

На правах рукописи

Кручинин Александр Геннадьевич

**ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ТЕХНОЛОГИИ ТАРГЕТИРОВАННОЙ
БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ КОНВЕРСИИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ
КОМПЛЕКСОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ**

4.3.3 – Пищевые системы

4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора технических наук

МОСКВА, 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

Научный консультант: доктор технических наук, профессор
Мельникова Елена Ивановна

Официальные оппоненты: **Кригер Ольга Владимировна**
доктор технических наук, доцент,
ФГАОУ ВО «Национальный
исследовательский университет ИТМО»,
факультет биотехнологий, профессор

Римарева Любовь Вячеславовна
доктор технических наук, профессор,
академик РАН, ВНИИПБТ – филиал
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,
отдел биотехнологии ферментов, дрожжей,
органических кислот и биологически
активных добавок, главный научный
сотрудник

Курбанова Марина Геннадьевна
доктор технических наук, доцент,
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный
университет», кафедра технологии продуктов
питания животного происхождения,
заведующая кафедрой

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский
федеральный университет»

Защита состоится «19» сентября 2024 года в 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 24.1.257.01 при ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН по адресу: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН и на сайте www.vniimp.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат технических наук,
старший научный сотрудник

А.Н. Захаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В современном обществе проблема несбалансированного и неполноценного питания человека в условиях стремительной урбанизации и изменения уровня жизни, усиливающегося влияния антропогенных негативных воздействий, ухудшения экологической обстановки, тяжелых, а также вредных условий труда, часто возникающих стрессовых ситуаций, остается одной из глобальных, как в социально-экономическом, так и в медицинском аспектах. Согласно мониторинговым данным ВОЗ, сохраняющаяся на протяжении 30 лет тенденция в изменении структуры питания привела к росту распространения неинфекционных алиментарно-зависимых заболеваний (НИЗ), среди которых следует выделить сердечно-сосудистые заболевания, заболевания желудочно-кишечного тракта, белково-энергетическую недостаточность, избыточный вес и ожирение, сахарный диабет 2 типа, остеопороз и пр. Анализируя сложившуюся ситуацию, становятся очевидными необходимость и актуальность разработки современных биотехнологических подходов к созданию новых пищевых продуктов и ингредиентов, сохраняющих и стимулирующих естественные механизмы защиты организма человека от воздействия неблагоприятных факторов среды, а также способствующих профилактике и снижению выраженности негативных последствий НИЗ. Сущность и необходимость развития данного направления сформулированы в Доктрине продовольственной безопасности РФ, утверждённой Указом Президента РФ от 21.01.2020 г. № 20, Стратегии повышения качества пищевой продукции в РФ до 2030 г., утверждённой распоряжением Правительства РФ от 29.06.2016 г. № 1364-р, Стратегии формирования здорового образа жизни населения, профилактики и контроля неинфекционных заболеваний на период до 2025 года (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 15 января 2020 г. № 8).

Быстрое развитие компьютерных технологий и глубоких аналитических методов привели к увеличению количества исследований, направленных на изучение фундаментальной проблемы современной фудомики – технологии высвобождения биологически активных пептидов (БАП) из пищевого сырья и доказательства их роли в регулировании различных функций организма, поддержании иммунологического статуса и снижении риска развития НИЗ. В то же время наукометрический анализ свидетельствует, что степень проработанности заявленной тематики исследований в РФ значительно уступает мировым лидерам в данной области и находится на уровне становления концептуальных основ и формирования собственного исследовательского опыта. Таким образом, развитие и дальнейшая интенсификация технологических решений совокупно с интеграцией современных алгоритмов биоинформатического моделирования, направленных на высвобождение БАП из структуры белка, являются одними из актуальных направлений исследований, а также перспективной стратегией по созданию продуктов функционального назначения (в т.ч. молочных) для профилактики НИЗ, что подтверждается Программой фундаментальных научных исследований в РФ на долгосрочный период (2021 – 2030 годы), утверждённой распоряжением Правительства РФ от 31.12.2020 г. № 3684-р.

Переориентация российского рынка сыра и творога на импортозамещение вследствие введенных санкций со стороны стран Евросоюза, США, Австралии и др. привело к закономерному увеличению объемов производства молочной сыворотки. Несмотря на постоянный мониторинг и штрафные санкции со стороны государства, большая часть производимой сыворотки по-прежнему утилизируется совместно с промышленными сточными водами на муниципальных очистных сооружениях либо на полях аэрации, создавая глобальную угрозу для экологии страны. В то же время, многочисленными исследованиями подтверждено, что пептидом сывороточных белков обладает большим потенциалом для высвобождения широкого спектра БАП. В данном контексте глубокая переработка молочной сыворотки с применением наукоемких технологий и биокаталитической конверсии белков, направленной на высвобождение БАП, является актуальным направлением, отвечающим Стратегии экологической безопасности РФ на период до 2025 года, утвержденной Указом Президента РФ от 19.04.2017 г. № 176.

Таким образом, развитие и интенсификация биотехнологических подходов к глубокой переработке молочного сырья с получением пептидно-белковых гидролизатов как источника БАП с доказанным действием являются актуальным и долгосрочным трендом в пищевой промышленности, требующим сочетания комплексного фундаментального анализа сырья и процессов переработки с возможностью дальнейшего трансфера полученных научных решений в промышленные технологии молочных продуктов с высокой добавленной стоимостью. В целом заявленный потенциал результатов работы соответствует Стратегии научно-технологического развития РФ, утвержденной Указом Президента РФ от 1 декабря 2016 г. № 642 в части «Г».

Степень разработанности темы исследования. По данным проведенного библиометрического и наукометрического анализа периодической научной литературы значительный вклад в научные и практические аспекты выделения и идентификации биологически активных пептидов из структуры молочного белка, а также формирования доказательной базы их положительного влияния на организм человека внесли зарубежные ученые: Amigo L., FitzGerald R.J., Gonzalez-Cordova A.F., Hernandez-Ledesma B., Kapila R., Kapila S., Korpela R., Miralles B., Nielsen S.D., Nongonierma A.B., Ramos M., Recio I., Tagliazucchi D., Vallejo-Cordoba B., Wu J.P. и отечественные ученые: Агаркова Е.Ю., Бабич О.О., Забодалова Л.А., Зорин С.Н., Королева О.В., Круглик В.И., Курченко В.П., Мельникова Е.И., Просеков А.Ю., Федорова Т.В., Харитонов В.Д. и другие. Анализ публикаций позволил оценить актуальность и масштаб проработанности темы, выявить основные научные школы и направление вектора дальнейшего развития пептидомии в молочной промышленности. Следует отметить, что доля России в общем потоке научной информации в заявленной области исследований крайне мала, что подчеркивает необходимость устранения критического отставания и перспективность развития данного направления исследований с учетом международного опыта.

Цель и задачи работы. Целью работы являлось развитие методологических принципов таргетированной биокаталитической конверсии полипептидных комплексов молочной сыворотки, когерентных современным тенденциям пептидомики, с дальнейшим трансфером научных решений в промышленные технологии молочных продуктов.

Задачи диссертационной работы:

1. Провести квантитативный анализ мирового рынка молочной сыворотки и теоретически обосновать современные методологические подходы к высвобождению из структуры молочных белков биоактивных пептидов с учетом их нутрициологического потенциала в профилактике неинфекционных алиментарно-зависимых заболеваний.

2. Разработать систему классификации молочной сыворотки на основе интегративного подхода и исследовать влияние полиморфизма гена *CSN3* на формирование белкового профиля молочных сывороток с учетом основных биотехнологических аспектов производства.

3. Разработать и практически реализовать алгоритм гибридной стратегии биоинформатического моделирования таргетированного ферментативного высвобождения биоактивных пептидов из белков молочной сыворотки с учетом ранжирования ключевых критериев на основе высокопроизводительных алгоритмов протеомных баз данных.

4. Провести биоинформатическое моделирование процесса биокаталитической конверсии на основе принципа «цифровых двойников» и разработать программное обеспечение для прогностической оценки потенциальной концентрации биоактивных, токсиноподобных и аллергенных пептидов, высвобождаемых из вариабельных белковых матриц молочных сывороток.

5. Разработать и оптимизировать процесс ферментативного гидролиза нативных и термоденатурированных сывороточных белков с критериальным учетом функции желательности, заключающейся в получении ГСБ с максимальной антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностью.

6. Обосновать использование каскадно-селективной мембранной фильтрации для очистки гидролизатов сывороточных белков, исследовать пептидный профиль и провести идентификацию биоактивных пептидов в очищенных ГСБ с применением протеомных баз данных.

7. Установить зависимости изменения технологических свойств ГСБ от продолжительности таргетированной биокаталитической конверсии белков молочной сыворотки.

8. Доказать на моделях лабораторных крыс (*in vivo*) безопасность и функциональные свойства гидролизатов сывороточных белков.

9. Разработать и экономически обосновать технологии сухих гидролизатов сывороточных белков с доказанными функционально-технологическими свойствами, а также интенсифицировать промышленные технологии молочных продуктов путем внедрения научных решений, включающих использование гидролизированных сывороточных белков.

Научная новизна. Предложена методология оценки структуры мирового, и, в частности, российского рынка молочной сыворотки с

использованием количественного анализа, с последующей валидацией данных посредством контент-анализа.

Предложена система классификации молочной сыворотки на основе интегративного подхода и получены новые знания об основных закономерностях совокупного влияния генетического полиморфизма *CSN3* и методов коагуляции белков молока на формирование критериальных отличий в физико-химических показателях и белковом профиле молочных сывороток с учетом основных биотехнологических аспектов производства.

Разработан алгоритм гибридной стратегии биоинформатического моделирования гидролиза для таргетированного высвобождения пептидов с прогнозируемой биоактивностью, безопасностью и сенсорными характеристиками из сложных белковых матриц молочного сырья.

Сформулирован принцип «цифровых двойников» применительно к гидролизатам сывороточных белков для прогностической оценки потенциальной концентрации биоактивных, токсиноподобных и аллергенных пептидов, высвобождаемых из переменных белковых матриц молочных сывороток.

