группы происходило нарушение функционального состояния печени с развитием патологии по антиоксидантному статусу, что выражалось в увеличении активностей АЛТ и АСТ (трансаминаз печени) приблизительно в 1,4 и 2,5 раза соответственно и повышении концентрации ТБК-реактивных продуктов в печени и сыворотки крови и в 1,7 и 4,0 раза соответственно. У животных опытных групп показана тенденция к снижению активностей АЛТ и АСТ, по сравнению с контрольной группой животных (таблица 4.3). Содержание ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови животных всех исследованных групп не имело статистически значимых отличий (таблица 4.3). Тем не менее, отмечалась тенденция к снижению величины данного показателя у животных получавших гидролизаты на фоне индукции свободнорадикальной патологии печени. В отличие от сыворотки крови, по содержанию ТБК-реактивных продуктов в печени, исследованные группы животных существенно различались друг с другом. Наибольшее содержание ТБК-реактивных продуктов в печени было отмечено у животных контрольной группы с интоксикацией тетрахлоридом углерода, которое в 1,6-1,8 раза превышало величину данного показателя у животных группы без интоксикации. Содержание ТБК-реактивных продуктов в печени у животных опытных групп (получавших гидролизаты) было достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже на 20%, по сравнению с контрольной группой животных с интоксикацией. Статистически значимых отличий в тестируемых показателях между двумя типами гидролизатов не отмечено.

Таблица 4.3 – Показатели антиоксидантного статуса лабораторных животных при тестировании антиоксидантных и гепатопротекторных свойств ГСБ *in vivo*

Показатель	Группа						
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7
АОЕ, кровь мм ТЭ	13,3±0,5	13,1±0,6	12,9±0,5	13,6±0,7	14,8±0,6	13,8±0,4	15,6±0,8
ТБК-реакт. прод. *, кровь мкМ МДА**	1,2±0,4	1,5±0,3	3,8±0,4 <sup>a</sup>	3,15±0,5 <sup>b</sup>	2,80±0,3 <sup>c</sup>	3,0±0,2 <sup>b</sup>	2,69±0,2 <sup>c</sup>
ТБК-реакт. прод, печень нмоль МДА/г	28,1±3,4	30,3±5,1	52,1±3,8 <sup>a</sup>	41,6±3,2 <sup>b</sup>	38,4±2,8 <sup>c</sup>	40,2±3,7 <sup>b</sup>	36,3±2,5 <sup>c</sup>
АЛТ, Ед/л	46,3±4,4	60,9±8,1	67,7±8,5	63,9±7,8	65,2±5,1	58,7±4,7	57,2±5,0
АСТ, Ед/л	47,2±5,8	119,7±9, 4	127,1±11, 0	118,8±7, 7	109,2±7, 9	128,2±9, 8	111,6±7, 4
ЛДГ, Ед/л	602±14	597±11	581±19	610±16	616±18	589±13	600±17

\* ТБК - тиобарбитуровая кислота, \*\* МДА - малоновый диальдегид

Оценка гипотензивных свойств двух типов пептидных гидролизатов *in vivo* проводилась с использованием крыс линии SHR (Spontaneously hypertensive rats) с устойчиво высоким уровнем артериального давления. Среднее систолическое давление у крыс на момент начала эксперимента составляло 175±15 мм рт. ст. (таблица 4.4). Показано статистически значимое снижение среднего систолического давления при внутрижелудочном введении гидролизатов. Гипотензивный эффект на 30 день эксперимента для концентратов нативных белков составил  $\Delta P=20$  мм. рт.ст., для соответствующих гидролизатов  $\Delta P=27$  мм. рт. ст. (таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Результаты определения АД у крыс SHR в начале и конце эксперимента

Группа, №	Систолическое АД, мм.рт.ст.			Диастолическое АД, мм.рт.ст.		
	В начале	В конце	$\Delta P$	В начале	В конце	$\Delta P$
1. Вода (Контроль)	175±14	179±15	+4	120±7	124±10	+4
2. КСБ 3	170±11	150±12	-20	127±8	102±7	-25
3. ГСБ 3	181±16	154±13	-27	114±12	102±8	-12
4. КСБ 5	179±15	158±13	-21	124±11	109±8	-15
5. ГСБ 5	172±12	145±11	-27	114±10	100±5	-15

Для выяснения механизмов гипотензивного действия гидролизатов были измерены концентрации основных компонентов ренин-ангиотензиновой системы: ангиотензинов I и II (рисунок 2.17).

Концентрация ангиотензина I в крови опытных групп животных (получавших гидролизаты) была выше и составляла 3,1-4,5 пг/мл, по сравнению с контрольной группой – 1,3 пг/мл (таблица 4.5).

Таблица 4.5 – Концентрация компонентов ренин-ангиотензиновой системы в сыворотке крыс SHR в конце эксперимента

Группа, №	Ангиотензин I, пг/мл	Ангиотензин II, пг/мл
1. Вода (Контроль)	1,3±0,09	5,66±0,21
2. КСБ 3	3,8±0,12	6,25±0,30
3. ГСБ 3	4,5±0,18	2,88±0,03
4. КСБ 5	3,4±0,11	4,51±0,33
5. ГСБ 5	3,1±0,12	3,86±0,15

Концентрация ангиотензина II в крови опытных групп животных была ниже и составляла 2,88-3,86 пг/мл, по сравнению с контрольной группой – 5,66 пг/мл (таблица 4.5). Полученные данные по изменению концентраций ангиотензинов I и II в сыворотке крови опытных групп коррелируют с данными по снижению давления у животных в этих группах, поскольку имеет место обратная регуляция между содержанием Ангиотензина II и Ангиотензина I. Когда уровень Ангиотензина II снижен вследствие ингибирования действия АПФ, повышается уровень Ангиотензина I. Таким образом, в основе механизма антигипертензивного эффекта гидролизатов *in vivo*, по всей видимости, лежит ингибирование ангиотензин I превращающего фермента (АПФ), поскольку оба типа гидролизатов обладают АПФ ингибирующей активностью *in vitro*. Доказанный гипотензивный эффект гидролизатов коррелируется с литературными данными, поскольку установлено понижение систолического давления у животных от 6 до 40 мм рт. ст. при тестировании гидролизатов белков молока с использованием различных протеаз и заквасочных культур молочнокислых бактерий.

Исследование показало, что при внутрижелудочном введении антибиотика в ЖКТ происходят изменения, по сравнению с интактным контролем,



свидетельствующие о развитии умеренного дисбактериоза. Прежде всего, это относится к составу микрофлоры кишечника. В толстом кишечнике уровень лактобацилл снижался на 20%, бифидобактерий – на 50%. Изменения касались и морфологических показателей слизистой толстого отдела кишечника (рисунок 4.1); красными стрелками показана воспалительная инфильтрация слизистой оболочки кишечника).

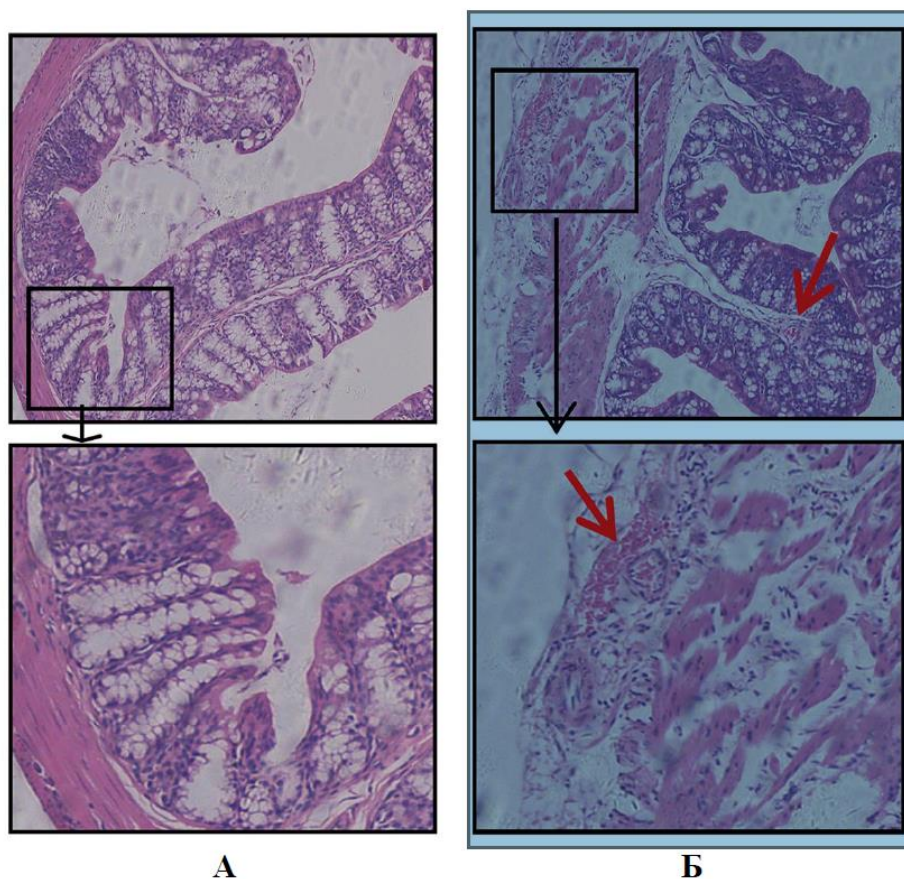


Рисунок – 4.1 Микрофотографии гистологических препаратов стенки толстой кишки экспериментальных животных: А – интактная группа, без введения антибиотика; Б – контрольная группа с введением антибиотика (окуляр x10; объектив x20)

В опытной группе животных, которым гидролизатов за 30 минут до момента введения антибиотика проводили зондовое введение пептидных гидролизатов, отмечены позитивные изменения в составе полезной пробиотической микрофлоры. Установлено увеличение общего количества кишечных лактобацилл *Lactobacillus*

и бифидобактерий (ориентировочно в три раза  $p < 0,05$ ) (статистически достоверное) (рисунок 4.2).

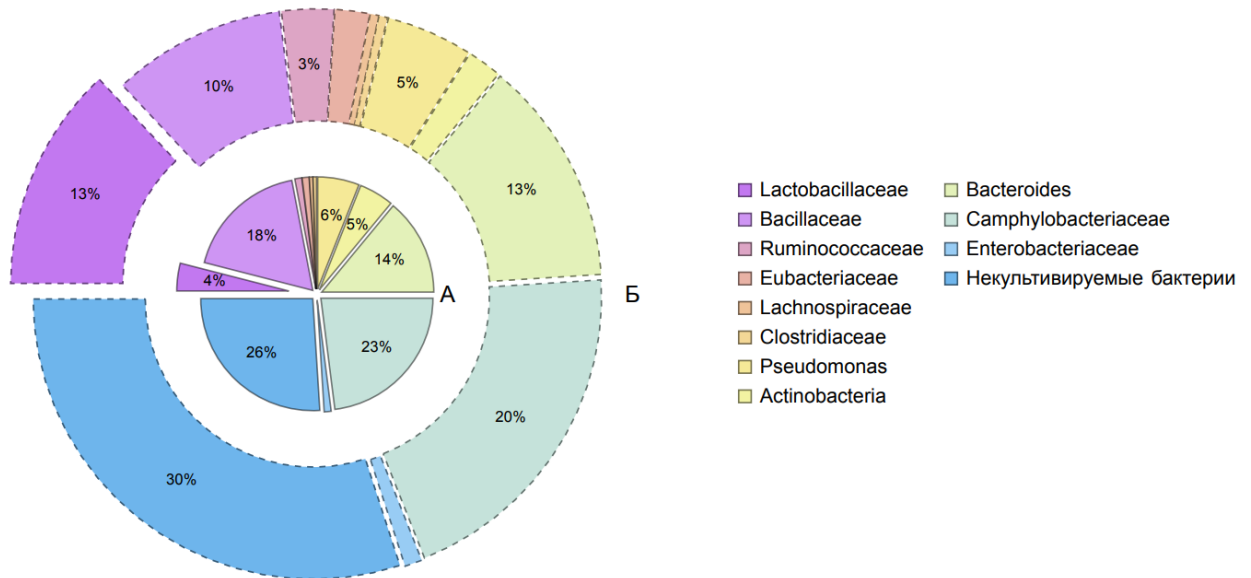


Рисунок 4.2 – Состав микрофлоры у животных экспериментальных групп в модели антибиотико-индуцированного дисбиоза (А – до кормления, Б – после кормления)

Противодисбактериозный эффект концентратов белков сыворотки был менее выражен, по сравнению с гидролизатами. Таким образом, в моделях *in vitro* показано, что гидролизаты обладают антиоксидантным, гипотензивным, антимикробным и бифидогенным действием, данные эффекты гидролизатов были также подтверждены в моделях *in vivo*, что позволяет их использовать в качестве функциональных ингредиентов для разработки продуктов питания.

## ГЛАВА 5 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИДРОЛИЗАТОВ НА СВОЙСТВА БАЗОВОГО АЭРИРОВАННОГО ПРОДУКТА

### 5.1 Исследование реологических характеристик аэрированной системы с гидролизатом

В качестве базовой пищевой матрицы для интегрирования полученных функциональных ингредиентов была определена аэрированная система, поскольку помимо функциональных свойств гидролизованные молочные белки обладают повышенной пенообразующей способностью.

Взамен цельного молока, предусмотренного рецептурой разработанного ранее продукта, в матрицу были введены белково-пептидные гидролизаты двух типов (ГСБЗ и ГСБ5) в разных процентных соотношениях: 25, 50, 75 и 100% (таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Рецептуры контрольного и опытных образцов аэрированных  
продуктов

Наименование компонента	Количество, г		
	Рецептура С 100 % ГК	Рецептура С1 50 % ГК : 50 % ТП	Рецептура С2 100 % ТП
Творог обезжиренный	40,0	40,0	40,0
Сливки 10% -ной жирности	11,65	11,65	11,65
Молоко 2,5%-ной жирности	34,14	34,14	34,14
Сахарный песок	10,7	10,7	10,7
СОМ	2,0	2,0	2,0
Желатин	0,83	0,83	0,83
Гуаровая камедь	0,42	0,21	-
Пектин тыквенный	–	0,21	0,42
Регулятор кислотности	0,26	0,26	0,26
ИТОГО	100	100	100

При разработке аэрированных десертных молочных продуктов, необходимым условием является изучение структурно-механических характеристик (вязкость, предельное напряжение сдвига, тиксотропность, плотность), оказывающих непосредственное влияние на их потребительские свойства, такие как внешний вид, текстура, сенсорные характеристики и стойкость продукта в хранении [281].

В связи с чем, далее были изучены реологические и структурно-механические характеристики изготовленных опытных образцов, содержащих два типа гидролизатов: ГСБ3, содержащего преимущественно  $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -лактальбумин и ГСБ5, в основном содержащего  $\alpha$ -  $\beta$ - к- казеины. Полученные данные представлены на рисунках 5.1 и 5.2.

Результаты исследования показали, что все образцы базового молочного продукта с использованием ГСБ являлись тиксотропными структурами и образовывали петли гистерезиса. Однако их площадь заметно отличалась, что свидетельствует о различной степени структурообразования в полученных дисперсных системах. Замена цельного молока в контрольной рецептуре (рецептура С в таблице 5.1) на белковые гидролизаты заметно ухудшала реологические свойства получаемых аэрированных систем, которые зависели также от типа белкового гидролизата (рисунки 5.1 и 5.2). Ниже в таблице 5.2 представлена кодировка образцов с заменой молока на ГСБ 3 и ГСБ 5.

Таблица 5.2 – кодировка образцов с заменой молока на гидролизат

Наименование рецептуры		
Рецептура «С», 0 % пектин	Рецептура «С1», 50 % пектин	Рецептура «С2», 100 % пектин
25 % ГСБ3 (G1)	25 % ГСБ3 (G9)	25 % ГСБ3 (G17)
50 % ГСБ3 (G2)	50%ГСБ3 (G10)	50 % ГСБ3 (G18)
75 % ГСБ3 (G3)	75 % ГСБ3 (G11)	75 % ГСБ3 (G19)
100 % ГСБ3 (G4)	100 % ГСБ3 (G12)	100 % ГСБ3 (G20)
25 % ГСБ5 (G5)	25 % ГСБ5 (G13)	25 % ГСБ5 (G21)
50 % ГСБ5 (G6)	50 % ГСБ5 (G14)	50 % ГСБ5 (G22)
75 % ГСБ5 (G7)	75 % ГСБ5 (G115)	75 % ГСБ5 (G23)
100 % ГСБ5 (G8)	100 % ГСБ5 (G16)	100 % ГСБ5 (G24)

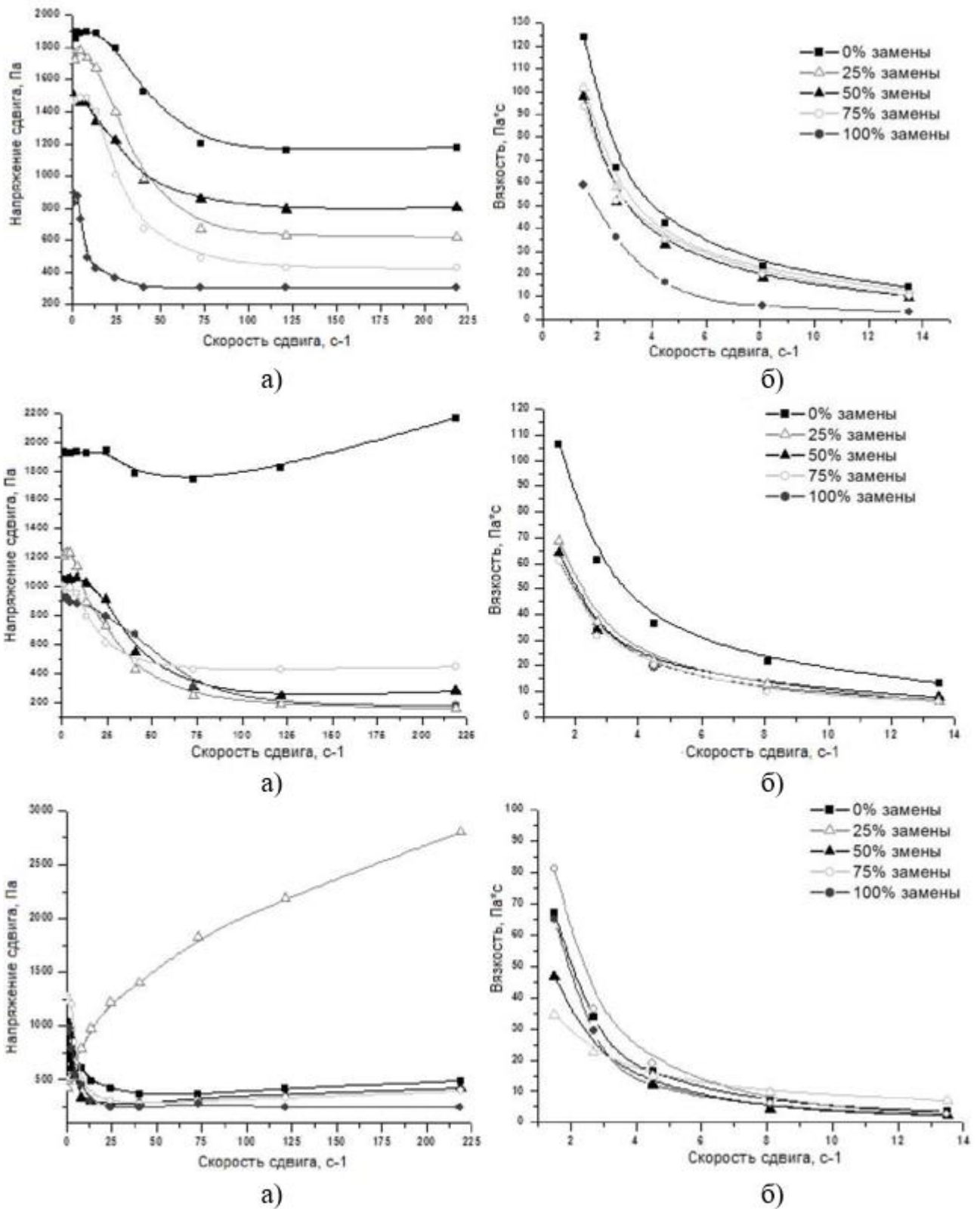


Рисунок 5.1 – Структурно-механические характеристики (а – реограмма течения; б – график зависимости вязкости от скорости сдвига) аэрированных систем на основе трех рецептур (С, С1 и С2 – сверху вниз) с заменой цельного молока на ГСБ 3: 0, 25, 50, 75 и 100% замены

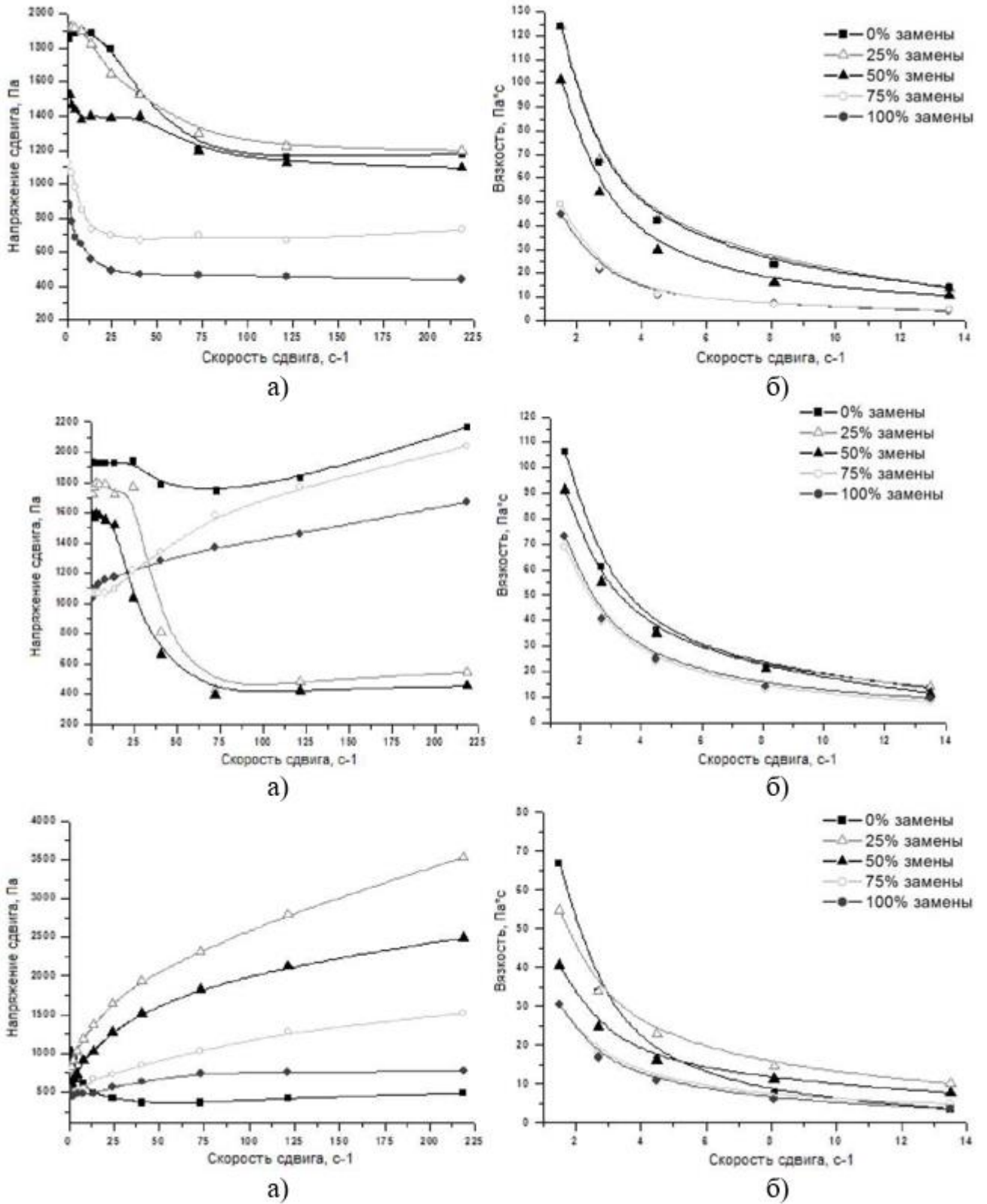


Рисунок 5.2 – Структурно-механические характеристики (а – реограмма течения; б – график зависимости вязкости от скорости сдвига) аэрированных систем на основе трех рецептур (С, С1 и С2 – сверху вниз) с заменой цельного молока на ГСБ 5: 0, 25, 50, 75 и 100% замены

Кроме того, органолептические показатели базовых молочных продуктов с использованием ГСБ также были заметно хуже контрольного образца и по консистенции, и по вкусу, причем образцы, содержащие гидролизат фракций казеинов, имели горьковатое послевкусие.

### **5.3 Разработка стабилизационной системы для базового аэрированного продукта с интегрированным гидролизатом**

Поэтому задачей следующего этапа исследований был подбор стабилизационной системы, включающей полисахариды. Для стабилизации структуры аэрированных систем, обогащенных гидролизатами, в рецептуру был включен тыквенный пектин, обладающий высокой вязкостью и имеющий высокую степень этерификации. К тому показана эффективность использования пектинов в бинарных композициях с различными полисахаридами, в том числе с камедями [281]. Действительно внесение пектина в разрабатываемый продукт приводило к улучшению реологических свойств аэрированных систем, а именно увеличению вязкости и степени тиксотропности ( $C_T$ ) (таблица 5.3). При этом образцы аэрированных систем с бинарной композицией полисахаридов (тыквенный пектин + гуар, рецептура С1) и ГСБ 5 (фракций казеина) образовывали более стабильную структуру геля, по сравнению с образцами, содержащими ГСБ 3 с высокой степенью тиксотропности (76-79%), что указывает на то, что в структуре геля представлены преимущественно коагуляционные связи, которые обеспечивают полную обратимость деформаций после снятия напряжений и стабильность его реологических свойств в процессе хранения. Из анализа литературных данных предположительно данное влияние связано с образованием связей между казеиновыми пептидами гидролизата, молочными белками и тыквенным пектином, повышающих устойчивость и стабильность структуры данного базового молочного продукта с использованием ГСБ, по сравнению с контрольным образцом (степень тиксотропности 52%) [282,283]. Интересно отметить, что при 100% замене на ГСБ 5 в стабилизационных системах с пектином у базового молочного продукта пропадает горечь.

Таблица 5.3 – Физические и бифункциональные свойства аэрированных систем

Наименование образца	Наименование показателя					
	$\rho$ , г/см <sup>3</sup>	$C_T$ , %	Эл., %	Пр., МПа	АОЕ, мкМ ТЕ/г белка	АПФ-ингиб. акт., мг белка/мл
<b>Рецептура «С», 0 % пектин</b>	0,493	52	125	14,7	198,5	19,06
25 % ГСБЗ (G1)	0,423	21	-	-	219,5	15,85
50 % ГСБЗ (G2)	0,427	15	174	12,8	219,5	12,02
75 % ГСБЗ (G3)	0,417	22	-	-	234,1	10,0
100 % ГСБЗ (G4)	0,306	31	145	12,9	247,4	7,56
<b>Рецептура «С1», 50 % пектин</b>	0,648	59	138	12,6	214,8	23,99
25 % ГСБЗ (G9)	0,440	13	-	-	231,4	6,92
50%ГСБЗ (G10)	0,471	21	181,3	8,5	232,7	6,03
75 % ГСБЗ (G11)	0,404	33	-	-	232,9	3,98
100 % ГСБЗ (G12)	0,408	12	213	9,5	238,4	2,69
<b>Рецептура «С2», 100 % пектин</b>	0,480	30	138	12,1	265,4	25,73
25 % ГСБЗ (G17)	0,646	94	-	-	268,3	9,12
50 % ГСБЗ (G18)	0,618	41	101	12,4	269,1	5,37
75 % ГСБЗ (G19)	0,634	22	-	-	270,5	6,03
100 % ГСБЗ (G20)	0,579	25	230	3,1	273,6	4,27
<b>Рецептура «С», 0 % пектин</b>	0,493	52	125	14,7	198,5	19,06
25 % ГСБ5 (G5)	0,516	53	-	-	254,9	18,2
50 % ГСБ5 (G6)	0,501	47	168	6,1	275,4	17,38
75 % ГСБ5 (G7)	0,451	57	-	-	272,7	7,24
100 % ГСБ5 (G8)	0,419	42	159	14,8	269,3	5,71
<b>Рецептура «С1», 50 % пектин</b>	0,648	59	138	12,6	214,8	23,99
25 % ГСБ5 (G13)	0,630	22	-	-	235,9	6,17
50 % ГСБ5 (G14)	0,582	26	105	3,2	236,1	5,62
75 % ГСБ5 (G115)	0,424	79	-	-	238,3	5,37
100 % ГСБ5 (G16)	0,404	76	155	3,4	243,9	5,13
<b>Рецептура «С2», 100 % пектин</b>	0,480	30	138	12,1	265,4	25,73
25 % ГСБ5 (G21)	0,886	89	-	-	275,2	11,22
50 % ГСБ5 (G22)	0,590	88	113	3,1	278,7	7,08
75 % ГСБ5 (G23)	0,582	84	-	-	279,4	7,24
100 % ГСБ5 (G24)	0,585	56	147	1,8	283,1	3,89



Это связано, видимо с тем, что биологически активные пептиды казеина достаточно гидрофобны, а именно гидрофобные аминокислоты являются дескрипторами горечи, и связывание пептидов с пектином происходит преимущественно путем за счет гидрофобных взаимодействий, маскируя тем самым сайты горького вкуса казеиновых пептидов.

