

Научная статья

УДК 663.67

EDN EICSME

DOI: 10.22450/19996837_2023_3_97

Разработка мороженого, обогащенного биологически активным пептидом с противовирусными свойствами

Наталья Вадимовна Мерзлякова¹, Сергей Леонидович Тихонов²,
Наталья Валерьевна Тихонова³

¹ Уральский государственный экономический университет
Свердловская область, Екатеринбург, Россия

² Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева
Москва, Россия

³ Уральский государственный аграрный университет
Свердловская область, Екатеринбург, Россия

² tihonov75@bk.ru

Аннотация. Из пепсинового гидролизата молозива коров выделен короткий пептид с молекулярной массой 0,9 кДа, состоящий из 8 аминокислот со следующей последовательностью: лейцин, аргинин, глутаминовая кислота, глицин, изолейцин, лизин, аспарагин, лизин. Согласно базе данных Protein NCBI, полученный пептид неизвестен и биологическое действие его не исследовано. Сделано предположение, что пептид обладает противовирусными свойствами. Для исследований использовали синтезированный пептид – аналог природному. В результате установлено, что синтезированный пептид обладает выраженными противовирусными свойствами в дозе 390 мкг/мл среды. Количество трансдуцированных лентивирусных частиц в геном клетки и проникновение вируса через мембрану клетки в присутствии пептида сократилось на 53,6 и 58,4 % соответственно. Разработано мороженое «Пломбир ванильный 15 %», обогащенное пептидом с противовирусными свойствами. Полученное мороженое соответствовало требованиям ГОСТ 31457–2012 «Мороженое молочное, сливочное и пломбир. Технические условия».

Ключевые слова: мороженое, биологически активные пептиды, молозиво коров, синтез пептидов, противовирусные свойства, аминокислотная последовательность

Для цитирования: Мерзлякова Н. В., Тихонов С. Л., Тихонова Н. В. Разработка мороженого, обогащенного биологически активным пептидом с противовирусными свойствами // Дальневосточный аграрный вестник. 2023. Том 17. № 3. С. 97–104. doi: 10.22450/19996837_2023_3_97.

Original article

Development of ice cream enriched with biologically active peptide with antiviral properties

Nataliya V. Merzlyakova¹, Sergey L. Tikhonov²,
Natalya V. Tikhonova³

¹ Ural State University of Economics, Sverdlovsk region, Yekaterinburg, Russia

² Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy
named after K. A. Timiryazev, Moscow, Russia

³ Ural State Agrarian University, Sverdlovsk region, Yekaterinburg, Russia

² tihonov75@bk.ru

Abstract. A short peptide with a molecular weight of 0.9 kDa was isolated from the pepsin hydrolysate of cow colostrum, consisting of 8 amino acids with the following sequence: leucine,

arginine, glutamic acid, glycine, isoleucine, lysine, asparagine, lysine. According to the Protein NCBI database, the resulting peptide is unknown and its biological effect has not been investigated. It is assumed that the peptide has antiviral properties. A synthesized peptide analog of the natural one was used for the studies. As a result of the studies, it was found that the synthesized peptide has pronounced antiviral properties at a dose of 390 mcg/ml of medium. The number of transmitted lentiviral particles into the cell genome and the penetration of the virus through the cell membrane in the presence of the peptide decreased by 53.6 and 58.4 %. The ice cream "Vanilla ice cream 15 %" enriched with a peptide with antiviral properties was developed. The resulting ice cream met the requirements of GOST 31457–2012 "Milk ice cream, cream".

Keywords: ice cream, biologically active peptides, cow colostrum, peptide synthesis, antiviral properties, amino acid sequence

For citation: Merzlyakova N. V., Tikhonov S. L., Tikhonova N. V. Razrabotka morozhenogo, obogashchennogo biologicheskimi aktivnymi peptidom s protivovirusnymi svoystvami [Development of ice cream enriched with biologically active peptide with antiviral properties]. *Dal'nevostochnyj agrarnyj vestnik. – Far Eastern Agrarian Bulletin*. 2023; 17; 3: 97–104. (in Russ.). doi: 10.22450/19996837_2023_3_97.