Научно обоснованы и оптимизированы параметры технологического процесса биокаталитической конверсии нативных и термоденатурированных сывороточных белков, направленной на получение ГСБ с максимальной антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностью.

Установлены эмпирические зависимости, описывающие взаимосвязь технологических свойств гидролизатов с продолжительностью процесса биоконверсии нативных и термоденатурированных сывороточных белков.

Доказаны на моделях *in vitro* и *in vivo* функциональные свойства и безопасность гидролизатов сывороточных белков.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенные исследования представляют концептуальный подход к процессу таргетированной биоконверсии белковых субстратов, направленной на высвобождение БАП с целевой биологической функцией. Фундаментальное значение подтверждено в форме развития теоретических и практических основ, связанных с фудомикой, биотехнологией, биоинформатикой, генетикой и селекцией молочного КРС, а также валоризацией и глубокой переработкой молочной сыворотки.

Систематизация полученных данных молекулярно-генетических исследований позволила расширить текущий объем данных о ДНК-маркерах прижизненного формирования молочной продуктивности животных, состава и технологических свойств сырого молока, а также открывает новые возможности для дальнейшего развития направления научных исследований, что в долгосрочной перспективе непременно отразится на коррекции селекционных программах по разведению молочных пород КРС.

Развитие принципов таргетированной биокаталитической конверсии белков вторичного молочного сырья с интегрированным алгоритмом гибридной стратегии биоинформатического моделирования способствовало аккумулярованию необходимых первичных данных для сокращения временных и экономических затрат на проведение экспериментов *in vitro*, а также позволило

реализовать прогностический подход к выбору субстрата и коммерческих протеаз в зависимости от требуемой биологической активности.

Проведенные исследования позволили расширить понимание процессов таргетированной биоконверсии и разработать наукоемкие и экономически эффективные технологии замкнутого цикла производства молочных (в т.ч. обогащенных) продуктов, позволяющие решить проблемы загрязнения окружающей среды и рационального использования природных ресурсов.

Теоретические принципы и аспекты исследований положены в основу разработки программного обеспечения, представленного в перечне результатов интеллектуальной деятельности.

Научные положения и материалы диссертационной работы внедрены в образовательный процесс подготовки бакалавров и магистров (направление 19.03.03 и 19.04.03 «Продукты питания животного происхождения») ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» и ФГБОУ ВО «МГУТУ им. К.Г. Разумовского (ПКУ)».

На основании результатов исследований разработано 12 комплектов технической документации. Разработанные и интенсифицированные технологии прошли апробацию и внедрены в производство на 12 предприятиях молочной промышленности стран-членов СНГ.

Методология и методы исследований. Основные этапы теоретических и экспериментальных исследований выполнены на базе ФГАНУ «ВНИМИ» в рамках реализации Программы фундаментальных научных исследований (ПФНИ) государственных академий наук на 2013-2020 гг., государственного задания на 2019-2022 гг., Государственного контракта (ГК) № 12.527.0025-153 «Разработка технологии получения гипоаллергенных функциональных молочных продуктов» в рамках Федеральной целевой программы (ФЦП), грантов РФ 16-16-00094 «Разработка технологии получения новых функциональных ингредиентов животного происхождения – пептидных гидролизатов молочных белков и создание функциональных продуктов на основе гидролизатов, про- и пребиотиков», РФ 21-76-00044 «Разработка технологии биокаталитической конверсии сывороточных белков молока в денатурирующих условиях» и частично РФ 24-26-00220 «Разработка технологии направленной биокаталитической модификации α -лактальбумина с целью повышения реакционной способности к специфическому связыванию ионов йода и цинка для коррекции патологических процессов при йоддефицитных состояниях». Часть исследований была проведена на базе ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ООО «Итальянские традиции», ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, ЦКП «Протеом человека» Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, с четкой градацией прав интеллектуальной собственности.

Методология работ построена на реализации логически взаимосвязанных этапов (аналитико-обзорного, молекулярно-генетического, биоинформатического, биокаталитического, технологического, аподиктического и практического), необходимых для достижения поставленной цели и решения задач исследования.

Программа исследовательских испытаний включала в себя стандартизованные и общепринятые методы, а также адаптированные под

конкретные научные задачи методики из других отраслей пищевой промышленности.

Эксперименты на лабораторных животных проводили в соответствии с законодательством о защите животных, используемых в научных целях в России (директива Минздрава России № 199н от 1 апреля 2016 г.) и ЕС (директива 2010/63/ЕС).

Положения, выносимые на защиту. Система классификации молочной сыворотки, сформированная на основе интегративного подхода с учетом основных технологических аспектов ее производства.

Новые систематизированные данные о взаимосвязи генетического полиморфизма *CSN3* у коров черно-пестрой породы и типа коагуляции белков молока с формированием белкового профиля молочных сывороток.

Алгоритм гибридной стратегии биоинформатического моделирования таргетированной биокаталитической конверсии белков молочной сыворотки.

Научно-обоснованные принципы создания ГСБ и доказательства их биологических свойств, а также безопасности в системах *in vitro* и *in vivo*.

Результаты изменения технологических свойств гидролизатов в зависимости от продолжительности процесса биокаталитической конверсии нативных и термоденатурированных сывороточных белков.

Концептуальный подход к обогащению молочных продуктов ГСБ с доказанными функционально-технологическими свойствами.

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно и является результатом многолетних научных изысканий. Автором лично сформулирована проблема, определена цель, спланированы задачи и структура исследований, установлены подходы к их реализации. Теоретические и экспериментальные результаты исследований, представленные в диссертационной работе, получены, статистически обработаны и интерпретированы лично автором. Автор также принимал непосредственное участие в разработке технической документации и лично участвовал в промышленной апробации и внедрении результатов диссертационной работы в производство.

Степень достоверности. Достоверность теоретических и экспериментальных данных подтверждается тщательно спланированной программой исследовательских испытаний, размером выборки объектов исследований, применением современной научно-методической и приборной базы, а также методов статистической обработки массивов данных. Полученные результаты исследований неоднократно подвергались рецензированию со стороны научного сообщества при реализации ПФНИ, ГЗ, ГК, грантов и публикации статей в высокорейтинговых периодических изданиях, являются логичными и не противоречат существующим знаниям.

Апробация результатов исследований. Основные результаты работы доложены и получили высокую оценку на конференциях и конгрессах различного уровня: Отраслевой конференции «Функциональные молочные продукты: здоровье и инновации» (Москва, 2024), Всероссийских конгрессах с международным участием «Нутрициология и диетология для здоровьесбережения населения России» (Москва, 2018, 2023 г.), Международной научно-практической конференции «Производство сыра,

масла и другой молочной продукции в современных условиях. Проблемы и пути решения» (Углич, 2023 г.), Научно-практических конференциях с международным участием «Роговские чтения» (Москва, 2022, 2023 г.), Международных научно-практических конференциях «Актуальные вопросы и современные решения в области пищевых систем» (Москва, 2016, 2022 г.), Научно-практическом форуме «Россия в XXI веке: глобальные вызовы, риски и решения» (Москва, 2022 г.), Международной научно-практической конференции «Питание детей. Интеграция науки, образования и промышленности» (Могилев, 2021 г.), Международной научно-практической конференции «Молочная и молкосодержащая продукция» (Москва, 2020 г.), II конференции по пищевой химии «Формирование будущего качества, безопасности, питания и здоровья пищевых продуктов» (Севилья, 2019), научной конференции «Актуальные вопросы создания функциональных продуктов птицеводства и других отраслей пищевой промышленности» (р.п. Ржавки, 2018 г.), Международных форумах «Биотехнологии: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, 2015, 2018 г.), Международных научно-практических конференциях «Новые подходы к разработке технологий производства и переработки сельскохозяйственной продукции» (Волгоград 2015, 2017, 2018, 2022 г.), VI Международной научно-практической конференции «Инновационные пищевые технологии в области хранения и переработки сельхозсырья: фундаментальные и прикладные аспекты» (Анапа, 2016 г.) и других.

Результаты работы отмечены дипломом I степени, золотой и серебряной медалями на Всероссийских смотр-конкурсах лучших пищевых продуктов (Волгоград, 2015, 2017, 2022 г.), дипломами победителя Международной научной конференции «Живые системы» (Москва, 2015 г.) и Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи» (Москва, 2017 г.), дипломом за лучший устный доклад на XV Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы и современные решения в области пищевых систем» (Москва, 2022 г.) и другими наградами.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 83 печатные работы, в том числе 2 монографии; 1 учебное пособие; 17 статей в журналах, входящих в международные базы данных Web of Science и Scopus; 3 статьи в журналах, входящих в базу данных RSCI; 24 статьи в журналах из перечня ВАК (К1-К2); 32 публикации в журналах, индексируемых в базе данных РИНЦ, и материалах конференций, а также получено 4 свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 8 взаимосвязанных глав, основных результатов и выводов, библиографии и приложений. Диссертация изложена на 444 страницах, включает в себя 134 таблицы и 78 рисунков. Библиография включает 460 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель и определены задачи, представлена научная новизна и

практическая значимость работы. Приведены основные научные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов исследований, положения, выносимые на защиту.

В первой главе на этапе аналитического обзора с использованием методологии количественного анализа рассмотрено современное состояние мирового и, в частности, российского рынка производства молочной сыворотки как потенциального субстрата для таргетированной биокаталитической конверсии белка. В алгоритм методологии количественного анализа заложена статистическая информация, отражающая объем производства целевой продукции (полутвердые сыры, творог и пр.), комплексная усредненная норма расхода молока базисной жирности, пошедшего на производство 1 т целевого продукта, а также усредненная норма сбора сыворотки на уровне 75% для свежих сыров и творога, а также 80% для твердых и полутвердых сыров (с учетом потерь). Данные подвергались проверке посредством контент-анализа, что позволяло провести отбраковку недостоверных сведений. В обзоре также приведен полномасштабный анализ и обсуждение исследований, связанных с оптимизацией производства биоактивных пептидов из молочного сырья, методами очистки и идентификации, механизмами действия антиоксидантных, АПФ-ингибирующих пептидов. Рассмотрены механизмы токсического действия и аллергических реакций как основные факторы риска при производстве биоактивных пептидов из молочного сырья. По итогам данной главы выявлен ряд пробелов в современных научных знаниях, которые позволили сформировать собственную концепцию, цель и задачи исследований.