На рисунках 5,3-5,5 проиллюстрирована микроструктура образцов базового молочного продукта с использованием ГСБ. Наибольшую дисперсность и компактность пузырьков имели образцы, содержащий в своем составе ГСБ 5 и бинарную композицию полисахаридов. Различия в микроструктуре аэрированных систем, обогащенных гидролизатами, связаны, прежде всего, с пенообразующими свойствами самих гидролизатов. Таким образом показана способность гидролизатов сывороточных белков молока образовывать стойкие мелкодисперсные пены, что напрямую связано со степенью гидролиза, молекулярной массой и гидрофобными свойствами образующихся пептидов [284]. Данные по исследованию дисперсности аэрированных систем коррелируют с данными по степени их тиксотропности.

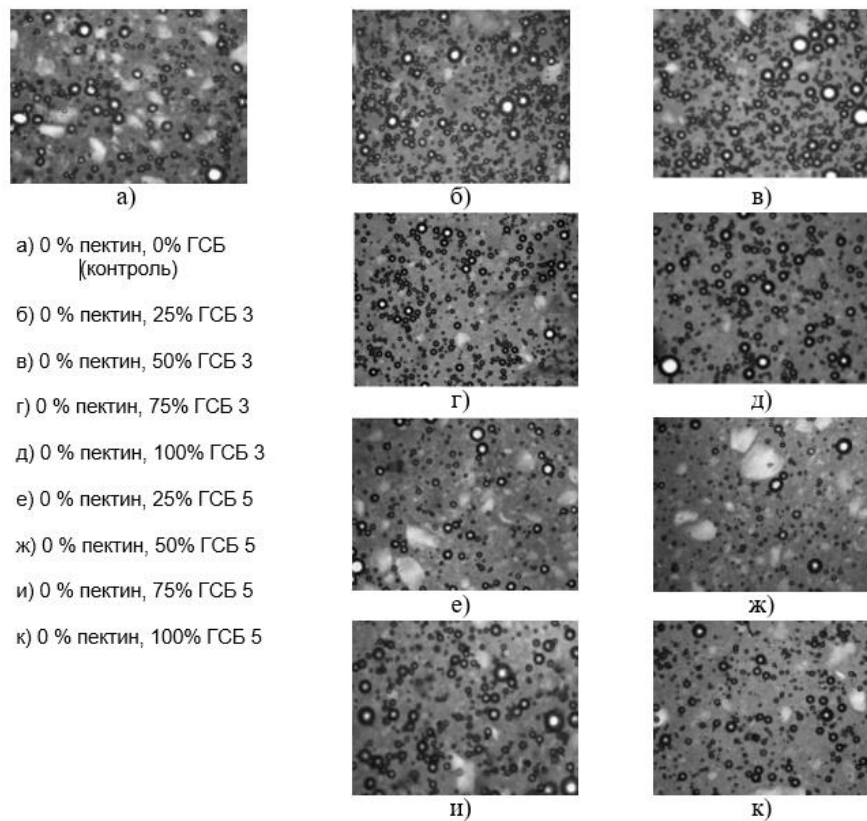


Рисунок 5.3 – Микроструктура аэрированных систем на основе рецептуры С

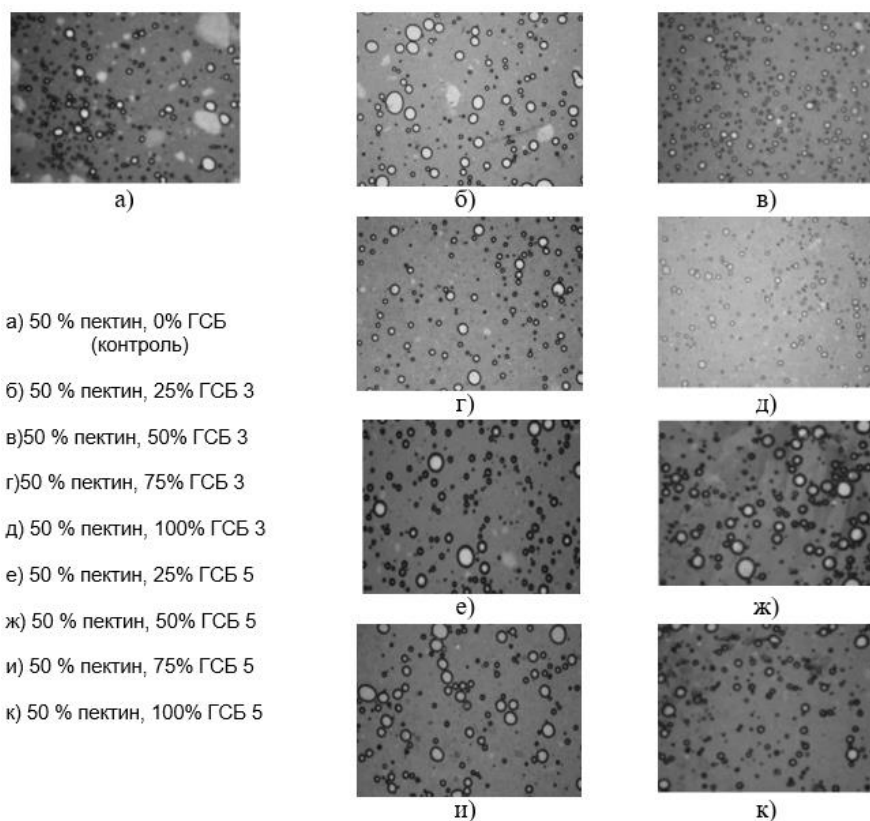


Рисунок 5.4 – Микроструктура аэрированных систем на основе рецептуры С1

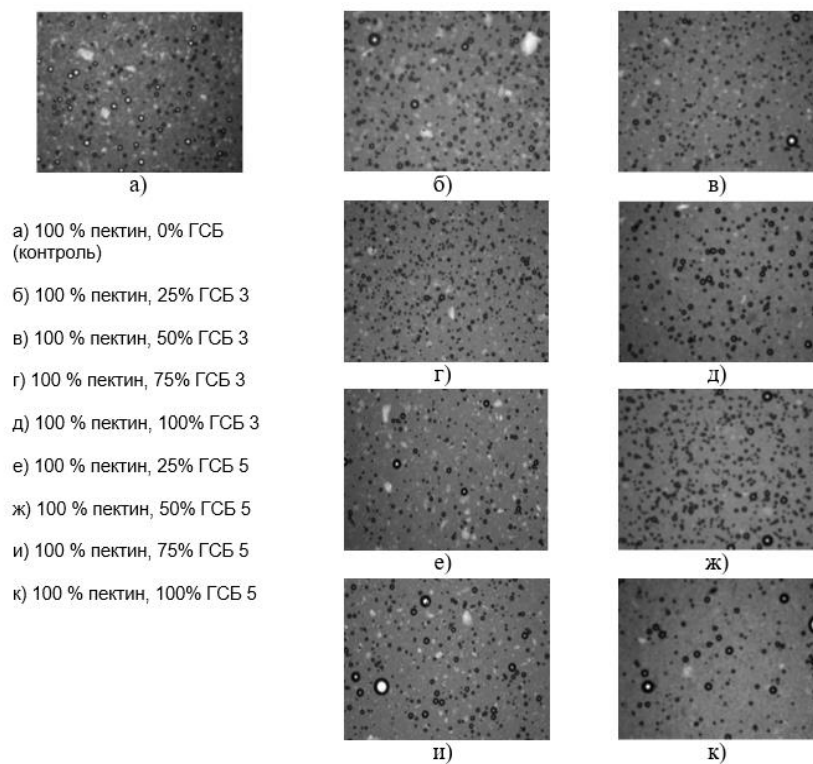


Рисунок 5.5 – Фотографии микроструктуры аэрированных систем на основе рецептуры С2

## 5.4 Оптимизация внутрикомпозиционного состава базового аэрированного продукта

Для оптимизации внутрикомпозиционного состава системы базового молочного продукта с использованием ГСБ был проведен полнофакторный эксперимент с 2 переменными параметрами: массовая доля гидролизата тип 1 и гидролизата тип 2, введенных поочередно взамен молока (X1 и X3 соответственно) и массовая доля тыквенного пектина в композиции системы гидроколлоидов (X2). Каждый из параметров варьировали на трех уровнях. Уровни вариации независимых параметров при проведении многофакторных экспериментов представлены в таблицах 5.4 и 5.5.

Таблица 5.4 – Уровни вариации независимых параметров при полнофакторных экспериментах по оптимизации внутрикомпозиционного состава базового молочного продукта с использованием ГСБ

Параметр	Переменная	Уровень варьирования		
		-1	0	+1
Массовая доля ГСБ3, %	X1	0	34,14	68,28
Массовая доля тыквенного пектина, %	X2	0	0,21	0,42

Таблица 5.5 – Уровни вариации независимых параметров при полнофакторных экспериментах по оптимизации внутрикомпозиционного состава базового молочного продукта с использованием ГСБ

Параметр	Переменная	Уровень варьирования		
		-1	0	+1
Массовая доля ГСБ5, %	X3	0	34,14	68,28
Массовая доля тыквенного пектина, %	X2	0	0,21	0,42

Ранжирование выходных параметров по значимости от большего к меньшему имеет следующую последовательность: АПФ-ингибирующая активность, плотность, степень тиксотропности. Эксперименты по оптимизации внутрикомпозиционного состава системы творожного базового молочного продукта с использованием ГСБ, проводили на модельных системах контрольных образцов, без замены (-1) с частичной (0) и с полной заменой (+1) рецептурных

количеств молока и гуаровой камеди на компоненты с доказанными биофункциональными свойствами - белковые гидролизаты и тыквенный пектин соответственно. Результаты полнофакторных экспериментов [279] по оптимизации внутрикомпозиционного состава базового молочного продукта с использованием ГСБ представлены в таблицах 5.6 и 5.7.

Таблица 5.6 – Композиционный план полнофакторного эксперимента с переменными массовой долей ГСБЗ и массовой долей тыквенного пектина

№ обр.	Входные параметры		Выходные параметры		
	X1	X2	АПФ-ингиб. акт., IC <sub>50</sub> , мг белка/мл	ρ, г/см <sup>3</sup>	C <sub>T</sub> , %
1	0	0	19,06	0,493	52
2	0	0,21	23,99	0,648	59
3	0	0,42	25,00	0,480	30
4	34,14	0	12,02	0,427	15
5	34,14	0,21	6,03	0,471	21
6	34,14	0,42	5,37	0,618	41
7	68,28	0	7,56	0,306	31
8	68,28	0,21	2,69	0,408	12
9	68,28	0,42	4,27	0,579	25

Таблица 5.7 – Композиционный план полнофакторного эксперимента с переменными массовой долей ГСБЗ и массовой долей тыквенного пектина

№ обр.	Входные параметры		Выходные параметры		
	X1	X2	АПФ-ингиб. акт., IC <sub>50</sub> , мг белка/мл	ρ, г/см <sup>3</sup>	C <sub>T</sub> , %
1	0	0	19,06	0,493	52
2	0	0,21	23,99	0,648	59
3	0	0,42	25,00	0,480	30
4	34,14	0	17,38	0,501	47
5	34,14	0,21	5,62	0,582	26
6	34,14	0,42	7,08	0,590	88
7	68,28	0	5,71	0,419	42
8	68,28	0,21	5,13	0,404	76
9	68,28	0,42	3,89	0,585	56

Графическая иллюстрация зависимостей АПФ-ингибирующей активности (А), плотности (Б) и тиксотропности (В) от переменных параметров (рисунок

5.6) показывает, что с возрастанием м.д. ГСБ 3 и тыквенного пектина значение  $IC_{50}$  (т.е. АПФ ингибирующая активность возрастает) и плотности базового молочного продукта с использованием ГСБ снижается, а с увеличением м.д. пектина наоборот плотность продукта увеличивается. Тыквенный пектин практически не влияет на тиксотропность продукта, а увеличение параметра м.д. ГСБ 3 приводит к негативному явлению – снижению степени тиксотропности.

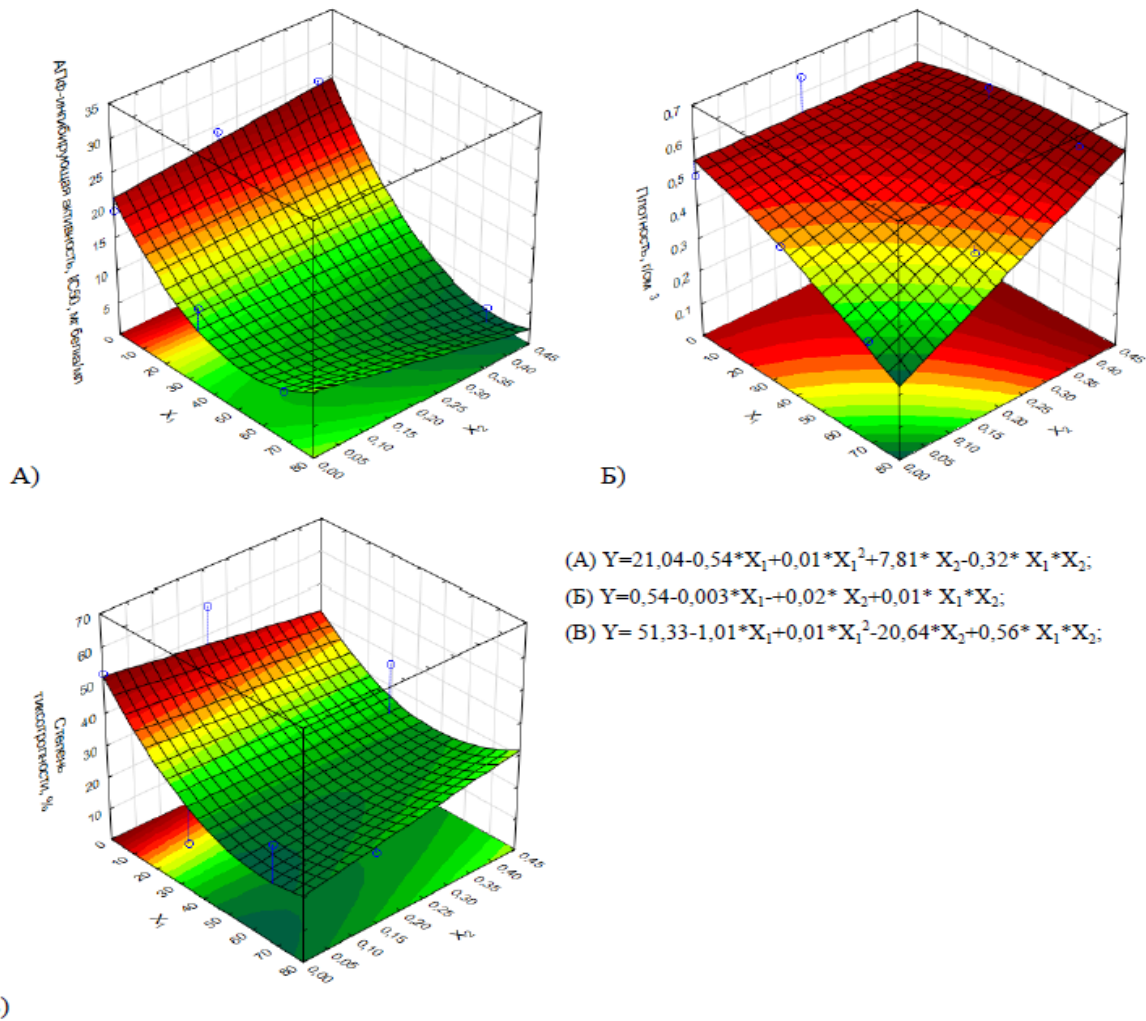


Рисунок 5.6 – Зависимость АПФ-ингибирующей активности (А), плотности (Б) и степени тиксотропности (В) базового молочного продукта с использованием ГСБ от переменных параметров массовой доли ГСБ3 ( $X_1$ ) и ТП ( $X_2$ )

Были проанализированы профили желательности оптимизационной модели исходя из ранжирования выходных параметров (рисунок 5.7) и показано, что оптимальные условия, удовлетворяющие требованиям разрабатываемого базового молочного продукта с использованием ГСБ, выполняются при полной замене молока на ГСБ 3 совокупно с частичной заменой гуаровой камеди на тыквенный пектин (0,14 из 0,42).

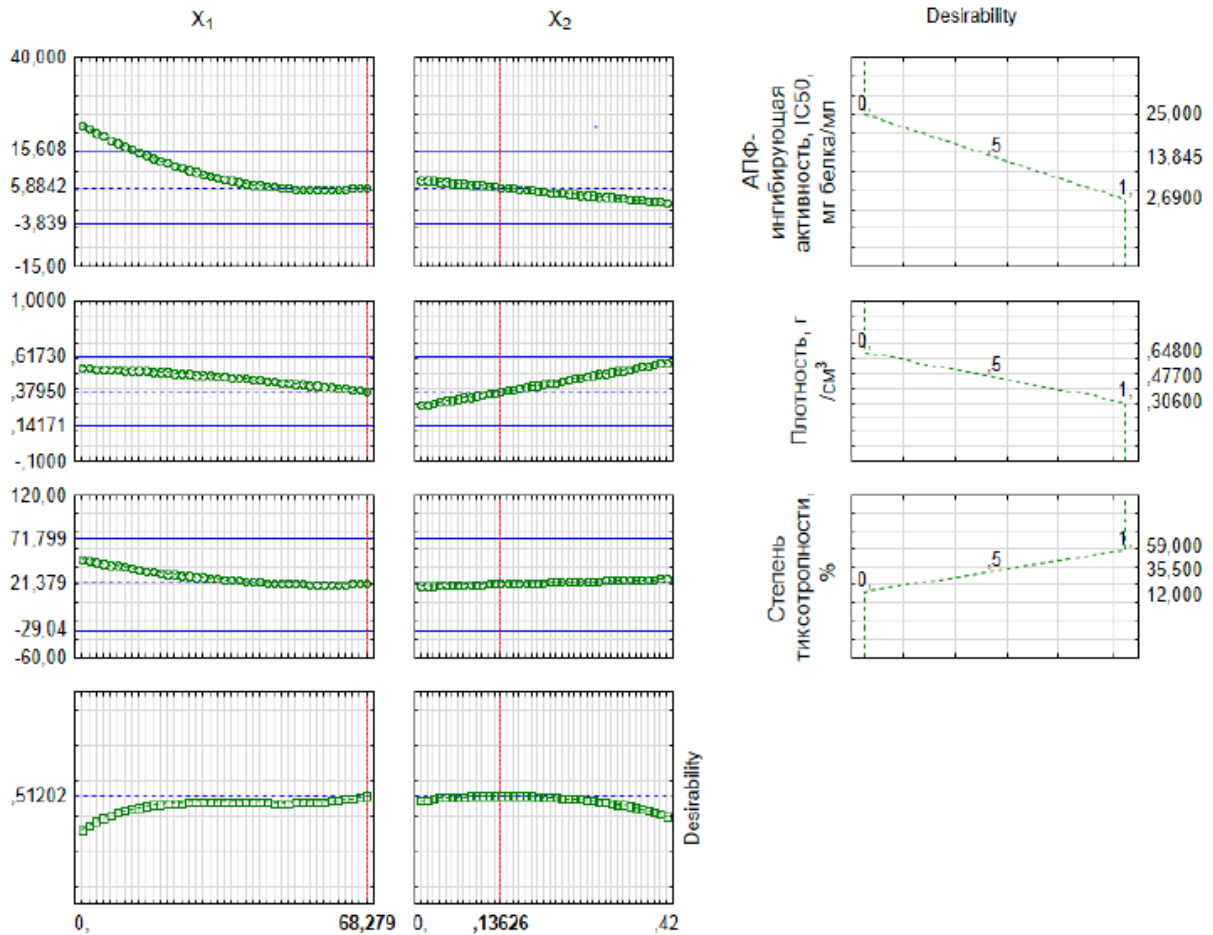


Рисунок 5.7 – Профили желательности оптимизации внутрикомпозиционного состава системы аэрированного творожного базового молочного продукта с использованием ГСБ при использовании параметров  $X_1$  и  $X_2$

Наибольший эффект на увеличение АПФ-ингибирующей активности оказывает фактор увеличения м.д. ГСБ 5, при этом влияние фактора м.д. тыквенного пектина крайне незначительно (рисунок 5.8). В отличие от ГСБ 3, ГСБ 5 на параметр плотности продукта оказывает значительно меньшее влияние.

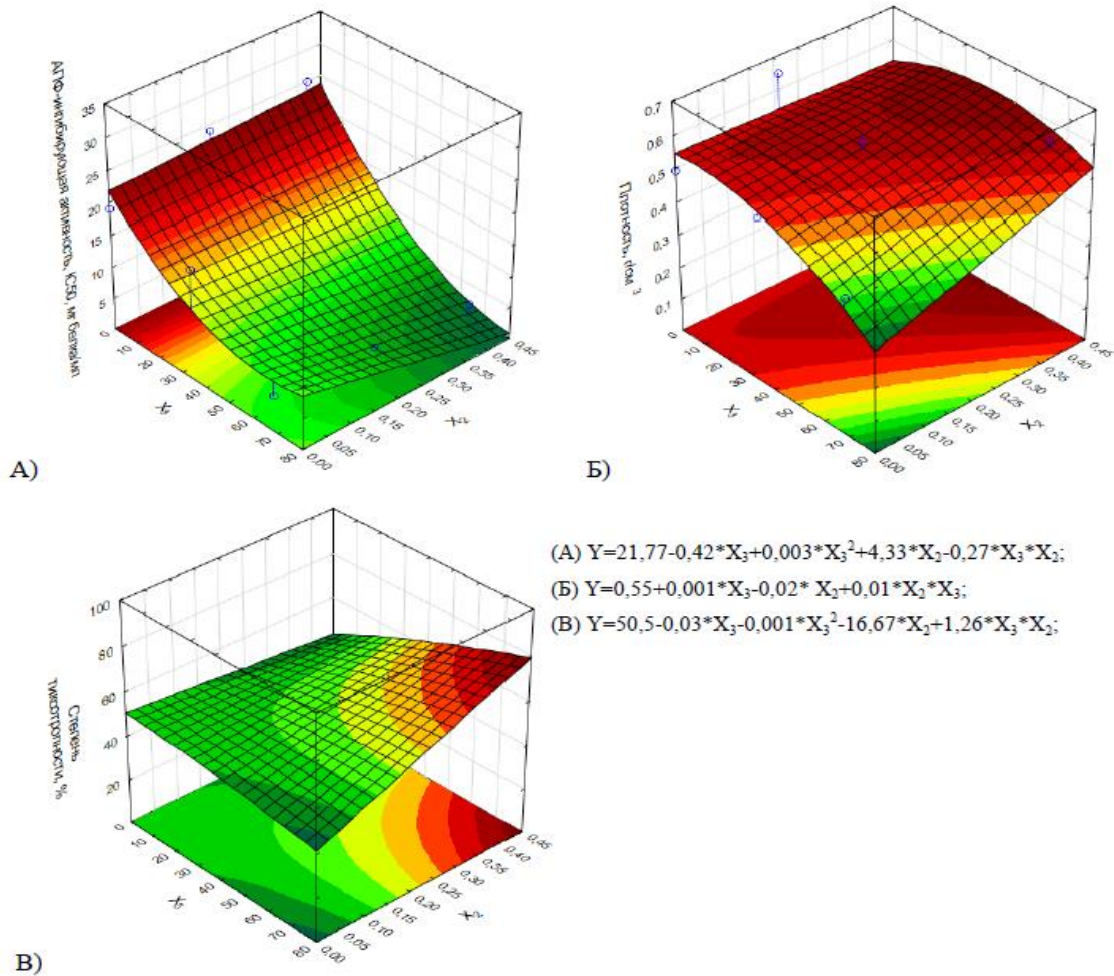


Рисунок 5.8 – Зависимость АПФ-ингибирующей активности (А), плотности (Б) и степени тиксотропности (В) от переменных параметров массовой доли ГСБ5 ( $X_3$ ) и ТП ( $X_2$ )

Плотность изменяется в основном за счет увеличения дозировки тыквенного пектина. При этом на величину степени тиксотропности оказывают незначительное влияние оба фактора. Оптимальные соотношения компонентов подбирали исходя из профилей желательности, учитывая ранжирование выходных параметров (рисунок 5.9). Так оптимальные значения АПФ-ингибирующей активности, плотности и тиксотропности достигается при полной замене молока на ГСБ 5 и частичной (0,27 из 0,42) замене гуаровой камеди в стабилизационной системе на тыквенный пектин. Прогнозируемая АПФ-ингибирующая активность составит  $IC_{50}=4,11$ , мг белка/мл, плотность 0,492 г/см<sup>3</sup> и тиксотропность 62%. Оптимальные

условия при использовании ГСБ 3 составят  $IC_{50}=5,88$ , мг белка/мл, плотность 0,380 г/см<sup>3</sup> (таблица 5.8).

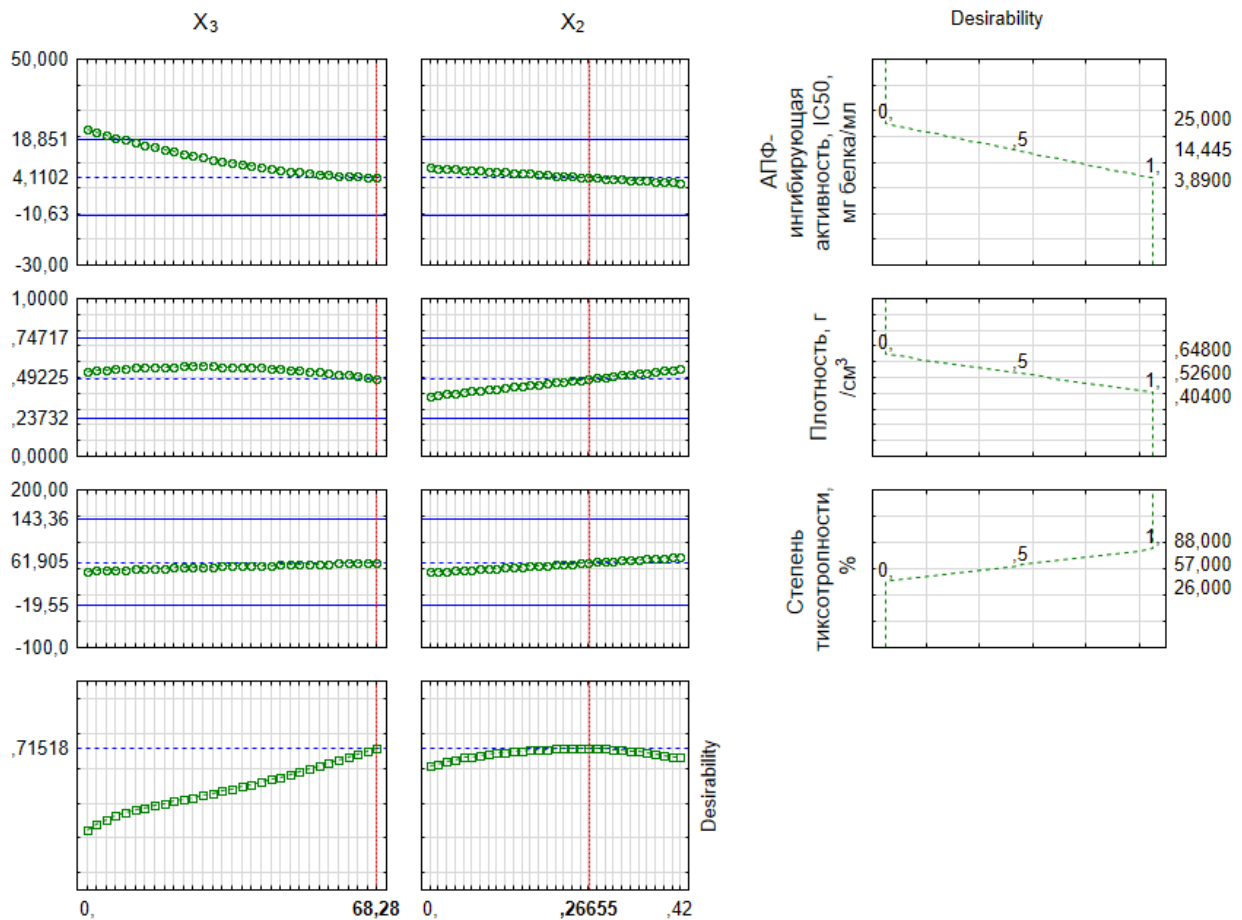


Рисунок 5.9 – Профили желательности оптимизации внутрикомпозиционного состава базового молочного продукта с использованием ГСБ при использовании параметров  $X_3$  и  $X_2$

Таблица 5.8 – Прогнозируемые выходные параметры оптимизации внутрикомпозиционного состава базового молочного продукта с использованием ГСБ

Входные параметры			Прогнозируемые выходные параметры		
X1	X2	X3	АПФ-ингибирующая активность, $IC_{50}$ , мг белка/мл	Плотность, г/см <sup>3</sup>	Степень тиксотропности, %
34,14	0,14	-	5,88	0,380	21
-	0,27	34,14	4,11	0,492	62



По результатам исследования в качестве основного функционального ингредиента для получения базового молочного продукта с использованием ГСБ был выбран ГСБ3 в количестве внесения в рецептуру 68,28%; массовая доля пектина – 0,14%. Полученный с использованием вышеперечисленных ингредиентов продукт имеет приемлемые структурно-механические и привлекательные органолептические характеристиками, а также обладает функциональными свойствами (показаны антиоксидантная, гипотензивная и бифидогенная активности в системах *in vitro*).