Введение. Для удовлетворения потребностей населения в микронутриентах периодически расширяется ассортимент функциональных продуктов питания [1–3]. Результатами научных исследований подтверждено, что употребление молочных продуктов благоприятно влияет на здоровье человека [4].

Мороженое – продукт, широко известный и потребляемый всеми возрастными группами населения по всему миру. Растущие опасения диетологов по поводу воздействия на здоровье привели к росту интереса к мороженому, изготовленному с включением полезных ингредиентов, включая пребиотики, пробиотические бактерии и другие биологически активные вещества. Но вместе с тем, на потребительском рынке редко встречается мороженое, обогащенное функциональными ингредиентами [5].

В качестве функциональных ингредиентов, используемых для обогащения мороженого, можно рассматривать биологически активные пептиды с противовирусной и антимикробной активностью, полученные из молочных белков [6, 7].

Целью исследований является разработка мороженого, обогащенного синтезированным биологически активным пептидом (аналог нативного, выделенного из молозива коров) с антимикробными и противовирусными свойствами.

Методы исследований. В качестве объекта исследований использовали синтезированный аналог пептида, выделенно-

го из пепсинового гидролизата молозива коров.

Пептид идентифицировали на масс-спектрометре МАЛДИ-ТОФ. Расшифровку проводили с помощью базы данных Mascot, опция Peptide Fingerprint («Matrix Science», США) с использованием базы данных Protein NCBI.

Score (величину достоверности для каждого совпадения) пептида рассчитывали по формуле (1):

$$\text{Score} = \frac{50000}{M_{\text{prot}} \cdot P_{\text{nm}} \quad (1)$$

где M_{prot} – молекулярная масса для каждого совпавшего белка;

P_{nm} – произведение, которое рассчитывается из Mowse-матрицы весов M для каждого совпадения экспериментальных данных и масс пептидов, рассчитанных из записей в геномной базе данных Protein NCBI.

Получение пептида (аналога природному) проводили в компании Perpic Co., Ltd (Сучжоу, Китай) стандартным твердофазным пептидным синтезом Fmoc (SPPS) с последующей очисткой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, выполняемой на хроматографической колонке SHIMADZU Inertsil ODS-SP (4,6 × 250 мм × 5 мкм).

Подтверждение чистоты и первичной структуры пептида выполняли с по-

мощью масс-спектрометрии на MALDI и ESI.

Для изучения воздействия пептида на интеграцию в геном и проникновение в мембрану лентивирусных частиц в качестве модельного объекта использовали клеточные линии С6 (ATCC CCL-107™), чей пассаж не превышал 15 на время проведения экспериментальных работ, а также НЕК 293Т (ATCC CRL-3216™), чей пассаж не превышал 20 на время проведения экспериментальных работ.

Для культивирования использовали среду DMEM (Gibco, США), к которой добавляли до конечного объема 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) (Capricorn, США), 1 % Sodium Pyruvate (Gibco, США), 1 % GlutaMAX (Gibco, США), 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, США).

Клетки хранили в CO₂-инкубаторе при условии: CO₂ – 5 %, влажность – 95 %. За две недели до начала проведения эксперимента клетки проверяли на наличие микоплазмы набором MycoReport (Евроген, Россия).

Экспериментальные образцы мороженого получали в соответствии с требованиями ГОСТ 31457-2012 «Мороженое молочное, сливочное и пломбир. Технические условия» в ООО «Хладокомбинат № 3» (г. Екатеринбург).

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения OriginPro 9.0 (Originlab Corporation, США). Данные представлены в виде сред-

него значения (плюс (минус) стандартная ошибка среднего значения). Статистическая значимость различий в полученных данных оценивалась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (U).

Результаты исследований и их об- суждение. В результате исследований из пепсинового гидролизата молозива коров выделен пептид, характеристика которого представлена в таблице 1.

Выделенный из молозива коров пептид состоит из восьми аминокислот со следующей последовательностью в пептидной цепи:

- лейцин (лей, L);
- аргинин (арг, R);
- глутаминовая кислота (глу, E);
- глицин (гли, G);
- изолейцин (иле, I);
- лизин (лиз, K);
- аспарагин (асн, N);
- лизин (лиз, K).

Согласно базе данных Protein NCBI, полученный пептид неизвестен и, соответственно, биологическое действие его не исследовано. Нами дано условное название пептиду – RR1.

