

Научная статья

УДК 577.12

EDN LZHTSV

<https://doi.org/10.22450/1999-6837-2024-18-3-135-144>

Генная модификация белка для усиления его устойчивости к протеолизу и перспектив использования как функционального ингредиента

Сергей Леонидович Тихонов¹, Наталья Валерьевна Тихонова²,
Шолпан Сергеевна Валиева³

¹ Уральский государственный лесотехнический университет
Свердловская область, Екатеринбург, Россия

^{1,2} Уральский государственный аграрный университет
Свердловская область, Екатеринбург, Россия

³ Южно-Уральский государственный аграрный университет
Челябинская область, Троицк, Россия

¹ tihonov75@bk.ru

Аннотация. Проведена генная модификация белка GDF-11, направленная на усиление его устойчивости к протеолизу и создание, синтез плазмид для его экспрессии. Синтез плазмид генно-модифицированного белка проводили в ЗАО «Евроген» (Москва) с использованием метода циклической сборки из олигонуклеотидов (РСА, polymerase cycling assembly). Разработан новый сшитый белок GDF-11 (генная модификация) с использованием циклизации. В аминокислотные последовательности белка GDF-11 введены два аминокислотных остатка цистеина (С) на основе двухкомпонентных (2С) групп. Для повышения стабильности пептидных последовательностей в исследуемом белке была проведена замена L-аминокислот на D-аминокислоты. Для получения белка GDF-11 (генно-модифицированного) ДНК-матрицу для выбранного необходимо включить в вектор, специфичный для хозяина, в данном случае, в клетки *E. coli*. Полученная модификация белка, возможно, позволит усилить биодоступность, устойчивость к протеолизу и, соответственно, биологическую активность. Заключительные выводы об эффективности генной модификации известного белка следует сделать после подтверждения в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, пищевые системы, синтез генов, генная модификация, биологические свойства, функциональный ингредиент

Для цитирования: Тихонов С. Л., Тихонова Н. В., Валиева Ш. С. Генная модификация белка для усиления его устойчивости к протеолизу и перспектив использования как функционального ингредиента // Дальневосточный аграрный вестник. 2024. Том 18. № 3. С. 135–144. <https://doi.org/10.22450/1999-6837-2024-18-3-135-144>.

Original article

Protein genetic modification for increasing its resistance to proteolysis and potential use as a functional ingredient

Sergey L. Tikhonov¹, Natalya V. Tikhonova², Sholpan S. Valieva³

¹ Ural State Forestry University, Sverdlovsk region, Ekaterinburg, Russian Federation

^{1,2} Ural State Agrarian University, Sverdlovsk region, Ekaterinburg, Russian Federation

³ South Ural State Agrarian University, Chelyabinsk region, Troitsk, Russia

¹ tihonov75@bk.ru

Abstract. The GDF-11 protein was genetically modified to enhance its resistance to proteolysis and creatinine, and plasmid synthesis for its expression was carried out. Plasmid synthesis of a genetically modified protein with the conditional name GDF-11 (gene modification) was carried

out at CJSC "Eurogen" (Russia, Moscow) using the method of cyclic assembly from oligonucleotides (PCA, polymerase cycling assembly). A new cross-linked protein GDF-11 (gene modification) using cyclization has been developed. Two amino acid residues of cysteine (C) based on two-component (2C) groups were introduced into the amino acid sequences of GDF-11 protein. To increase the stability of peptide sequences in the studied protein, L-amino acids were replaced with D-amino acids. To obtain the GDF-11 protein (genetically modified), the DNA matrix for the selected one must be included in a protein-specific vector, in this case, in *E. coli* cells. The resulting protein modification may enhance bioavailability, resistance to proteolysis and, accordingly, biological activity. Final conclusions about the effectiveness of gene modification of a known protein should be made after confirmation *in vitro* and *in vivo* experiments.

Keywords: recombinant protein, food systems, gene synthesis, genetic modification, biological properties, functional ingredient

For citation: Tikhonov S. L., Tikhonova N. V., Valieva Sh. S. Protein genetic modification for increasing its resistance to proteolysis and potential use as a functional ingredient. *Dal'nevostochnyj agrarnyj vestnik*. 2024;18;3:135–144. (in Russ.). <https://doi.org/10.22450/1999-6837-2024-18-3-135-144>.