Во второй главе приведена методология и методы исследований. Структурно-иерархическая схема исследований представлена на рисунке 1.

На разных этапах диссертационной работы объектами исследований являлись: цельное молоко, полученное от здоровых коров с гомо- и гетерозиготным генотипом *CSN3*, содержащихся на молочных фермах ЗАО «Совхоз им. Ленина» (Московская область), ООО «Николаевские фермы» (Воронежская область), КФХ «Мухаметшин» (Республика Татарстан); молокосвертывающие ферментные препараты (Cagliificio Clerici, Италия); заквасочные культуры из коллекции Центральной лаборатории микробиологии ФГАНУ «ВНИМИ»; сыворотки, полученные при кислотной (творог, кислотный казеин), кислотно-сычужной (творог, сыры типа «Моцарелла»), сычужной (сыры с высокой и низкой температурой второго нагревания), термокислотной (свежие сыры типа «Адыгейский») и термокальциевой (высококальциевый копреципитат) коагуляции белков молока; информация о субстратной специфичности ферментов пепсин (ЕС 3.4.23.1), панкреатическая эластаза (ЕС 3.4.21.36), протеиназа Р1 (ЕС 3.4.21.96), фицин (ЕС 3.4.22.3), стим бромелайн (ЕС 3.4.22.32), химотрипсин А (ЕС 3.4.21.1) и С (ЕС 3.4.21.2), протеиназа К (ЕС 3.4.21.67), папаин (ЕС 3.4.22.2), термолизин (ЕС 3.4.24.27), субтилизин (ЕС 3.4.21.62), коколизин (ЕС 3.4.24.30), химаза (ЕС 3.4.21.39), трипсин (3.4.21.4), глутамилэндопептидаза (ЕС 3.4.21.19), панкреатическая эластаза II (ЕС 3.4.21.71), олигопептидаза В (ЕС 3.4.21.83), коммерческие ферментные препараты: субтилизин (Alcalase 2.4L (Новозаймс, Дания)) и химотрипсин



Рисунок 1 – Структурно-иерархическая схема исследований

(Formea CTL (Новозаймс, Дания)); информация из протеомных и наукометрических баз данных; сухие и жидкие концентраты, а также гидролизаты нативных и термоденатурированных сывороточных белков; молочные продукты, обогащенные ГСБ; вспомогательное сырье и материалы.

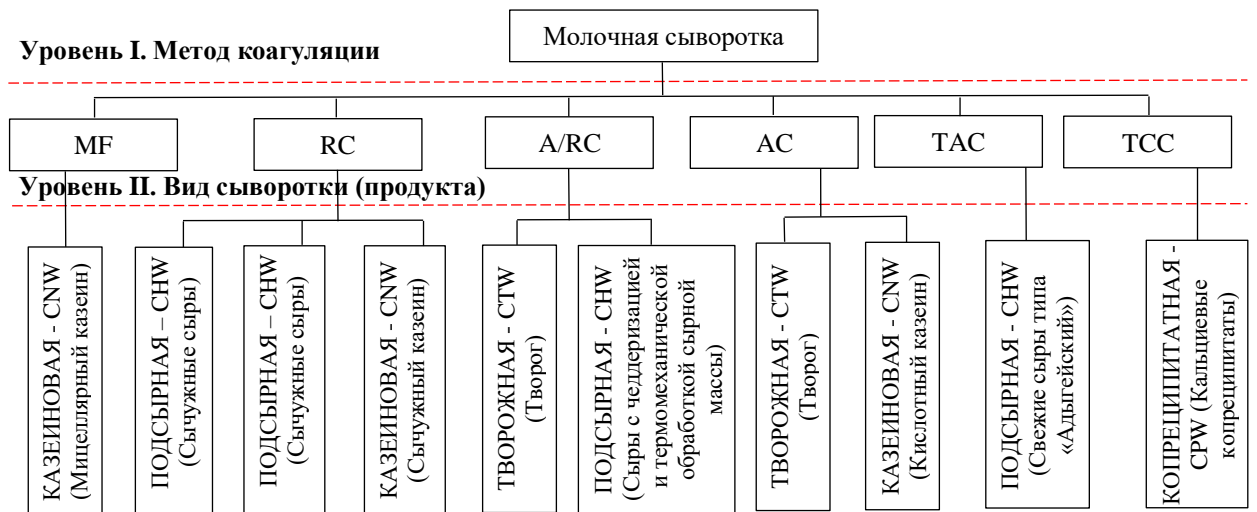
В работе использовано более 20 стандартизованных методов контроля органолептических, физико-химических и микробиологических показателей. Генотипирование животных осуществляли методом ПЦР-ПДРФ-анализа. Выделение ДНК проводили с использованием набора «ДНК-сорб-С-М» (ЦНИИ Эпидемиологии, Россия), идентификацию и количественную оценку фракционного состава белков проводили методом ВЭЖХ с использованием хроматографа «МАЭСТРО» (ООО «Интерлаб», Россия). Средний диаметр мицелл казеина определяли методом лазерной дифракции на анализаторе LS 13 320 XR (Beckman Coulter, США), определение термостойчивости по тепловой пробе проводили при помощи прибора УКТ-150 (ФГАНУ «ВНИМИ», Россия), степень гидролиза оценивали на спектрофотометре-флуориметре Feuyond-A400 (Allsheng, Китай) при длине волны 340 нм с применением реактива TNBS (2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты). Определение антиоксидантной активности по методу ТЕАС проводили по способности образца нейтрализовать катион-радикал АВТС (2,2'-азинобис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) в сравнении с эталонным антиоксидантным стандартом Тролоксом (детектирование при длине волны 734 нм). Антиоксидантную емкость (ORAC) против пероксильного радикала, индуцированного 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлоридом (AAPH) определяли при 37°C с использованием флуоресцеина в качестве «флуоресцентного зонда» при длине волн возбуждения и эмиссии 485 нм и 535 нм. Антиоксидантную способность к восстановлению железа по методу FRAP проводили в кислой среде с использованием фотометрического реагента – ТРТЗ (2,4,6-Трис(2-пиридил)-с-триазин) и раствора хлорида железа (III). Детектирование проводили при длине поглощения 594 нм. Исследование гипотензивных свойств проводили по способности ингибировать ангиотензин-1-превращающий фермент (АПФ) с регистрацией кинетики возрастания интенсивности флуоресценции при длине волн возбуждения и эмиссии 320 и 420 нм. Общее содержание свободных аминокислот в экв. L-глутаминовой кислоты определяли спектрофотометрическим методом по реакции аминогрупп α -аминокислот с 2,4-динитрофторбензолом (DNFB) и детектировании флуоресценции при 420 нм. Остаточное содержание иммунореактивных белков определяли методом ИФА с использованием тест-набора Agraquant Allergen – Milk (Romer Labs, Германия). Горечь оценивали органолептически в эквиваленте шкалы разведения стандарта кофеина. Протеомный анализ пептидов осуществляли с использованием ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific, США) соединенной с масс-спектрометром Q-Exactive HF-X в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (Thermo Scientific, США). Идентификацию пептидов проводили при помощи программы SearchGUI с использованием поисковых алгоритмов OMSSA, X!Tandem and MS-GF+. Идентификацию биоактивных пептидов осуществляли с использованием биоинформационных инструментов баз данных BioPer, ACEperDB, MBPDB, ANTPDB, AllergenOnline, AlgPred2, ToxinPred и др. Гранулометрию и морфологию сухих

продуктов оценивали на лазерных дифракционных анализаторах S3 Plus и 2600 (Bettersizer, Китай). Смачиваемость определяли по методу изменения краевого угла смачивания (КУС) «лежащей капли» во времени на анализаторе DSA25 (Krüss, Германия), активность воды измеряли сорбционно-емкостным методом на анализаторе HydroLab 3 (Rotronic, Франция), гигроскопичность сухих продуктов определяли гравиметрическим методом в климатической камере СМ-70/150-250ТВХ (ООО «СМ-Климат», Россия). Антиокислительную способность определяли по изменению перекисного и анизидинового числа в процессе ускоренной порчи жира. Исследование поверхностного натяжения осуществляли методом висючей капли на оптическом анализаторе «DSA25» (KRÜSS, Германия). Определение динамической вязкости осуществляли с помощью вискозиметра Brookfield DV-II+Pro (Brookfield Co., США), колориметрические исследования проводили с использованием цветового пространства CIELAB. Микроскопирование образцов выполняли с использованием микроскопа «МИКМЕД-6» с камерой ТСА-5.0 С (АО «ЛОМО», Россия). Взбитость, растворимость, эмульгирующую и жирудерживающую способность оценивали по общепринятым методикам. Определение содержания аминокислот осуществляли методом капиллярного электрофореза на системе «Капель 205М» (Люмекс, Россия).

Исследование острой (2000 мг БЭ/ кг массы тела) и субхронической (500 мг БЭ/ кг массы тела) токсичности ГСБ осуществляли на крысах линии Wistar в соответствии с ГОСТ 34557-2019 и ГОСТ 32637-2020. Аллергенные свойства ГСБ оценивали в сравнении с выраженным аллергеном (овальбумином) на крысах линии Wistar. Тестирование антиоксидантной активности и гепатопротекторных свойств проводили на моделях крыс линии Wistar с антиоксидантной патологией печени, индуцированной CCl_4 . Тестирование гипотензивных свойств проводили на модели крыс-самцов с артериальной гипертензией линии SHR.

Планирование экспериментов и визуализацию данных осуществляли с использованием пакета программ «Statistica 2010» (Statsoft, США), «Microsoft Excel» (Microsoft, США). Статистический анализ экспериментальных данных проводили с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного теста Тьюки с использованием пакета статистических программ RStudio (Posit Software, США). Надстрочные буквы (a–d) отражают значительные различия между группами при $p < 0,05$. Отсутствие надстрочных букв указывает на $p \geq 0,05$ (если не указано иное).