Согласно исследованиям [8], проведенным *in vitro*, природный пептид RR1 обладает выраженными противоопухолевыми свойствами. Согласно данным, представленным в работе [9], некоторые

Таблица 1 – Характеристика пептида, выделенного из пепсинового гидролизата молозива коров

Table 1 – Characteristics of the peptide isolated from pepsin hydrolysis of bovine colostrum

Аминокислотная последовательность (количество аминокислот)	Подобный пептид по базе данных Protein NCBI	Score (оптимальный Score = 80)	Биологическое действие	Молекулярная масса, Да
LREGIKNK (8)	подобный пептид не найден, так как уровень покрытия с известными пептидами низкий	76	ранее не исследовано	956

противоопухолевые пептиды могут обладать противовирусными свойствами.

Так как получение природного пептида сопряжено с определенными трудностями: стабильные качественные характеристики сырья – молозива коров (химический состав); поддержание соответствующих технологических параметров ферментативного гидролиза (температура, кислотность, продолжительность) и др., для исследования противовирусных свойств и последующего обогащения мороженого был получен синтезированный пептид – аналог природного с условным названием RR1c.

В таблице 2 представлена информация о процессе синтеза пептида RR1c.

На рисунке 1 представлена хроматограмма пептида RR1c.

В таблице 3 представлены пиковые значения хроматограммы пептида RR1c (детектор A Chi1/220 нм).

На рисунке 2 представлен масс-спектр пептида RR1c.

В таблице 4 представлена теоретическая и фактическая молекулярная масса пептида RR1c.

В результате исследований установлено, что синтезированный пептид RR1c

Таблица 2 – Информация о процессе синтеза пептида RR1c

Table 2 – Information on the process of synthesis of the RR1c peptide

Наименование пептида	RR1c
Последовательность	LREGIKNK
Серия	PCM 15633-2-1224
Насос А	0,1 % трифторуксусной кислоты в 100 % воды
Насос В	0,1 % трифторуксусной кислоты в 100 % ацетонитрила
Общий поток	1 мл/мин
Длина волны	220 нм
Тип аналитической колонки	SHIMADZU Inertsil ODS-SP (4,6 × 250 мм × 5 мкм)
Способ растворения	100 % H ₂ O
Объем впрыска	20 мкл