Введение. Рекомбинантные белки являются продуктами технологии рекомбинантной ДНК, которая включает в себя введение генетически модифицированного гена белка в клетку организма-хозяина. Эта технология уже широко используется для получения многих рекомбинантных белков [1], например, в получении идентичных человеку белков и гормонов, а также в пищевой промышленности (в производстве некоторых ферментов) [2].

Однако синтез функциональных ингредиентов на основе рекомбинантного белка не проводится. Это прежде всего связано с тем, что на основании Федерального закона от 03.07.2016 № 358-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в части совершенствования государственного регулирования в области генно-инженерной деятельности» использование продукции с генно-модифицированными организмами запрещено. Однако научные исследования в области рекомбинантных белков разрешены.

Возможно, по мере развития генной модификации биологически активных веществ и появления доказательств безопасности применения для здоровья человека, производство пищевых белков, пептидов генной модификации, в том числе в качестве функциональных ингредиентов станет возможным при условии экономической целесообразности. Она, в частности, подтверждена модельными исследованиями рекомбинантной продукции ферментов грибами [3], бактериальной продукции α -лактальбумина сывороточ-

ного белка [4], биологической активности пептидов [5, 6].

Рекомбинантное производство белков было показано для всех классов микроорганизмов, включая, например, бактерию *Escherichia coli* [7], дрожжи *Pichia pastoris* [8] и нитчатый гриб *Rhizopus* [9]. При этом выбор микроорганизма для производства белка имеет важные последствия для выхода, чистоты и посттрансляционных модификаций синтезированного белка [10]. Для производства функциональных ингредиентов на основе белков все эти аспекты важны, поскольку низкий выход и (или) низкая чистота делают массовое производство пищевых белков неэкономичным, тогда как модификации после трансляции нужны для достижения необходимых функциональных свойств.

Технологии получения функциональной пищевой продукции представлены в работах [11–14].

Бактериальный синтез рекомбинантных белков обычно приводит к получению белков, которые не модифицируются посттрансляционно, как было показано в исследовании по отсутствию фосфорилирования рекомбинантного β -казеина человека и β -лактоглобулина крупного рогатого скота. Отмечено, что синтез рекомбинантного β -лактоглобулина, который не модифицируется посттрансляционно в своей бычьей форме, приводит к получению белка с аналогичным фолдингом и функциональностью [15].

Совершенствование технологий экспрессии белков способствует снижению

стоимости рекомбинантных белков, что представляет интерес для производства продуктов питания и функциональных ингредиентов на их основе.

Для синтеза рекомбинантных молочных белков, независимо от используемого вида микроорганизмов, в качестве ДНК-матрицы применяют гены человеческого и коровьего молока, что позволяет синтезировать белки, используемые в составе детской молочной смеси [16].

Одним из перспективных функциональных ингредиентов является белок GDF-11, который экспрессируется в основном в селезенке, почках и головном мозге и предотвращает процессы старения организма. С возрастом количество данного белка снижается [17], при этом полное его отсутствие несовместимо с жизнью [18]. Полученный с пищей экзогенный GDF-11 может ослаблять гипертрофию сердца и фиброз при перегрузке давлением у мышей дозозависимым образом и не токсичен в высоких дозах [19]. Данные результаты свидетельствуют, что при патологических состояниях GDF-11 способен оказывать кардиопротекторное действие.

Белки при попадании в желудочно-кишечный тракт подвергаются ферментативному гидролизу, что приводит к ослаблению биологической активности.

С помощью биоинженерии можно изменить белок GDF-11 и создать новый потенциальный биологически активный белок для перорального применения с за-

данными функциональными свойствами и сохранением или усилением свойств исходного белка.

Целью исследований явилось проведение генной модификации белка GDF-11, направленное на усиление его устойчивости к протеолизу и создание, синтез плазмид для его экспрессии.

Методы исследований. В качестве исходного белка для генной модификации использован белок GDF-11, характеристики которого были получены из базы данных Национального центра биотехнологической информации (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10220#gene-expression>).

Белок GDF-11 также известен под названиями VHO, BMP11 и BMP-11 ген и кодируется 12 хромосомой (рис. 1). Он экспрессируется в большинстве органов человека. При этом наибольшая экспрессия отмечена в головном мозге, кишечнике, яичниках и простате. Белок относится к семейству белков TGF-бета (фактор роста) и предотвращает процесс старения органов и тканей.