В третьей главе представлены результаты влияния полиморфизма гена *CSN3* на формирование белкового профиля молочных сывороток, полученных в результате воздействия различных коагулирующих факторов на белки молока. На первом этапе разработана система классификации молочной сыворотки с использованием интегративного подхода в основу которой заложены научные принципы коагуляции белка, используемые в молочной промышленности (сычужная (RC), кислотная (AC), кислотно-сычужная (A/RC), термокислотная (TAC), термокальциевая (TCC), а также безкоагуляционный метод микрофльтрации молочного сырья, используемый при производстве мицеллярного казеина (MF)) и вид целевого продукта (Рисунок 2).



Критерии идентификации

Органолептический профиль

Сладкая Сладкая Соленая Сладкая Кислая Среднекислая Кислая Кислая Среднекислая Сладкая

Общий азот, %

0,05-0,10 0,10-0,16 0,10-0,16 0,08-0,14 0,06-0,09 0,11-0,15 0,05-0,10 0,07-0,11 <0,07 <0,06

GMP

- + + + + + - - - -

Кислотность (рН)

>6,0 >6,0 >6,0 >6,0 4,8-5,2 5,3-5,9 ≤4,6 ≤4,6 5,3-5,9 >6,0

Содержание кальция, мг/100 г

50-60 50-60 50-60 50-60 65-80 60-75 85-100 95-110 75-90 60-70

Ферментация лактозы

Отс. Низкая Низкая Отс. Высокая Средняя Высокая Отс. Отс. Отс.

Рисунок 2 – Интегративная подход к классификации молочной сыворотки

В качестве идентификационных критериев применены дескрипторы органолептического профиля, содержания общего азота и кальция, кислотности, присутствия гликомакропептида, а также уровень ферментации лактозы, что позволяет достоверно охарактеризовать каждый вид сыворотки и выбрать оптимальную технологию для ее глубокой переработки.

С точки зрения переработки коровьего молока на производство творога, сыра, копреципитатов и пр. особое значение приобретают гены, отвечающие за экспрессию молочных белков. Одним из наиболее широко используемых на сегодняшний день подходов является тестирование биоматериала и/или молочного сырья по локусу гена *CSN3*, что коррелирует с его особым (защитным) положением среди остальных казеиновых фракций и непосредственным влиянием на формирование сгустка, а, соответственно, и белкового профиля сыворотки.

Для идентификации сырого молока по гену *CSN3*, полученного от КРС черно-пестрой породы, проведены предварительные исследования по его аллельному ранжированию методом ПЦР-ПДРФ анализа (Таблица 1).

Таблица 1 – Результаты генотипирования КРС по гену *CSN3*

Генотип <i>CSN3</i>	Численность коров, гол.	Отелы	Частота встречаемости генотипов, %	Частота встречаемости аллелей, %	
				<i>A</i>	<i>B</i>
<i>AA</i>	536	2,3±0,1	63,7	77,5	22,5
<i>AB</i>	231	2,6±0,1	27,5		
<i>BB</i>	74	2,1±0,2	8,8		

С помощью ДНК-анализа биоматериала генотипировано 841 животное по гену *CSN3*, из них 536 коров идентифицированы с гомозиготным генотипом *AA*, 74 – *BB* и 231 корова с гетерозиготным генотипом – *AB*. Таким образом, частота встречаемости генотипов у КРС черно-пестрой породы находится для *AA* на уровне 63,7%, для *AB* – 27,5%, для *BB* – 8,8%. Частота встречаемости аллеля *A* гена *CSN3* составила 77,5%, а аллеля *B* – 22,5%.

Для оценки влияния полиморфизма гена *CSN3* на молочную продуктивность и физико-химический состав молока-сырья проведен блок исследований, охватывающий систематическую равную дисперсионную выборку в количестве 74 коров по каждому генотипу (Таблица 2).

Таблица 2 – Физико-химический анализ молока КРС, полиморфных по гену *CSN3*

Наименование показателя	Фактические значения для генотипа коров		
	<i>CSN3 AA</i>	<i>CSN3 AB</i>	<i>CSN3 BB</i>
Средний удой за лактацию, кг	10359±443	10297±405	9983±381
М. д. жира, %	3,69±0,15	3,71±0,12	3,88±0,21
М. д. общего белка, %	3,23±0,07	3,26±0,13	3,38±0,09
М. д. казеиновых белков, %	2,59±0,05	2,63±0,06	2,70±0,05
αS_1 -CN, %	1,14±0,03	1,16±0,03	1,19±0,04
αS_2 -CN, %	0,25±0,02	0,27±0,02	0,23±0,01
β -CN, %	0,97±0,03	0,96±0,02	0,98±0,02
κ -CN, %	0,23±0,02 ^b	0,24±0,01 ^b	0,30±0,02 ^a
М. д. сывороточных белков, %	0,64±0,06	0,63±0,05	0,68±0,07
β -LG, %	0,38±0,03	0,37±0,03	0,40±0,04
α -LA, %	0,15±0,03	0,13±0,04	0,14±0,03
BSA, %	0,030±0,006	0,031±0,005	0,040±0,005
LF, %	0,0028±0,0004	0,0021±0,0006	0,0034±0,0005
М. д. лактозы, %	4,63±0,12	4,68±0,15	4,81±0,17
М. д. минеральных веществ, %	0,69±0,04	0,70±0,03	0,73±0,06
Содержание Ca, мг/100 г	119,37±3,15 ^b	122,19±3,76 ^b	131,49±3,48 ^a
Содержание Mg, мг/100 г	13,71±0,22 ^b	13,87±0,24 ^b	14,64±0,27 ^a
М. д. сухих веществ, %	12,52±0,22	12,66±0,27	12,97±0,34
Кислотность, °Т	16,4±0,3	17,1±0,4	16,8±0,4
Активная кислотность, pH	6,74±0,05	6,69±0,04	6,72±0,05
Соматические клетки, тыс. в 1 см ³	278,7±19,9	303,9±30,4	294,2±24,1
Размер мицеллы казеина, нм	147,2±4,5 ^a	143,2±4,2 ^{ab}	135,3±3,8 ^b

Несмотря на установленные различия в медианных значениях молочной продуктивности и ряда физико-химических показателей молока, полученного от коров, полиморфных по гену *CSN3*, данные различия не обладали достоверностью ($p \geq 0,05$). В то же время значения м.д. κ -CN, содержания кальция и магния в молоке, полученном от КРС с генотипом *BB* достоверно ($p < 0,05$) были выше, чем в молоке КРС с генотипами *AB* и *AA*. Установлена взаимосвязь ($p < 0,05$) размера мицелл казеина с полиморфизмом гена *CSN3*, где средний

размер мицелл казеина в молоке, полученном от коров с генотипом *BB*, был меньше по сравнению с генотипом *AA*. Полученные результаты в целом коррелируют с научными знаниями в области формирования структуры мицеллы казеина.

На следующем этапе был проведен блок исследований, направленный на установление влияния генетического полиморфизма гена *CSN3* на формирование белкового профиля сывороток, полученных кислотной, сычужной, кислотно-сычужной, термокислотной и термокальциевой коагуляцией белков молока (Таблицы 3-6,9,10).

Таблица 3 – Белковый профиль творожной сыворотки, полученной в процессе кислотной коагуляции белков молока

Наименование показателя	Фактические значения для генотипа		
	<i>CSN3 AA</i>	<i>CSN3 AB</i>	<i>CSN3 BB</i>
М. д. общего белка, %	0,63±0,07	0,57±0,05	0,59±0,09
М. д. казеиновых белков, %	0,05±0,02	0,04±0,01	0,06±0,02
αS ₁ -CN, %	0,02±0,01	0,01±0,01	0,03±0,02
αS ₂ -CN, %	отс.	отс.	отс.
β-CN, %	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01
κ-CN, %	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01
М. д. сывороточных белков, %	0,58±0,04	0,53±0,07	0,53±0,05
β-LG, %	0,31±0,04	0,30±0,02	0,33±0,03
α-LA, %	0,15±0,02	0,12±0,01	0,11±0,02
GMP, %	отс.	отс.	отс.
BSA, %	0,032±0,006	0,021±0,003	0,022±0,004
LF, %	0,0027±0,0003	0,0026±0,0002	0,0025±0,0002

Анализ полученных результатов позволил установить отсутствие существенных различий в белковом профиле молочных сывороток, полученных в результате сквашивания молока, полученного от полиморфных коров по гену *CSN3*. Анализ белкового профиля показал, что м.д. общего белка в сыворотке, полученной при кислотной коагуляции, находится на уровне 0,57-0,63%, среди которых 0,53-0,58% приходится на сывороточные белки (49,2-55,9% на β-LG; 18,6-23,8% на α-LA; и 3,7-5,1% на BSA) и 0,04-0,06% - на казеиновые фракции.

Таблица 4 – Белковый профиль подсырной сыворотки, полученной в процессе сычужной коагуляции белков молока

Наименование показателя	Фактические значения для генотипа		
	<i>CSN3 AA</i>	<i>CSN3 AB</i>	<i>CSN3 BB</i>
М. д. общего белка, %	0,81±0,05 ^b	0,92±0,07 ^{ab}	0,99±0,07 ^a
М. д. казеиновых белков, %	0,07±0,02	0,08±0,02	0,11±0,03
αS ₁ -CN, %	0,02±0,01	0,01±0,01	0,03±0,01
αS ₂ -CN, %	отс.	отс.	отс.
β-CN, %	0,03±0,02	0,04±0,01	0,03±0,01
κ-CN, %	0,02±0,01	0,03±0,02	0,05±0,03
М. д. сывороточных белков, %	0,74±0,05 ^b	0,84±0,04 ^{ab}	0,88±0,07 ^a
β-LG, %	0,35±0,02 ^b	0,36±0,04 ^{ab}	0,40±0,02 ^a
α-LA, %	0,15±0,01	0,15±0,02	0,17±0,02
GMP, %	0,09±0,01	0,10±0,02	0,12±0,03
BSA, %	0,041±0,001	0,037±0,004	0,047±0,003
LF, %	0,0015±0,0003	0,0016±0,0002	0,0019±0,0004

Установлено достоверное ($p < 0,05$) увеличение перехода общего белка и, в частности, сывороточных белков (β -LG) в сыворотку, полученную сычужной коагуляцией молока коров с генотипом *CSN3 BB*, относительно генотипов *CSN3 AA* и *AB*. В зависимости от генетического полиморфизма *CSN3* в подсырную сыворотку при сычужной коагуляции переходит 0,07-0,11% казеиновых фракций (κ -CN 2,5-5,1%; β -CN 3,0-4,3%; α S₁-CN 1,1-3,0%) и 0,74-0,88% сывороточных белков (β -LG 39,1-43,2%; α -LA 16,3-18,5%; GMP 10,9-12,1%; 4,0-5,1% BSA).