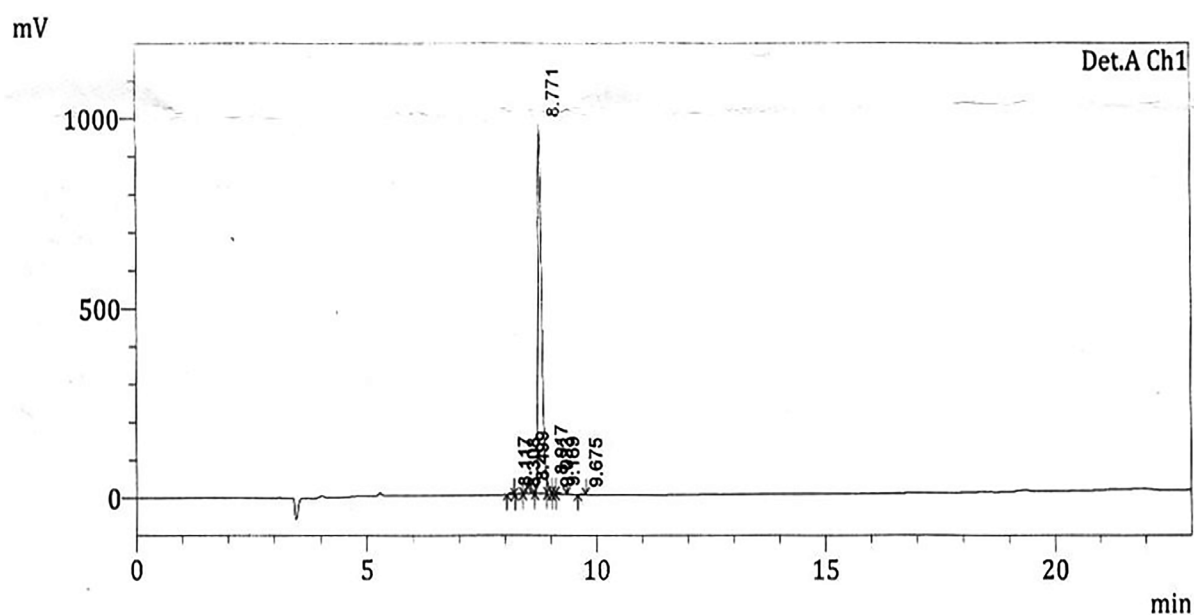


Рисунок 1 – Хроматограмма пептида RR1c

Figure 1 – Chromatogram of the RR1c peptide

Таблица 3 – Величины пиков хроматограммы пептида RR1c (детектор A Chi1/220 нм)
Table 3 – RR1c Peptide Chromatogram Peak Values (detector A Chi1/220 nm)

Номер пика	Текущее время, с	Площадь, %	Высота, %
1	8,117	0,440	0,555
2	8,308	0,252	0,251
3	8,499	1,727	1,836
4	8,771	95,194	93,018
5	8,917	1,527	3,376
6	9,033	0,139	0,224
7	9,169	0,421	0,424
8	9,675	0,299	0,316
Итого	–	100,000	100,000

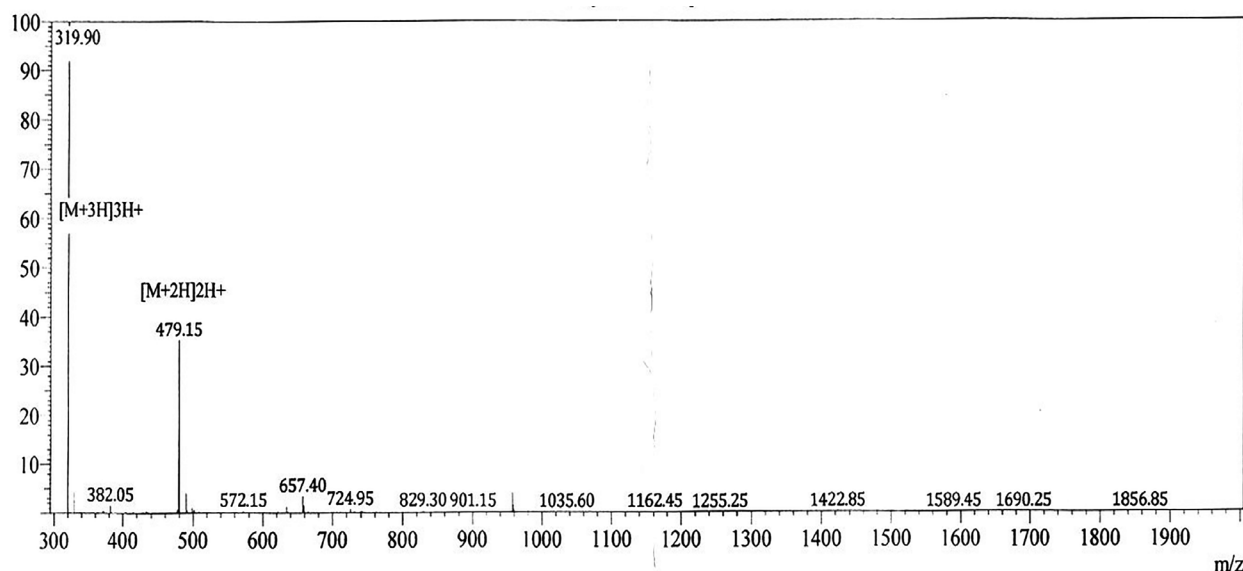


Рисунок 2 – Масс-спектр пептида RR1c
Figure 2 – Mass spectrum of the RR1c peptide

Таблица 4 – Теоретическая и фактическая молекулярная масса пептида RR1c
Table 4 – Theoretical and actual molecular weight of the RR1c peptide

Образец	RR1c
Последовательность	LREGIKNK
Номер	PCM15633-1-1224
Теоретическая молекулярная масса, Да	957,14
Фактическая молекулярная масса, Да	956,70

обладает выраженными противовирусными свойствами в дозе 390 мкг/мл среды. Так, количество трансдуцированных лентивирусных частиц в геном клетки, определяемых по наличию в них экспрессии зеленого флуоресцентного белка (*Green fluorescent protein* – GFP), и проникновение вируса через мембрану клетки сократилось на 53,6 и 58,4 % соответственно, по сравнению со средой, в которой отсутствовал пептид ($p \leq 0,0001$).