Синтез плазмид генно-модифицированного белка с условным названием GDF-11 (генная модификация) проводили в ЗАО «Евроген» (Россия, Москва) с использованием метода циклической сборки из олигонуклеотидов (PCA, polymerase cycling assembly). Сначала были синтезированы олигонуклеотиды, комплементарные либо одной, либо другой цепи гена, перекрывающиеся участками в 20–30 пар

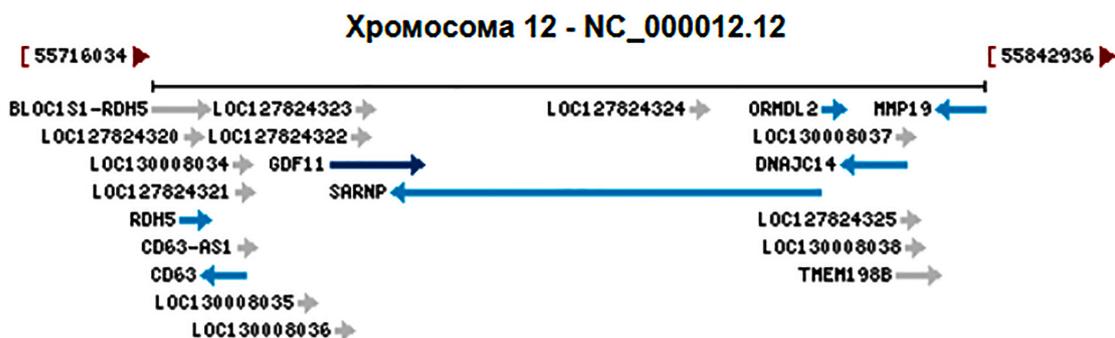


Рисунок 1 – Кодирование белка GDF-11 хромосомой 12 -NC_000012.12
 Figure 1 – GDF-11 protein coding by 12 -NC_000012.12 chromosome

оснований. Затем с помощью ДНК-полимеразы достроены цепи с заполнением промежутков между олигонуклеотидами. На последнем этапе сконструированный ген амплифицировался путем стандартной ПЦР. Последовательности, кодирующие белок GDF-11 (генная модификация), после амплификации обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI, *Xho*I и клонировали в вектор pET-25b(+) по сайтам узнавания этих ферментов. Клоны были отсекуены методом Сэнгера.

Результаты исследований и их обсуждение. Создание пищевой продукции функционального и специализированного назначения на основе биологически активных белков является сложной задачей в связи с действием ферментов, начиная с амилазы и липазы, обнаруженных в слюне и расщепляющих белки на пептиды и более мелкие молекулы. При попадании в желудок белки подвергаются кислотному воздействию и протеолизу катепсином и пепсином. Даже если пептид, полученный при гидролизе белка в желудке, остается интактным, то в просвете тонкой кишки происходит изменение кислотности и образуется большое количество протеолизирующих ферментов, включая трипсин, химотрипсин и карбоксипептидазу.

По сравнению с биологическими препаратами период полураспада пептидов в крови значительно короче (дни по сравнению с неделями), что может приводить к снижению их эффективности. Для сохранения и усиления биологических свойств пептидов можно использовать несколько способов, например, циклизацию.

Методы циклизации широко использовались в области производства пептидов и достигались несколькими способами: циклизации от головки к хвосту, от головки (хвоста) к боковой цепи или от боковой цепи к боковой цепи. Тип циклизации от боковой цепи к боковой цепи называется сшиванием. Данный метод позволяет зафиксировать пептид в желаемой конформации. Сшивание пептидов обычно используется для улучшения вторичной структуры пептида, такой как α -спирали и β -витки, что может улучшить сродство связывания с мишенью и усилить биологические свойства и доступность [20].

Существуют две подгруппы пептидных сшивающих средств (ПС): одноком-

понентные (1С) и двухкомпонентные (2С). В однокомпонентном пептидном сшивании (1С-PS) имеется внутримолекулярная связь между часто неестественными боковыми цепями аминокислот и может допускаться циклизация в зависимости от вторичной структуры.