### 5.5 Исследование технологических режимов получения базового аэрированного продукта

Далее были отработаны технологические режимы получения базового молочного продукта с использованием ГСБ с использованием гидродинамического измельчителя-диспергатора ГИД-100/1. При его использовании свойства газодисперсной системы можно регулировать путем изменения величины зазора между боковыми поверхностями ротора и статора, а также градиент скорости оборотов роторного устройства. Была исследована структура продукта при различной величине зазора ротор/статор ( $\Delta$ ), где критерием оценки служили размер и относительное распределение пузырьков в объеме продукта (таблица 5.9). Были исследованы пенообразующие свойства базового молочного продукта с использованием ГСБ, а именно плотность в зависимости от частоты вращения ротора ( $n$ ) и продолжительности газонаполнения ( $\tau$ ), результаты представлены таблице 5.9.

Таблица 5.9 – Распределения газовых агломератов при различном межцилиндровом зазоре ( $\bar{X} \pm m$ ;  $m \leq 0,05$ )

$\Delta$ , мм	Распределение газовых агломератов, %			
	менее 1	1-3	3-5	более 5
0,10	100	0	0	0
0,44	58	29	10	0
0,78	26	37	31	2
1,12	0	21	57	19
1,46	0	10	29	58

1,80	0	4	14	79
------	---	---	----	----

При его использовании свойства газодисперсной системы можно регулировать путем изменения величины зазора между боковыми поверхностями ротора и статора, а также градиент скорости оборотов роторного устройства. Была исследована структура продукта при различной величине зазора ротор/статор ( $\Delta$ ), где критерием оценки служили размер и относительное распределение пузырьков в объеме продукта.

Были исследованы пенообразующие свойства базового молочного продукта с использованием ГСБ, а именно плотность в зависимости от частоты вращения ротора ( $n$ ) и продолжительности газонаполнения ( $\tau$ ), результаты представлены в таблице 5.10.

Таблица 5.10 – Плотность базового молочного продукта с использованием ГСБ в зависимости от частоты вращения ротора и продолжительности газонаполнения

№ опыта	$\tau$ , мин	об/мин	$\Delta$ , мм	$\rho$ , г/см <sup>3</sup>
1	1	600	0,1	0,469
<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1200</b>	0,1	<b>0,373</b>
3	1	1200	0,1	0,427
4	3	600	0,1	0,402

Из данных таблицы видно, что наиболее рациональные условия для создания базовых аэрированных систем с использованием ГСБ 3 достигнуты в процессе проведения опыта № 2, при частоте вращения ротора 1200 об/мин; межцилиндровом зазоре 0,1 мм в течение 3 минут.

## ГЛАВА 6 ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТИРОВАНИЯ *IN VIVO* ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БАЗОВОГО МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА

### 6.1 Исследование антиоксидантных и гепатопротекторных свойств базового молочного продукта с использованием пептидного гидролизата

Проведено тестирование *in vivo* функциональных свойств (антиоксидантные и гепатопротекторные свойства) базового молочного продукта с использованием пептидного гидролизата ГСБЗ.

В ходе эксперимента не было выявлено значимых отличий в величинах среднего живого веса между исследованными группами животных. По результатам оценки вскрытия установлено наличие отличий в макроморфологии печени между экспериментальными группами лабораторных животных (рисунок 6.1).



Рисунок 6.1 – Макроморфология печени у лабораторных животных в эксперименте по тестированию антиоксидантной активности ГСБ и ФП *in vivo*: а) – печень без патологических изменений (интактная группа 1); б) - макроморфологическая картина жировой дистрофии печени; в) - макроморфологическая картина жировой дистрофии печени с наличием фибриновых пленок

У животных 1 группы без интоксикации тетрахлоридом углерода не было выявлено патологических изменений в макроморфологии печени (рисунок 6.1 а)). У животных 2-6 групп при вскрытии отмечалась картина жировой дистрофии печени (рисунок 6.1 б)), у некоторых крыс этих групп на поверхности долей печени было выявлено наличие участков с белыми фибриновыми пленками (рисунок 6.1 в)), свидетельствующее о локальных нарушениях гемостаза в печени при

интоксикации тетрахлоридом углерода. При определении индекса массы печени (таблица 2.1) показано, что его средние величины максимальны (3,8 %) у животных 2 группы и минимальны у животных 1 группы (3,3%). При этом у животных, получавших контрольный образец творожного мусса (группа 5), не отмечено статистически значимого снижения величины индекса массы печени, по сравнению с контрольной группой животных с интоксикацией (группа 2).

Результаты, полученные при тестировании показателей антиоксидантного статуса и функционального состояния печени в контрольной и опытных группах животных, представлены в таблицах 6.1 и 6.2. Как видно из представленных данных 3-6 группы животных не имели значимых отличий по величине АОЕ сыворотки крови по отношению к пероксильному радикалу по сравнению с 1 группой (контроль без интоксикации). Группы 3 и 5 (контрольные образцы продуктов), также не имели значимых отличий по величине АОЕ сыворотки крови по отношению к пероксильному радикалу, по сравнению со 2 группой (контроль с интоксикацией). Величины АОЕ сыворотки крови у животных 4 и 6 групп (опытные образцы продуктов) были достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с величиной данного показателя у животных 2 группы (контроль с интоксикацией). При тестировании содержания ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови животных установлено, что все исследованные группы животных не имели значимых отличий друг с другом (таблица 6.1).

Таблица 6.1 – Показатели антиоксидантного статуса лабораторных животных при тестировании антиоксидантных и гепатопротекторных свойств функциональных продуктов *in vivo*

Показатель	Группа			
	№1	№2	№5	№6
АОЕ, кровь мМ ТЭ	8,1±0,4	8,6±0,8	8,3±0,4	7,8±0,4
ТБК, кровь мкМ МДА	2,8±0,4	3,2±0,5	2,7±0,4	2,5±0,4
ТБК, печень нмоль МДА/г	34,6±4,7	56,5±3,3	48,3±4,8	44,7±3,9

Таблица 6.2 – Показатели активности печеночных трансаминаз в сыворотке крови лабораторных животных при тестировании антиоксидантных и гепатопротекторных свойств функциональных продуктов *in vivo*

Показатель	Группа			
	№1	№2	№5	№6
АЛТ, Ед/л	33,0±4,2	30,0±3,3	34,3±2,4	28,2±2,6
АСТ, Ед/л	119,1±13,5	104,8±13,6	108,3±6,9	126,1±11,0
ЛДГ, Ед/л	1196±166	1102±134	1432±179	1404±116

Тем не менее, отмечалась тенденция к снижению величины данного показателя у животных, получавших на фоне индукции свободнорадикальной патологии печени опытный образец творожного базового молочного продукта с использованием ГСБ. В отличие от сыворотки крови по содержанию ТБК-реактивных продуктов в печени исследованные группы животных существенно различались друг с другом. Наибольшее содержание ТБК-реактивных продуктов в печени было отмечено у животных контрольной группы с интоксикацией тетрахлоридом углерода (группа 2), которое в 1,6 раза превышало величину данного показателя у животных контрольной группы без интоксикации (группа 1). На фоне приема как контрольных, так и опытных образцов продуктов у животных отмечалось снижение содержания ТБК-реактивных продуктов в печени, по сравнению с контрольной группой с интоксикацией. При этом наибольшее снижение отмечено у групп, получавших опытные продукты. При анализе данных таблицы 6.2 полученных при тестировании активности ЛДГ и АЛТ в сыворотке крови животных установлено, что все исследованные группы животных не имеют значимых отличий друг с другом. По активности АСТ 1-6 группы животных не имеют значимых отличий друг с другом. В целом во всех исследованных группах животных активность печеночных трансаминаз АЛТ и АСТ в сыворотке крови на 28 день эксперимента соответствует физиологической норме для крыс линии Wistar [285].

## 6.2 Исследование гипотензивных свойств базового молочного продукта с использованием пептидного гидролизата

Данные, полученные при определении артериального давления и концентрации ангиотензинов I и II в различных группах животных, приведены в таблицах 6.3 и 6.4.

Таблица 6.3 – Результаты определения артериального давления (АД) у крыс SHR в начале и конце эксперимента

Группа	Систолическое АД, мм. рт. ст.			Диастолическое АД, мм. рт. ст.		
	В начале	В конце	$\Delta P$	В начале	В конце	$\Delta P$
Вода (Контроль)	166±15	200±19	+34	90±11	127±17	+37
Контроль (без ГСБ)	184±16	179±11	-5	110±13	110±5	0
Продукт с ГСБ	188±15	170±16	-18	118±12	106±7	-12

Таблица 6.4 – Концентрация компонентов ренин-ангиотензиновой системы в сыворотке крыс SHR в конце эксперимента

Группа, №	Ангиотензин I, пг/мл	Ангиотензин II, пг/мл
1. Вода (Контроль)	4,47±0,21	2,59±0,23
4. Контроль (без ГСБ)	4,85±0,31	2,91±0,33
5. Продукт с ГСБ	5,0±0,20	2,46±0,15

Исследование показало, что при внутрижелудочном введении антибиотика в ЖКТ происходят изменения, по сравнению с интактным контролем, свидетельствующие о развитии умеренного дисбактериоза. Прежде всего, это относится к составу микрофлоры кишечника. В толстом кишечнике статистически достоверно ( $p < 0,01$ ) снижался уровень лактобацилл в 2.2 раза, бифидобактерий – в 9 раз (таблица 6.5). В опытных группах животных, которым на фоне приема антибиотика ежедневно вводили внутрижелудочно опытные образцы продукта, выявлены позитивные изменения в составе «полезной» (пробиотической) флоры.

Таблица 6.5 – Содержание лактобактерий и бифидобактерий в фекальных массах крыс в модели антибиотикоиндуцированного дисбиоза

Номер группы	Количество бифидобактерий, КОЕ/г feces	Количество лактобактерий, КОЕ/г feces
0 (интактный контроль)	$9,0 \times 10^8$	$8,8 \times 10^8$
1 (отрицательный контроль АБ*+вода)	$1,5 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$
4 (АБ+ контрольный мусс)	$1,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$
5 (АБ+ опытный образец)	$5,5 \times 10^8$	$5,4 \times 10^8$

Показано статистически достоверное нарастание количества кишечных лактобацилл *Lactobacillus* и бифидобактерий (примерно в 1,5 и 3 раза соответственно  $p < 0,05$ ) в фекальных массах животных, которым на фоне приема антибиотика вводили опытные образцы базового молочного продукта с использованием ГСБ (таблица 6.5). В то время как для контрольных образцов продуктов пробиотический эффект отсутствовал.

Поскольку практически все натуральные корма, используемые для разведения и содержания лабораторных животных, содержат компоненты растительного происхождения, то наблюдается значительная вариабельность между партиями кормов по содержанию микронутриентов, оказывающих влияние на процессы переваривания полисахаридов и липидов, входящих в состав корма. В этой связи рациональным подходом является содержание животных на полусинтетических рационах с постоянным составом. Еще одним преимуществом полусинтетических рационов являются более широкие возможности по модификации их состава, поскольку макронутриенты вносятся в составе различных ингредиентов. При разработке состава полусинтетических рационов за основу были взяты рекомендации Американского института питания (American Institute of Nutrition, AIN) по оптимальному составу кормовой смеси для содержания взрослых лабораторных животных (таблицы 6.6-6.8).

Таблица 6.6 – Состав кормовых рационов при тестировании  
гипохолестеринемических свойств продукта (г/кг корма)

Компонент	Рекомендации AIN по оптимальному составу полусинтетического рациона для содержания лабораторных животных	Рацион с повышенной алиментарной липидной нагрузкой	Контрольный рацион
Кукурузный крахмал	465,7	415,7	417,7
Декстринизированный кукурузный крахмал	155,0	155,0	155,0
Казеин	140,0	140,0	140,0
Сахароза	100,0	88,0	88,0
Соевое масло	40,0	10,0	100,0
Масло топленое	-	90,0	-
Смесь минеральных солей <sup>1</sup>	35,0	35,0	35,0
Смесь витаминов <sup>2</sup>	10,0	10,0	10,0
L-цистеин	1,8	1,8	1,8
Холина битатрат	2,5	2,5	2,5
Холестерин	-	2,0	-
Микрокристаллическая целлюлоза	50,0	50,0	50,0
Терт-бутилгидрохинон (мг)	8,0	8,0	8,0

Таблица 6.7 – Состав смеси минеральных солей AIN-93M, входящей в состав кормовых рационов для содержания взрослых лабораторных животных

Компонент	Количество, г/кг солевой смеси
Карбонат кальция безводный	357,000
Дигидрофосфат калия	250,000
Цитрат калия трехзамещенный моногидрат	28,000
Хлорид натрия	74,000
Сульфат калия	46,600
Оксид магния	24,000
Цитрат железа (III)	6,060
Карбонат цинка	1,650
Метасиликат натрия нонагидрат	1,450
Карбонат магния	0,630
Карбонат меди (II)	0,300
Хромовокалиевые квасцы	0,275
Борная кислота, мг	81,50
Фторид натрия, мг	63,50
Карбонат никеля, мг	31,80
Хлорид лития, мг	17,40
Селенат натрия безводный, мг	10,25
Йодат калия, мг	10,00
Парамолибдат аммония тетрагидрат	7,95
Ванадат аммония, мг	6,60
Сахароза	209,806



Таблица 6.8 – Состав смеси витаминов AIN-93-VX, входящей в состав кормовых рационов для содержания взрослых лабораторных животных

Компонент	Количество, г/кг смеси витаминов
Никотиновая кислота	3,000
Пантотенат кальция	1,600
Пиридоксин гидрохлорид	0,700
Тиамин гидрохлорид	0,600
Рибофлавин	0,600
Фолиевая кислота	0,200
Биотин	0,020
Витамин В12 (0,1% в маните)	2,500
Витамин Е (500 МЕ/г)	15,000
Витамин А (500000 МЕ/г)	0,800
Витамин D3 (400000 МЕ/г)	0,250
Витамин К1	0,075
Сахароза	974,655

Оптимальное содержание суммы растворимых и нерастворимых пищевых волокон в рационе взрослых крыс составляет 5% (таблица 6.6). Для моделирования условий, сопутствующих развитию метаболического синдрома (повышенное потребление пищи, богатой холестерином и животными жирами), был создан полусинтетический кормовой рацион с повышенным содержанием животных жиров и холестерина (таблица 6.6). В оптимальном кормовом рационе содержание жиров составляет около 4%, при этом основным источником жиров служит соевое масло, содержащее преимущественно ненасыщенные жирные кислоты. В модельном полусинтетическом рационе с повышенной алиментарной липидной нагрузкой общее содержание жиров было увеличено до 10,2%. В составе жирового модуля модельного рациона с повышенной алиментарной липидной нагрузкой 90% приходилось на жир животного происхождения (масло топленое) и только 10% - на жиры растительного происхождения. Кроме того, в состав рациона было введено 0,2% холестерина. Увеличение количества жировых компонентов в составе кормового рациона проведено за счет незначительного снижения количества вносимого кукурузного крахмала и сахарозы (таблица 6.6). В качестве контрольного был предложен рацион без добавки холестерина с аналогичным содержанием жира (10%), источником которого служило исключительно соевое

масло (таблица 6.6). Средние начальные массы животных в группах составили  $257 \pm 5$  г.

Сывороточные уровни общего холестерина и триглицеридов у животных, содержащихся на рационе с преимущественно насыщенными жирами, достоверно выше по сравнению с показателями животных контрольной группы (таблица 6.9). На этом фоне у животных, получавших насыщенные жиры, отмечено снижение концентрации неатерогенной фракции липопротеидов ЛПВП, по сравнению с контрольной группой, при сохранении сывороточной концентрации атерогенной фракции липопротеидов – ЛПНП на уровне данного показателя в контрольной группе. Таким образом, на фоне приема рациона с преимущественно насыщенными жирами у животных изменялось соотношение между атерогенной и неатерогенной фракциями липопротеидов в сыворотке крови. По показателям липидного обмена были выявлены существенные отличия между исследованными группами животных (таблица 6.9).

Таблица 6.9 – Результаты тестирования липидного профиля сыворотки крови у экспериментальных животных различных групп

Показатель	Группы			
	№1 (n=10)	№2 (n=10)	№3 (n=10)	№4 (n=10)
Холестерин, мМ	$2,20 \pm 0,12$	$2,68 \pm 0,07$	$2,57 \pm 0,10$	$2,45 \pm 0,16$
ЛПВП*, мг/дл	$26,16 \pm 1,03$	$30,51 \pm 0,99$	$24,99 \pm 2,03$	$26,55 \pm 1,08$
ЛПНП**, мг/дл	$31,09 \pm 0,94$	$32,28 \pm 1,22$	$29,15 \pm 1,52$	$27,38 \pm 1,25$
Триглицериды, мМ	$0,33 \pm 0,04$	$0,48 \pm 0,05$	$0,44 \pm 0,06$	$0,35 \pm 0,06$

\*- липопротеины высокой плотности; \*\*- липопротеины низкой плотности

Показана тенденция к увеличению сывороточной концентрации триглицеридов, холестерина, концентрации ЛПВП и атерогенной фракции липопротеидов ЛПНП у животных 2 группы по сравнению с 1-ой ( $p < 0,05$ ). Для 4 группы животных (опытный образец базового молочного продукта с использованием ГСБ) показано статистически значимое снижение сывороточной концентрации триглицеридов на 51,4% ( $p < 0,01$ ), концентрации общего холестерина в сыворотке крови на 8,6% ( $p < 0,05$ ), а также значимое ( $p < 0,05$ )

снижение концентрации атерогенной фракции липопротеидов ЛПНП в сыворотке крови, по сравнению с величинами данных показателей в контрольной группе №2. Полученные данные свидетельствуют о наличии у творожного базового молочного продукта с использованием ГСБ гипохолестеринемического действия.

Таким образом, в различных моделях *in vivo* показано, что разработанные продукты с использованием белково-пептидных гидролизатов сывороточных белков молока обладают функциональными свойствами, такими как антиоксидантные и гепатопротекторные, гипотензивные, гипохолестеринемические и бифидогенные.

### 6.3 Установление рекомендованных сроков годности базового аэрированного продукта

Для определения сроков хранения разработанного с использованием базового продукта мусса проводили определение органолептических, физико-химических, структурно-механических и микробиологических показателей, а также функциональных свойств в динамике хранения. Мусс готовили в приборе «Термомикс™ ТМ31». В чашу прибора при перемешивании со скоростью 500 об/мин и комнатной температуре вносили жидкие компоненты, затем творог, перемешивали 5 мин, затем вносили сухие компоненты согласно рецептуре (таблица 6.10).

Таблица 6.10 – Рецептура контрольного и опытного образца мусса

Наименование компонента	Количество компонента, г	
	Контрольный продукт	Базовый продукт
Творог обезжиренный	40,0	40,0
Сливки 10% -ной жирности	11,65	11,65
Молоко 2,5%-ной жирности	34,14	-
Белковый гидролизат	-	34,14
Сахарный песок	10,7	10,7
Сухое обезжиренное молоко	2,0	2,0
Желатин	0,83	0,83
Гуаровая камедь	0,42	-
Тыквенный пектин	-	0,42
Регулятор кислотности	0,26	0,26
ИТОГО	100	100

После получения однородной смеси увеличивали температуру до 40 °С и диспергировали 5 мин при 1000 об/мин. Пастеризацию проводили при температуре 75 °С с выдержкой 5 мин. Полученную эмульсию охлаждали до 15 °С и далее аэрировали в течение 3 мин при 1200 об/мин при помощи миксера «BOSCH MFQ 2420». Опытный мусс помещали в стерильную тару для определения сроков годности. Хранение базового молочного продукта с использованием ГСБ осуществляли в холодильнике при температуре 5°С и относительной влажности 74 %. Дизайн эксперимента по установлению сроков годности базового молочного продукта с использованием ГСБ представлен в таблице 6.11.

Таблица 6.11 – Дизайн эксперимента по определению сроков хранения базового молочного продукта с использованием ГСБ

Сутки хранения	Продукт	Определяемые показатели
Фон	Контрольный мусс	Массовая доля сухих веществ, массовая доля общего белка, массовая доля лактозы, титруемая кислотность, структурно-механические характеристики
	Опытный мусс	
3	Контрольный мусс	
	Опытный мусс	
6	Контрольный мусс	
	Опытный мусс	
9	Контрольный мусс	
	Опытный мусс	
12	Контрольный мусс	
	Опытный мусс	
15	Контрольный мусс	
	Опытный мусс	
18	Контрольный мусс	
	Опытный мусс	

Определены сроки хранения и разработаны ТУ и ТИ на продукт творожный опытный мусс, вырабатываемый из творога, сливок, белково-пептидного гидролизата подсырной сыворотки с внесением тыквенного пектина в качестве стабилизатора. Анализ данных органолептических показателей контрольного мусса в процессе хранения (таблица 6.12) показал, что на протяжении всего срока

наблюдения вкус и запах, консистенция и внешний вид, а также цвет образца, оставались неизменными.

Таблица 6.12 – Органолептические показатели контрольного мусса в процессе хранения

Наименование показателя	Норма по ТУ 9222-021-00419785-2016	Периодичность контроля - контрольные точки проведения исследования		
		Сутки хранения		
		фон	3 сутки	18 сутки
Вкус и запах	Чистый кисломолочный, допускается привкус сухого молока. При добавлении пищевкусовых компонентов – обусловленный добавленными компонентами. Без посторонних привкусов и запахов.	Чистый, кисломолочный, в меру сладкий, вкус.	Чистый, кисломолочный, в меру сладкий, вкус.	Чистый, кисломолочный, в меру сладкий, вкус.
Консистенция и внешний вид	Взбитая, слегка мажущаяся. Или однородная, слегка мажущаяся. При добавлении пищевкусовых компонентов - с их наличием	Однородная, взбитая, довольно упругая, слегка мажущаяся консистенция.	Однородная, взбитая, довольно упругая, слегка мажущаяся консистенция.	Однородная, взбитая, довольно упругая, слегка мажущаяся консистенция.
Цвет	Белый с кремовым оттенком, однородный по всей массе. При использовании наполнителей и/или красителей - характерный для используемого наполнителя или красителя.	Белый с легким кремовым оттенком, однородный по всей массе.	Белый с легким кремовым оттенком, однородный по всей массе.	Белый с легким кремовым оттенком, однородный по всей массе.

Таким образом, контрольный образец мусса по органолептическим показателям соответствует нормам, указанным в ТУ 9222-021-00419785-2016. Отсутствие изменения органолептических показателей контрольного мусса на 18 сутки хранения, косвенно свидетельствует о замедлении биохимических и микробиологических процессов, вызывающих порчу продуктов. Анализируя органолептические показатели разработанного базового молочного продукта с использованием ГСБ в процессе хранения (таблица 6.13) стоит отметить, что на 15

сутки хранения произошли изменения сенсорных характеристик продукта, а именно, появился стойкий посторонний запах.

Таблица 6.13 – Органолептические показатели базового молочного продукта с использованием ГСБ в процессе хранения

Наименование показателя	Норма по ТУ 9222-021-00419785-2016	Периодичность контроля - контрольные точки проведения исследования			
		Сутки хранения			
		фон	3 сутки	15 суток	18 суток
Вкус и запах	Чистый кисломолочный, допускается привкус сухого молока. При добавлении пищевкусных компонентов - обусловленный добавленными компонентами. Без посторонних привкусов и запахов.	Кисломолочный, в меру сладкий вкус, с легким привкусом кипячения	Кисломолочный, в меру сладкий вкус, с легким привкусом кипячения	Кисломолочный, в меру сладкий, вкус. Присутствует посторонний запах	Кисломолочный, в меру сладкий, вкус. Присутствует посторонний запах и прогорклый привкус
Консистенция и внешний вид	Взбитая, слегка мажущаяся. Или однородная, слегка мажущаяся. При добавлении пищевкусных компонентов - с их наличием	Однородная, взбитая, слегка мажущаяся консистенция.	Однородная, взбитая, слегка мажущаяся консистенция.	Однородная, взбитая, довольно упругая, слегка мажущаяся консистенция.	Однородная, взбитая, мажущаяся консистенция.
Цвет	Белый с кремовым оттенком, однородный по всей массе. При использовании наполнителей и/или красителей - характерный для используемого наполнителя или красителя.	Белый с легким кремовым оттенком, однородный по всей массе.	Белый с легким кремовым оттенком, однородный по всей массе.	Белый с легким кремовым оттенком, однородный по всей массе.	Белый с легким кремовым оттенком, однородный по всей массе.

На 18 суток хранения посторонний запах усилился, появился прогорклый привкус в образце базового молочного продукта с использованием ГСБ. Помимо

этого, на последних сутках хранения, консистенция образца сильно изменилась – стала более мажущаяся, незначительно уменьшился объем продукта. Таким образом, исходя из изменения органолептических показателей, следует считать нецелесообразным хранение базового молочного продукта с использованием ГСБ более 12 суток при температуре  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  и относительной влажности 47%. Как видно из таблицы 6.14 в процессе хранения физико-химические показатели на протяжении исследуемого срока хранения изменялись незначительно и находились в пределах границ абсолютной погрешности измерений. Увеличение массовой доли лактозы в образце контрольного мусса начиная с 12 суток хранения, можно теоретически объяснить разрушением комплексных соединений коагулированных белков и лактозы.

Таблица 6.14 – Физико-химические показатели контрольного мусса и базового молочного продукта с использованием ГСБ в процессе хранения

Наименование показателя	Норма по ТУ	Периодичность контроля - контрольные точки проведения исследования						
		Сутки хранения						
		фон	3	6	9	12	15	18
<b>Контрольный мусс</b>								
Массовая доля общего белка, %	-	10,74	9,83	10,01	10,12	10,33	10,10	10,04
Массовая доля сухих веществ, %	He < 28,5	29,72	29,96	29,28	30,10	29,12	30,21	29,39
Массовая доля лактозы, %	-	7,61	7,85	7,17	7,89	9,09	8,49	8,99
Кислотность, °Т	He > 60,0	38,0	39,1	39,7	40,2	41,0	41,40	42,0
<b>Опытный мусс</b>								
Массовая доля общего белка, %	-	9,93	10,61	10,26	10,87	10,14	10,32	10,43
Массовая доля сухих веществ, %	He < 28,5	29,04	29,66	29,34	29,67	29,10	29,10	29,33
Массовая доля лактозы, %	-	9,78	9,61	9,43	9,26	9,31	9,01	8,21
Кислотность, °Т	He > 60,0	35	37,3	40,8	44,8	51,7	59,3	64,9

Сопоставляя данные изменения титруемой кислотности с данными массовой доли лактозы в образце базового молочного продукта с использованием ГСБ в процессе хранения, можно констатировать тот факт, что вероятнее всего, начиная с 15 суток, начинается фаза активного роста посторонней микрофлоры, которая вызывает микробиологическую порчу продукта. Рассматривая кинетику изменения кислотности в процессе хранения базового молочного продукта с использованием ГСБ, можно выделить, что предельно допустимые нормируемые показатели титруемой кислотности наблюдались на 15 сутки хранения. Структурно-механические характеристики в значительной степени обуславливают качество готовой продукции, а также определяют свойства продуктов на разных стадиях технологического процесса. Поэтому в полученных образцах контрольного мусса и базового молочного продукта с использованием ГСБ были исследованы реологические характеристики и тиксотропные свойства в процессе хранения при температуре  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  и относительной влажности 47%. Данные исследований представлены в виде графических зависимостей на рисунках 6.2-6.8.

В процессе хранения, как в контрольном образце, так и в образце базового молочного продукта с использованием ГСБ отмечена тенденция возрастания вязкости вплоть до 6 суток хранения. Повышение вязкости происходит за счет укрупнения частиц дисперсной фазы продукта, совокупно с проявлением термодинамической стабильности белковых частиц, что в свою очередь совместно с использованием стабилизирующих веществ приводит к структурированию продукта.