Нами разработана рецептура мороженого «Пломбир ванильный 15 %», обогащенного пептидом RR1c (табл. 5).

Пептид предварительно растворяли в пастеризованной воде при температуре 40 °С в соотношении 1:1 000.

Мороженое, обогащенное противовирусным пептидом, соответствовало требованиям ГОСТ 31457–2012 «Мороженое

молочное, сливочное и пломбир. Технические условия» по органолептическим и физико-химическим показателям; отмечены достоверные отличия от контрольных образцов мороженого без дополнительного введения в рецептуру пептида.

Заключение. В результате проведенных методом трехфазного синтеза исследований получен короткий биологически активный пептид, состоящий из восьми аминокислот.

В исследованиях *in vitro* установлено, что пептид обладает противовирусными свойствами в концентрации 390 мкг.

Разработано мороженое, обогащенное противовирусным пептидом. Доказано, что полученное мороженое соответствует требованиям нормативной документации.

Таблица 5 – Рецептура мороженого «Пломбир ванильный 15 %», обогащенного пептидом RR1c

Table 5 – Ice cream recipe "Vanilla ice cream 15 %" enriched with RR1c peptide

Наименование сырья	Количество, кг	Химический состав, %			
		молочный жир	СОМО	сахароза	сухие вещества
Молоко цельное	500,000	3,20	8,10	0,00	11,30
Молоко сгущенное с сахаром цельное	175,000	8,50	20,00	43,50	72,00
Масло сливочное	144,400	82,50	1,50	0,00	84,00
Молоко сухое обезжиренное	23,500	–	95,00	–	95,00
Сахар-песок	63,900	–	–	100,00	100,00
Стабилизатор-эмульгатор	3,500	–	–	–	95,00
Пептид	0,300	–	–	–	–
Ароматизатор ванилин	0,100	–	–	–	–
Итого сырья	910,679	–	–	–	–
Вода питьевая	89,321	–	–	–	–
Итого	1 000,000	15,00	10,00	14,00	39,38

Список источников

1. Villava F. J., Cravero Bruneri A. P., Vinderola G., Goncalvez De Oliveira E., Paz N. F., Ramon A. N. [et al.]. Formulation of a peach ice cream as potential symbiotic food // *Journal of Food Science and Technology*. 2017. Vol. 37. P. 456–461. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-457x.19716>.
2. Иванкина И. Ф., Решетник Е. И., Фролова Н. А. Функциональная пищевая добавка вторичного сырья пантового оленеводства для обогащения кондитерских изделий // *Дальневосточный аграрный вестник*. 2013. № 4 (28). С. 50–52. EDN: TMWSKN.
3. Решетник Е. И., Уточкина Е. А. Влияние компонентного состава на пищевую и биологическую ценность продукта // *Вестник Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления*. 2013. № 2 (41). С. 63–67. EDN: PZDKZB.
4. Thorning T. K., Bertram H. C., Bonjour J.-P., De Groot L., Dupont D., Feeney E. [et al.]. Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: current evidence and knowledge gaps // *American Journal of Clinical Nutrition*. 2017. Vol. 105. P. 1033–1045. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.151548>.
5. Sun-Waterhouse D. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review // *International Journal of Food Science and Technology*. 2011. Vol. 46. P. 899–920. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02499.x>.
6. Тихонов С. Л., Чернуха И. М. Полипептид молозива коров – перспективный функциональный ингредиент специализированной пищевой продукции для профилактики вирусных инфекций // *Ползуновский вестник*. 2023. № 1. С. 114–122. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.014.
7. Guha S., Sharma H., Deshwal G. K., Rao P. S. A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species // *Food Production, Processing and Nutrition*. 2021. Vol. 3 (2). DOI: <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00045-7>.
8. Тихонов С. Л., Тихонова Н. В. Функциональное исследование противоопухолевых природных пищевых пептидов // *Дальневосточный аграрный вестник*. 2022. Т. 16. № 4. С. 122–130. DOI: 10.22450/199996837_2022_4_122.
9. Sani M.-A., Separovic F. How membrane-active peptides get into lipid membranes (Available from) // *Accounts of Chemical Research*. 2016. Vol. 49 (6). P. 1130–1138. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00074.