Нами разработан новый сшитый белок GDF-11 (генная модификация) с использованием циклизации. В частности, в аминокислотные последовательности белка GDF-11 TVDFEAFGWD и FMQKYRHTNL введены два аминокислотных остатка цистеина (С) на основе двухкомпонентных (2С) групп и получены следующие – TCDFEAFGCD и FCQKYRHTCL.

Для повышения стабильности пептидных последовательностей в исследуемом белке была проведена замена L-аминокислот на D-аминокислоты. Так, у D-аминокислотной последовательности снижено распознавание субстрата и сродство к связыванию с протеолитическими ферментами [21]. Примером увеличения периода полураспада биологически активного пептида является модификация соматостатина до октреотида, используемого для лечения опухолей желудочно-кишечного тракта. Аминокислотная последовательность октреотида включает две D-аминокислоты, тогда как соматостатин состоит только из L-аминокислот. В результате период полувыведения увеличивается от нескольких минут для соматостатина до 1,5 часов для октреотида, что усиливает биологическое действие [22].

Проведен синтез двух генов, кодирующих GDF-11 (генная модификация), и клонирование синтезированных последовательностей в вектор pET-25b(+). В роли продуцента для экспрессии нового белка предполагается применять *E. coli*, что позволяет получить чистый белок с применением плазмид без введения антибиотиков. В таблице 1 представлены праймеры для синтеза генов белка GDF 11 (генная модификация). На рисунке 2 дана хроматограмма праймеров для синтеза генов GDF 3 F (генная модификация).

Для получения белка GDF-11 (генно-модифицированного) ДНК-матрицу для выбранного необходимо включить в вектор, специфичный для хозяина, в данном случае, в клетки *E. coli*. Этот вектор

Таблица 1 – Праймеры для синтеза генов белка GDF 11

Table 1 – Primers for the synthesis of GDF 11 protein genes

Название гена	Название праймера	Последовательность праймера, 5'–3'
Последовательность, кодирующая белок GDF-11 (генная модификация)	GDF 3 F	TGGCCATGGATATCGGAATTAATTCGGATCCaAA CggtGGTCTTGACTGCGATGAACA
	GDF 4 R	CGACCGTCAGCGGATAACGACAACAGCGGCTTT CtacGGAATGTTTCATCGCAGTCAAGAC
	GDF 5 F	CCGCTGACGGTTCGATTTTCGAAGCGTTCGGCTGGG ATTGGATCATTGCTCCGCGCCGTTAC
	GDF 6 R	GCAgttGCCAGAGCAATAGTTTGCTTTGTAACGGC GCGGAGCAATG
	GDF 7 F	GCTCTGGCCAGTGCAGTACATGTTTATGCAGAA ATATCCGCACACCCATTTAG
	GDF 8 R	GGGCCC GCGCTACAGCGCGGATTGGCCTGCTGT ACTAAATGGGTGTGCGGATATT
	GDF 9 F	GCGCGGGCCCGTGCTGCACACCTACCAAGATGT CGCCCATTAAC
	GDF 10 R	TGTTGTTTGTTCATTAAGTACAGCATGTTAATGG GCGACATCTTGGTAGG
	GDF 11 F	TGCTGTACTTTAATCCTAAACTTCAGATTATTTAT GGTAAGATCCCACGTATGGTGGTT
	GDF 12 R	TCGAGACTACATCCGCATCGATCAACCACCATA GTGGGATCTTA
	GDF 13 R	TGCGGATGTAGTCTCGAGATCAAACGGGCTAGC CAGCCAGAACTCGCCCCGGAAG

состоит из промотора, который может быть либо индуцируемым, либо конститутивным; сигнального пептида, который либо специфичен для хозяина, либо является частью гена белка; затем ДНК, кодирующей сам белок.

В качестве используемого вектора будет плаزمид, праймеры которой показаны в таблице 1.

Заключение. Полученная модификация белка, возможно, позволит усилить биодоступность, устойчивость к протеолизу и, соответственно, биологическую активность.

Заключительные выводы об эффективности генной модификации известного белка следует сделать после подтверждения в ходе экспериментов in vitro и in vivo.

В дальнейшем при положительном результате нового белка целесообразно будет рассмотреть его использование в качестве функциональных ингредиентов, но только на экспериментальных животных в целях развития возможности применения технологий генного модифицирования в пищевой отрасли в научных исследованиях.