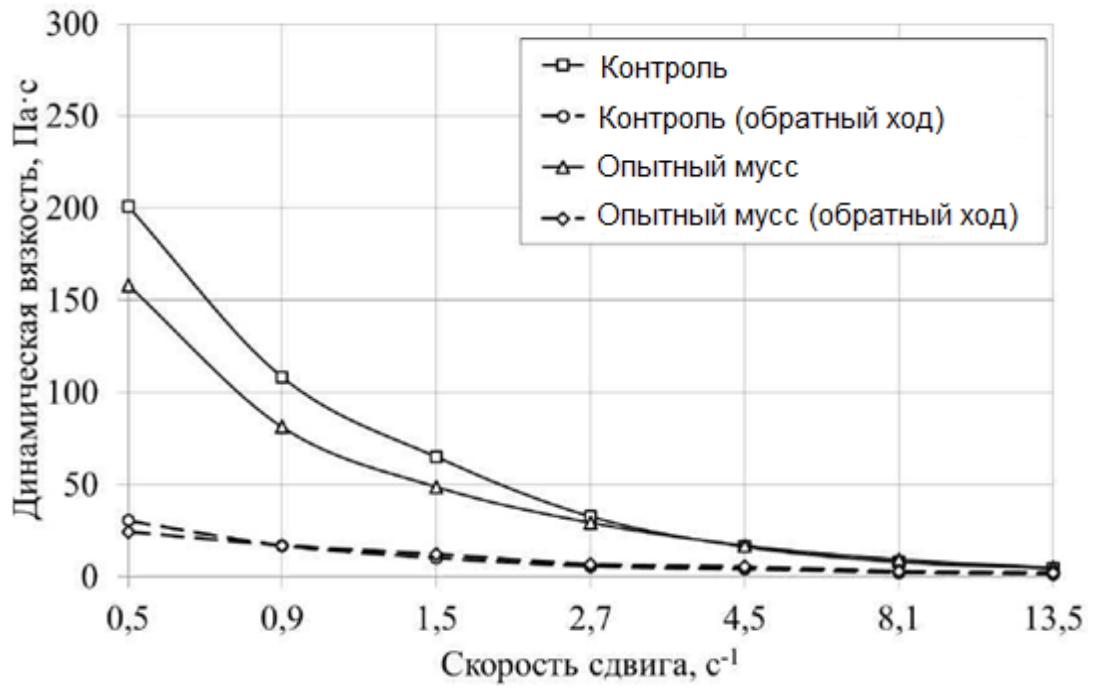


Рисунок 6.2 – Структурно-механические характеристики муссов на 0 суток хранения

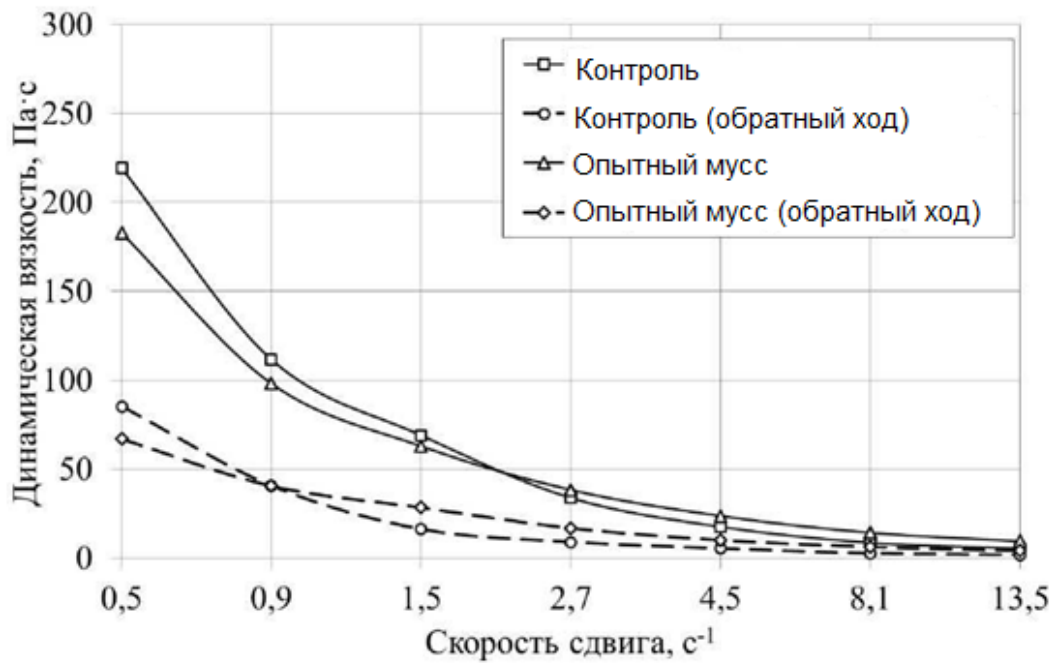


Рисунок 6.3 – Структурно-механические характеристики муссов на 3 суток хранения

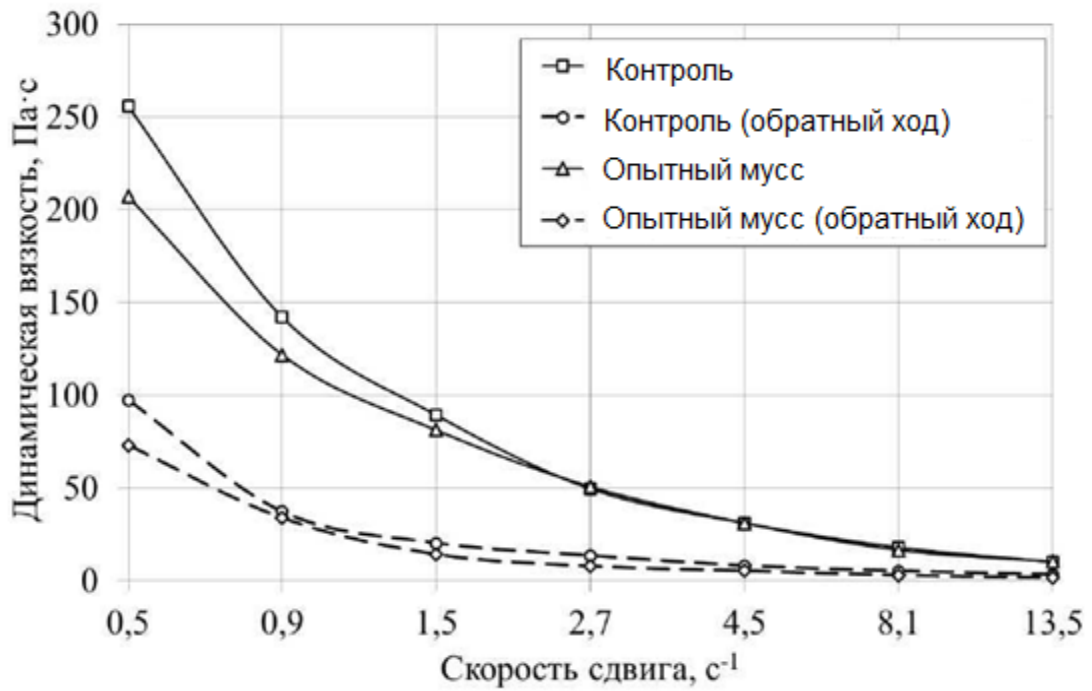


Рисунок 6.4 – Структурно-механические характеристики муссов на 5 сутки хранения

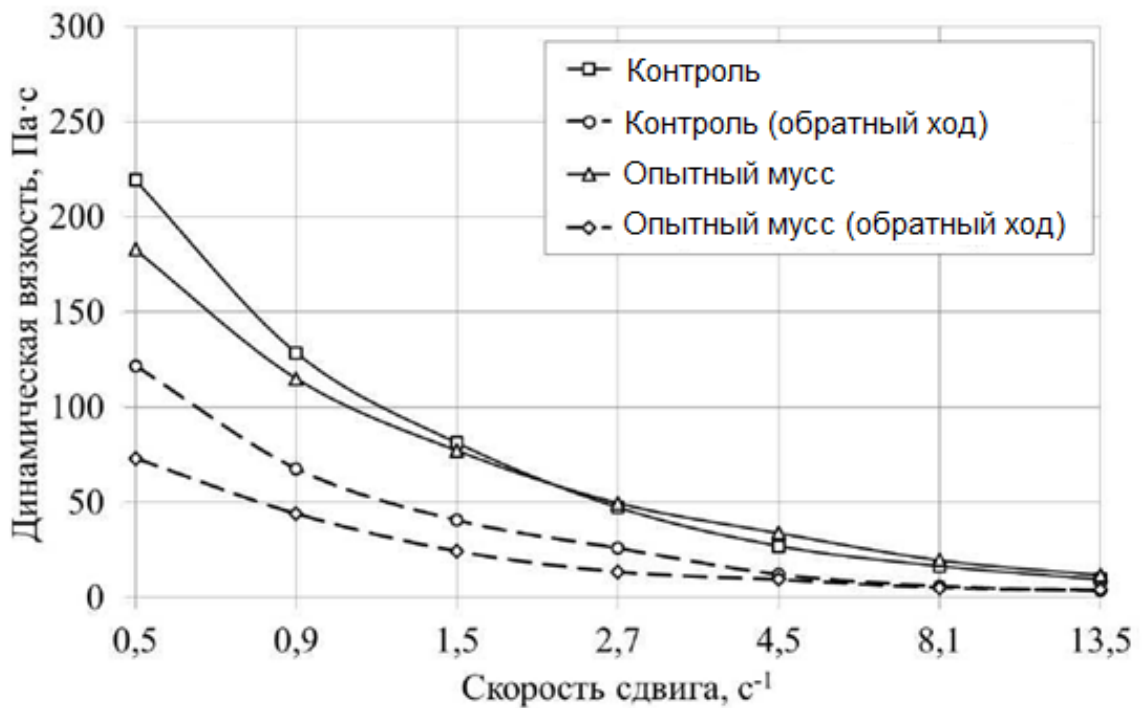


Рисунок 6.5 – Структурно-механические характеристики муссов на 9 сутки хранения

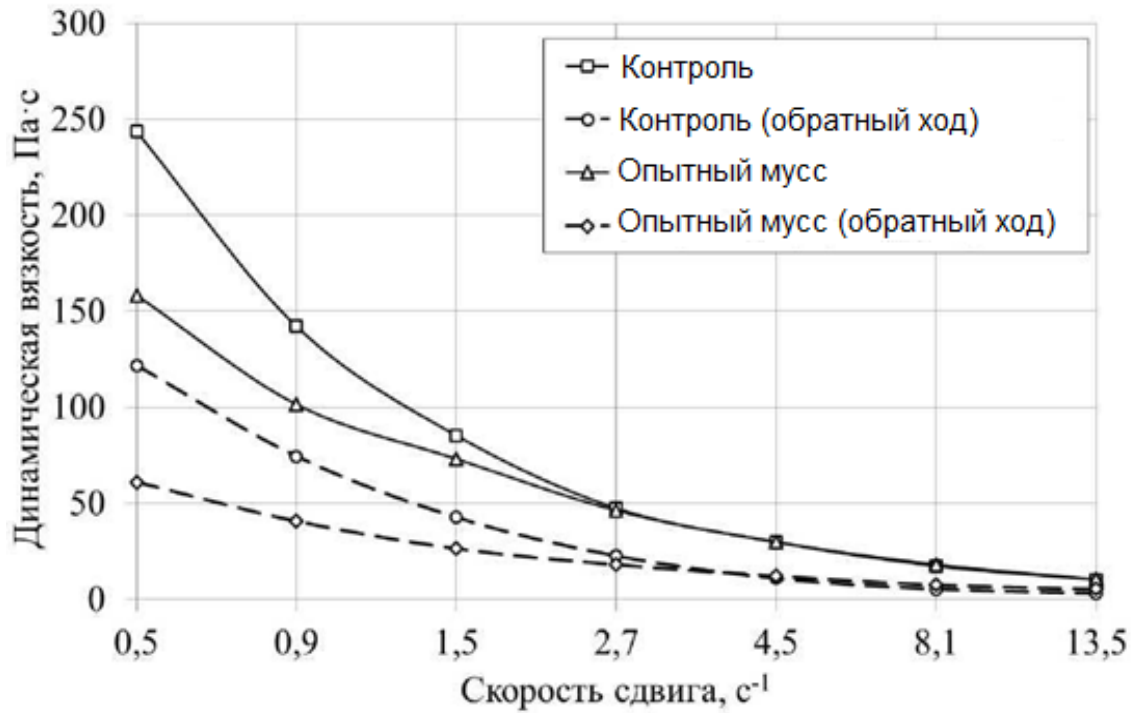


Рисунок 6.6 – Структурно-механические характеристики муссов на 12 сутки хранения

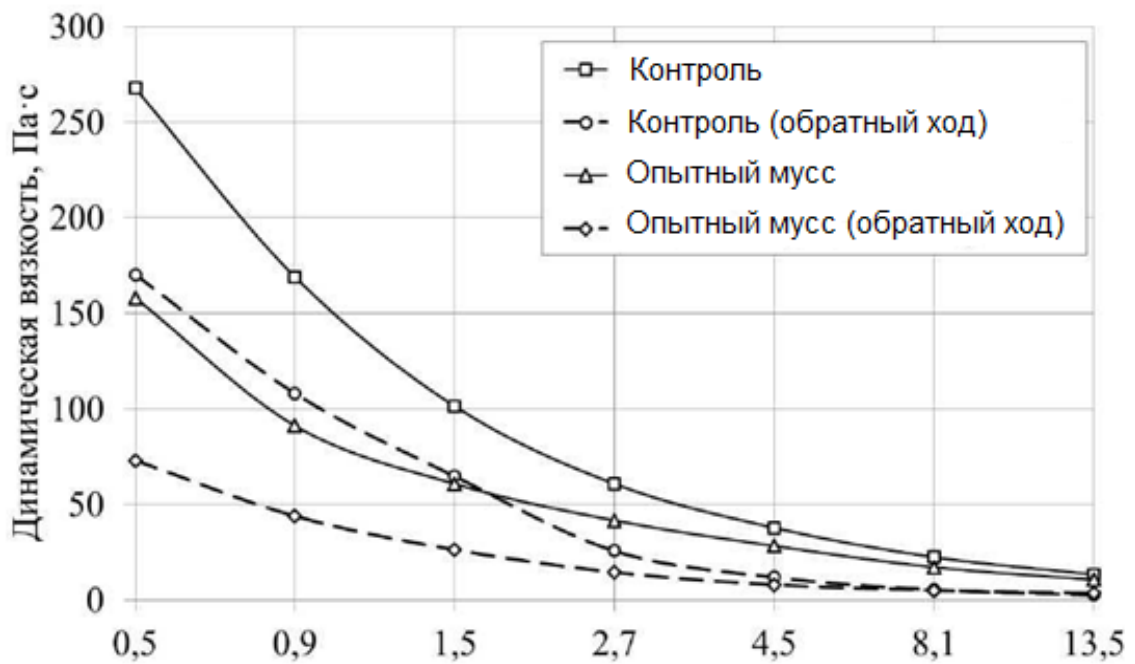


Рисунок 6.7 – Структурно-механические характеристики муссов на 15 сутки хранения

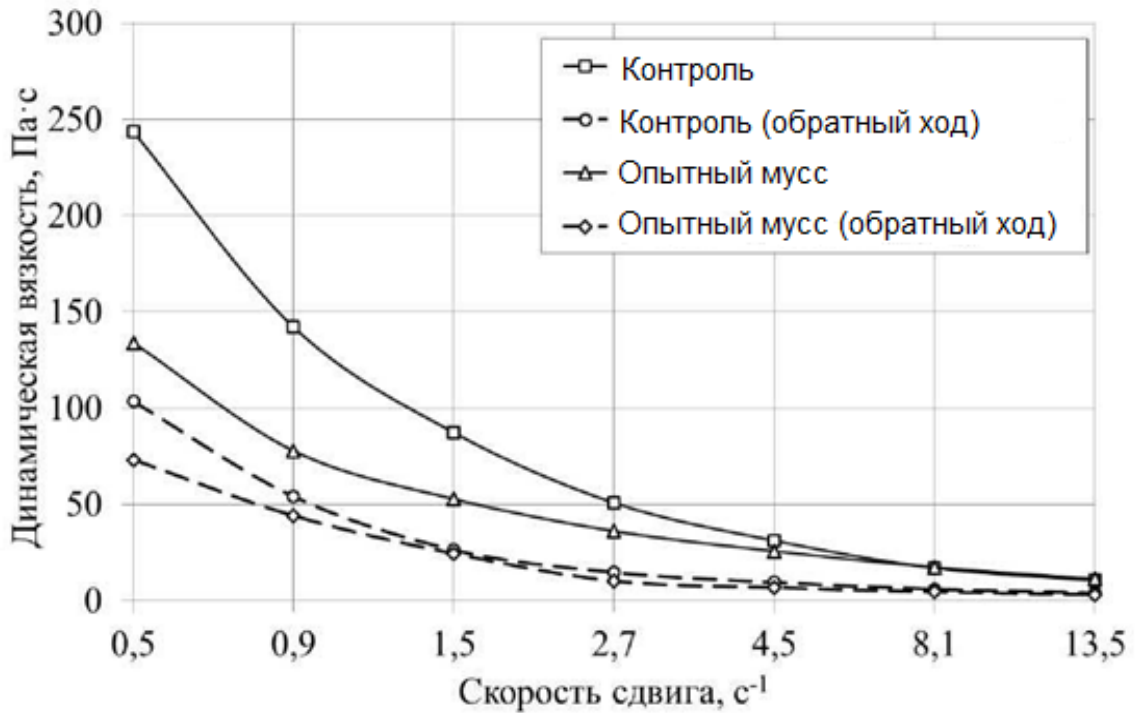


Рисунок 6.8 – Структурно-механические характеристики муссов на 18 сутки хранения

Так, касаясь контрольного образца, динамическая вязкость до 18 суток изменяется в интервалах погрешности, но при этом степень тиксотропности повышается вплоть до 15 суток, после чего происходит старение белков, сопровождающееся снижением их влагоудерживающей способности и структура контрольного мусса теряет способность к быстрому восстановлению (рис. 16). В образце базового молочного продукта с использованием ГСБ отмечено медленное снижение динамической вязкости, начиная с 6 суток хранения до 18. Вероятнее всего, с одной стороны тыквенный пектин в одиночку не способен на продолжительном отрезке времени структурировать сложную белковую систему, состоящую из высокомолекулярных казеиновых фракций (коагулированных) и низкомолекулярных гидролизованных сывороточных белков, а с другой стороны частичное снижение вязкости может быть связано с началом микробиологической порчи продукта. Однако после структурирования базового молочного продукта с использованием ГСБ в процессе хранения степень тиксотропности практически не снижалась, что свидетельствует о том, что тыквенный пектин не способен долгое время поддерживать высокую вязкость в продукте (опытный мусс), но при этом

стабилизирует продукт и позволяет ему частично восстанавливать консистенцию после полного разрушения. На следующем этапе были проанализированы функциональные свойства контрольного мусса и базового молочного продукта с использованием ГСБ в процессе хранения, а именно АПФ-ингибирующая активность. Данные представлены в таблице 6.15.

Таблица 6.15 – Функциональные свойства контрольного мусса и базового молочного продукта с использованием ГСБ в процессе хранения

Сутки хранения	Наименование образца	АПФ-ингиб. активность, IC <sub>50</sub> , мг белка/мл
Фон	Мусс (контроль)	19,06
	Опытный мусс	4,27
3	Мусс (контроль)	18,99
	Опытный мусс	4,35
6	Мусс (контроль)	19,16
	Опытный мусс	4,39
9	Мусс (контроль)	19,33
	Опытный мусс	4,26
12	Мусс (контроль)	19,39
	Опытный мусс	4,19
15	Мусс (контроль)	19,44
	Опытный мусс	4,15
18	Мусс (контроль)	19,49
	Опытный мусс	4,19

Из представленных в таблице данных видно, что АПФ-ингибирующая активность контрольного мусса и базового молочного продукта с использованием ГСБ изменялась не значительно, в пределах погрешности измерений. Таким образом, биохимические процессы, происходящие в данных продуктах в процессе хранения, не влияют на функциональные свойства контрольного мусса и базового молочного продукта с использованием ГСБ.

Микробиологические показатели опытного творожного базового молочного продукта с использованием ГСБ и контрольного творожного мусса определяли в свежесделанных образцах и через каждые 3 дня в течение всего срока хранения.

Результаты представлены в таблице 6.16 и на рисунке 6.9.

Таблица 6.16 – Изменение КМАФАнМ в образцах контрольного и опытного творожного муссов в процессе хранения при температуре  $(4\pm 2)$  °С, КОЕ/см<sup>3</sup>

№	Наименование образца	Фон	Содержание КМАФАнМ					
			Сутки хранения					
			3	6	9	12	15	18
1	Контрольный мусс	220	300	300	400	2000	2300	40000
		200	290	280	290	3100	1600	65000
		180	310	320	420	1000	3000 <sup>3</sup>	15000
2	Опытный мусс	220	200	300	1600	100000	200000	1400000
		200	170	400	1200	80000	210000	2000000
		180	230	200	1800	120000	190000	1000000



<b>Контрольный мусс</b>							
1	БГКП в 1см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 0,1 см <sup>3</sup>					
2	Дрожжи и плесневые грибы, КОЕ/см <sup>3</sup>	Не обнаружено					
<b>Опытный мусс</b>							
3	БГКП в 1см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 0,1 см <sup>3</sup>				<b>Обнаружено в 0,01 см<sup>3</sup></b>	
4	Дрожжи и плесневые грибы, КОЕ/см <sup>3</sup>	10 плес	Не обнаружено	10 плес	Не обнаружено	10 плес	Не обнаружено

В соответствии с МУК 4.2.1847-04 «Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов», установлены сроки годности разработанных функционального творожного базового молочного продукта с использованием ГСБ и напитка кисломолочного. Рекомендуемый срок годности функционального продукта творожного базового молочного продукта с использованием ГСБ с момента окончания технологического процесса составляет не более 7 суток. Рекомендуемый срок годности функционального продукта напитка кисломолочного с момента окончания технологического процесса составляет не более 10 суток при температуре хранения  $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Допускается увеличивать сроки годности продуктов при условии подтверждения их в установленном законодательством порядке.



## ГЛАВА 7 ИНТЕГРИРОВАНИЕ БАЗОВОГО ПРОДУКТА В ЧАСТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ОБОГАЩЕННЫХ ПРОДУКТОВ

В качестве основы при разработке частных технологий были использованы разработанные ранее рецептуры без использования гидролизатов. При получении всех образцов в продуктах оценивали органолептические и реологические характеристики.

С использованием ГСБ 3 получено ещё пять видов обогащенных продуктов. При получении мусса и суфле различался рецептурный состав компонентов, а при получении крема (рецептура аналогичная) отсутствовала операция «аэрирование» и достаточно длительный процесс созревания.

В таблице 7.1 представлены рецептуры группы однородных молочных и творожных продуктов, обогащенных гидролизатом сывороточных белков, а также контрольных образцов без внесения гидролизата и пектина.

После приготовления образцов была проведена органолептическая оценка контрольных и экспериментальных образцов обогащенных продуктов (рисунок 7.1).

Как видно из данных профилограмм, практически по всем показателям экспериментальный образец мусса был близок к контрольному, наибольшие отклонения отмечены дегустаторами в дескрипторе «цвет» (рисунок 7.1, а). Как и в случае творожного мусса, в случае суфле, дегустаторы отметили более низкими баллами показатель «цвет».

Также по сравнению с контрольным образцом консистенция продукта была оценена ниже, но при этом общее впечатление от продукта было на 0,1 балла выше. Это связано с тем, что экспериментальный образец имел более воздушную, но при этом стабильную консистенцию, что подтвердили результаты проведенных далее реологических исследований (рисунок 7.1, б). Оценка органолептического профиля контрольного и экспериментального образца паст показала, что практически по всем показателям образец со 100 %-ной заменой молока на гидролизат с добавлением пектина практически не уступал по бальной оценке контрольному образцу (рисунок 7.1, в).

Таблица 7.1 – Рецептуры обогащенных продуктов

Наименование компонента	Количество, г на 100 г									
	Мусс (крем)		Суфле		Паста		Напиток		Кисель	
	К*	Э**	К	Э	К	Э	К	Э	К	Э
Творог обезжиренный	40,00	40,00	57,30	57,30	-	-	-	-	-	-
Творог 5%-ной жирности	-	-	-	-	48,00	48,00	-	-	-	-
Сливки 10% -ной жирности	11,65	11,65	13,90	7,60	-	-	15,50	15,50	-	-
Молоко 2,5%-ной жирности	-	-	10,20	-	39,66	-	62,00	25,00	72,33	-
Гидролизат З	34,14	34,14	-	16,4	-	39,66	-	37,00	-	72,33
Сок вишневый	-	-	-	-	-	-	10,00	10,00	-	-
Пюре яблочное	-	-	-	-	-	-	8,00	8,00		
Наполнитель фруктово-ягодный	--	-	-	-	-	-	-	-	22,90	22,90
Какао-порошок	-	-	-	-	-	-	2,50	2,50	-	-
Сахарный песок	10,70	10,70	12,30	12,30	-	-				
Сахарный песок	-	-	-	-	10,54	10,54	-	-	-	-
Ванилин	-	-	-	-	-	-	1,00	1,00		-
СОМ	2,00	2,00	4,20	4,20	-	-	-	-		
Сыворотка молочная сухая	-	-	-	-	-	-	-	-	4,20	4,20
Желатин	0,83	0,83	0,67	0,60	-	-	-	-	-	-
Крахмал горячего набухания	-	-	-	-	1,10	1,10	-	-	-	-
Крахмал холодного набухания	-	-	-	-	-	-	-	-	0,45	0,45
Камедь рожкового дерева	-	-	0,45	0,40	-	-	-	-	-	-
Агар-агар	-	-	0,28	0,25	-	-	-	-	-	-
α-каррагинан	-	-	-	0,11	-	-	0,20	0,2	-	-
Гуаровая камедь	0,42	0,28	-	-	0,43	0,23			-	
Пектин тыквенный	-	0,14	-	0,14	-	0,20	-	0,18	-	0,12
Пектин цитрусовый	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12	-
Лимонная кислота	-	-	-	-	-	-	0,30	0,03	-	-
Натрий двууглекислый	0,26	0,26	-	-	0,27	0,27	-	-	-	-
Цитрат натрия	-	-	0,70	0,70	-	-	0,50	0,50	-	-

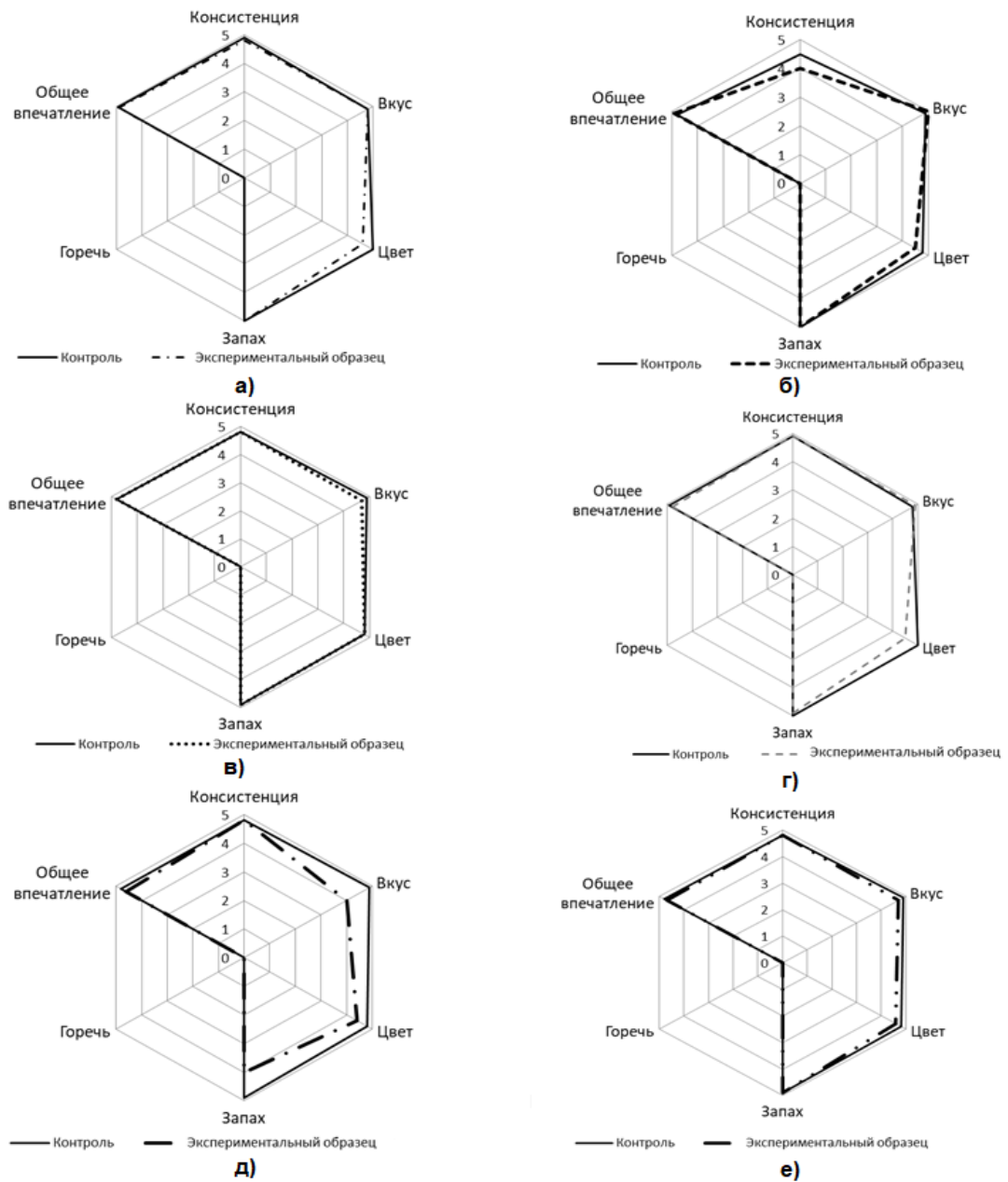


Рисунок 7.1 – Профилограммы органолептической оценки контрольных и экспериментальных образцов: а) муссы б) суфле в) пасты г) напитки д) кисели е) кремы

Как видно из данных профилограммы рисунка 7.1 г), образцы с внесением гидролизата в напиток имели достаточно привлекательные органолептические характеристики, максимально приближенные к контрольному образцу. Как и в случае вышеописанных продуктов, наибольшие отличия по сравнению с контролем зафиксированы в показателе «цвет». В случае киселя обогащенного

претензии дегустаторов коснулись не только цвета, но и вкуса и запаха. Экспериментальные образцы отличались резким сывороточным вкусом и запахом, которые не нивелировались вкусом-ароматической добавкой (рисунок 7.1, д). Поэтому были проведены дополнительные исследования по внесению гидролизата в рецептуру киселя с осуществлением замены молока на гидролизат от 10 до 90 % с шагом 10 [27]. По результатам эксперимента было установлено, что без ущерба вкусовым характеристикам возможна 40 % -ная замена молока на гидролизат.