Таблица 5 – Белковый профиль творожной сыворотки, полученной в процессе кислотно-сычужной коагуляции белков молока

Наименование показателя	Фактические значения для генотипа		
	<i>CSN3 AA</i>	<i>CSN3 AB</i>	<i>CSN3 BB</i>
М. д. общего белка, %	0,47±0,03 ^b	0,50±0,05 ^{ab}	0,58±0,04 ^a
М. д. казеиновых белков, %	0,02±0,01	0,03±0,02	0,07±0,03
α S ₁ -CN, %	отс.	отс.	отс.
α S ₂ -CN, %	отс.	отс.	отс.
β -CN, %	отс.	отс.	0,02±0,02
κ -CN, %	0,02±0,01	0,03±0,02	0,05±0,02
М. д. сывороточных белков, %	0,45±0,03	0,47±0,04	0,52±0,04
β -LG, %	0,23±0,04	0,24±0,05	0,25±0,05
α -LA, %	0,11±0,02	0,10±0,03	0,12±0,02
GMP, %	0,05±0,01	0,06±0,02	0,08±0,02
BSA, %	0,029±0,003	0,033±0,005	0,031±0,004
LF, %	0,0023±0,0005	0,0027±0,0006	0,0031±0,0005

Белковый профиль творожной сыворотки, полученной в процессе кислотно-сычужной коагуляции белков молока, состоит из 0,45-0,52% сывороточных белков (β -LG 43,1-48,9%; α -LA 20,0-23,4%; GMP 10,6-13,8% BSA 5,3-6,2%) и 0,02-0,07% казеиновых фракций (κ -CN 4,3-8,6%; β -CN \leq 3,4%). При этом присутствие β -CN в сыворотке имеет непостоянный характер. Достоверно установлено, что в творожную сыворотку, полученную из молока коров с генотипом *CSN3 BB*, переходит большее количество общего белка в сравнении с генотипом *CSN3 AA*. При этом белковый профиль сывороток статистически значимо не отличался между генотипами *CSN3* ($p \geq 0,05$).

Таблица 6 – Белковый профиль подсырной сыворотки, полученной в процессе кислотной-сычужной коагуляции белков молока

Наименование показателя	Фактические значения для генотипа		
	<i>CSN3 AA</i>	<i>CSN3 AB</i>	<i>CSN3 BB</i>
М. д. общего белка, %	0,81±0,04 ^b	0,83±0,06 ^{ab}	0,94±0,05 ^a
М. д. казеиновых белков, %	0,04±0,02	0,05±0,01	0,08±0,03
α S ₁ -CN, %	отс.	0,01±0,01	0,01±0,01
α S ₂ -CN, %	отс.	отс.	отс.
β -CN, %	0,01±0,01	0,01±0,01	0,02±0,01
κ -CN, %	0,03±0,02	0,03±0,01	0,05±0,02
М. д. сывороточных белков, %	0,77±0,04	0,78±0,06	0,86±0,04
β -LG, %	0,34±0,03	0,36±0,03	0,38±0,04
α -LA, %	0,15±0,01	0,16±0,02	0,16±0,02
GMP, %	0,09±0,02	0,09±0,01	0,11±0,02
BSA, %	0,041±0,003	0,038±0,005	0,043±0,003
LF, %	0,0023±0,0004	0,0028±0,0003	0,0026±0,0002

Анализ данных таблицы 6 показал значимое ($p < 0,05$) увеличение на 16% м.д. общего белка в подсырной сыворотке, произведенной в процессе кислотной-сычужной коагуляции белков молока, полученного от коров с генотипом *CSN3 BB* относительно генотипа *CSN3 AA*. Достоверных отличий во фракционном составе белков отмечено не было. Исследование фракционного состава белков позволило выявить диапазон распределения основных белков, присутствующих в сыворотке на постоянной основе, среди которых преобладающую массу представляют β -LG (40,4-43,4%), α -LA (17,0-19,2%), GMP (10,8-11,7%) κ -CN (3,6-5,3%), BSA (4,6-5,1%), α S₁-CN ($\leq 1,2\%$).

Исследование стабильности белковой фазы в аспекте термоиндуцированной (термокислотной и термокальциевой) коагуляции белков молока, полученного от коров полиморфных по гену *CSN3*, проводили методом алкогольной и тепловой проб, в градиенте pH (Таблица 7) и концентрации хлорида кальция (Таблица 8).

Таблица 7 – Исследование термоустойчивости молока, полиморфного по гену *CSN3*, в градиенте pH по алкогольной и тепловой пробам

Генотип	Активная кислотность, pH						
	5,5	5,7	5,9	6,1	6,3	6,5	6,7
Алкогольная проба, об. доля этилового спирта, %							
<i>CSN3 AA</i>	–*	–	–	–	68	78	95
<i>CSN3 AB</i>	–	–	–	–	68	75	95
<i>CSN3 BB</i>	–	–	–	–	–	68	90
Тепловая проба, мин							
<i>CSN3 AA</i>	0,5±0,2	0,9±0,3	1,3±0,3	2,0±0,4 ^a	8,1±1,5 ^a	24,0±2,0 ^a	>30
<i>CSN3 AB</i>	0,4±0,1	0,8±0,2	1,2±0,3	1,8±0,4 ^{ab}	6,5±1,2 ^a	20,0±1,0 ^b	>30
<i>CSN3 BB</i>	0,2±0,1	0,5±0,2	0,9±0,2	1,2±0,2 ^b	3,3±0,9 ^b	18,0±1,0 ^b	>30

* «–» - образец не выдержал алкогольную пробу со спиртовым раствором с об. долей этилового спирта 68%

Комплексный подход к оценке термостабильности позволил достоверно установить зависимость, в соответствии с которой молоко, полученное от коров, несущих аллельный вариант *A* гена *CSN3*, превалировало над молоком с аллельным вариантом *B* по стабильности белковой фазы в диапазоне pH 6,1-6,7. При pH < 6,1 разница в термоустойчивости между образцами молока не являлась статистически значимой ($p \geq 0,05$).

Таблица 8 – Исследование термоустойчивости молока, полиморфного по гену *CSN3*, в градиенте содержания CaCl₂ по алкогольной и тепловой пробам

Генотип	Доза внесения 15 %-ного раствора CaCl ₂ , мл/кг						
	0	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0
Алкогольная проба, об. доля этилового спирта, %							
<i>CSN3 AA</i>	95	68	–	–	–	–	–
<i>CSN3 AB</i>	95	68	–	–	–	–	–
<i>CSN3 BB</i>	90	–*	–	–	–	–	–
Тепловая проба, мин							
<i>CSN3 AA</i>	>30	3,5±0,3 ^a	1,8±0,2 ^a	1,2±0,1 ^a	0,9±0,1	0,5±0,1	0,4±0,1
<i>CSN3 AB</i>	>30	3,2±0,2 ^a	1,6±0,1 ^a	1,1±0,2 ^{ab}	0,7±0,2	0,4±0,1	0,4±0,1
<i>CSN3 BB</i>	>30	2,5±0,1 ^b	1,1±0,2 ^b	0,8±0,1 ^b	0,5±0,2	0,3±0,1	0,2±0,1

* «–» - образец не выдержал алкогольную пробу со спиртовым раствором с об. долей этилового спирта 68%

Подтверждено, что термоустойчивость белков молока находится в обратно пропорциональной зависимости от концентрации хлорида кальция в

системе. При этом, сохраняется тенденция, где термоустойчивость молока коров, несущих *A*-аллель гена *CSN3*, была выше, чем у молока коров, несущих *B*-аллель. Следует отметить, что увеличение дозы внесения 15%-ного раствора хлорида кальция до 10 мг/кг приводит к нивелированию значимого воздействия генетического фактора на термоустойчивость сырья.

Таблица 9 – Белковый профиль подсырной сыворотки, полученной в процессе термокислотной коагуляции белков молока

Наименование показателя	Фактические значения для генотипа		
	<i>CSN3 AA</i>	<i>CSN3 AB</i>	<i>CSN3 BB</i>
М. д. общего белка, %	0,45±0,05	0,40±0,06	0,37±0,03
М. д. казеиновых белков, %	0,22±0,04 ^a	0,15±0,04 ^{ab}	0,12±0,03 ^b
αS ₁ -CN, %	0,07±0,02	0,05±0,03	0,03±0,01
αS ₂ -CN, %	0,02±0,01	отс.	0,01±0,01
β-CN, %	0,08±0,03	0,06±0,03	0,04±0,02
κ-CN, %	0,05±0,02	0,04±0,01	0,04±0,02
М. д. сывороточных белков, %	0,23±0,03	0,25±0,04	0,25±0,03
β-LG, %	0,05±0,02	0,05±0,03	0,06±0,01
α-LA, %	0,05±0,02	0,06±0,02	0,06±0,03
GMP, %	отс.	отс.	отс.
BSA, %	0,004±0,001	0,007±0,002	0,006±0,003
LF, %	0,0013±0,0004	0,0010±0,0005	0,0009±0,0004

Установлено, что в результате термокислотной коагуляции в среднем в сыворотку переходит 0,40-0,47% белков, среди которых 51,1-67,6% приходится на сывороточные белки и небелковый азот (β-LG 11,1-16,2%; α-LA 11,1-16,2%; BSA 0,9-1,8%) и 32,4-48,9% на казеиновые фракции (αS₁-CN 8,1-15,6%; αS₂-CN 0-4,4%; β-CN 10,8-17,8%; κ-CN 10,0-11,1%). При этом ввиду большей термоустойчивости наблюдается тенденция к увеличению перехода в сыворотку казеина из молока, полученного от коров с преобладанием аллеля *A CSN3*. Зависимость носит накопительный характер и не выражается в достоверном отличии отдельных фракций между образцами сывороток.