Список источников

1. Pham P. V. Medical biotechnology: techniques and applications. Ch. 19 // Barh D., Azevedo V. (Eds.). Omics technologies and bio-engineering towards improving quality of life. Academic Press, 2018. P. 449–469. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1>.
2. Khan S., Ullah M. W., Siddique R., Nabi G., Manan S., Yousaf M. [et al.]. Role of recombinant DNA technology to improve life // International Journal of Genomics. 2016. Vol. 1. P. 2405954. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>.

3. Klein-Marcuschamer D., Oleskowicz-Popiel P., Simmons B. A., Blanch H. W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels // *Biotechnology and Bioengineering*. 2012. Vol. 109. No. 4. P. 1083–1087. <https://doi.org/10.1002/bit.24370>.
4. Vestergaard M., Chan S. H. J., Jensen P. R. Can microbes compete with cows for sustainable protein production – a feasibility study on high quality protein // *Scientific reports*. 2016. Vol. 6. P. 36421. <https://doi.org/10.1038/srep36421>.
5. Permyakova L., Sergeeva I., Ryabokoneva L., Atuchin V., Li Y., Markov A. Peptides of yeast *Saccharomyces cerevisiae* activated by the malt sprout extract: Preparation, identification and bioactivity // *Food Bioscience*. 2024. Vol. 61. P. 104867. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104867>.
6. Sergeeva I., Permyakova L., Markov A., Ryabokoneva L., Atuchin V., Anshukov A. [et al.]. Peptides of yeast *Saccharomyces cerevisiae* activated by the aquatic extract of *Atriplex sibirica* L. // *ACS Food Science & Technology*. 2024. Vol. 4. No. 1. P. 173–189. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.3c00455>.
7. Keppler J. K., Heyse A., Scheidler E., Uttinger M. J., Fitzner L., Jandt U. [et al.]. Towards recombinantly produced milk proteins: physicochemical and emulsifying properties of engineered whey protein beta-lactoglobulin variants // *Food Hydrocolloids*. 2021. Vol. 110. P. 106132. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106132>.
8. Karbalaee M., Rezaee S. A., Farsiani H. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins // *Journal of Cellular Physiology*. 2020. Vol. 235. No. 9. P. 5867–5881. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>.
9. Ward O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi // *Biotechnology Advances*. 2012. Vol. 30. No. 5. P. 1119–1139. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.012>.
10. Pourmir A., Johannes T. W. Directed evolution: selection of the host organism // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2012. Vol. 2. No. 3. P. e201209012. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209012>.
11. Гапонова Л. В., Логвинова Т. Т., Першикова А. В., Решетник Е. И. Соя в лечебно-профилактическом и детском питании // *Молочная промышленность*. 1999. № 5. С. 25–27. EDN NVBNEP.
12. Решетник Е. И., Шарипова Т. В., Максимюк В. А. Возможность использования нутовой муки в производстве мясорастительных полуфабрикатов для геродиетического питания // *Дальневосточный аграрный вестник*. 2014. № 1 (29). С. 48–51. EDN TMWSRL.
13. Мифтахутдинова Е. А., Тихонов С. Л., Тихонова Н. В., Пестова И. Г., Пищиков Г. Б., Попова Д. Г. [и др.]. Мясной паштет для геродиетического питания при активном образе жизни // *Ползуновский вестник*. 2020. № 2. С. 70–74. <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2020.02.013>. EDN SJTHKM.
14. Miftahutdinova E. A., Tikhonov S. L., Tikhonova N. V. Development of lithium-containing feed additive and its use for fortification of chicken broilers meat and by-products // *Theory and Practice of Meat Processing*. 2020. Vol. 5. No. 1. P. 27–31. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2020-5-1-27-31>.
15. Loch J. I., Bonarek P., Tworzydło M., Polit A., Hawro B., Lach A. [et al.]. Engineered b-lactoglobulin produced in *E. coli*: purification, biophysical and structural characterization // *Molecular Biotechnology*. 2016. Vol. 58. No. 10. P. 605–618. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9960-z>.
16. Jensen H. B., Holland J. W., Poulsen N. A., Larsen L. B. Milk protein genetic variants and isoforms identified in bovine milk representing extremes in coagulation properties // *Journal of Dairy Science*. 2012. Vol. 95. No. 6. P. 2891–2903. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5346>.
17. Karo T., Lee R. T. GDF-11 as a potential cardiac pro-angiogenic factor // *JACC. Basic to Translational Science*. 2023. Vol. 8. No. 6. P. 636–637. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2023.04.003>.
18. Lian J., Walker R. G., D’Amico A., Vujic A., Mills M. J., Messemer K. A. [et al.]. Functional substitutions of amino acids that differ between GDF11 and GDF8 impact skeletal