Оценка степени тиксотропности экспериментальных образцов обогащенных молочных и творожных продуктов в сравнении с контрольными показала, что внесение гидролизата и тыквенного пектина не только не ухудшало, но и в некоторых случаях и немного улучшало структурно-механические характеристики, о чем свидетельствуют данные по определению степени тиксотропности, представленные на рисунке 7.2.

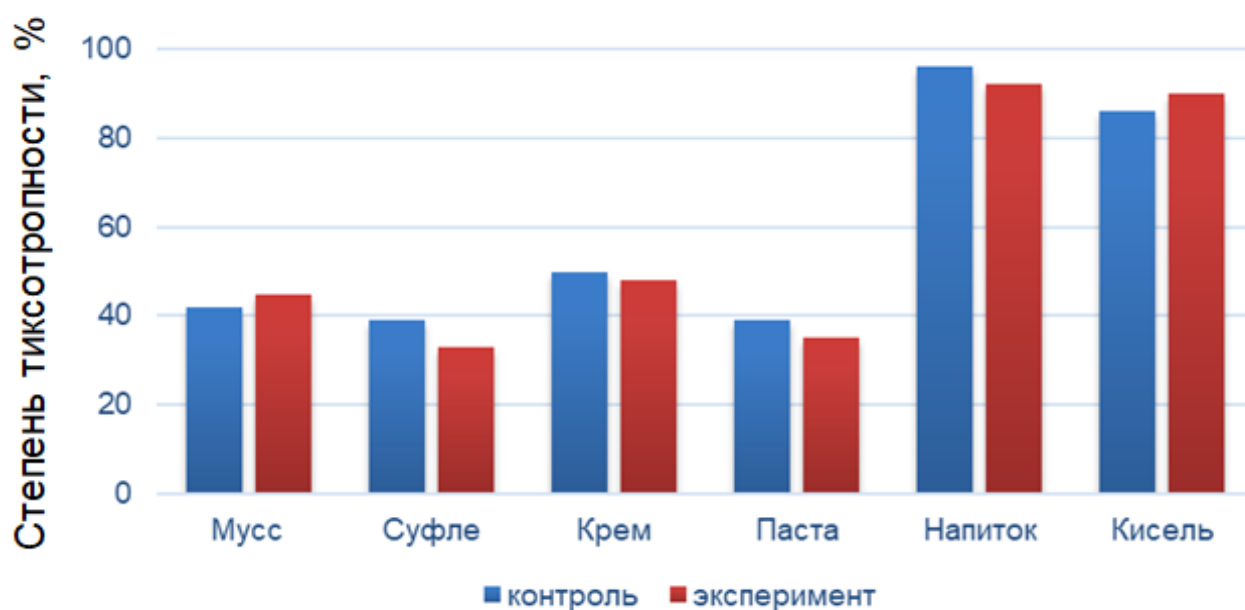


Рисунок 7.2 – Степень тиксотропности контрольных и экспериментальных образцов

По результатам работы, представленной в данной главе, разработана общая технологическая схема получения обогащенных продуктов (рисунок 7.3).

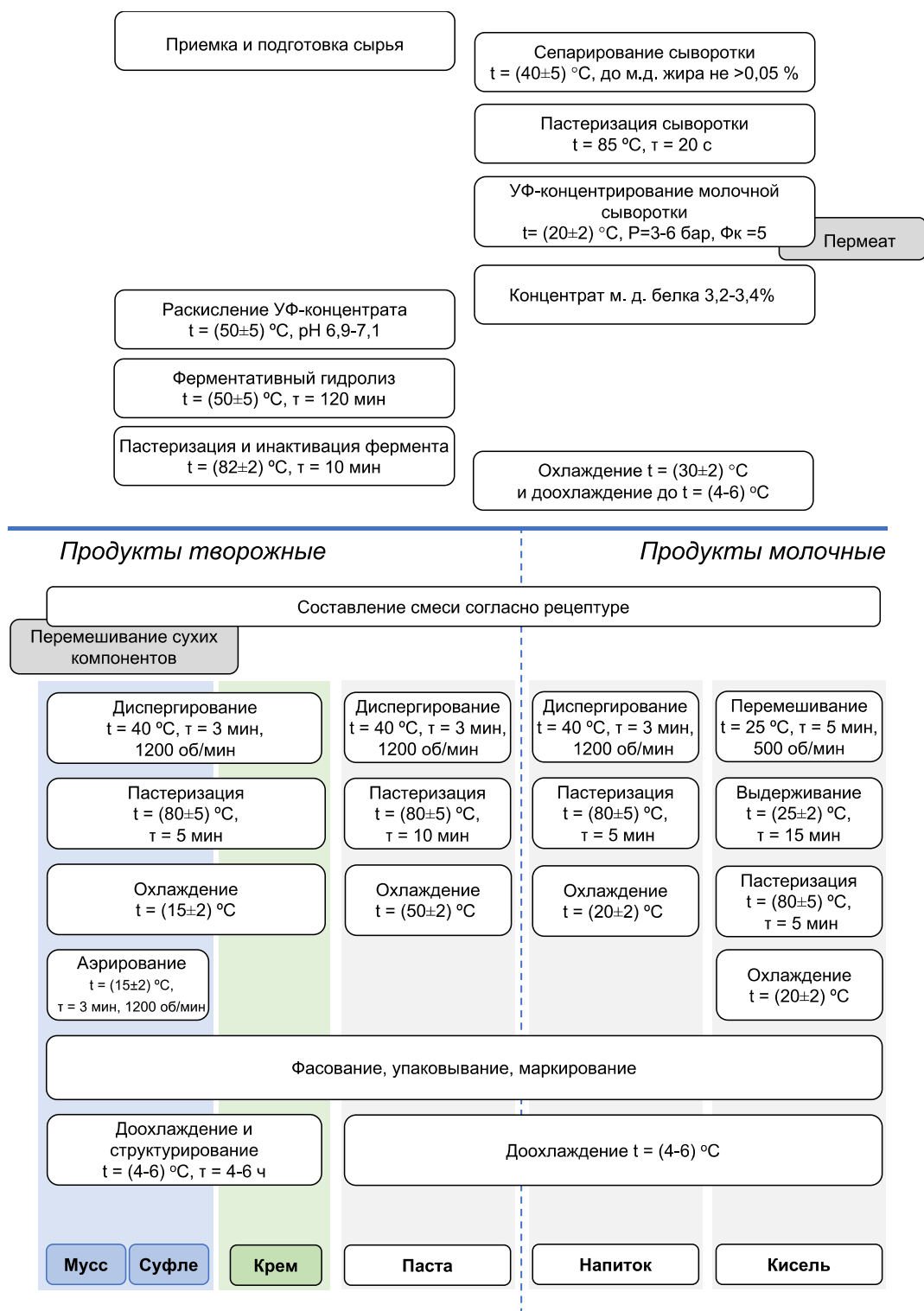


Рисунок 7.3 – Технологическая схема получения обогащенных продуктов (УФ – ультрафильтрация, Фк – фактор концентрирования)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сформулирован концептуальный подход к направленной трансформации молочного сырья для усиления функционального потенциала белков молока с последующим созданием на их основе функциональных продуктов и ингредиентов.

Установлены закономерности изменения белкового профиля сывороток, полученных при различных способах коагуляции сгустка: при кислотном-сычужном и термокислотном. В первом случае белковый профиль представлен преимущественно белками сывороточной фракции ( $\alpha$ -лактальбумин и  $\beta$ -лактоглобулин), во втором случае фракциями  $\beta$ -,  $\alpha$ - и  $\kappa$ -казеина, сывороточные белки составляют 24 %. При исследованных способах коагуляции в сыворотках не выявлено различий в содержании горьких аминокислот.

Исследование *in silico* показало, что пептиды с наиболее высокой антигипертензивной активностью (KW) были обнаружены при применении химотрипсина С ( $IC_{50}$  1,63 мМ) и субтилизина (VF и VY) – ( $IC_{50}$  7,1 и 9,2 мМ). Наименьшее количество горьких пептидов ( $A_E=0,0124$ ) зафиксировано в трипсиновых гидролизатах, наибольшее ( $A_E=0,1429$ ) – в гидролизатах, полученных с протеиназой К.

Был разработан алгоритм системного анализа протеолитических ферментов с интегрированием таких выходных параметров работы фермента, как ингибирование АПФ, ДПП IV; АОЕ, свободных аминокислот и количество горьких пептидов. Оптимальными по интегральному показателю оказались химотрипсин С ( $C_j=0,314$ ) и субтилизин ( $C_j=0,284$ ). Однако наличие в гидролизатах химотрипсина С аллергенных эпитопов ограничивает его использование для получения функциональных ингредиентов. Для каппа-казеина оптимальными являлись термолизин ( $C_j=0,434$ ) и субтилизин ( $C_j=0,371$ ).

Установлены оптимальные параметры протеолиза сывороток: сыворотка №1 –  $\tau$  94,8 мин, E/C (Prot/Alc) 3,25/0,75 %; №2 и №4 –  $\tau$  90 мин, E/C (Prot/Alc) 3,00/1,00 %; №3 –  $\tau$  120 мин, E/C (Prot/Alc) 3,88/0,12 %; №5 –  $\tau$  121,2 мин, E/S (Prot/Therm/Alc) 2,00/1,00/1,00 %. При данных условиях и соблюдении режимов

оптимума действия ферментного препарата получены гидролизаты с минимальным САК (от 2,94 до 11,92 %), СГ составила от 6,00 до 14,40 %, средняя антиоксидантная активность 461,36 мкмоль ТЭ/г белка. С помощью разработанной модели равновесия – модифицированного уравнения Михаэлиса-Мэнтен – осуществлено прогнозирование АОЕ ГСБ с учетом вариабельности параметров процесса гидролиза в условиях производства.

Показано, что в гидролизатах подсырных сывороток кислотно-сычужной коагуляции происходит значительное снижение доли высокомолекулярной фракции (>10 кДа) в сторону средне (3-10 кДа) и низкомолекулярной (<3 кДа) фракций, с преобладанием среднемолекулярной фракции (от 47% до 58%). В то время, как в гидролизате кислотной коагуляции, практически отсутствует высокомолекулярная фракция (>10 кДа), при этом доля средне- и низкомолекулярной фракции составляет 40,87% и 55,08%. Анализ последовательностей, идентифицированных с помощью базы данных BIOPEP пептидов позволил установить присутствие в составе всех гидролизатов антиоксидантных и гипотензивных фрагментов.

Охарактеризована АОЕ всех гидролизатов, она составила 400-600 мкМ ТЭ/г белка. Показана антимикробная активность ГСБ в отношении тест-штаммов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Установлено, что наиболее выраженной антимикробной активностью обладали ГСБ 3 (гидролизат сыворотки твердых сыров) и ГСБ 5 (гидролизат сыворотки мягких сыров без созревания), что коррелирует с данными *in silico* прогнозирования. На *in vivo* модели на фоне приема ГСБ у животных показана тенденция к снижению величины ТБК-реактивных продуктов в печени, выявлен бифидогенный и гипотензивный эффект (снижение артериального давления на 27 мм. рт. ст.).

Выявлено, что интегрирование ГСБ 3 и ГСБ 5 взамен цельного молока в матрицу базового продукта негативно повлияло на реологические и органолептические показатели, но при этом 100%-ная замена привела к повышению АПФ-ингибирующей активности базового (аэрированного) продукта в 5 и 9 раз соответственно (IC<sub>50</sub> 5,13 и 2,69 мг белка/мл по сравнению с 24 мг

белка/мл в контрольном образце). По итогам полнофакторного эксперимента были установлены оптимальные дозы внесения ГСБ 3, выбранного по результатам комплексной оценки, и тыквенного пектина – 34,14 % и 0,14 %.

Показано, что на фоне приема образцов мусса с ГСБ 3 у животных содержание ТБК-реактивных продуктов в было ниже на 20 % по сравнению с группой №2 с интоксикацией. Гипотензивный эффект на 30 день эксперимента для опытного образца мусса составил  $\Delta P=18$  мм. рт. ст., а для контрольного образца  $\Delta P=5$  мм. рт. ст. Показано статистически достоверное увеличение – в 1,4 и 3,7 раза ( $p<0,05$ ) относительного содержания лакто- и бифидобактерий у экспериментальных животных, получавших на фоне приема антибиотика опытные образцы мусса. На модели с повышенной алиментарной липидной нагрузкой показано снижение сывороточной концентрации триглицеридов на 51,4 %, концентрации общего холестерина в сыворотке крови на 8,6 %, а также снижение концентрации атерогенной фракции липопротеидов ЛПНП на фоне приема мусса.

Разработан Стандарт Организации на гидролизат сывороточных белков (СТО 00419785-044-2019), который может быть использован для получения широкой гаммы обогащенных продуктов. О чем свидетельствует успешное внедрение разработанных на его основе шести видов обогащенных продуктов: «Муссы творожные обогащенные» ТУ 10.51.56-060-00419785-2019, «Суфле творожное обогащенное» ТУ 10.51.56-086-00149785-2022, «Пасты творожные обогащенные» ТУ 10.51.56-088-00149785-2022, «Кисели молочные обогащенные» ТУ 10.51.56-090-00149785-2022, «Напитки молочные обогащенные» ТУ 10.51.56-091-00149785-2022, «Кремы творожные обогащенные» ТУ 10.51.56-092-00149785-2022. Оценка степени тиксотропности экспериментальных образцов обогащенных молочных и творожных продуктов в сравнении с контрольными показала, что внесение гидролизата и стабилизационной системы улучшало структурно-механические характеристики новых продуктов. Разработана общая технологическая схема получения обогащенных продуктов.



**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

САК – содержание свободных аминокислот

СГ – степень гидролиза

КСБ – концентрат сывороточных белков

АПФ – ангиотензин превращающий фермент

АГА – антигипертензивная активность

АОЕ – антиоксидантная емкость

АМА – антимикробная активность

АЛТ – аланиновая аминотрансфераза

АСТ – аспарагиновая аминотрансфераза

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МДА – малоновый диальдегид

ТБК – тиобарбитуровая кислота

PDB – Protein Data Bank

АД – артериальное давление

NC-IUBMB (Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology) – Международный союз биохимиков и молекулярных биологов

E/S – субстрат-ферментное соотношение

ПААГ – полиакриламидный гель

MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией

ORAC (oxygen radical absorbance capacity) – способность поглощения радикалов кислорода

GLYCAM1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1) – зависящая от гликозилирования молекула клеточной адгезии -1

ТЭ – тролокс эквивалент

ЛПНП – липиды низкой плотности

ЛНВП – липиды высокой плотности

УФ – ультрафильтрация

SHR (spontaneously hypertensive rat) – крысы линии со спонтанной гипертензией

IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования

Alc – ферментный препарат Alcalase® 2.4 L FG (субтилизин)

Prot – ферментный препарат Protamex® FG (субтилизин)

Therm – ферментный препарат Thermolysin® FG

A<sub>E</sub> – частота встречаемости пептидов

ГСБ – гидролизат сывороточных белков

Фк – фактор концентрирования

ФГК – фосфолицераткиназа

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Witzmann F.A. Biological Concepts and Techniques in Toxicology / Proteomics. - CRC Press, 2006. - P. 25–46.
2. Рогов, И. А. Функциональные продукты: состав, свойства, предназначение / И.А. Рогов, А.И. Жаринов, М.П. Воякин // Мясные технологии. – 2010. – № 2. – С. 6-11.
3. Рогов, И. А. Медико-технологические аспекты разработки и производства функциональных пищевых продуктов / И.А. Рогов, Е.Н. Орешкин, В.Н. Сергеев // Пищевая промышленность. – 2017. – № 1. – С. 13-15.
4. Krylov, P.A., Virtual database screening algorithm for the detection of practically valuable proteins of bovine and pig lungs / P. A. Krylov, E. V. Matveev, V. V. Novochadov // Biotekhnologiya. State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms. - 2019. - Vol. 35. - № 5. - P. 80–86.
5. Шишкин, С.С. Отечественная база данных «Протеомика злокачественных клеток»: эффективный поиск белковых биомаркеров / С.С. Шишкин, Л.И. Ковалев, Н.В. Пашинцева, М.А. Ковалева, Л.С. Еремина, А.В. Иванов, Э.Г. Садыхов // Прикладные информационные аспекты медицины. - 2017. - Т. 20. - № 4. - С. 234.
6. Шишкин, С.С. Протеомные базы данных в России. Биотехнологические аспекты / С.С. Шишкин, Л.И. Ковалев, Н.В. Пашинцева, Л.С. Еремина, А.В. Иванов, Э.Г. Садыхов // Актуальная биотехнология. - 2016. Т. 3. - № 16. - С. 40–44.
7. Вострикова, Н.Л. Биоинформатика — инструмент интерпретации протеомных профилей белков мяса / Н.Л. Вострикова, И.М. Чернуха // Теория и практика переработки мяса. - 2017. Т.2. - № 1. - С. 4–7.
8. Chen C. Protein bioinformatics databases and resources / C. Chen, H. Huang, C. H. Wu // Methods in Molecular Biology. - 2017. - Vol. 1558. - P. 3–39.
9. Nakajima, N. Databases for Protein–Protein Interactions / N. Nakajima, T. Akutsu, R. Nakato // Methods in Molecular Biology. - 2021. - Vol. 2361. - P. 229–248.
10. Werner, J. A novel metaproteomics tool for the creation of relevant protein databases and automatized protein annotation / J. Werner, A. Geron, J. Kerssemakers, S. Matallana-Surget // Biology Direct. - 2019. - Vol. 14. - № 1. - P. 1–5.

11. Mirdita, M. Uniclust databases of clustered and deeply annotated protein sequences and alignments / M. Mirdita, L. von den Driesch, C. Galiez, M. J. Martin, J. Soding, M. Steinegger // *Nucleic Acids Research. Oxford Academic.* - 2017. - Vol. 45. - № D1. - P. D170–D176.

12. Демидов, Е.А. Протеомика / Е. А. Демидов, С. Е. Пельтек // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* - 2014. Т. 18. - № 1. - С. 166–174.

13. Ежова, Г.П. Биоинформационные аспекты протеомики и деградации белка: учеб. метод. пособие // Г.П. Ежова, А.А. Бабаев, В.В. Новиков: — Н. Новгород: Изд-во ННГУ, 2007. — 86 с.

14. Shruthi, B.S. Proteomics: A new perspective for cancer / B.S. Shruthi, P. Vinodhkumar, Selvamani // *Advanced Biomedical Research.* - 2016. - Vol. 5. - № 1. - P. 74.

15. Wen, B. Deep Learning in Proteomics / B. Wen, W-F. Zeng, Y. liao, Z. Shi, S.R. Savage, W. Jiang, B. Zhang // *Proteomics.* - 2020. - Vol. 20. - № 21–22. - P. 1900335.

16. Jiang, Y. Identification and Comparison of Potential Biomarkers by Proteomic Analysis in Traditional Chinese Medicine-Based Heart Failure Syndromes / Y. Jiang, Q. Zhao, S. Huang, B. Cheng, Z. Hu // *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* - 2022. Vol. 2022.

17. Johnson, E.C.B. Large-scale proteomic analysis of Alzheimer’s disease brain and cerebrospinal fluid reveals early changes in energy metabolism associated with microglia and astrocyte activation / E.C.B. Johnson, E.B. Dammer, D. M. Duong, L. Ping, M. Zhou, L. Yin, L.A. Higginbotam, A. Guajardo, B. White, J.C. Troncoso, M. Thambisetty, T. J. Montine, E. B. Lee, J.Q. Trojanowski, T. G. Beach, E. M. Reiman, V. Haroutunian, M. Wang, E. Shadt, B. Zhang, D. W. Dickson, N. Ertekin-Tarner, T. E. Glode, V. A. Petyuk, P.L. De Jager, D. A. Bennet, T. S. Wingo, S. Rangaraju, I. Hajjar, J. M. Shulman, J. J. Lah, A.I. Levey, N.T. Seyfried // *Nature medicine.* - 2020. - Vol. 26. - № 5. - P. 769–780.

18. Yao, B. Identification of potential therapeutic targets of deer antler extract on bone regulation based on serum proteomic analysis / B. Yao, H. Gao, J. Lui, M. Zhang, X. Leng, D. Zhao // *Molecular Biology Reports.* - 2019. - Vol. 46. - № 5. - P. 4861–4872.

19. Рязанцева, К.А. Использование методов *in silico* для получения биоактивных пептидов молочной сыворотки / К.А. Рязанцева, Е.Ю. Агаркова // Пищевая промышленность. - 2021. - №5. - С. 32–35.

20. Fitzgerald, R. Application of *in silico* approaches for the generation of milk protein-derived bioactive peptides / R. Fitzgerald, M. Cermeño, M. Khalesi, Thanyaporn Kleekayai, M. Amigo-Benavent // Journal of Functional Foods. - 2020. - Vol. 64. - P. 103636.

21. Parmar, H. In Vitro and In Silico Analysis of Novel ACE-Inhibitory Bioactive Peptides Derived from Fermented Goat Milk / H. Prammar, S. Hati, A. Sakure // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. - 2018. - Vol. 24. - № 3. - P. 441–453.

22. Титов Е.И. Экспертная система оптимизации состава продуктов и рациона питания: монография / Е.И. Титов, И.А. Рогов, Ю.А. Ивашкин, М.А. Никитина, И.В. Глазкова, Л.Ф. Митасева. - М.: МГУПБ. 2009. 124 с.

23. Vostrikova, N.L. Bioinformatics — instrument interpretation proteomic profiles of meat protein / N.L. Vostrikova, I.M. Chernukha // Theory and Practice of Meat Processing. - 2017. - Vol. 2. - № 1. - P. 4–17.

24. Sansi, M.S. Antimicrobial bioactive peptides from goat Milk proteins: In silico prediction and analysis / M.S. Sansi, D. Iram, S. Zanab, S. Vij, A. K. Puniya, A. Singh, Ashutosh, S. Meena // Journal of Food Biochemistry. - 2022. - Vol. 46. - Iss. 10. - e14311.

25. Никитина, М. А. Лисицын А. Б., Чернуха И. М. Информационные технологии, как инструмент, в оценке и анализе сбалансированности рационов питания / М. А. Никитина, А. Б. Лисицин, И. М. Чернуха // Все о мясе. – 2021. – №. 3. – С. 36-39.

26. Лисицын, А. Б. Оценка качества белка с использованием компьютерных технологий / А. Б. Лисицин, М.А. Никитина, Е.Б. Сусь // Пищевая промышленность. – 2016. – №. 1. – С. 26-29.

27. Торкова, А.А. Рациональный дизайн ферментной композиции для получения функциональных гидролизатов сывороточных белков / А.А. Торкова,

К.А. Рязанцева, Е.Ю. Агаркова, А.Г. Кручинин, М.Ю. Центалович, Т.В. Федорова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. - №6. – С. 580-591.

28. Рязанцева, К.А. Использование методов *in silico* для получения биоактивных пептидов молочной сыворотки / К.А. Рязанцева, Е.Ю. Агаркова // Пищевая промышленность. - 2021. - №. 5. - С. 32–35.

29. Agyei, D. M.K.D. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides / D. Agyei, M.K. Danquah // Biotechnology Advances. - 2011. - Vol. 29. - № 3. - P. 272–277.

30. Кручинин, А.Г. Биологически активные пептиды молока: обзор / А.Г. Кручинин, Е.Ю. Агаркова // Пищевая промышленность. - 2020. - №. 12. - С. 92–96.

31. Räder, A.F.B. Orally Active Peptides: Is There a Magic Bullet? / A. F. B. Räder, M. Weinmuller, F. Reichart, A. Shumacher-Kliger, S. Merzbach, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler // Angewandte Chemie. International Edition. - 2018. - Vol. 57. - № 44. - P. 14414–14438.

32. Properties of bovine colostrum and the possibilities of use / S. Dzik, B. Miciński, I. Aitzhanova [et al.] // Polish Annals of Medicine. – 2017. – Vol. 24. - № 2. – P. 295-299.

33. El-Fattah, A. A. Developing functional yogurt rich in bioactive peptides and gamma-aminobutyric acid related to cardiovascular health / A.A. El-Fattah, S.S. Sakr, S. El-Dieb, H. Elkashef // LWT. Academic Press. - 2018. - Vol. 98. - P. 390–397. DOI:10.1016/j.lwt.2018.09.022

34. Ali, M.A. Functional dairy products as a source of bioactive peptides and probiotics: current trends and future prospectives / Md Aslam Ali , Md Mostafa Kamal, Md Hafizur Rahman, Md Nurealam Siddiqui, Md Azizul Haque, Khokan Kumar Saha, Md Atikur Rahman // Journal of Food Science and Technology. - 2022. - Vol. 59. - № 4. - P. 1263–1279.

35. Чернуха, И. М. Образование биологически активных пептидов в мясном сырье под влиянием протеаз различного происхождения / И.М. Чернуха // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – №. 6. – С. 1247-1261.

36. Чернуха, И. М. Образование биоактивных пептидов под действием микроорганизмов и их идентификация / И. М. Чернуха, Н.Г. Машенцева, Д.А. Афанасьев // Мясные технологии. – 2020. – №. 2. – С. 42-46.

37. Дыдыкин, А. С. Функциональные продукты - современный вектор развития пищевой индустрии / А. С. Дыдыкин, А. Б. Лисицын, М. А. Асланова // Функциональные продукты питания: научные основы разработки, производства и потребления : Сборник докладов III Международной научно-практической конференции, Москва, 30–31 октября 2019 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН, 2019. – С. 24-32.

38. Picariello, G. Novel Mass Spectrometry-Based Applications of the “Omic” Sciences in Food Technology and Biotechnology / G. Picariello, G. Mamone, F. Addeo, P. Ferranti // Food Technology and Biotechnology. - 2012. - Vol. 50 (3). - P. 286–305.

39. Тихомирова, Н. А. Функционально необходимые компоненты и технологические вспомогательные средства / Н. А. Тихомирова // Молочная промышленность. – 2016. – № 6. – С. 42-44.

40. Murray, B. A. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins: Biochemistry, Bioactivity and Production / B. A. Murray, R. J. FitzGerald // Current Pharmaceutical Design. - 2007. - Vol. 13. - №8. - P. 773–791.

41. Sah, B.N.P. Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins / B.N.P. Sah, T. Vasilevich, S. McKechnie, O.N. Doncor // Food Science and Nutrition. - 2017. - Vol. 58. - № 5. - P. 726–740.

42. USDA (2015) Dairy World Markets and Trade. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. Approved by the World Agricultural Outlook Board/USDA Dec 2015. - References - Scientific Research Publishing. // Article citations. - URL: <https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1842680>. (дата обращения: 16.05.2022).

43. Мангазеев, А. В. Применение керамической мембраны для концентрирования молочной сыворотки / А. В. Мангазеев, В. В. Потапов, Д. С.

Горев // Вестник Камчатского государственного технического университета. – 2018. – № 43. – С. 13-21. – DOI 10.17217/2079-0333-2018-43-13-21.

44. Дымар, О. В. Концептуальные подходы к организации переработки молочной сыворотки в Республике Беларусь / О. В. Дымар // Молочная промышленность. – 2016. – № 4. – С. 72-76.

45. Smithers, G.W. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’ / G.W. Smithers // International Dairy Journal. - 2008. - Vol. 18. - № 7. - P. 695–704.

46. Brandelli, A. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities / A. Brandelli, D. J. Daroit, A.P.F. Corrêa // Food Research International. - 2015. - Vol. 73. - P. 149–161.

47. Тихомирова, Н. А. Формирование ассортимента и планирование объемов производства отечественной молочной продукции / Н. А. Тихомирова // Молочная промышленность. – 2017. – № 5. – С. 24-25.

48. Мельникова, Е. И. Оценка кинетических параметров протеолиза сывороточных белков в УФ-концентрате подсырной сыворотки / Е. И. Мельникова, Е. В. Богданова // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2020. – Т. 82, № 4(86). – С. 107-112. – DOI 10.20914/2310-1202-2020-4-107-112.