Таблица 10 – Белковый профиль копреципитатной сыворотки, полученной в процессе термокальциевой коагуляции белков молока

Наименование показателя	Фактические значения для генотипа		
	<i>CSN3 AA</i>	<i>CSN3 AB</i>	<i>CSN3 BB</i>
М. д. общего белка, %	0,38±0,04	0,34±0,02	0,31±0,06
М. д. казеиновых белков, %	0,13±0,04	0,11±0,03	0,08±0,02
αS ₁ -CN, %	0,04±0,02	0,04±0,02	0,02±0,01
αS ₂ -CN, %	отс.	отс.	отс.
β-CN, %	0,05±0,02	0,03±0,01	0,03±0,01
κ-CN, %	0,04±0,01	0,04±0,01	0,03±0,02
М. д. сывороточных белков, %	0,25±0,03	0,23±0,02	0,23±0,03
β-LG, %	0,06±0,03	0,05±0,02	0,04±0,02
α-LA, %	0,07±0,01	0,07±0,03	0,08±0,04
GMP, %	отс.	отс.	отс.
BSA, %	0,006±0,002	0,005±0,001	0,004±0,001
LF, %	0,0008±0,0003	0,0009±0,0004	0,00011±0,0003

Белковый состав сывороток, полученных термокальциевой коагуляцией по технологии высококальциевого копреципитата, характеризовался минимальным количеством общего белка (0,31-0,38%), среди которого на долю

казеиновых фракций приходилось 25,8-34,2% (α S₁-CN 6,5-11,8%; β -CN 8,8-13,2%; κ -CN 9,8-11,8%), а на долю сывороточных белков с учетом небелкового азота 65,8-74,2% (β -LG 12,9-15,8%; α -LA 18,4-25,8%; BSA 1,3-1,6%). Медианные значения свидетельствуют о более высоком содержании общего белка и, в частности, казеина в сыворотке, полученной из молока коров с генотипом *CSN3 AA*, в сравнении с генотипом *CSN3 BB*. Однако полученные различия не обладают статистической значимостью ($p \geq 0,05$), что связано с присутствием помех аналитического и технологического характера.

В результате проведенных исследований установлены вариабильности белкового профиля и общего белка в сыворотке в зависимости от типа коагуляции, а также полиморфизма гена *CSN3* (кроме кислотной и термокальциевой коагуляции). Таким образом, в дальнейшем при проектировании процесса таргетированной биокаталитической конверсии полипептидных комплексов вторичных сырьевых ресурсов молочной промышленности следует учитывать весь белковый матрикс исходя из требований безопасности и снижения потенциальных рисков появления токсиноподобных пептидов и антигенных детерминант.

В четвертой главе представлен разработанный и реализованный на практике алгоритм гибридной стратегии биоинформатического моделирования для таргетированного высвобождения БАП из молочного белка. Алгоритм стратегии построен с учетом получения аналитических данных о белковом профиле сырья, аминокислотной последовательности белков, входящих в состав сырья на основе их генетической изменчивости и с последующей идентификацией биоактивных аминокислотных сайтов в структуре белка. Дальнейшие этапы включали подбор оптимальных ферментных препаратов, моделирование гидролиза с последующей оценкой биоактивности пептидов по протеомным базам данных. Данная стратегия подразумевает оценку безопасности (токсичность, аллергенность) всех продуктов гидролиза, физико-химические и технологические свойства, а также устойчивость к деградации БАП в условиях ЖКТ.

На первом этапе биоинформатического моделирования процесса гидролиза получены данные об аминокислотных последовательностях основных белков молочной сыворотки с учетом полиморфизма генов (доминирующих у коров на территории РФ), экспрессируемых белки, посредством использования протеомных баз данных NCBI, UniProt, VIOPER-UWM. Скрининг БАП внутри аминокислотной структуры белков, присутствующих в молочной сыворотке, осуществляли при использовании биоинформатических инструментов баз данных MBPDB и VIOPER-UWM (Рисунок 3).

На этапе скрининга частоты встречаемости биоактивных фрагментов в основных белках молочной сыворотки установлено, что для β -LG и α -LA наиболее встречаемыми биоактивными фрагментами являются ДПП-IV-ингибирующие ($A=0,654$ и $0,659$), АПФ-ингибирующие ($A=0,568$ и $0,431$), антиоксидантные ($A=0,278$ и $0,073$). Для BSA и LF наблюдалась схожая тенденция активностей ДПП-IV-ингибирующая ($A=0,588$ и $0,635$), АПФ-ингибирующие ($A=0,408$ и $0,473$), антиоксидантные ($A=0,088$ и $0,065$). В казеиновых фракциях (κ -CN, β -CN, α S₁-CN, α S₂-CN), попадающих в сыворотку

в основном в виде казеиновой пыли, также выявлена наибольшая частота встречаемости пептидов с ДПП-IV- и АПФ-ингибирующей, а также антиоксидантной активностями. Дальнейшие исследования показали, что потенциальная гипотензивная активность пептидов внутри белков значительно выше, чем антидиабетическая активность. При этом потенциальная АПФ-ингибирующая активность β -LG была в среднем в 5 раз выше, чем у других сывороточных белков, в 1,7 раза выше, чем у κ -CN, β -CN и в 3,3–3,8 раза выше, чем у α S₁-CN и α S₂-CN.

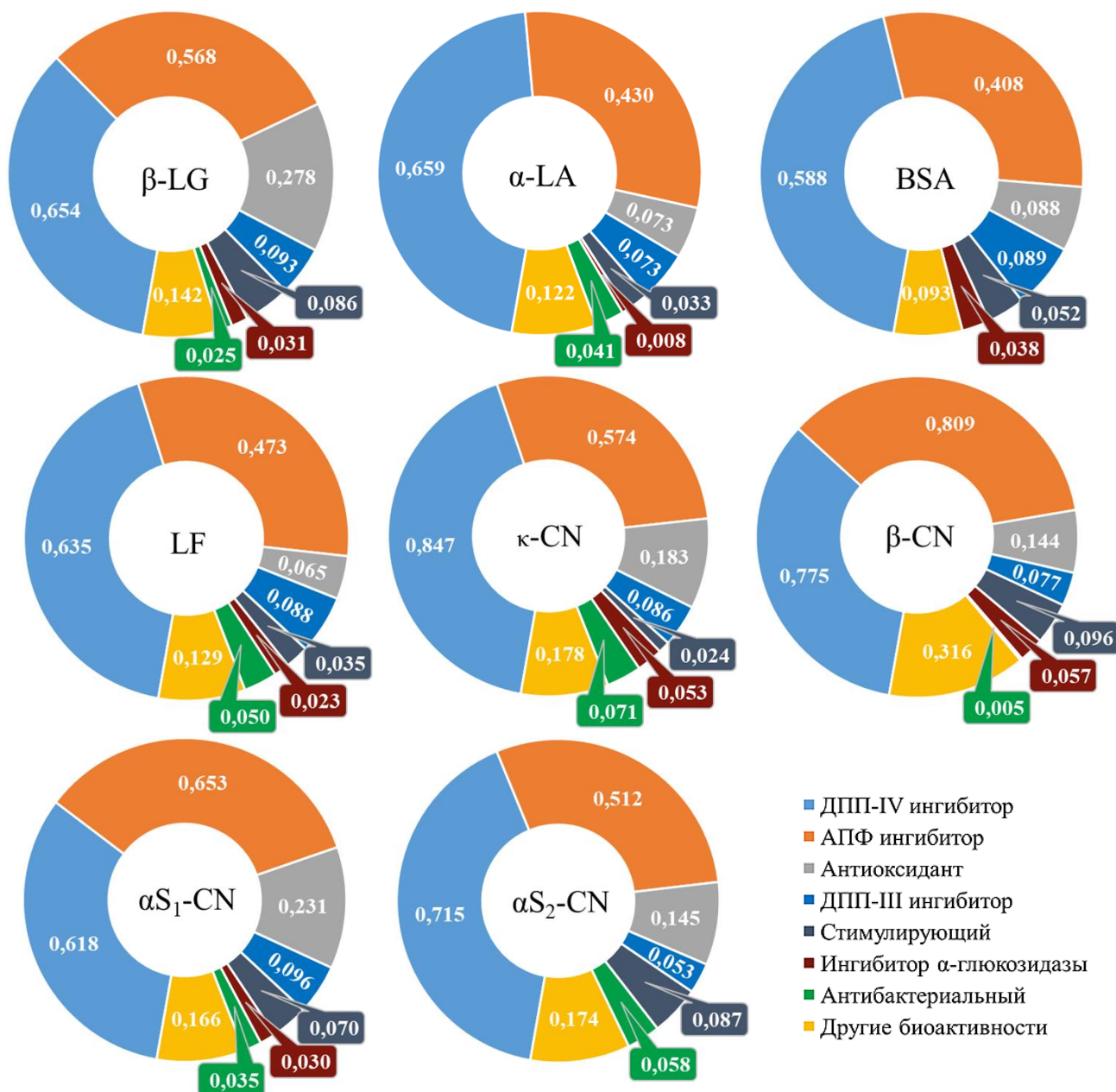


Рисунок 3 – Частота встречаемости БАП в белках молочной сыворотки

Скрининг специфичности коммерчески доступных протеаз и проектирование ферментной композиции, удовлетворяющей максимальному потенциальному высвобождению пептидов с антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностями из структуры белков, входящих в молочную сыворотку, проводили комбинаторным методом и методом попарного тестирования с использованием алгоритмов BIOPEP-UWM. В результате

проведенных исследований установлено, что наибольшим потенциалом к высвобождению АПФ-ингибирующих и антиоксидантных БАП из белкового матрикса молочных сывороток (Таблица 11) обладает биферментная композиция химотрипсин (ЕС 3.4.21.2) - субтилизин (ЕС 3.4.21.62).