development and skeletal muscle // Life Science Alliance. 2023. Vol. 6. No. 3. P. e202201662. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201662>.

19. Harper S. C., Johnson J., Borghetti G., Zhao H., Wang T., Wallner M. [et al.]. GDF11 decreases pressure overload-induced hypertrophy, but can cause severe cachexia and premature death // Circulation Research. 2018. Vol. 123. No. 11. P. 1220–1231. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312955>.

20. Cooper B. M., Iegre J., O' Donovan D. H., Halvarsson M. Ö., Spring D. R. Peptides as a platform for targeted therapeutics for cancer: peptide-drug conjugates (PDCs) // Chemical Society reviews. 2021. Vol. 50. No. 3. P. 1480–1494. <https://doi.org/10.1039/d0cs00556h>.

21. Di L. Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties // The AAPS Journal. 2015. Vol. 17. No. 1. P. 134–143. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9687-3>.

22. Wu H., Huang J. Optimization of protein and peptide drugs based on the mechanisms of kidney clearance // Protein and Peptide Letters. 2018. Vol. 25. No. 6. P. 514–521. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180530122835>.

References

1. Pham P. V. Medical biotechnology: techniques and applications. Ch. 19. In.: Barh D., Azevedo V. (Eds.). Omics technologies and bio-engineering towards improving quality of life, Academic Press, 2018, P. 449–469. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1>.

2. Khan S., Ullah M. W., Siddique R., Nabi G., Manan S., Yousaf M. [et al.]. Role of recombinant DNA technology to improve life. International Journal of Genomics, 2016;1: 2405954. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>.

3. Klein-Marcuschamer D., Oleskowicz-Popiel P., Simmons B. A., Blanch H. W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. Biotechnology and Bioengineering, 2012;109;4:1083–1087. <https://doi.org/10.1002/bit.24370>.

4. Vestergaard M., Chan S. H. J., Jensen P. R. Can microbes compete with cows for sustainable protein production – a feasibility study on high quality protein. Scientific reports, 2016;6:36421. <https://doi.org/10.1038/srep36421>.

5. Permyakova L., Sergeeva I., Ryabokoneva L., Atuchin V., Li Y., Markov A. Peptides of yeast *Saccharomyces cerevisiae* activated by the malt sprout extract: Preparation, identification and bioactivity. Food Bioscience, 2024;61:104867. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104867>.

6. Sergeeva I., Permyakova L., Markov A., Ryabokoneva L., Atuchin V., Anshukov A. [et al.]. Peptides of yeast *Saccharomyces cerevisiae* activated by the aquatic extract of *Atriplex sibirica* L. ACS Food Science & Technology, 2024;4;1:173–189. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.3c00455>.

7. Keppler J. K., Heyse A., Scheidler E., Uttinger M. J., Fitzner L., Jandt U. [et al.]. Towards recombinantly produced milk proteins: physicochemical and emulsifying properties of engineered whey protein beta-lactoglobulin variants. Food Hydrocolloids, 2021;110:106132. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106132>.

8. Karbalaee M., Rezaee S. A., Farsiani H. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. Journal of Cellular Physiology, 2020; 235;9:5867–5881. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>.

9. Ward O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. Biotechnology Advances, 2012;30;5:1119–1139. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.012>.

10. Pourmir A., Johannes T. W. Directed evolution: selection of the host organism. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2012;2;3:e201209012. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209012>.

11. Gaponova L. V., Logvinova T. T., Pershikova A. V., Reshetnik E. I. Soybean in medical and preventive and children's nutrition. *Molochnaya promyshlennost'*, 1999;5:25–27. EDN NVBNEP (in Russ.).