References

1. Villava F. J., Cravero Bruneri A. P., Vinderola G., Goncalvez De Oliveira E., Paz N. F., Ramon A. N. [et al.]. Formulation of a peach ice cream as potential symbiotic food. *Journal of Food Science and Technology*, 2017; 37: 456–461. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-457x.19716>.
2. Ivankina N. F., Reshetnik E. I., Frolova N. A. Funktsional'naya pishchevaya dobavka vtorichnogo syr'ya pantovogo olenevodstva dlya obogashcheniya konditerskikh izdelii [Functional food additive secondary raw antler deer-raising for enrichment confectionery]. *Dal'nevostochnyy agrarnyy vestnik. – Far Eastern Agrarian Bulletin*, 2013; 4 (28): 50–52 EDN: TMWSKN (in Russ.).
3. Reshetnik E. I., Utochkina E. A. Vliyanie komponentnogo sostava na pishchevuyu i biologicheskuyu tsennost' produkta [Influence of the component composition on the nutritional and biological value of the product]. *Vestnik Vostochno-Sibirskogo gosudarstvennogo universiteta tekhnologij i upravleniya. – Bulletin of the East Siberian State University of Technology and Management*, 2013; 2 (41): 63–67. EDN: PZDKZB (in Russ.).
4. Thorning T. K., Bertram H. C., Bonjour J.-P., De Groot L., Dupont D., Feeney E. [et al.]. Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: current evidence and knowledge gaps. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2017; 105: 1033–1045. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.151548>.
5. Sun-Waterhouse D. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011; 46: 899–920. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02499.x>.

6. Tikhonov S. L., Chernukha I. M. Polipeptid moloziva korov – perspektivnyi funktsional'nyi ingredient spetsializirovannoi pishchevoi produktsii dlya profilaktiki virusnykh infektsii [Cow colostrum polypeptide is a promising functional ingredient in the composition of specialized food products for the prevention of viral infections]. *Polzunovskii vestnik. – Polzunovsky Bulletin*, 2023; 1: 114–122 DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.014 (in Russ.).

7. Guha S., Sharma H., Deshwal G. K., Rao P. S. A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2021; 3 (2). DOI: <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00045-7>.

8. Tikhonov S. L., Tikhonova N. V. Funktsional'noe issledovanie protivopukholevykh prirodnykh pishchevykh peptidov [Functional study of antitumorigenic natural food peptides]. *Dal'nevostochnyj agrarnyj vestnik. – Far Eastern Agrarian Bulletin*, 2022; 4: 122–130. DOI: 10.22450/199996837_2022_4_122 (in Russ.).

9. Sani M.-A., Separovic F. How membrane-active peptides get into lipid membranes (Available from). *Accounts of Chemical Research*, 2016; 49 (6): 1130–1138. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00074.

© Мерзлякова Н. В., Тихонов С. Л., Тихонова Н. В., 2023

Статья поступила в редакцию 25.07.2023; одобрена после рецензирования 29.08.2023; принята к публикации 04.09.2023.

The article was submitted 25.07.2023; approved after reviewing 29.08.2023; accepted for publication 04.09.2023.

Информация об авторах

Мерзлякова Наталия Вадимовна, аспирант, Уральский государственный экономический университет;

Тихонов Сергей Леонидович, доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой технологии хранения и переработки плодоовощной и растениеводческой продукции, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева, tihonov75@bk.ru;

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

Information about authors

Nataliya V. Merzlyakova, Postgraduate Student, Ural State University of Economics;

Sergey L. Tikhonov, Doctor of Technical Sciences, Professor, Head of the Department of Technology of Storage and Processing of Fruit and vegetable and Crop Products, Russian State Agrarian University – Moscow State Agricultural Academy named after K. A. Timiryazev, tihonov75@bk.ru;

Natalya V. Tikhonova, Doctor of Technical Sciences, Professor, Head of the Department of Food Engineering and Agricultural Production, 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.