Таблица 11 – Результаты биоинформатического моделирования гидролиза белков молочной сыворотки комплексом протеаз химотрипсин-субтилизин

Наименование белка	DHt, %	САК, ед.	Активность	A _E	W	B _E	V
β-LG	52,12	47	АПФ-ИА	0,072	0,133	0,0022	0,023
			АОА	0,036	0,143	–*	–
α-LA	46,83	25	АПФ-ИА	0,063	0,151	0,0035	0,146
			АОА	–	–	–	–
BSA	46,83	125	АПФ-ИА	0,072	0,182	0,0029	0,143
			АОА	0,007	0,079	–	–
LF	47,26	113	АПФ-ИА	0,071	0,156	0,0049	0,194
			АОА	0,014	0,226	–	–
κ-CN	56,98	55	АПФ-ИА	0,087	0,161	0,0011	0,021
			АОА	0,017	0,107	–	–
β-CN	68,69	110	АПФ-ИА	0,126	0,192	0,0016	0,031
			АОА	0,009	0,087	–	–
αS ₁ -CN	62,25	81	АПФ-ИА	0,102	0,164	0,0039	0,151
			АОА	0,015	0,070	–	–
αS ₂ -CN	58,96	74	АПФ-ИА	0,066	0,135	0,0025	0,080
			АОА	0,019	0,154	–	–

* «–» - показатель не выявлен и/или не определяется для данной биологической активности

Компьютерное моделирование (*in silico*) биоконверсии белковых фракций сыворотки с использованием алгоритмов ExPASy Peptide Cutter и BIOPEP-UWM позволило сформировать совокупность продуктов гидролиза, провести их картирование и оценить биофункциональность посредством инструментов БД: MBPDB, ACePePDB, ANTPDB и BIOPEP-UWM. Оценку физико-химических свойств осуществляли с использованием программ PepCalc, ExPASy ProtParam, прогнозирование остаточной антигенности проводили по базам данных AllergenOnline, BIOPEP, AlgPred2. Оценку токсичности пептидов осуществляли с использованием инструментов ToxinPred. Прогнозирование вкусового профиля проводили с использованием базы BIOPEP-UWM и BitterDB (Таблица 12).

Таблица 12 – Результаты пептидного картирования виртуальных ГСБ

Наименование белка	Пептиды с биологической функцией и сенсорные пептиды					
	АОА	АПФ-ИА	ДПП-IV-ИА	Горькие	ТПП	АП
β-LG	6	11	14	8	0	0
α-LA	0	7	10	3	0	0
BSA	3	25	35	12	7	0
LF	6	23	28	11	0	0
κ-CN	3	14	14	9	0	0
β-CN	2	18	22	10	0	0
αS ₁ -CN	3	14	15	10	0	0
αS ₂ -CN	4	11	21	7	0	0

Пептидное картирование продуктов гидролиза белковой матрицы молочной сыворотки позволило идентифицировать 57 видов пептидов с АПФ-ингибирующей функцией и 15 видов пептидов с антиоксидантной функцией.

Кроме того, в биоинформатически смоделированном гидролизате обнаружено 68 видов пептидов с ингибирующей ДПП-IV функцией. При этом 42 вида пептидов (из 95 идентифицированных) обладали как минимум двойной функциональностью, а 17 видов биоактивных пептидов характеризовались горьким вкусом. Оценка безопасности продуктов гидролиза не выявила антигенных детерминант, способных запустить механизм иммунного ответа в организме, но позволила идентифицировать 7 пептидов (ADCSE, CCAKDDP, CCDKP, CCHGDL, VDKCCAADDKE, VGTRCCTKP, VTKCSTE), обладающих потенциально слабыми токсикологическими свойствами. Токсиноподобные пептиды имеют молекулярную массу от 539 до 1196 Да и локализуются в белке-предшественнике BSA. Таким образом, следует учесть и нивелировать данный факт при оптимизации процесса гидролиза *in vitro* и формировании доказательной базы *in vivo*.

Аналитические данные по варибельности белкового профиля молочных сывороток, совокупно с проведенным пептидным картированием продуктов компьютерного моделирования гидролиза белков, выбранным комплексом ферментов позволили создать «цифровые двойники» ГСБ для прогностической оценки потенциальной концентрации биоактивных, токсиноподобных, аллергенных пептидов, а также их деградации под действием пищеварительных ферментов в ЖКТ (Таблица 13). Моделирование *in silico* деградации БАП в ЖКТ осуществляли посредством описанного выше алгоритма биоинформатического анализа с применением комплекса ферментов (пепсин, панкреатическая эластаза и химотрипсин А), а также инструментов ExPASy Peptide Cutter. На основе полученных данных разработано ПО «Расчет содержания потенциально биоактивных пептидов» <https://observablehq.com/d/98172b13d2fc7c3e>.

Таблица 13 – Содержание БАП в «цифровых двойниках» ГСБ

Тип сыворотки	Содержание БАП в гидролизатах различных видов сыворотки, мг/100 г (в пересчете на стандартизованную сыворотку с массовой долей белка 1%)					
	АОА	АПФ-ИА	ДПП-IV-ИА	Горькие	ТПП	АП
1	2	3	4	5	6	7
До моделирования деградации в ЖКТ						
СТW (AC)	29,4 (46,6)	85,6 (136,0)	97,2 (154,8)	51,3 (81,7)	1,9 (3,2)	0,0 (0,0)
СТW (A/RC)	22,1 (46,9)	62,2 (131,1)	73,3 (154,3)	38,4 (81,0)	1,9 (3,8)	0,0 (0,0)
CHW (RC)	33,8 (41,4)	104,0 (127,4)	120,6 (147,9)	63,6 (77,8)	2,5 (3,2)	0,0 (0,0)
CHW (A/RC)	33,4 (40,9)	93,2 (115,6)	110,1 (136,6)	58,3 (72,3)	2,5 (3,2)	0,0 (0,0)
CHW (TAC)	9,1 (20,1)	65,0 (146,2)	70,0 (157,8)	37,6 (84,3)	0,3 (0,6)	0,0 (0,0)
CPW (TCC)	8,3 (22,0)	49,6 (130,9)	55,5 (145,9)	29,3 (77,7)	0,4 (1,3)	0,0 (0,0)
После моделирования деградации в ЖКТ						
СТW (AC)	0,0 (0,0)	47,1 (74,9)	50,2 (80,2)	52,3 (83,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
СТW (A/RC)	0,0 (0,0)	35,2 (74,3)	39,7 (83,6)	43,2 (91,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
CHW (RC)	0,0 (0,0)	56,8 (69,7)	64,3 (78,5)	70,5 (85,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
CHW (A/RC)	0,0 (0,0)	52,9 (65,7)	60,7 (75,3)	67,8 (83,5)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
CHW (TAC)	0,0 (0,0)	31,4 (70,2)	36,8 (82,6)	31,9 (71,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
CPW (TCC)	0,0 (0,0)	25,6 (67,7)	29,5 (74,0)	24,9(66,4)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)

Установлено, что гидролизаты подсырных сывороток CHW (RC) и CHW (A/RC) содержат наибольшую концентрацию БАП, что коррелирует с их белковым профилем и м.д. общего белка. Сравнительный анализ данных после моделирования переваривания показал полную деградацию пептидов с

антиоксидантными функциями, а также деградацию 48,3-56,9% и 51,6–55,1% пептидов с АПФ- и ДПП-IV-ингибирующими активностями. Пептидное картирование продуктов гидролиза пищеварительными ферментами позволило идентифицировать 20 видов пептидов с АПФ- и 19 видов пептидов с ДПП-IV-ингибирующей активностью. При этом 6 видов пептидов (из 20 видов пептидов) обладали двойной функциональностью. В то же время эффективная концентрация полумаксимального ингибирования биологического процесса (IC_{50}) для большинства пептидов на сегодняшний день не установлена. По имеющимся данным, наименьшая IC_{50} для ингибирования АПФ наблюдалась для пептидов IW (0,7 мкМ), IY (2,1 мкМ) и VY (7,1 мкМ), а для ДПП-IV у пептидов VL (74,0 мкМ), IP (149,6 мкМ) и VA (168,2 мкМ). Показано также отсутствие пептидов с аллергенными и потенциально токсическими свойствами как среди биоактивных пептидов, так и среди других продуктов гидролиза. Деструкция пищеварительными ферментами БАП с АОА не снижает перспективности их высвобождения и использования в качестве природных антиоксидантов в технологическом аспекте и до момента деградации *in vivo*.

Несмотря на все достоинства биоинформатики и различных стратегий, *in silico* остается лишь предварительным этапом каскада исследований для изучения БАП молочного белка ввиду невозможности прогнозирования таргетированного компьютерного ферментативного расщепления с учетом оптимальных технологических режимов, а также многоаспектности физиологического фактора процесса пищеварения, что предопределяет необходимость проведения дальнейших исследований *in vitro* и *in vivo*.

В пятой главе приведены исследования закономерностей таргетированной биокаталитической конверсии нативных и термоденатурированных полипептидных комплексов, подобранными в результате биоинформатического анализа протеазами с учетом основных факторов, непосредственно влияющих на кинетику процесса. Исследования проводили на сыворотках, полученных из молока коров с генотипом CSN3 AA, который по литературным данным и результатам собственных исследований превалирует над другими полиморфными вариантами по частоте встречаемости на территории РФ.

На предварительном этапе были сформированы подходы к повышению доступности белка к гидролитическому ферментативному расщеплению посредством его температурно-индуцированного рефолдинга, исключив при этом процесс повторной самосборки молекулы (ренатурации) и образования крупных белковых агрегатов. Общеизвестно, что полный рефолдинг β -LG, основного белка молочной сыворотки, достигается при температуре 85-95°C с продолжительностью термической обработки 60-120 мин. Ввиду имеющихся данных, в т.ч. полученных на предварительном этапе исследований, интенсификацию процесса биокаталитической конверсии проводили на нативных и предварительно термоденатурированных в условиях полного рефолдинга (95°C с выдержкой 120 мин) белках подсырной сыворотки (CHW (RC) и (CHW (RC) HD соответственно). Исследования по определению оптимального диапазона температур и pH гидролиза для каждого фермента проводили на сыворотках с м.д. белка 1%, E/S=1/2000 CPROT г/г и продолжительностью инкубирования 60 мин при скорости перемешивания 300 об/мин с последующей термоинактивацией ферментов при температуре 85°C и выдержке в течении 10 мин (Рисунок 4).