49. Abd El-Salam, M.H. Reduction of Milk Protein Antigenicity by Enzymatic Hydrolysis and Fermentation. A Review / M.H. Abd El-Salam, S. El-Shibiny // Food Reviews International. - 2019. Vol. 37, № 3. P. 276–295.

50. Ryan, G. Functional properties of bovine milk protein isolate and associated enzymatic hydrolysates / G. Ryan, A. B. Nongonierma, J. O'Regan, R. J. FitzGerald // Elsevier International Dairy Journal. -2018. - Vol. 81. - P. 113–121.

51. Richard, J.P. Protein Flexibility and Stiffness Enable Efficient Enzymatic Catalysis / J.P. Richard // J Journal of the American Chemical Society. - 2019. - Vol. 141. - № 8. - P. 3320–3331.

52. Зорин, С.Н. Ферментативные гидролизаты пищевых белков для специализированных пищевых продуктов диетического (лечебного и



профилактического) питания / С.Н. Зорин // Вопросы питания. - 2019. Т. 88. - № 3. - С. 23–31.

53. Podlegaeva, T. V. Reducing allergenicity by biocatalytic conversion of whey protein using aspergillus oryzae / T. V. Podlegaeva, O. V. Kozlova, O. V. Kriger, N. L. Poturaeva // Food Processing: Techniques and Technology. - 2020. - Vol. 50. - № 3. - P. 415–424.

54. Бирюков, Р.Н. Получение и антимикробная активность пептидов казеинов молока сельскохозяйственных животных / Р. Н. Бирюков, К.А. Губчик, А. А. Костеневич, И.С. Агиевич, М. А. Капустин // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Сборник научных трудов. Том 11. – Минск: Республиканское унитарное предприятие "Издательский дом "Белорусская наука", 2019. – С. 371-385.

55. Свириденко, Ю.Я. Разработка технологии производства гидролизатов сывороточных белков молока с использованием мембранной техники. Часть 2. Оптимизация технологических режимов производства гидролизатов сывороточных белков молока в ферментативном мембранном реакторе / Ю.Я. Свириденко, Д. С. Мягконосов, Д. В. Абрамов, Е. Г. Овчинникова // Техника и технология. - 2017. С. 40–42.

56. Авершина, А. С. Изучение фракционного состава белков обезжиренного молока после гидролиза с использованием протеолитического фермента - пепсина говяжьего / А. С. Авершина // Сборник тезисов докладов участников пула научно-практических конференций, Сочи, 23–27 января 2020 года / Государственная организация высшего профессионального образования «Донецкий национальный университет экономики и торговли имени Михаила Туган-Барановского»; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Керченский государственный морской технологический университет»; Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Луганской Народной Республики «Луганский национальный университет имени Тараса Шевченко». – Сочи: ФГБОУ ВО

«Керченский государственный морской технологический университет», 2020. – С. 187-189

57. Головач, Т.Н. Сравнительная характеристика и оценка антигенных свойств продуктов гидролиза сывороточных белков сериновыми протеазами трипсином и алкалазой / Т.Н. Головач, Н. К. Жабанос, В. П. Курченко // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья. - 2009. № 4. - С.102–113.

58. Suwal, S. Comparative Study of in Situ and ex Situ Enzymatic Hydrolysis of Milk Protein and Separation of Bioactive Peptides in an Electromembrane Reactor / S. Suwal, E. Rozoy, M. Manenda, A. Doyen // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. - 2017. - Vol. 5. - № 6. - С. 5330–5340.

59. Espejo-Carpio, F.J. Artificial neuronal networks (ANN) to model the hydrolysis of goat milk protein by subtilisin and trypsin / F. J. Espejo-Carpio, R. Perez-Galvez, A. Guadix, E. M. Guadix // J. Dairy Res. Cambridge University Press. - 2018. - Vol. 85. - № 3. - P. 339–346.

60. Damodaran, S., A two-step enzymatic modification method to reduce immunoreactivity of milk proteins / S. Damodaran, Y. Li // Food Chemistry. - 2017. - Vol. 237. - P. 724–732.

61. Ghosh, B.C. Enzymatic hydrolysis of whey and its analysis / B.C. Ghosh, L.N. Prasad, N.P. Saha // Journal of Food Science and Technology. - 2017. - Vol. 54. - № 6. - P. 1476–1483.

62. Егоров, А.М. Бактериальные ферменты и резистентность к антибиотикам // Acta Nature. - 2018. Т. 10. - № 4. - С. 33–48.

63. Римарева, Л.В. Некоторые аспекты методологии контроля безопасности, качества и подлинности ферментных препаратов для пищевой промышленности / Л. В. Римарева, М. Б. Оверченко, Н. И. Игнатова, П. Ю. Таджбинова, Е. М. Серба // Пищевая промышленность. - 2020. - № 4. - С. 48–55.

64. Римарева, Л.В. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности / Л. В. Римарева, Е. М. Серба, Е. Н. Соколова, Ю. А. Борщева, Н. И. Игнатова // Вопросы питания. - 2017. - Т. 86. - № 5. - С. 63–73.

65. Бикташев, Р.У. Сравнительная эффективность растительных гидролаз / Р. У. Бикташев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2020. - Т. 241. - № 1. - С. 27–30.

66. Rawlings, N.D. Evolutionary families of peptidases / N. D. Rawlings, A. J. Barrett // *Biochemical Journal*. - 1993. - Vol. 290. - № 1. - P. 205–218.

67. Rawlings, N.D. Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes / N.D. Rawlings // *Biochimica et Biophysica (BBA) - Proteins and Proteomics*. - 2020. - Vol. 1868. - № 2. - P. 140345.

68. Niemirowicz, G. Handbook of proteolytic enzyme / G. Niemirowicz, A. Frasch, J.J. Cazzulo: edited by A.J. Barrett, N.D. Rawlings, and J.F. Woessner. 1998. London: Academic Press. 1666 pp. 90.00 for the CD-ROM. // *Protein Sci*. Cambridge University Press, 1999. Vol. 8, № 3. P. 693–694.

69. Burley, S.K. Protein Data Bank (PDB): The single global macromolecular structure archive / S.K. Burley, H. M. Berman, G. J. Klewegt, J. L. Markley, H. Nakamura, S. Velankar // *Methods in Molecular Biology*. - 2017. - Vol. 1607. - P. 627–641.

70. Burley, S.K. RCSB Protein Data Bank: Sustaining a living digital data resource that enables breakthroughs in scientific research and biomedical education / S.K. Burley, H. M. Berman, C. Christie, J. M. Durate, Z. Feng, J. Westbrook, J. Young, C. Zaderski // *Protein Science*. - 2018. - Vol. 27. - № 1. - P. 316–330. <https://doi.org/10.1002/pro.3331>

71. Gore S. Validation of Structures in the Protein Data Bank / S. Gore, E. S. Garcia, P. M. S. Hendricks, A. Gutmanas, J. D. westbook, H. Yang, Z. Feng, K. Baskaran, J. M. Berrisford, B. P. Hudson, Y. Ikegawa, N. Kobayashi, C. L. Lawson, S. Mading, L. Mak, A. Mukhopadhyay, T. J. Oldfield, A. Patwardhan, E. Peisach, G. Sahni, M. R. Sekharan, S. Sen, C. Shao, O. S. Smart, E. I. Ulrich, R. Yamashita, M. Quesada, J. Y. Young, H. Nakamura, J.L. Markley, H. M. Berman, S. K. Burley, S. Velankar, G. J. Kleywegt // *Structure*. - 2017. - Vol. 25. - № 12. - P. 1916–1927.

72. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рём; пер. с англ. Т. П. Мосоловой. — 6-е изд. — М.: Лаборатория знаний, 2019. — 509 с..

73. Мельникова, Е. И. Разработка технологических рекомендаций для эффективной инактивации протеаз при получении гидролизата сывороточных белков / Е. И. Мельникова, Е. В. Богданова // Современная биотехнология: актуальные вопросы, инновации и достижения: Сборник тезисов Всероссийской с международным участием онлайн-конференции, Кемерово, 21 октября 2020 года / Под общей редакцией А.Ю. Просекова. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2020. – С. 102-103.

74. Nandan, A. Therapeutic and biotechnological applications of substrate specific microbial aminopeptidases / A. Nandan, K. M. Nampoothiri // Applied Microbiology and Biotechnology. - 2020. - Vol. 104. - № 12. - P. 5243–5257.

75. Gurumallesh, P. A systematic reconsideration on proteases / P. Gurumallesh, K. Alagu, B. Ramakrishnan, S. Muthusamy // International Journal of Biological Macromolecules. - 2019. - Vol. 128. - P. 254–267.

76. Shinde, A.A. Bacillus subtilis RTSBA6 6.00, a new strain isolated from gut of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) produces chymotrypsin-like proteases / A. A. Shinde, F. K. Shaikh, M. V. Padul, M. S. Kachole // Saudi Journal of Biological Science. - 2012. - Vol. 19. - № 3. - P. 317–323.

77. Vijayaraghavan, P. De-hairing protease production by an isolated Bacillus cereus strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties / P. Vijayaraghavan, S. Lazarus, S. G. P. Vincent // Saudi Journal of Biological Sciences. - 2014. - Vol. 21. - № 1. - P. 27–34.

78. Asker, M.M.S. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from Bacillus megaterium / M.M.S. Asker, M. G. Mahmoud, K. El Shebwy // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. - 2013. - Vol. 11. - № 2. - P. 103–109.

79. Venugopal, M. Saramma A. V. An alkaline protease from Bacillus circulans BM15, newly isolated from a mangrove station: Characterization and application in laundry detergent formulations / M. Venugopal, A. V. Saramma // Indian Journal of Microbiology. - 2007. - Vol. 47. - № 4. - P. 298–303.

80. Johnvesly, B. Manjunath B.R., Naik G.R. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 / B. Johnvesly, B. R. Manjunath, G.R. Naik // *Bioresource Technology*. - 2002. - Vol. 82. - № 1. - P. 61–64.

81. Sivaprakasam, S. Optimization studies on production of a salt-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain BC1 and its application on tannery saline wastewater treatment / S. Sivaprakasam, B. Dhandapani, S. Mahadevan // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2011. – T.42. – P. 1506-1515.

82. Domann, E. Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene / E. Domann, M. Leimeister-Wachter, W. Goebel, T. Chakraborty // *Infection and Immunity*. - 1991. - Vol. 59. - № 1. - P. 65–72.

83. Shafee, N. Nutritional factors affecting organic solvent-tolerant alkaline protease production by a new *Bacillus cereus* strain 146 / N. Shafee, C.C. tan, S. Mahamad, R. N. Z. Raja Abd Rahman // *Annals of Microbiology*. - 2006. - Vol. 56. - № 1. - P. 29–34.

84. Costa, B. Partial purification and characterization of metalloprotease of halotolerant alkaliphilic bacterium *Bacillus cereus* from coastal sediment of Goa, India / B. Costa, D. Khanolkar, S.K. Dubey // *African journal of biotechnology*. - 2013. - Vol. 12. - № 31. - P. 4905–4914.

85. Chen, X.G. Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge / X.G. Chen, J. H. Tay, J. Y. Wang, S. T-L. Tay // *Extremophiles*. - 2004. - Vol. 8. - № 6. - P. 489–498.

86. Arulmani, M. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkaliphilic *Bacillus laterosporus*-AK1 / M. Arulmani, K. Aparanjini, K. Vasanthi, P. Arumugam // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. - 2007. - Vol. 23. - № 4. - P. 475–481.

87. Kalaiarasi, K. Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil / K. Kalaiarasi, P.U. Sunitha // *African Journal Biotechnology*. - 2011. - Vol. 8. - № 24. - P. 7035–7041.

88. Chu, W.H. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus* / W.H. Chu // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. - 2007. - Vol. 34. - № 3. - . 241–245.

89. Gaur, S. Purification of Protease from GW1 Isolated from Poultry Waste Site / S. Gaur, S. Agrahari, N. Wadhwa // *Open Microbiology Journal*. - 2010. - Vol. 4 - № 1. - P. 67–74.

90. Hsiao, N.W. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R / N.W. Hsiao, S. Agrahari, N. Wadhwa // *Electronic Journal of Biotechnology*. - 2014. - Vol. 17. - № 2. - P. 89–94.

91. Machado, A.R.G. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region / A.R.G. Machado, M. F. Simas Teixeira, L. de Souza Kirsh, M. Lourerio Campelo, O. M. de Aguar Oliveria // *Saudi Journal of Biological Sciences*. - 2016. - Vol. 23. - № 5. - P. 621–627.

92. Khademi, F. Optimization of fungal rennet production by local isolate of *Rhizomucor nainitalensis* under solid substrate fermentation system / F. Khademi, S. Abachi, A. Mortazavi, M. Ehsani // *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. – 2013. – Vol. 5. – №. 2. – C. 115-121.

93. Chellappan, S. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation / S. Chellappan, J. C, S. Basheer // *Process Biochemistry*. - 2006. - Vol. 41. - № 4. - P. 956–961.

94. Agrawal, D. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis / D. Agrawal, P. Patidar, T. Banerjee, S. Patil // *Process Biochemistry*. - 2005. - Vol. 40. - № 3–4. - P. 1131–1136.

95. Sindhu, R. Optimization of process parameters for the production of alkaline protease from *Penicillium godlewskii* SBSS 25 and its application in detergent industry / R. Sindhu, G. N. Suprabha, S. Shashidhar // *African Journal of Microbiology Research* – 2009. – Vol. 3. – №. 9. – C. 515-522.

96. Bajaj, B.K. Sharma P. An alkali-thermotolerant extracellular protease from a newly isolated *Streptomyces* sp. DP2 / B. K. Bajaj, P. Sharma // *New Biotechnology*. - 2011. - Vol. 28. - № 6. - P. 725–732.

97. Hajji, M. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1 / M. Hajji, S. Kanoun, M. Nasri, N. Gharsallah // *Process Biochemistry*. - 2007. - Vol. 42. - № 5. - P. 791–797.

98. Галиев, А. Р. Молочные продукты с повышенной антиоксидантной активностью / А. Р. Галиев, А. М. Джаманбаева // *Известия Кыргызского государственного технического университета им. И. Раззакова*. – 2016. – № 4(40). – С. 85-90.

99. Будкевич, Р. О. Определение антиоксидантной активности в молочных продуктах / Р. О. Будкевич, Н. М. Федорцов // *Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством*. – 2020. – Т. 1, № 1(1). – С. 73-78. – DOI 10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-73-78.

100. Niki, E. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects / E. Niki, Y. Yoshida, Y. Saito, N. Noguchi // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2005. - Vol. 338. - № 1. - P. 668–676.

101. Stadtman, E.R. Protein Oxidation and Aging / E. R. Stadtman // *Science*. - 1992. - Vol. 257. - № 5074. - P. 1220–1224.

102. Штерман, С.В. Антиоксиданты в спортивном питании. Часть II / С. В. Штерман, М. Ю. Сидоренко, В. С. Штерман, Ю. И. Сидоренко // *Пищевая промышленность*. – 2019. – № 6. – С. 30-34. – DOI 10.24411/0235-2486-2019-10084.

103. Гуревич, М.А. Хронические обструктивные заболевания легких, артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца: особенности патогенеза, клинической картины, терапии / М. А. Гуревич, Е. В. Долгова, Н. А. Кузьменко // *Русский медицинский журнал*. - 2016. Т. 24. - № 16. - С. 1098–1102.

104. Сальков, В.Н. Изменение содержания меди и цинка в структурах головного мозга при болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера / В. Н. Сальков, Р. М. Худоерков // *Клиническая и экспериментальная морфология*. - 2020. Т. 9. - № 3. - С. 21–26.

105. Peng, X. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase / X. Peng, B. Kong, X. Xia, Q. Lui // *International Dairy Journal*. - 2010. - Vol. 20. - № 5. - С. 360–365.

106. Hernández-Ledesma, B. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS / B. Hernández-Ledesma, A. Davalos, B. Bartolome, L. Amigo // *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. - 2005. - Vol. 53. - № 3. - P. 588–593.

107. Остапчук, П.С. Роль антиоксидантов и использование их в животноводстве и птицеводстве (обзор) / П. С. Остапчук, Д. В. Зубоченко, Т. А. Куевда // *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. - 2019. - Т. 20. - № 2. - С. 103–107.

108. Pandey, M. Kapila. R., Kapila S. Osteoanabolic activity of whey-derived antioxidative (MHIRL and YVEEL) and angiotensin-converting enzyme inhibitory (YLLF, ALPMHIR, IPA and WLAHK) bioactive peptides / M. Pandey, R. Kapila, S. Kapila // *Peptides*. - 2018. - Vol. 99. - P. 1–7.

109. Kong, S. Milk Protein-Derived Antioxidant Tetrapeptides as Potential Hypopigmenting Agents / S. Kong, H. R. Choi, Y.J. Kim, Y. S. Lee, K. C. Park, S.Y. kwak // *Antioxidants*. - 2020. - Vol. 9. - № 11. - P. 1106.

110. Serda, M. Synteza i aktywność biologiczna nowych analogów tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza / M. Serda // *Uniw. śląski ed. G. Balint et al. Uniwersytet Śląski. Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii*, 2013. P. 343–354. (дата обращения: 02.06.2022). doi:10.2/JQUERY.MIN.JS

111. Contreras, M. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology / M. Contreras, B. Hernandez-Ledesma, L. Amigo, P. J. Martin-Alvarez // *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. - 2011. - Vol. 44. - № 1.- P. 9–15.

112. Zhou, D.Y. In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera / D. Y. Zhou, B. W. Zhu, L. Qiao, H. T. Wu // *Food and Bioproducts Processing*. - 2012. - Vol. 90. - № 2. - P. 148–54.

113. Харитонов В.Д. Влияние нового кисломолочного продукта с гидролизатом сывороточных белков на переносимость и динамику проявлений



атопического дерматита у детей с аллергией на белки коровьего молока [Текст] / В.Д. Харитонов, Е.Ю. Агаркова, А. Г. Кручинин, К. А. Рязанцева, О. В. Королева, Т. В. Федорова, Е.А. Зверева, Т. В. Тяжелова, Л. Г. малашенок, В. А. Ревякина, О. В. Георгиева, Н. В, Пономарева, Е. И. Мельникова, Г. Ю. Лаптев, Л. А. Ильина // Вопросы питания. – 2015. - № 5. С. 56-63.

114. Курченко, В.П. Снижение аллергенных свойств белков молока. Технологические подходы / В.П.Курченко, Т.Н. Головач, В.И. Круглик, В.Д. Харитонов, Е.Ю. Агаркова // Молочная промышленность. – 2012. – №4. – С. 73-75.

115. García, J.M. Peptidomic analysis of whey protein hydrolysates and prediction of their antioxidant peptides / J. M. Garcia, C. Udenigwe, J. Duitama, A. F. Gonzalez Barrios // Food Science and Human Wellness. - 2022. - Vol. 11. - № 2. - P. 349–355.

116. Просеков, А. Ю. Теоретическое обоснование и технологические принципы формирования молочных пенообразных дисперсных систем: дис ... докт. техн. наук : 05.18.04 / Просеков Александр Юрьевич. – Кемерово., 2004. – 472 с.

117. Sadat, L. Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine  $\alpha$ -lactalbumin / L. Sadat, C. K. Celine, M. A. N'Negue, J. L. Gaillard // International Dairy Journal. - 2011. - Vol. 21. - № 4. - P. 214–221.

118. Power, O. Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of  $\beta$ -lactoglobulin // J. Funct. Foods. Elsevier, 2014. Vol. 9, № 1. P. 38–47.

119. Zhang, Q.X. Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS / Q. X. Zhang, H. Wu, Y. F. Ling, R. R. Lu // Journal of Dairy Research. - 2013. - Vol. 80. - № 3. - P. 367–373.

120. Hernández-Ledesma, B. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of synthetic  $\beta$ -lactoglobulin peptide sequences / B. Hernández-Ledesma, M. Miguel, L. Amigo, M. A. Aleixandre // Journal of Dairy Research. - 2007. - Vol. 74. - № 3. - P. 336–339.

121. Pihlanto-Leppälä, A. Rokka T., Korhonen H. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins / A. Pihlanto-Leppälä,

S. Y. Park, A. Atwal, B. F. Gibbs // *Journal of Food Biochemistry*. - 1998. - Vol. 8. - № 4. - P. 325–331.

122. Rossini, K. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat / K. Rossini, C. Norena, F. Cladera-Olivera, A. Brandelli // *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. - 2009. - Vol. 42. - № 4. - P. 862–867.

123. Haque, E. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins / E. Haque, R. Chand // *European Food Research and Technology*. - 2008. - Vol. 227. - № 1. - P. 7–15.

124. Ferreira, S.H. Isolation of Bradykinin-Potentiating Peptides from Bothrops jararaca Venom / S.H. Ferreira, D.C. Bartelt, L.J. Greene // *Biochemistry*. - 1970. - Vol. 9. - № 13. - P. 2583–2593.

125. Ondetti, M.A. Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: New Class of Orally Active Antihypertensive Agents / M.A. Ondetti, B. Rubin, D.W. Cushman // *Chemistry, Biology*. - 1977. - Vol. 4288. - № 196. - P. 441–444.

126. Bougatef, A. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases / A. Bougatef, N. n. Arroume, R. Ravallec-Ple, Y. Leroy // *Food Chemistry*. - 2008. - Vol. 111. - № 2. - P. 350–356.

127. Nasri, M. Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review / M. Nasri // *Advances in Food and Nutrition Research*. - 2017. - Vol. 81. - P. 109–159.

128. Erdmann, K. Cheung B.W.Y., Schröder H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease / K. Erdmann, B. W. Y. Cheyng, H. Schroder // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. - 2008. - Vol. 19. - № 10. - P. 643–654.

129. Costa, E. Effect of intraperitoneally administered hydrolyzed whey protein on blood pressure and renal sodium handling in awake spontaneously hypertensive rats / E. Costa, A. Almeida, F. M. Netto, J. A.R. Gontij// *Brazilian journal of medical and biological research*. - 2005. - Vol. 38. - № 12. - P. 1817–1824.

130. Pan, D. Optimization of sour milk fermentation for the production of ACE-inhibitory peptides and purification of a novel peptide from whey protein hydrolysate / D. Pan, Y. Guo // *International Dairy Journal*. - 2010. - Vol. 20. - № 7. - P. 472–479.

131. Tavares, T. Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes / T. Tavares, M. del Mar Contreras, M. M. Amorim, M. Pintado // *Peptides*. - 2011. - Vol. 32. - № 5. - P. 1013–1019.

132. Tavares, T.G. Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *Cynara cardunculus* / T.G. Tavares, K. M. Monteiro, A. Possenti, M. Pintado // *International Dairy Journal*. - 2011. - Vol. 21. - № 12. - P. 934–939.

133. Abubakar, A. Structural Analysis of New Antihypertensive Peptides Derived from Cheese Whey Protein by Proteinase K Digestion / A. Abubakar, T. Saito, H. Kitazawa, Y. Kawai, T. Itoh // *Journal of Dairy Science*. - 1998. - Vol. 81. - № 12. - P. 3131–3138.

134. Otte, J. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis / J. Otte, S. Shalaby, M. Zakora, M. S. Nielsen // *International Dairy Journal*. - 2007. - Vol. 17. - № 12. - P. 1460–1472. DOI:10.1016/j.idairyj.2007.04.008

135. Агаркова, Е.Ю. Актуальность получения антигипертензивных пептидов из молочной сыворотки / Е.Ю. Агаркова, Н.Е. Шерстнева // *Пищевая промышленность*. –2020. - №11 - С.179-185. DOI:10.36718/1819-4036-2020-8-179-185.

136. Mullally, M.M. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine  $\beta$ -lactoglobulin / M. M. Mullally, H. Meisel, R. J. Fitzgerald // *FEBS Letters*. - 1997. - Vol. 402. - № 2–3. - P. 99–101.

137. Jones, F.S. Simms H.S. The bacterial growth inhibitor (lactenin) of milk : i. the preparation in concentrated form / F. S. Jones, H. S. Simms // *Journal of Experimental Medicine*. - 1930. - Vol. 51. - № 2. - P. 327.

138. Hernández-Ledesma, B. et al. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits / B. Hernández-Ledesma, M. J. Garcia-Nebot, S. Fernandez-Tome, L. Amigo // *International Dairy Journal*. - 2014. - Vol. 38. - № 2. - P. 82–100.

139. Chatterton, D.E.W. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin—Technological implications for processing / D.E.W. Chatterton, G. Smithers, P. Roupas, A. Brodkorb // *International Dairy Journal*. - 2006. - Vol. 16. - № 11. - P. 1229–1240.

140. Demers-Mathieu, V. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration / V. Demers-Mathieu, S. F. Gauthier, M. Britten, I. Fliss // *International Dairy Journal*. - 2013. - Vol. 28. - № 2. - P. 94–101.

141. Théolier J. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate / J. Théolier, R. Hammami, P. Labelle, I. Fliss // *Journal of Functional Foods*. - 2013. - Vol. 5. - № 2. - P. 706–714.

142. Pellegrini, A. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule / A. Pellegrini, U. Thomas, N. Bramaz, P. Hunziker, R. von Fellenberg // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. - 1999. - Vol. 1426. - № 3. - P. 439–448.

143. Pellegrini, A. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine  $\beta$ -lactoglobulin / A. Pellegrini, U. Thomas, N. Bramaz, P. Hunziker, R. von Fellenberg // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. - 2001. - Vol. 1526. - № 2. - P. 131–140.

144. Oevermann, A. The antiviral activity of naturally occurring proteins and their peptide fragments after chemical modification / A. Oevermann, M. Engles, U. Thomas, A. Pellegrini // *Antiviral Research*. - 2003. - Vol. 59. - № 1. - P. 23–33.

145. Biziulevičius, G.A. Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a ‘cause and effect’ theory of bifunctionality / G.A. Biziulevičius, O. V. Kislukhina, J. Kazlauskaitė, V. Zukaite // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. - 2006. - Vol. 46. - № 1. - P. 131–138.

146. Pihlanto-Leppälä, A. The effect of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103 / A. Pihlanto-Leppälä,

P. Marnila, L. Hubert, T. Rokka, H. J. Korhonen, M. Karp // *Journal of Applied Microbiology*. -1999. - Vol. 87. - № 4. - P. 540–545.

147. Benkerroum, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review / N. Benkerroum // *International Journal of Dairy Technology*. - 2010. - Vol. 63. - № 3. - P. 320–338.

148. Sibel, A. A. Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals / A. A. Sibel // *Trends in Food Science & Technology*. - 2014. - Vol. 36. - № 2. - P. 79–95. DOI:10.1016/j.tifs.2014.01.002

149. Агаркова, Е.Ю. Противодиабетическая активность белков молочной сыворотки / Е.Ю. Агаркова, К.А. Рязанцева, А.Г. Кручинин // *Техника и технология пищевых производств*. – 2020. – Т. 50.- №5. – С.26-27. DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-2-306-318>.

150. Kahn, S.E. Cooper M.E., Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future / S. E. Kahn, M. E. Cooper, S. Del Prato // *Lancet*. - 2014. - Vol. 383. - № 9922. - P. 1068–1083.

151. Jakubowicz, D. Froy O. Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and Type 2 diabetes / D. Jakubowicz, O. froy // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. - 2013. - Vol. 24. - № 1. - P. 1–5. DOI:10.1016/j.jnutbio.2012.07.008

152. Gaudel, C. A Whey Protein Hydrolysate Promotes Insulinotropic Activity in a Clonal Pancreatic  $\beta$ -Cell Line and Enhances Glycemic Function in ob/ob Mice / C. Gaudel, A. B. Nongonierma, S. Maher, S. Flynn, M. Krause, B. A. Murray, P. M. Kelly, A. W. Baird, R. J. FitzGerald, P. Newsholme // *The Journal of Nutrition*. - 2013. - Vol. 143. - № 7. - P. 1109–1114.

153. Nongonierma, A.B. FitzGerald R.J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: Influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food–drug interaction / A. B. Nongonierma, R. J. FitzGerald // *Peptides*. - 2013. - Vol. 32. - № 1. - P. 33–39.

154. Juillerat-Jeanneret, L. Dipeptidyl peptidase IV and its inhibitors: Therapeutics for type 2 diabetes and what else? / L. Juillerat-Jeanneret // *Journal of Medicinal Chemistry*. - 2014. - Vol. 57. - № 6. - P. 2197–2212.

155. Nongonierma, A.B. Milk protein isolate (MPI) as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides / A. B. Nongonierma, M. Lalmahomed, S. Paolella, R. J. FitzGerald // *Food Chemistry*. - 2017. - Vol. 231. - P. 202–211.

156. Nongonierma, A.B. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides / A. B. Nongonierma, R.J. FitzGerald // *Food and Function*. - 2013. - Vol. 5. - № 4. - P. 1909–1917.

157. Power, O. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes / O. Power, A. B. Nongonierma, // *The Proceedings of the Nutrition Society*. - 2014. - Vol. 73. - № 1. - P. 34–46.

158. Lacroix, I.M.E., Li-Chan E.C.Y. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates / I.M.E. Lacroix, E. C. Y. Li-Chan // *International Dairy Journal*. - 2012. - Vol. 25. - № 2. - P. 97–102.