12. Reshetnik E. I., Sharipova T. V., Maksimyuk V. A. Possibility of application chick-pea flour in the production of meat-vegetable prepared foods for elderly nutrition. *Dal'nevostochnyy agrarnyy vestnik*, 2014;1(29):48–51. EDN TMWSRL (in Russ.).
13. Miftakhutdinova E. A., Tikhonov S. L., Tikhonova N. V., Pestova I. G., Pishchikov G. B., Popova D. G. [et al.]. Meat pate for gerodietic nutrition for active lifestyle. *Polzunovskiy vestnik*, 2020;2:70–74. <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2020.02.013>. EDN SJTHKM (in Russ.).
14. Miftakhutdinova E. A., Tikhonov S. L., Tikhonova N. V. Development of lithium-containing feed additive and its use for fortification of chicken broilers meat and by-products. Theory and Practice of Meat Processing, 2020;5;1:27–31. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2020-5-1-27-31>.
15. Loch J. I., Bonarek P., Tworzydło M., Polit A., Hawro B., Lach A. [et al.]. Engineered b-lactoglobulin produced in *E. coli*: purification, biophysical and structural characterization. *Molecular Biotechnology*, 2016;58;10:605–618. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9960-z>.
16. Jensen H. B., Holland J. W., Poulsen N. A., Larsen L. B. Milk protein genetic variants and isoforms identified in bovine milk representing extremes in coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 2012;95;6:2891–2903. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5346>.
17. Karo T., Lee R. T. GDF-11 as a potential cardiac pro-angiogenic factor. *JACC. Basic to Translational Science*, 2023;8;6:636–637. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2023.04.003>.
18. Lian J., Walker R. G., D'Amico A., Vujic A., Mills M. J., Messemmer K. A. [et al.]. Functional substitutions of amino acids that differ between GDF11 and GDF8 impact skeletal development and skeletal muscle. *Life Science Alliance*, 2023;6;3:e202201662. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201662>.
19. Harper S. C., Johnson J., Borghetti G., Zhao H., Wang T., Wallner M. [et al.]. GDF11 decreases pressure overload-induced hypertrophy, but can cause severe cachexia and premature death. *Circulation Research*, 2018;123;11:1220–1231. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312955>.
20. Cooper B. M., Iegre J., O' Donovan D. H., Halvarsson M. Ö., Spring D. R. Peptides as a platform for targeted therapeutics for cancer: peptide-drug conjugates (PDCs). *Chemical Society reviews*, 2021;50;3:1480–1494. <https://doi.org/10.1039/d0cs00556h>.
21. Di L. Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. *The AAPS Journal*, 2015;17;1:134–143. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9687-3>.
22. Wu H., Huang J. Optimization of protein and peptide drugs based on the mechanisms of kidney clearance. *Protein and Peptide Letters*, 2018;25;6:514–521. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180530122835>.

© Тихонов С. Л., Тихонова Н. В., Валиева Ш. С., 2024

Статья поступила в редакцию 15.08.2024; одобрена после рецензирования 05.09.2024; принята к публикации 06.09.2024.

The article was submitted 15.08.2024; approved after reviewing 05.09.2024; accepted for publication 06.09.2024.

Информация об авторах

Тихонов Сергей Леонидович, доктор технических наук, профессор кафедры химической технологии древесины, биотехнологии и наноматериалов, Уральский государственный лесотехнический университет; профессор кафедры пищевой инженерии и аграрного производства, Уральский государственный аграрный университет, tihonov75@bk.ru;

Тихонова Наталья Валерьевна, доктор технических наук, профессор, заведующая кафедрой пищевой инженерии и аграрного производства, Уральский государственный аграрный университет;

Валиева Шолпан Сергеевна, аспирант, Южно-Уральский государственный аграрный университет

Information about the authors

Sergey L. Tikhonov, Doctor of Technical Sciences, Professor of the Department of Chemical Technology of Wood, Biotechnology and Nanomaterials, Ural State Forestry University; Professor of the Department of Food Engineering and Agricultural Production, Ural State Agrarian University, tikhonov75@bk.ru;

Natalya V. Tikhonova, Doctor of Technical Sciences, Professor, Head of the Department of Food Engineering and Agricultural Production, Ural State Agrarian University;

Sholpan S. Valieva, Postgraduate Student, South Ural State Agrarian University

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article. The authors declare no conflicts of interests.