159. Uchida, M. Novel Dipeptidyl Peptidase-4-Inhibiting Peptide Derived From  $\beta$ -Lactoglobulin / M. Uchida, Y. Ohshiba, O. Mogami // *Journal of Pharmacological Sciences*. - 2011. - Vol. 117. - № 1. - P. 63–66.

160. Silveira, S.T. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in  $\beta$ -lactoglobulin / S. T. Silveira, D. Martinez-Maqueda, I. Recio, B. Hernandez-Ledesma // *Food Chemistry*. - 2013. - Vol. 141. - № 2. - P. 1072–1077.

161. Lacroix, I.M.E. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins / I.M.E. Lacroix, E.C.Y. Li-Chan // *Peptides*. - 2014. - Vol. 54. - P. 39–48.

162. Tulipano, G. Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors / G. Tulipano, V. Sibilìa, A. M. Caroli, D. Cocchi // *Peptides*. - 2011. - Vol. 32. - № 4. - P. 835–838.

163. Lacroix, I.M.E., Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and  $\alpha$ -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins / I.M.E. Lacroix, E.C.Y. Li-Chan // *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. - 2013. - Vol. 61. - № 31. - P. 7500–7506.

164. Torkova, A.A. Physicochemical and functional properties of Cucurbita maxima pumpkin pectin and commercial citrus and apple pectins: A comparative evaluation / A. A. Torkova, K. V. Lisitskaya, I. S. Filimonov, O. A. Glazunova, G. S. Kachalova, V.N. Golubev, T. V. Fedorova // *PLOS ONE*. - 2018. - Vol. 13. - № 9. P. - e0204261.

165. Chalamaiah, M. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review / M. Chalamaiah, W. Yu, J. Wu // *Food Chemistry*. - 2018. - Vol. 245. - P. 205–222.

166. Cencič, A. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology — A review / A. Cencič, T. Langerholc // *International Journal of Food Microbiology*. - 2010. - Vol. 141. - P. S4–S14.

167. Samaranayaka, A.G.P. Antioxidative and Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Potential of a Pacific Hake (*Merluccius productus*) Fish Protein Hydrolysate Subjected to Simulated Gastrointestinal Digestion and Caco-2 Cell Permeation / A.G.P. Samaranayaka, D.D. Kitts, E.C.Y. Li-Chan // *Journal of Agriculture and Foods Chemistry*. - 2010. - Vol. 58. - № 3. - P. 1535–1542.

168. Lazidis, A. Whey protein fluid gels for the stabilisation of foams / A. Lazidis, R. D. Hancocks, F. Spyropoulos, M. Kreub // *Food Hydrocolloids*. - 2016. - Vol. 53. - P. 209–217.

169. Dombrowski, J. Correlation between bulk characteristics of aggregated  $\beta$ -lactoglobulin and its surface and foaming properties / J. Dombrowski, F. Joner, M. Warncke, U. Kulozik // *Food Hydrocolloids*. - 2016. - Vol. 61. - P. 318–328.

170. Cao, Y. Interfacial properties of whey protein foams as influenced by preheating and phenolic binding at neutral pH / Y. Cao, Y. Xiong, Y. Cao, A. D. True // *Food Hydrocolloids*. - 2018. - Vol. 82. - P. 379–387.

171. Анализ состава и технологических свойств молока: учебно-методическое пособие / составители В. А. Рудакова [и др.]. — Архангельск: САФУ,

2017. — 109 с. — ISBN 978-5-98450-516-1. — Текст: электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/161835>.

172. Ho, T.M., Bhandari B.R., Bansal N. Functionality of bovine milk proteins and other factors in foaming properties of milk: a review / T. M. Ho, B. R. Bhandari, N. Bansal // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. - 2021. - P. 1–21.

173. Hinderink, E.B.A. Behavior of plant-dairy protein blends at air-water and oil-water interfaces / E.B.A. Hinderink, L. Sagis, K. Schroen, C. C. Berton- Carabin // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. - 2020. - Vol. 192. - P. 111015.

174. Huppertz, T. Foaming properties of milk: A review of the influence of composition and processing / T. Huppertz // *International Journal of Dairy Technology*. - 2010. - Vol. 63. - № 4. - P. 477–488.

175. Lajnaf, R. Foaming and air-water interfacial properties of camel milk proteins compared to bovine milk proteins / R. Lajnaf, L. Picart-Palmade, H. Attia, S. Marchesseau, M. A. Ayadi // *Food Hydrocolloids*. - 2022. - Vol. 126. - P. 107470.

176. Ho, K.K.H.Y. Physicochemical stability of lycopene-loaded emulsions stabilized by plant or dairy proteins / K.K.H.Y. Ho, K. Schroen, M. F. S. Martin-Gonzalez, C. C. Berton-Carabin // *Food Structure*. - 2017. - Vol. 12. - P. 34–42.

177. Hill, C. Foams: From nature to industry / C. Hil, J. Eastoe // *Advances in Colloid and Interface Science*. - 2017. - Vol. 247. - P. 496–513.

178. Britten, M. and Lavoie, L., Foaming properties of proteins as affected by concentration, *Journal of Food Science*. - 1992. - Vol. 57. - №5. - P. 1219-1241.

179. Tamm, F. Pendant drop tensiometry for the evaluation of the foaming properties of milk-derived proteins / G. Sauer, M. Scampicchio, S. Drusch // *Food Hydrocolloids*. - 2012. - Vol. 27. - № 2. - P. 371–377.

180. Falco, C. Y. Edible foam based on Pickering effect of probiotic bacteria and milk proteins / C. Y. Falco, X. Geng, M. Cardenas, J. Risbo // *Food Hydrocolloids*. - 2017. - Vol. 70. - P. 211–218.

181. Dachmann, E. Surface and foaming properties of potato proteins: Impact of protein concentration, pH value and ionic strength / E. Dachmann, V. Noibs, U. Kulozik, J. Dombrowski // *Food Hydrocolloids*. - 2020. - Vol. 107. - P. 105981.



182. Монахова, Ю. Б. Использование хемометрических алгоритмов для контроля качества молока методом рН-метрического титрования / Ю. Б. Монахова, И. В. Кузнецова // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2019. – Т. 19, № 4. – С. 387-395. – DOI 10.18500/1816-9775-2019-19-4-387-395.
183. Подорожная, И. В. Анализ некоторых физико-химических показателей питьевого молока после введения новых требований к его кислотности / И. В. Подорожная, С. С. Ветохин // Труды БГТУ. №4. Химия, технология органических веществ и биотехнология. – 2016. – № 4(186). – С. 182-187.
184. Vafin, R.R.  $\kappa$ -casein polymorphism effect on technological properties of dried milk / R. R. Vafin, I. A. Radaeva, A. G. Kruchinin, E. E. Illarionova, A. V. Bigaeva, S. N. Turovskaya, G. A. Belozarov, K. K. Gilmanov, E. A. Yurova // *Foods Raw Materials*. - 2021. - Vol. 9. - № 1. - P. 95–105.
185. Горлов, И. Ф. Развитие технологий раскисления молока и молочных продуктов путем электрообработки с целью повышения их качества / И. Ф. Горлов, И. М. Осадченко, Н. И. Мосолова, Е. С. Воронцова // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: Наука и высшее профессиональное образование. – 2018. – № 2(50). – С. 186-193.
186. Broyard, C. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge / C. Broyard, F. Gaucheron // *Dairy Science and Technology*. - 2015. - Vol. 95. - № 6. - P. 831–862.
187. Zhao, X. Influence of calcium on the properties of micellar casein in goat milk / X. Zhao // *LWT*. - 2021. - Vol. 150. - P. 111935.
188. Zhou, B. Interfacial properties of milk proteins: A review / B. Zhou, J. T. Tobin, S. Drusch, S. A. Hogan // *Advances in Colloid and Interface Science*. - 2021. - Vol. 295. - P. 102347.
189. Augustin, M.A. Skim milk powders with enhanced foaming and steam-frothing properties / M. A. Augustin, P. T. Clarke // *Dairy Science and Technology*. - 2008. - Vol. 88. - № 1. - P. 149–161.

190. Ward, B.R. EDTA-induced dissociation of casein micelles and its effect on foaming properties of milk / B.R. Ward, S. J. Goddard, M. A. Augustin, I. R. McKinnon // *Journal of Dairy Research*. – 1997. - Vol. 64. - № 4. - P. 495–504.
191. Zhang, Z. Effect of pH and ionic strength on competitive protein adsorption to air/water interfaces in aqueous foams made with mixed milk proteins / Z. Zhang, D.G. Dalgleish, H.D. Goff // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. - 2004. - Vol. 34. - № 2. - P. 113–121.
192. Borchering, K. Effect of protein content, casein-whey protein ratio and pH value on the foaming properties of skimmed milk / K. Borchering, P.C.H.R. Lorenzen, W. Hoffmann // *International Journal of Dairy Technology*. - 2009. - Vol. 62. - № 2. - P. 161–169.
193. Phillips, L.G. pH and Heat Treatment Effects on Foaming of Whey Protein isolate / L.G. Phillips, W. Schulman, J.E. Kinsella // *Journal of Food Science*. - 1990. - Vol. 55. - № 4. - P. 1116–1119.
194. Dombrowski, J. Multiscale approach to characterize bulk, surface and foaming behavior of casein micelles as a function of alkalisation / J. Dombrowski, J. Dechau, U. Kulozik // *Food Hydrocolloids*. - 2016. - Vol. 57. - P. 92–102.
195. Имангалиева Ж.К. Технологические процессы тонкого измельчения творога // *Пищевые инновации в биотехнологии: Сборник тезисов VI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 16 мая 2018 года / Под общей редакцией А.Ю. Просекова. Том 1. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2018. – 402 с.*
196. Григорян М.А. К вопросу образования структуры пастообразных продуктов со сложным сырьевым составом // *Повышение качества и безопасности пищевых продуктов: Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции, Махачкала, 23–24 октября 2018 года. – Махачкала: Дагестанский государственный технический университет, 2018. – 276 с.*
197. Grynchenko, N. Development of technology for the production of semifinished products with an emulsion structure based on the decalcified dairy raw

materials / N. Grynchenko, D. Tyutyukova, P. Pyvovarov, O. Nagorny // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. - 2018. - Vol. 1. - P. 4–10.

198. Pein, D. Clawin-Rädecker I., Lorenzen P.C. Peptic treatment of beta-lactoglobulin improves foaming properties substantially / D. Pein, I. Clawin-Radecker, P. Chr. Lorenzen // Journal of Food Processing and Preservation. - 2018. - Vol. 42. - № 3. - P. e13543.

199. Sinha, R. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation / R. Sinha, R. Cheruppanpullil, J. Prakash, P. Kaultiku // Food Chemistry. - 2007. - Vol. 101. - № 4. - P. 1484–1491.

200. Chihi, M.L. Heat-Induced Soluble Protein Aggregates from Mixed Pea Globulins and  $\beta$ -Lactoglobulin / M.L. Chihi, J-L. Mession, N. Sok, R. Saurel // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2016. - Vol. 64. - № 13. - P. 2780–2791.

201. Bhagya, S. Srinivasan K.S. Effect of different methods of drying on the functional properties of enzyme treated groundnut flour / S. Bhagya, K. Srinivasan // Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - 1989. - Vol. 22. - P. 329.

202. Schröder, A. Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability / A. Schröder, C. C. Berton-Carabin, P. Venema, L. Cornacchia // Food Hydrocolloids. - 2017. - Vol. 73. - P. 129–140.

203. Tamm, F. Impact of enzymatic hydrolysis on the interfacial rheology of whey protein/pectin interfacial layers at the oil/water-interface / F. Tamm, S. Drusch // Food Hydrocolloids. - 2017. - Vol. 63. - P. 8–18.

204. Zhang, X. Covalent conjugation of whey protein isolate hydrolysates and galactose through Maillard reaction to improve the functional properties and antioxidant activity / X. Zhang, X. Li, L. Liu, L. Wang // International Dairy Journal. - 2020. - Vol. 102. - P. 104584.

205. Loveday, S.M. Whey protein nanofibrils: The environment-morphology-functionality relationship in lyophilization, rehydration, and seeding / S.M. Loveday, J. Su, M. Anandha Rao, S. G. Anema, H. Singh // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2012. - Vol. 60. - № 20. - P. 5229–5236.

206. Mohammadian, M. Madadlou A. Characterization of fibrillated antioxidant whey protein hydrolysate and comparison with fibrillated protein solution / M. Mohammadian, A. Madadlou // *Food Hydrocolloids*. - 2016. - Vol. 52. - P. 221–230.
207. Oboroceanu, D. Fibrillization of whey proteins improves foaming capacity and foam stability at low protein concentrations / D. Oboroceanu, L. Wang, M. A. E. Auty // *Journal of Food Engineering*. - 2014. - Vol. 121. - № 1. - P. 102–111.
208. Taco, N.  $\beta$ -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications / N. Taco, M. Britten, C. Schmitt // *Food Hydrocolloids*. - 2011. - Vol. 25. - № 8. - P. 1945–1962.
209. Авершина, А.С. Исследование фракционного состава белков гидролизованного обезжиренного молока / А. С. Авершина, С. А. Соколов // *Вестник ЛНУ имени Тараса Шевченко*. - 2019. - № 3. - С. 5–8.
210. Барсуков, А.К. Методологические проблемы биологии-биотехнологии / А. К. Барсуков, А. И. Кузнецов, О. Ю. Нестерова, Х. Х. Шарафуллин, И. А. Якушев // *Актуальная биотехнология*. - 2018. - Т 3. - № 26. - С. 90–94.
211. Ma, S. Changes in structure and antioxidant activity of  $\beta$ -lactoglobulin by ultrasound and enzymatic treatment / S. Ma, C. Wang, M. Guo // *Ultrasonics Sonochemistry*. - 2018. - Vol. 43. - P. 227–236.
212. Leeb, E. Tryptic hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin: A generic approach to describe the hydrolysis kinetic and release of peptides / E. Leeb, T. Stefan, T. Letzel, J. Hinrichs, U. Kulozik // *International Dairy Journal*. - 2020. - Vol. 105. - P. 104666.
213. Липатов, Н.Н. Воздух в молоке и молочных продуктах / Н.Н. Липатов К.И. Тарасов // *Известия вузов, Пищевая технология*. – 1983. - № 4. С. 74-90.
214. Du, Q. The complex of whey protein and pectin: Interactions, functional properties and applications in food colloidal systems – A review / Q. Du, L. Zhou, F. Lyu, J. Liu, Y. Ding // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. - 2022. - Vol. 210. P. 12253
215. Wagoner, T.B. Whey protein–pectin soluble complexes for beverage applications / T. B. Wagoner, E.A. Foegeding // *Food Hydrocolloids*. - 2017. - Vol. 63. - P. 130–138.

216. Xu, D. Impact of whey protein – Beet pectin conjugation on the physicochemical stability of  $\beta$ -carotene emulsions / D. Xu, X. Wang, J. Jiang, F. Yuan, Y. Gao // *Food Hydrocolloids*. - 2012. - Vol. 28. - № 2. - P. 258–266.

217. Prosekov, A. Properties of Carboxymethylcellulose as Vegetative Analogue to Pharmaceutical Gelatin / A. Prosekov, E. Ulrikh, O. Kozlova, L. Dishluk, A. Arkhipov // *Advances in Environmental Biology*. - 2014. - Vol. 8. - № 10. - P. 290–294.

218. Сарафанова Л. А. ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ: ЭНЦИКЛОПЕДИЯ. - Санкт-Петербург: ГИОРД, 2004. - 208 с.

219. Сарафанова Л. А. Применение пищевых добавок в молочной промышленности. - Санкт-Петербург: Профессия, 2010. - 224 с.

220. Kouhdasht, A. M. Gelatin production using fish wastes by extracted alkaline protease from *Bacillus licheniformis* / A. M. Kouhdasht, M. Moosavi-Nasab, M. Aminlari // *Journal of Food Science and Technology*. - 2018. - Vol. 55. - № 12. - P. 5175–5180.

221. Fan, L. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings / L. Fan, H. Yang, J. Yang, M. Peng, J. Hu // *Carbohydrate Polymers*. - 2016. - Vol. 146. - P. 427–434.

222. Jongjareonrak, A. Chemical compositions and characterisation of skin gelatin from farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) / A. Jongjareonrak, S. Rawdkuen, M. Chaijan, S. Benjakul, K. Osako, M. Tanaka // *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. - 2010. - Vol. 43. - № 1. - P. 161–165.

223. Jellouli, K. Chemical composition and characteristics of skin gelatin from grey triggerfish (*Balistes capriscus*) / K. Jellouli, R. Balti, A. Bougatef, N. Hmidet, A. Barkia // *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. - 2011. - Vol. 44. - № 9. - P. 1965–1970.

224. The investigation of the physical-chemical and functional properties of fish gelatin from warm-water fish (tilapia) // Library and learning services. Open research URL: <https://openresearch.surrey.ac.uk/esploro/outputs/doctoral/The-investigation-of-the-physical-chemical-and/99516102102346> (дата обращения: 03.04.2022).

225. Агарков, А.А. Разработка технологии сквашенного напитка на основе ультрафильтрационного концентрата сывороточных белков: специальность 05.18.04 “Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств: дисс. ... канд. техн. наук: 05.18.04 / Агарков Александр Александрович. – М., 2021. – 121 с.

226. Хабилова, И. С. Современные виды стабилизаторов для формирования консистенции кисломолочных продуктов / И. С. Хабилова // Инновации в пищевой биотехнологии: сборник тезисов VII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 14 мая 2019 года / Кемеровский государственный университет. Том 1. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2019. – С. 196-198.

227. Неповинных, Н.В. Исследование структурных и физико-химических свойств маршмеллоу без желатина / Н. В. Неповинных, Ю. А. Кодацкий, О. Н. Ключкина, Н. М. Птичкина, С. Еганехзад // Индустрия питания. – 2018. – Т. 3, № 4. – С. 39-44. – DOI 10.29141/2500-1922-2018-3-4-4.

228. Thombare, N. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review / N. Thombare, U. Jha, S. Mishra, M. Z. Siddiqui // International Journal of Biological Macromolecules. - 2016. - Vol. 88. - P. 361–372. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.001

229. Galante, M. Microstructural and textural properties of rennet-induced milk protein gel: Effect of guar gum / M. Galante, V. Boeris, E. M. Alvarez, P. H. Risso // International Journal of Food Properties. - 2018. - Vol. 20. - P. S2569–S2578. DOI:10.1080/10942912.2017.1375513

230. Goeda, D. V. Gum and Its Pharmaceutical and Biomedical Applications / D. V. Goeda, K. M. Manjunath, Anjali, P. Kumar, A. Srivastava, R. A. Osmani, C. Shinde, S. Hatna // Advanced Science, Engineering and Medicine. - 2016. - Vol. 8. - № 8. - P. 589–602.

231. Amaral, T.N. Blends of Pereskia aculeata Miller mucilage, guar gum, and gum Arabic added to fermented milk beverages / T. N. Amaral, L. A. Junqueira, M/ E. T.

Prado, M. A. Cirillo, L. R. de Abreu, F. F. Costa, J. V. de Resende // *Food Hydrocolloids*. - 2018. - Vol. 79. - P. 331–342.

232. Mudgil, D. Influence of partially hydrolyzed guar gum as soluble fiber on physicochemical, textural and sensory characteristics of yoghurt / D. Mudgil // *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. - 2018. - Vol. 8. - № 2. - P. 794–797.

233. Mudgil, D. Development of functional yoghurt via soluble fiber fortification utilizing enzymatically hydrolyzed guar gum / D. Mudgil, S. Barak, B.S Khatkar // *Food Bioscience* - 2016. - Vol. 14. - P. 28–33.

234. Рогов, И. А. Пищевые продукты нового поколения / И. А. Рогов, Е. И. Титов, Л. Ф. Митасева, В. А. Алексапхина, Н. Г. Кроха // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. – 1995. – №. 1-2. – С. 59-61.

235. Нечаев А.П., Кочеткова А.А. Зайцев А.Н. Пищевые добавки. - Москва: Колосс, 2001. - 256 с.

236. Glicksman M. *Food Hydrocolloids*. - New York: CRC Press, 2020. - 248 с.

237. Булдаков А. С. Пищевые добавки. - Москва: ДеЛи принт, 20203. - 435 с.

238. Kabziński, M. The impact of addition of xanthan gum and guar gum on rheological properties of foams produced by continuous method / M. Kabziński, K. Neupauer, M. Nowak, J. Kruk, K. Kaczmarczyk // *Polimery*. - 2019. - Vol. 64. - № 6–7. - P. 538–541.

239. Горлов, И.Ф. Влияние растительных компонентов на свойства творожных десертов / И. Ф. Горлов, М. И. Сложенкина, С. П. Полозова, Н. И. Мосолова // *Пищевая промышленность*. – 2019. – № 9. – С. 21-23. – DOI 10.24411/0235-2486-2019-10137.

240. Šeremet, D. Challenges in confectionery industry: Development and storage stability of innovative white tea-based candies / D. Šeremet, A. Mandura, A. Vojvodić Cebin, A. Martinić, K. Galić, D. Komes // *Journal of Food Science*. - 2020. - Vol. 85. - № 7. - P. 2060–2068. doi: 10.1111/1750-3841.15306.

241. Bajić, B. Process model economics of xanthan production from confectionery industry wastewaters / B. Bajić, D. G. Vučurović, S. N. Dodić, J. A.

Grahovac, J. M. Dodić // Journal of Environmental Management. - 2017. - Vol. 203. - P. 999–1004.

242. Tsykhanovska, I. Technology of Confectionery Products Using Magnetofood as a Food Additive / I. Tsykhanovska // Bioenhancement Fortif. Foods a Heal. Diet. - 2022. - P. 47–66.

243. Cruciata, M. Formation and characterization of early bacterial biofilms on different wood typologies applied in dairy production / M. Cruciata, R. Gaglio, M. L. Scatassa, G. Sala, C. Cardamone, M. Palmeri, G. Moschetti, T. La Mantia, L. Settanni // Applied and Environmental Microbiology. - 2018. - Vol. 84. - № 4. doi: 10.1128/AEM.02107-17.

244. Montcho, M. Variation of nutritional and microbiological properties of milk in relation to climate adaptation strategies across dairy production systems in West Africa / M. Montcho, E. A. Padonou, M. Hounbedji, M. Montcho, M. N. Matua, B. Sinsin // International Dairy Journal - 2021. - Vol. 122. - P. 105144.

245. Colombo, M. Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production 06 Biological Sciences 0605 Microbiology / M. Colombo, N. P. A. Castilho, S. D. Todorov, L. A. Nero // BMC Microbiology. - 2018. - Vol. 18. - № 1. - P. 1–12.

246. Homayouni, A. Advanced Methods in Ice Cream Analysis: a Review / A. Homayouni, M. Javadi, F. Ansari, H. Pourjafar, M. Jafarzadeh, A. Barzegar // Food Analytical Methods. - 2018. - Vol. 11. - № 11. - P. 3224–3234.

247. Dertli, E. Development of a fermented ice-cream as influenced by in situ exopolysaccharide production: Rheological, molecular, microstructural and sensory characterization / E. Dertli, O. S. Toker, M. Z. Durak, M. T. Yilmaz, N. B. Tatlisu, O. Sagdic, H. Cankurt // Carbohydrate Polymers. - 2016. - Vol. 136. - P. 427–440.

248. Голубев В. Н. Химия, технология, применение. - Москва: АТН, 1995. - 387 с.

249. Santos, E.E. Extraction of pectin from agroindustrial residue with an ecofriendly solvent: use of FTIR and chemometrics to differentiate pectins according to degree of methyl esterification / E. E. Santos, R. C. Amaro, C. C. C. Bustamante, M. H.



A. Guerra, L. C. Soares, R. E. S. Froes // *Food Hydrocolloids*. - 2020. - Vol. 107. - P. 105921.

250. Polanco-Lugo, E. Citrus pectin obtained by ultrasound-assisted extraction: Physicochemical, structural, rheological and functional properties / E. Polanco-Lugo, J. I. Martinez-Castillo, J. C. Cuevas-Bernardino, T. Gonzalez-Flores, R. Valdez, N. A. Pacheco Lopez, T. Ayora // *CyTA - Journal of Food*. - 2019. - Vol. 17. - № 1. - P. 463–471.

251. Liang, W. Physicochemical characteristics and functional properties of high methoxyl pectin with different degree of esterification / W. Liang, J. S. Liao, J. R. Qi, W. X. Jiang, X. Q. Yang // *Food Chemistry*. - 2022. - Vol. 375. - P. 131806.

252. Schmidt, U.S. Interfacial and emulsifying properties of citrus pectin: Interaction of pH, ionic strength and degree of esterification / U. S. Schmidt, L. Schütz, H.P. Schuchmann // *Food Hydrocolloids*. - 2017. - Vol. 62. - P. 288–298.

253. Артемова, Е. Н. Научные основы пенообразования и эмульгирования в технологии пищевых продуктов с растительными добавками: автореф. дис. ... д-ра. техн. наук: 05.18.16 / Артемова Елена Николаевна. - Санкт-Петербург, 1999. - 48 с.

254. Jiang, Y. Antioxidative pectin from hawthorn wine pomace stabilizes and protects Pickering emulsions via forming zein-pectin gel-like shell structure / Y. Jang, Y. Zhu, F. Li, J. Du, Q. Huang, D. Sun-Waterhouse // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2020. - Vol. 151. - P. 193–203.

255. Buathongjan, C. Studies on chemical composition, rheological and antioxidant properties of pectin isolated from Riang (*Parkia timoriana* (DC.) Merr.) pod / C. Buathongjan, K. Israkarn, W. Sangwan // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2020. - Vol. 164. - P. 4575–4582.

256. Sun, X. Cameron R.G., Bai J. Effect of spray-drying temperature on physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of pectin/sodium alginate microencapsulated carvacrol / X. Sun, R. Cameron, J. Bai // *Food Hydrocolloids*. - 2020. - Vol. 100. - P. 105420.

257. Patova, O.A. Structural, rheological and antioxidant properties of pectins from *Equisetum arvense* L. and *Equisetum sylvaticum* L. / O. A. Patova, V. V. Smirnov, V. V. Golovchenko, F. V. Vityazev, A. S. Shashkov, S. V. Popov // *Carbohydrate Polymers*. - 2019. - Vol. 209. - P. 239–249.

258. Doi, S. Bioactivity of alginetin, a caramelization product of pectin: Cytometric analysis of rat thymic lymphocytes using fluorescent probes / S. Doi, M. Kawamura, K. Oyama, T. Akamatsu, M. Mizobuchi, Y. Oyama, T. Masuda, N. Kamemura // *PLoS One*. - 2020. - Vol. 15. - № 11. - P. e0241290. doi: 10.1371/journal.pone.0241290.

259. Chen, Y. Ultrasound-assisted modified pectin from unripe fruit pomace of raspberry (*Rubus chingii* Hu): Structural characterization and antioxidant activities / Y. Chen, Y. Wang, L. Xu, N. Y. Jia, Z. Xue, M. Zhang, M. Phisalaphong, H. Chen // *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. - 2020. - Vol. 134. - P. 110007. DOI:10.1016/j.lwt.2020.110007

260. Bai, Y. Relations between digestibility and structures of pumpkin starches and pectins / Y. Bai, M. Zhang, S. Atluri, J. Chen, R. G. Gilbert // *Food Hydrocolloids*. - 2020. - Vol. 106. - P. 105894.

261. Košťálová, Z. Microwave-assisted extraction of pectin from unutilized pumpkin biomass / Z. Košťálová, M. Aguedo, Z. Hromádková // *Environmental Science*. - 2016. - Vol. 102. - P. 9–15.

262. Müller-Maatsch, J. Pectin content and composition from different food waste streams / J. Müller-Maatsch, M. Bencivenni, A. Caligiani, T. Tedeschi, G. Bruggeman, M. Montse Bosch, Janos Petrusan, B. V. Droogenbroeck, K. Elst, S. Sforza // *Food Chemistry*. - 2016. - Vol. 201. - P. 37–45.

263. Aldow, A. Effect of Soxhlet Method Extraction on Characterization of Pectin of Pumpkin Peels Extraction and assessment of pectin from pumpkin peels View project Effect of Freeze and Re-freeze on Chemical Composition of Beef and Poultry Meats at Storage Period View project Effect of Soxhlet Method Extraction on Characterization of Pectin of Pumpkin Peels / A. Aldow, R. Hamed, A. E. Elkhedir, E. Elkhedir, S. E. Mustafa

// Asian Journal of Natural Product Biochemistry. - 2018. - Vol. 3. - № 1. - P. 1–3. DOI <https://doi.org/10.13057/biofar/f160101>

264. Li, W. Effect of pectin oligosaccharide on quality control of quick-frozen pumpkin puree / W. Li, H. Wang, D. Yang, J. Liu, J. Wu, Y. Ge // Int. J. Food Sci. Technol. - 2022. - Vol. 57. - № 2. - P. 1061–1073.

265. Adler-Nissen, J. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid / J. Adler-Nissen // J. Agric. Food Chem. American Chemical Society. - 1979. - Vol. 27. - № 6. - P. 1256–1262. DOI: 10.1021/jf60226a042

266. Chen, L. A novel colorimetric determination of free amino acids content in tea infusions with 2,4-dinitrofluorobenzene / L. Chen, Qi, Chen, Z. Zhang, X. Wan // Journal of Food Composition and Analysis. - 2009. - Vol. 22. - № 2. - P. 137–141. DOI:10.1016/j.jfca.2008.08.007

267. Просеков, А.Ю. Получение ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки с использованием протеолитических ферментов / А. Ю. Просеков, Е. В. Ульрих, С. Ю. Носкова, В. Г. Будрик, С. Г. Ботина, Е. Ю. Агаркова, Е. И. Мельникова // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 6-5. – С. 1089-1093.

268. Головач, Т. Н. Влияние комплексообразования с  $\beta$ -циклодекстрином на антиоксидантные свойства пептидов сывороточных белков молока / Т. Н. Головач, Е. И. Тарун // Инновации в пищевой биотехнологии: Сборник трудов Международного симпозиума, Кемерово, 14–16 мая 2018 года / Под общей редакцией А.Ю. Просекова. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2018. – С. 144-147.

269. Carvalho N. caldeira de et al. Physicochemical changes and bitterness of whey protein hydrolysates after transglutaminase cross-linking / N. Carvalho, T. B. Pessato, F. N. Silva, M. N. Eberlin, J. H. Behrens, R. L. Zollner, F. M. Netto // Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. - 2019. - Vol. 113. - P. 108291.

270. Alim, A. Identification of bitter constituents in milk-based infant formula with hydrolysed milk protein through a sensory-guided technique // *Int. Dairy J.* Elsevier, 2020. Vol. 110. P. 104803.

271. Moon, J.K. Antioxidant Assays for Plant and Food Components / J. K. Moon, T. Shibamoto // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. - 2009. - Vol. 57. - № 5. - P. 1655–1666.

272. Лисицкая, К.В. Сравнительный анализ антиоксидантных свойств пектинов из различного растительного сырья на модельных клеточных системах / К. В. Лисицкая, А. А. Торкова, И. В. Николаев, Т. В. Федорова, М. А. Михалева, О. В, Королева // *Пищевая промышленность*. – 2012. - №12. - С. 64-66.

273. Aranda, A. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells / A. Aranda, L. Sequedo, L. Tolosa, G. Quintas, E. Burello, J. V. Castell, L. Gombau // *Toxicology in Vitro*. - 2013. - Vol. 27. - № 2. - P. 954–963.

274. Carmona, A. K. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay / A. K. Carmona, S. L. Schwager, M. A. Juliano, L. Juliano, E. D. Sturrock // *Nature Protocols*. - 2006. - Vol. 1. - № 4. - P. 1971–1976.

275. Alves, M.F. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity / M. F. Alves, M. C. Araujo, M. A. Juliano, E. M. Olivera, J. E. Krieger, D. E. Casarini, L. Juliano, A. K. Carmona // *Brazilian journal of medical and biological research*. - 2005. - Vol. 38. - № 6. - P. 861–868. DOI: 10.1590/s0100-879x2005000600007

276. Липатов, Н.Н. Аналитическое исследование кинетики процесса коагуляции белков молока / Н.Н. Липатов // *Труды ВНИМИ*. - 1978. - вып. 45. С. 66-76.

277. Липатов, Н.Н. Теоретический анализ влияния гомогенизации на структурообразование при кислотной коагуляции молока / Н.Н. Липатов К.И. Тарасов // – *Труды ВНИМИ*. – 1979. - вып. 47. С. 74-90.

278. Reddy, K.V.R. Yedery R.D., Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises / K. V. R. Reddy, R. D. Yedery, C. Aranha // *International Journal of Antimicrobial Agents*. - 2004. - Vol. 24. - № 6. - P. 536–547.

279. Агаркова, Е. Ю. Разработка технологии функциональных эмульсионных аэрированных продуктов на основе трансформации полипептидных комплексов : дис. ... канд. техн. наук : 05.18.04 / Агаркова Евгения Юрьевна. – М., 2014. – 156 с.

280. Saiga, A. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides in a Hydrolyzed Chicken Breast Muscle Extract / A. Saiga, T. Okumura, T. Makihara, S. Katsuta, T. Shimizu, R. Yamada, T. Nishimura // *Journal of Agricultural and Food Chemistr.* - 2003. - Vol. 51. - № 6. - P. 1741–1745.

281. Chiu, Y.J. Three methods for studying coupled vibration in a multi flexible disk rotor system / Y. J. Chiu, X. Y. Li, Y. C. Chen, S. R. jian, C. H. Yang, I. H. Lin // *J Journal of Mechanical Science and Technology*. - 2017. - Vol. 31. - № 11. - P. 5219–5229.

282. Perez, A.A. Foaming characteristics of  $\beta$ -lactoglobulin as affected by enzymatic hydrolysis and polysaccharide addition: Relationships with the bulk and interfacial properties / A. A. Perez, C. Sánchez, J. Patino, A. Rubiolo, L. Santiago // *Journal of Food Engineering*. - 2012. - Vol. 113. - № 1. - P. 53–60. DOI:10.1016/J.JFOODENG.2012.05.024

283. Girard, M. Turgeon S.L., Gauthier S.F. Quantification of the Interactions between  $\beta$ -Lactoglobulin and Pectin through Capillary Electrophoresis Analysis / M. Girard, S. L. Turgeon, S. F. Gauthier // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. - 2003. - Vol. 51. - № 20. - P. 6043–6049.

284. Ven, C. Biochemical and functional characterization of casein and whey protein hydrolysates: A study on the correlations between biochemical and functional properties using multivariate data analysis (doctoral dissertation, SI: Sn) // Wageningen (Netherlands): Wageningen University & Research. – 2002.

285. Gao X. Y. AT~ 1 receptor in rostral ventrolateral medulla mediating blunted baroreceptor reflex in spontaneously hypertensive rats / X. Y. Gao, F. Zhang, Y. Han, H.

J. Wang, Y. Zhang, R. Guo, G.Q. Zhu //Acta Pharmacologica Sinica. – 2004. – T. 25. –  
№. 11. – C. 1433-1438.

## Приложение А. Акты проведения опытных выработок

Утверждаю:  
Заместитель генерального директора  
по заготовкам молока  
ПАО МК «Воронежский»  
Т.А. Хохлева



**АКТ**  
Проведения опытной выработки

05 декабря 2022 г.

г. Воронеж

**От ПАО МК «Воронежский»:**

Главный технолог, д.т.н. – Мельникова Е.И.

Главный инженер – Сошин Ю.В.

**От ФГАНУ «ВНИМИ»**

Ведущий научный сотрудник лаб. МБК, д.т.н. – Федотова О.Б.

Зав. лаб. МБК, старший научный сотрудник, к.т.н. – Агаркова Е.Ю.

Мы, нижеподписавшиеся, составили настоящий акт о том, что на ПАО МК «Воронежский» 05 декабря 2022 г. осуществлен выпуск опытной партии гидролизата сывороточных белков. Выработка осуществлялась согласно технологии, разработанной ФГАНУ «ВНИМИ».

Для выработки гидролизата в качестве сырья и компонентов использовались:

- сыворотка молочная подсырная, полученная при производстве полутвердых сыров;
- ферментный препарат Alcalase® 2.4 L FG (субтилизин);
- ферментный препарат Protamex® FG (субтилизин);
- натрия гидроокись.

Выработка гидролизата сывороточных белков осуществлялась по следующим основным технологическим операциям:

- приемка и подготовка сырья
- сепарирование сыворотки  $t = (40 \pm 5) ^\circ\text{C}$ , до м.д. жира не  $> 0,05 \%$
- пастеризация сыворотки  $t = 85 ^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 20 \text{ с}$
- УФ-концентрирование молочной сыворотки  $t = (20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ,  $= 3-6 \text{ бар}$ ,  $\Phi_k = 5$
- раскисление УФ-концентрата  $t = (50 \pm 5) ^\circ\text{C}$ , pH 6,9-7,1
- ферментативный гидролиз  $t = (50 \pm 5) ^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 120 \text{ мин}$
- пастеризация и инаktivация фермента  $t = (82 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 10 \text{ мин}$
- доохлаждение  $t = (4-6) ^\circ\text{C}$ .
- фасование, упаковывание, маркирование

По органолептическим и физико-химическим показателям гидролизат соответствовал требованиям СТО 00419785-044-2019 «Гидролизат сывороточных белков».

\_\_\_\_\_ Мельникова Е.И.  
\_\_\_\_\_ Сошин Ю.В.  
\_\_\_\_\_ Федотова О.Б.  
\_\_\_\_\_ Агаркова Е.Ю.

## Продолжение приложения А. Акты проведения опытных выработок

Утверждаю:  
Директор  
ООО «Южский молочный завод»  
А. Закочурин



**АКТ**  
Проведения опытной выработки

07 декабря 2022 г.

Ивановская область,  
г. Южа

**От ООО «Южский молочный завод»:**

Главный технолог – Белов Юрий Анатольевич

Технолог – Белова Олеся Юрьевна

**От ФГАНУ «ВНИМИ»**

Зав. сектором упаковки, старший научный сотрудник, к.т.н. – Мяленко Д.М.

Зав. лаб. МБК, старший научный сотрудник, к.т.н. – Агаркова Е.Ю.

Мы, нижеподписавшиеся, составили настоящий акт о том, что на ООО «Южский молочный завод» 07 декабря 2022 г. осуществлен выпуск образцов мусса творожного обогащенного, крема творожного обогащенного, суфле творожного обогащенного. Выработка осуществлялась согласно технологии, разработанной ФГАНУ «ВНИМИ».

Для выработки и крема мусса в качестве сырья использовались:

- творог обезжиренный;
- сливки 10% -ной жирности;
- гидролизат сывороточных белков (СТО 00419785-044-2019);
- сахарный песок;
- сухое обезжиренное молоко;
- стабилизационная система (желатин, гуаровая камедь, пектин тыквенный);
- натрий двууглекислый.

Выработка крема творожного обогащенного осуществлялась по следующим основным технологическим операциям:

- приемка и подготовка сырья
- сепарирование сыворотки  $t = (40 \pm 5) ^\circ\text{C}$ , до м.д. жира не  $> 0,05 \%$
- пастеризация сыворотки  $t = 85 ^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 20 \text{ с}$
- УФ-концентрирование молочной сыворотки  $t = (20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ,  $= 3-6 \text{ бар}$ ,  $\Phi_k = 5$
- раскисление УФ-концентрата  $t = (50 \pm 5) ^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,9-7,1$
- ферментативный гидролиз  $t = (50 \pm 5) ^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 120 \text{ мин}$
- пастеризация и инаktivация фермента  $t = (82 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 10 \text{ мин}$
- охлаждение  $t = (30 \pm 2) ^\circ\text{C}$  и доохлаждение до  $t = (4-6) ^\circ\text{C}$
- диспергирование  $t = 40 ^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 3 \text{ мин}$ , 1200 об/мин
- пастеризация  $t = (80 \pm 5) ^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 5 \text{ мин}$
- охлаждение  $t = (15 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- фасование, упаковывание, маркирование
- доохлаждение  $t = (4-6) ^\circ\text{C}$ .

По органолептическим и физико-химическим показателям продукт соответствовал требованиям ТУ 10.51.56-092-00149785-2022 «Кремы творожные обогащенные».

Выработка мусса творожного обогащенного осуществлялась по следующим основным технологическим операциям:

- приемка и подготовка сырья



## Продолжение приложения А. Акты проведения опытных выработок

- сепарирование сыворотки  $t = (40 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ , до м.д. жира  $\text{не} > 0,05 \%$
  - пастеризация сыворотки  $t = 85 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 20 \text{ с}$
  - УФ-концентрирование молочной сыворотки  $t = (20 \pm 2) \text{ }^\circ\text{PC}$ ,  $= 3\text{-}6 \text{ бар}$ ,  $\Phi_{\text{к}} = 5$
  - раскисление УФ-концентрата  $t = (50 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,9\text{-}7,1$
  - ферментативный гидролиз  $t = (50 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 120 \text{ мин}$
  - пастеризация и инактивация фермента  $t = (82 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 10 \text{ мин}$
  - охлаждение  $t = (30 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$  и доохлаждение до  $t = (4\text{-}6) \text{ }^\circ\text{C}$
  - диспергирование  $t = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 35 \text{ мин}$ ,  $1200 \text{ об/мин}$
  - пастеризация  $t = (80 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 5 \text{ мин}$
  - охлаждение  $t = (15 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$
  - Аэрирование  $t = (15 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 5 \text{ мин}$
  - фасование, упаковывание, маркирование
  - доохлаждение и структурирование  $t = (4\text{-}6) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 4\text{-}6 \text{ ч}$ .
- Для выработки суфле в качестве сырья использовались:
- творог обезжиренный;
  - сливки 10% -ной жирности;
  - гидролизат сывороточных белков (СТО 00419785-044-2019);
  - сахарный песок;
  - сухое обезжиренное молоко;
  - стабилизационная система (желатин, камедь рожкового дерева, агар-агар,  $\kappa$ -каррагинан, пектин тыквенный);
  - цитрат натрия.

По органолептическим и физико-химическим показателям продукт соответствовал требованиям ТУ 10.51.56-060-00419785-2019 «Муссы творожные обогащенные».

Выработка суфле творожного обогащенного осуществлялась по следующим основным технологическим операциям:

- приемка и подготовка сырья
- сепарирование сыворотки  $t = (40 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ , до м.д. жира  $\text{не} > 0,05 \%$
- пастеризация сыворотки  $t = 85 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 20 \text{ с}$
- УФ-концентрирование молочной сыворотки  $t = (20 \pm 2) \text{ }^\circ\text{PC}$ ,  $= 3\text{-}6 \text{ бар}$ ,  $\Phi_{\text{к}} = 5$
- раскисление УФ-концентрата  $t = (50 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,9\text{-}7,1$
- ферментативный гидролиз  $t = (50 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 120 \text{ мин}$
- пастеризация и инактивация фермента  $t = (82 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 10 \text{ мин}$
- охлаждение  $t = (30 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$  и доохлаждение до  $t = (4\text{-}6) \text{ }^\circ\text{C}$
- диспергирование  $t = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 35 \text{ мин}$ ,  $1200 \text{ об/мин}$
- пастеризация  $t = (80 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 5 \text{ мин}$
- охлаждение  $t = (15 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$
- Аэрирование  $t = (15 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 5 \text{ мин}$
- фасование, упаковывание, маркирование
- доохлаждение и структурирование  $t = (4\text{-}6) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 4\text{-}6 \text{ ч}$ .

По органолептическим и физико-химическим показателям продукт соответствовал требованиям ТУ 10.51.56-086-00149785-2022 «Суфле творожное обогащенное».

Расфасованные продукты направлены на дальнейшие испытания.

\_\_\_\_\_ Белов Ю.А.  
 \_\_\_\_\_ Белова О.Ю.  
 \_\_\_\_\_ Мяленко Д.М.  
 \_\_\_\_\_ Агаркова Е.Ю.

## Продолжение приложения А. Акты проведения опытных выработок



**АКТ**  
Проведения опытной выработки

09 декабря 2022 г.

Московская область  
г. Дмитров

**От АО «Дмитровский молочный завод»:**

Главный технолог – Голикова С.И

Заведующая лабораторией - Патрикеева Е.В

**От ФГАНУ «ВНИМИ»**

Зав. лаб. санитарной обработки оборудования,  
старший научный сотрудник, к.т.н. – Маневич Б.В.

Зав. лаб. МБК, старший научный сотрудник, к.т.н. – Агаркова Е.Ю.

Мы, нижеподписавшиеся, составили настоящий акт о том, что на АО «ДМЗ» 09 декабря 2022 г. осуществлен выпуск образцов киселя молочного обогащенного и напитка молочного обогащенного. Выработка осуществлялась согласно технологии, разработанной ФГАНУ «ВНИМИ».

Для выработки киселя в качестве сырья использовались:

- гидролизат сывороточных белков (СТО 00419785-044-2019)
- наполнитель фруктово-ягодный;
- сыворотка молочная сухая;
- желатин;
- крахмал холодного набухания;
- пектин тыквенный.

Выработка киселя молочного обогащенного осуществлялась по следующим основным технологическим операциям:

- приемка и подготовка сырья
- составление смеси согласно рецептуре
- перемешивание  $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau = 5\text{ мин}$ , 500 об/мин
- выдерживание  $t = (25 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau = 15\text{ мин}$
- пастеризация  $t = (80 \pm 5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau = 5\text{ мин}$
- охлаждение  $t = (20 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$
- фасование, упаковывание, маркирование
- доохлаждение  $t = (4-6)\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

По органолептическим и физико-химическим показателям продукт соответствовал требованиям ТУ 10.51.56-090-00149785-2022 «Кисели молочные обогащенные».

Для выработки напитка в качестве сырья использовались:

- сливки 10% -ной жирности;
- молоко 2,5%-ной жирности;
- гидролизат сывороточных белков (СТО 00419785-044-2019);
- сок вишневый;
- пюре яблочное;
- какао-порошок;
- ванилин;

## Продолжение приложения А. Акты проведения опытных выработок





- æ-каррагинан;
- пектин тыквенный;
- лимонная кислота;
- цитрат натрия.

Выработка напитка молочного обогащенного осуществлялась по следующим основным технологическим операциям:

- приемка и подготовка сырья
- составление смеси согласно рецептуре
- диспергирование  $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau = 3\text{ мин}$ , 1200 об/мин
- пастеризация  $t = (80 \pm 5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau = 5\text{ мин}$
- охлаждение  $t = (20 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$
- фасование, упаковывание, маркирование
- доохлаждение  $t = (4-6)\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

По органолептическим и физико-химическим показателям продукт соответствовал требованиям ТУ 10.51.56-091-00419785-2019 «Напитка молочные обогащенные».

Расфасованные продукты направлены на дальнейшие испытания.

	Голикова С.И.
	Патрикеева Е.В.
	Маневич Б.В.
	Агаркова Е.Ю.

## Продолжение приложения А. Акты проведения опытных выработок



**АКТ**  
Проведения опытной выработки

12 декабря 2022 г.

Брянская обл.  
г. Брянск**От ОАО «Брянский молочный комбинат»:**

Главный технолог – Повтарь Е.Н.

Технолог – Белова О.Г.

**От ФГАНУ «ВНИМИ»:**

Зав. сектором унаковки, старший научный сотрудник, к.т.н. – Маленко Д.М.

Зав. лаб. МБК, старший научный сотрудник, к.т.н. – Агаркова Е.Ю.

Мы, нижеподписавшиеся, составили настоящий акт о том, что на ОАО «Брянский молочный комбинат» 12 декабря 2022 г. осуществлен выпуск образцов крема творожного обогащенного, пасты творожной обогащенной. Выработка осуществлялась согласно технологии, разработанной ФГАНУ «ВНИМИ».

Для выработки крема в качестве сырья использовались:

- творог обезжиренный;
- сливки 10% -ной жирности;
- гидролизат сывороточных белков (СТО 00419785-044-2019);
- сахарный песок;
- сухое обезжиренное молоко;
- стабилизационная система (желатин, гуаровая камедь, пектин тыквенный);
- натрий двууглекислый.

Выработка крема творожного обогащенного осуществлялась по следующим основным технологическим операциям:

- приемка и подготовка сырья;
- составление смеси согласно рецептуре;
- диспергирование  $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau = 3\text{ мин}$ , 1200 об/мин;
- пастеризация  $t = (80 \pm 5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau = 5\text{ мин}$ ;
- охлаждение  $t = (15 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- фасование, упаковывание, маркирование;
- доохлаждение  $t = (4-6)\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

По органолептическим и физико-химическим показателям продукт соответствовал требованиям ТУ 10.51.56-092-00149785-2022 «Кремы творожные обогащенные».

Для выработки пасты в качестве сырья использовались:

- творог 5%-ной жирности;
- гидролизат сывороточных белков (СТО 00419785-044-2019);
- сахарный песок;
- крахмал горячего набухания;
- гуаровая камедь;
- пектин тыквенный;
- натрий двууглекислый;

Выработка пасты творожной обогащенной осуществлялась по следующим основным технологическим операциям:

## Продолжение приложения А. Акты проведения опытных выработок


- составление смеси согласно рецептуре;
- диспергирование  $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau = 3$  мин, 1200 об/мин;
- пастеризация  $t = (80 \pm 5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau = 10$  мин;
- охлаждение  $t = (50 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- фасование, упаковывание, маркирование;
- доохлаждение  $t = (4-6)\text{ }^{\circ}\text{C}$ .


По органолептическим и физико-химическим показателям продукт соответствовал требованиям ТУ 10.51.56-088-00149785-2022 «Пасты творожные обогащённые».

Расфасованные продукты направлены на дальнейшие испытания.

\_\_\_\_\_  
 Повтарь Е.Н.

\_\_\_\_\_  
 Белова О. Г.

\_\_\_\_\_  
 Мяленко Д.М.

\_\_\_\_\_  
 Агаркова Е.Ю.

## Приложение Б. Свидетельства о Государственной регистрации программ для ЭВМ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**СВИДЕТЕЛЬСТВО**  
о государственной регистрации программы для ЭВМ

**№ 2022680921**

**«ПРОГРАММА СИСТЕМНОГО АНАЛИЗА И ВЫБОРА  
ОПТИМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ  
ВЫСВОБОЖДЕНИЯ БИОАКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ»**

Правообладатель: **ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ  
ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (RU)**

Авторы: **Агаркова Евгения Юрьевна (RU), Семипятный Владислав  
Константинович (RU), Пряничникова Наталья Сергеевна (RU),  
Рябова Анастасия Евгеньевна (RU), Блиадзе Владимир Геннадьевич  
(RU), Галстян Арам Генрихович (RU), Зобкова Зинаида Семёновна  
(RU)**

Заявка № **2022680193**  
Дата поступления **28 октября 2022 г.**  
Дата государственной регистрации  
в Реестре программ для ЭВМ **08 ноября 2022 г.**



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

  
Ю.С. Зубов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**СВИДЕТЕЛЬСТВО**  
о государственной регистрации программы для ЭВМ  
**№ 2022669040**

**«РАСЧЕТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И  
НОРМ РАСХОДА СЫРЬЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ  
ТВОРОГА»**

Правообладатель: **ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
АВТНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (RU)**

Авторы: **Блиадзе Владимир Геннадьевич (RU), Семиятний  
Владислав Константинович (RU), Бигаева Алана Владиславовна  
(RU), Рябова Анастасия Евгеньевна (RU), Пряничникова Наталья  
Сергеевна (RU), Азаркова Евгения Юрьевна (RU), Кручинин  
Александр Геннадьевич (RU)**

Заявка № **2022667489**  
Дата поступления **26 сентября 2022 г.**  
Дата государственной регистрации  
в Реестре программ для ЭВМ **14 октября 2022 г.**



*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*  
  
**Ю.С. Зубов**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**СВИДЕТЕЛЬСТВО**

о государственной регистрации программы для ЭВМ

**№ 2022669428****«ПРОЕКТИРОВАНИЕ КИСЛОМОЛОЧНОГО  
ПРОДУКТА С ОБОГАЩАЮЩИМИ  
КОМПОНЕНТАМИ»**

Правообладатель: **ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (RU)**

Авторы: **Зобкова Зинаида Семёновна (RU), Семипятный Владислав  
Константинович (RU), Лазарева Екатерина Германовна (RU),  
Галстян Арам Генрихович (RU), Агаркова Евгения Юрьевна (RU),  
Кручинин Александр Геннадьевич (RU)**

Заявка № **2022668656**Дата поступления **11 октября 2022 г.**

Дата государственной регистрации

в Реестре программ для ЭВМ **19 октября 2022 г.**

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

**Ю.С. Зубов**



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ  
ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИМИ»)



СТАНДАРТ  
ОРГАНИЗАЦИИ

СТО  
00419785 – 044 – 2019

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по  
научной работе ФГАНУ «ВНИМИ»

  
Н.С. Пряничникова  
«15» / июля 2019 г.




## ГИДРОЛИЗАТ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ

РАЗРАБОТАНО:

лаборатория технологии молочно-белковых  
концентратов, пищевых добавок и произ-  
водства продуктов на их основе  
зав. лабораторией, к.т.н.

  
Е.Ю. Агаркова

старший научный сотрудник, к.т.н.

  
А.Г. Кручинин

научный сотрудник, к.т.н.

  
К.А. Рязанцева

Москва  
2019

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
(ФГАНУ «ВНИМИ»)**

ОКПД 2 10.51. 56.154

ОКС 67.100.10

Группа Н17

**УТВЕРЖДАЮ**Врио директора ФГАНУ  
«ВНИМИ»

Галстян А.Г.

« 31 » сентября 2019 г.**МУССЫ ТВОРОЖНЫЕ ОБОГАЩЕННЫЕ**

**Технические условия  
ТУ 10.51.56-060-00419785-2019**

Дата введения в действие - 2019-11-01

РАЗРАБОТАНО:

ФГАНУ «ВНИМИ»

Зав. лабораторией технологии молочно-  
белковых концентратов, пищевых добавок  
и производства продуктов на их основек.т.н.  Е.Ю. Агаркова  
подпись

Научный сотрудник

 К.А. Рязанцева  
подпись

Ст. научный сотрудник

 Н.С. Пряничникова  
подпись

Ст. научный сотрудник

 Д.М. Мяленко  
подписьг. Москва  
2019

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
(ФГАНУ «ВНИМИ»)**

ОКПД 2 10.51. 56.154

ОКС 67.100.10

Группа Н17

**УТВЕРЖДАЮ**

Директор ФГАНУ «ВНИМИ»



Галстян А.Г.

«28» ноября 2022 г.

**ПАСТЫ ТВОРОЖНЫЕ ОБОГАЩЕННЫЕ**

Технические условия  
ТУ 10.51.56-088-00419785-2022

Дата введения в действие - 2022-11-29

**РАЗРАБОТАНО:**

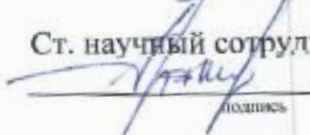
ФГАНУ «ВНИМИ»

Зав. лабораторией технологии молочно-белковых концентратов, пищевых добавок и производства продуктов на их основе

к.т.н.  Е.Ю. Агаркова

подпись

Ст. научный сотрудник

 Н.С. Пряничникова

подпись

Научный сотрудник

 К.А. Рязанцева

Подпись

Ст. научный сотрудник

 А.Е. Рябова

подпись

г. Москва  
2022

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
(ФГАНУ «ВНИМИ»)**

ОКПД 2 10.51. 56.154

ОКС 67.100.10

Группа Н17

**УТВЕРЖДАЮ**

Директор ФГАНУ «ВНИМИ»

Галстян А.Г.

«20» ноября 2022 г.

**СУФЛЕ ТВОРОЖНОЕ ОБОГАЩЕННОЕ**

**Технические условия  
ТУ 10.51.56-086-00419785-2022**

Дата введения в действие - 2022-11-24

РАЗРАБОТАНО:

ФГАНУ «ВНИМИ»

Зав. лабораторией технологии молочно-  
белковых концентратов, пищевых добавок  
и производства продуктов на их основек.т.н.  Е.Ю. Агаркова

Ст. научный сотрудник

 А.Г. Кручинин

Ст. научный сотрудник

 Н.С. Пряничникова

Ст. научный сотрудник

 А.Е. Рябоваг. Москва  
2022

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
(ФГАНУ «ВНИМИ»)**

ОКПД 2 10.51. 56.130

ОКС 67.100.10

Группа Н17

**УТВЕРЖДАЮ**

Директор ФГАНУ «ВНИМИ»



Галстян А.Г.  
«00» ноября 2022 г.

**КИСЕЛИ МОЛОЧНЫЕ ОБОГАЩЕННЫЕ**

**Технические условия  
ТУ 10.51.56-090-00419785-2022**

Дата введения в действие - 2022-12-01

РАЗРАБОТАНО:

ФГАНУ «ВНИМИ»

Зав. лабораторией технологии молочно-белковых концентратов, пищевых добавок и производства продуктов на их основе

к.т.н.  Е.Ю. Агаркова

подпись

Ст. научный сотрудник

 Д.М. Мяленко


подпись

Ст. научный сотрудник

 Н.С. Пряничникова

Подпись

Ст. научный сотрудник

 А.Г. Кручинин

подпись

г. Москва  
2022

Продолжение приложения В

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
(ФГАНУ «ВНИМИ»)**

ОКПД 2 10.51. 56.120

ОКС 67.100.10

Группа Н17

**УТВЕРЖДАЮ**

Директор ФГАНУ «ВНИМИ»



Галстян А.Г.  
« 2 » февраля 2022 г.

**НАПИТКИ МОЛОЧНЫЕ ОБОГАЩЕННЫЕ**

**Технические условия  
ТУ 10.51.56-091-00419785-2022**

Дата введения в действие - 2022-12-05

РАЗРАБОТАНО:

ФГАНУ «ВНИМИ»

Зав. лабораторией технологии молочно-белковых концентратов, пищевых добавок и производства продуктов на их основе

к.т.н.  Е.Ю. Агаркова

Научный сотрудник

 К.А. Рязанцева

Ст. научный сотрудник

 Н.С. Пряничникова

Ст. научный сотрудник

 А.Е. Рябоваг. Москва  
2022

Продолжение приложения В