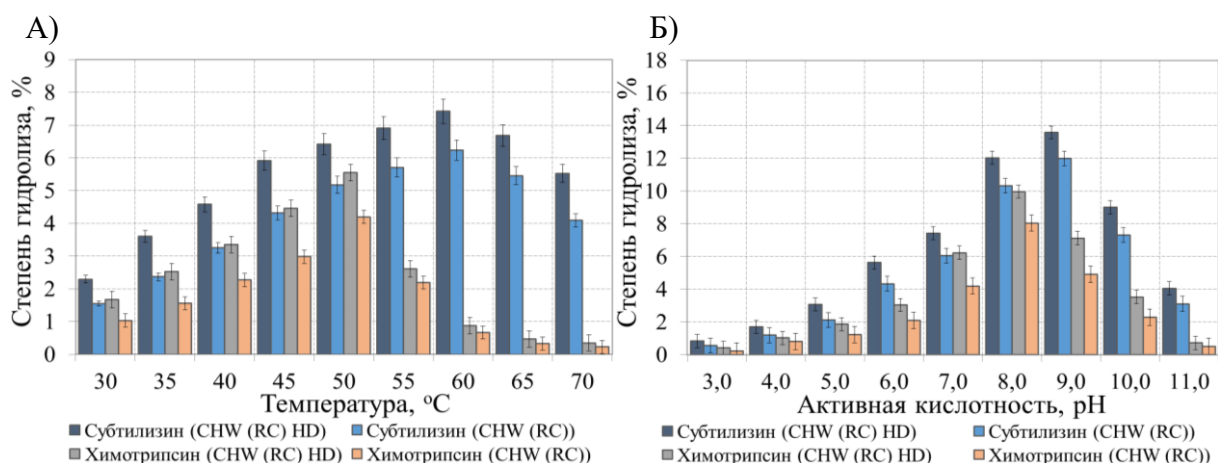


Рисунок 4 – Определение оптимального диапазона температур (А) и рН (Б) для гидролиза белкового субстрата, подобранными протеазами

Установлено, что температурный и кислотный факторы процесса критически влияют на каталитическую активность обоих ферментов при гидролизе нативных и термоденатурированных сывороточных белков. Максимальная активность субтилизина (Alcalase 2.4L) находилась в диапазоне температур 55-65°C и рН 8,0-9,0, в то время как химотрипсина (Formea STL) в диапазоне 40-50°C и рН 7,0-9,0.

Исследование кинетики биокаталитической конверсии сывороточных белков (нативных и денатурированных) проводили в условиях статического (рН-stat) и неконтролируемого понижения рН (рН-din) при рН 8,0. рН-статирование осуществляли 5М растворами КОН и NaOH (Рисунок 5).

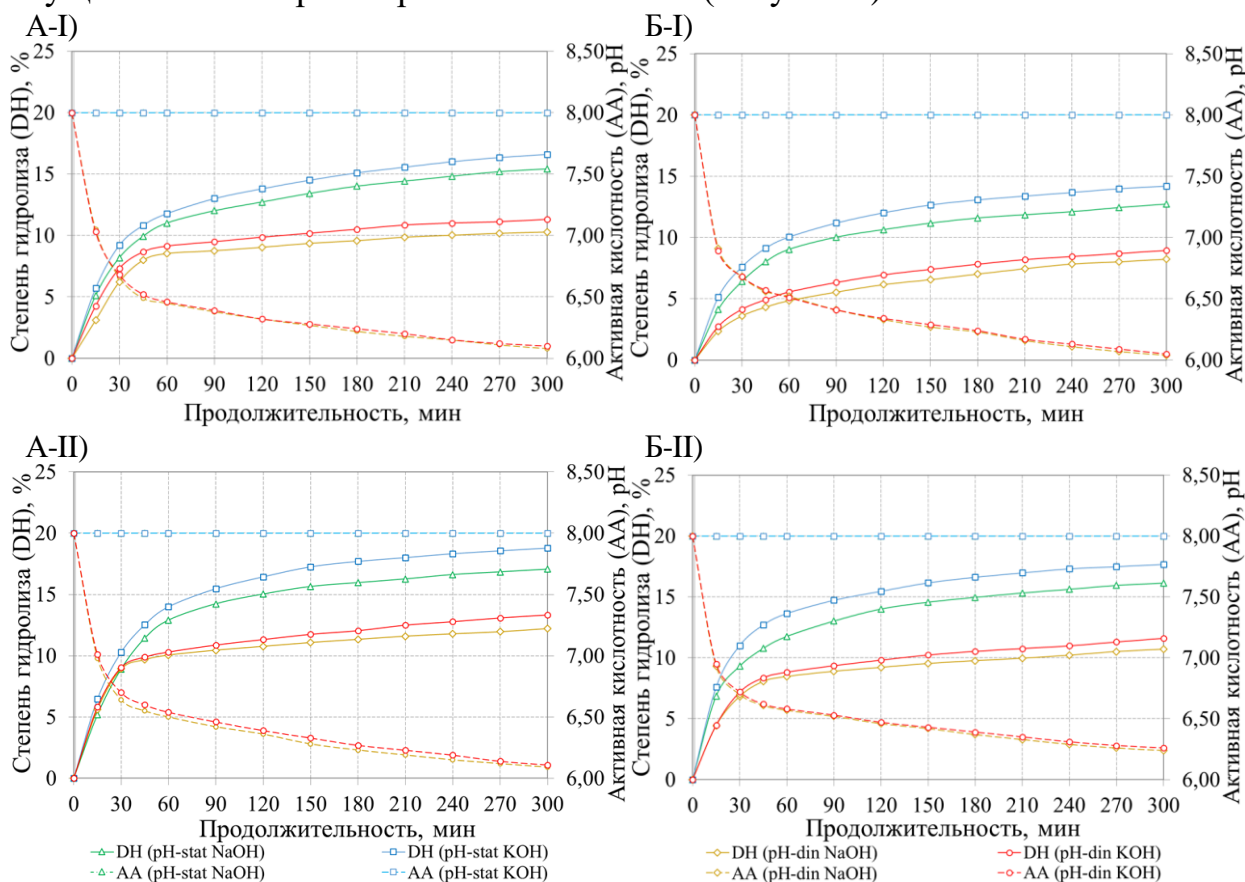


Рисунок 5 – Кинетика гидролиза белков молочной сыворотки (А – субтилизин; Б – химотрипсин; I – CHW (RC); II – CHW (RC) HD)

В результате проведенных исследований, установлена перспективность проведения гидролиза в условиях pH-stat (DN на 33-35% выше, чем при pH-din) с использованием КОН (DN на 8-12% выше, чем при использовании NaOH). Установлена зависимость повышения DN при проведении процесса химотрипсином и субтилизином в денатурирующих условиях. По результатам проведенных исследований выявлена эффективная продолжительность процесса – 180 мин, обеспечивающая более 91% от максимальных экспериментальных значений DN во всех системах.

Проведенный многофакторный эксперимент, критерием оптимизации которого являлись максимальная степень гидролиза, относительная частота высвобождения БАП (искусственно введенная для уравнивания желательности показателей и зависящая только от концентрации белка) и минимальная стоимость закладки фермента, позволил установить оптимальное содержание белка в реакционной смеси – 3,4%, а также E/S на уровне 1/1000 CPROT г/г.

Дальнейшие исследования были направлены на установление рационального соотношения между субтилизином и химотрипсином в биферментной системе с акцентом на повышение биофункциональных свойств ГСБ (Рисунок 6 и Таблица 14).

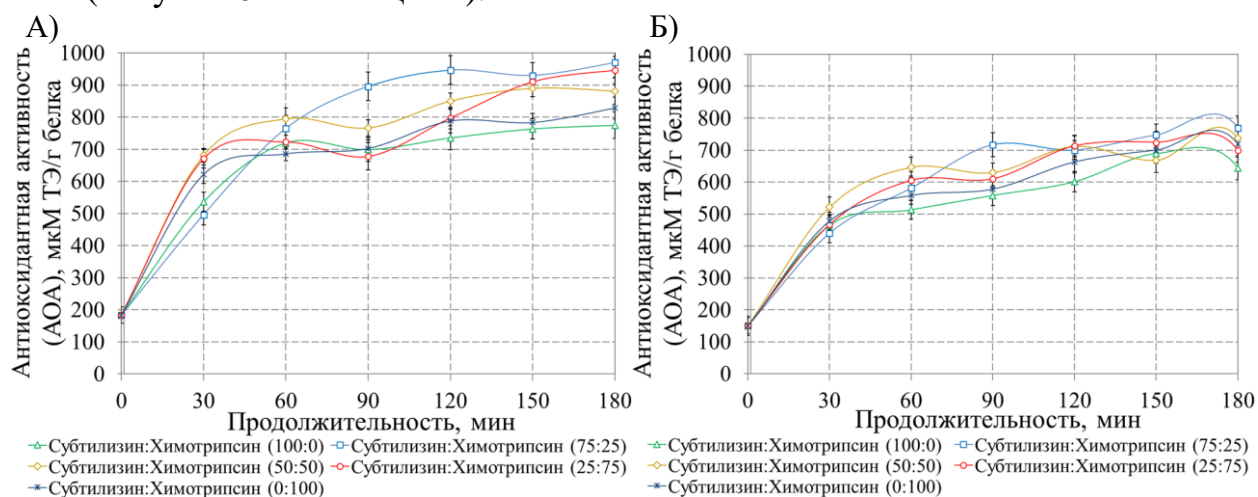


Рисунок 6 – Исследование изменения АОА_{ТЕАС} ГСБ в процессе протеолиза комплексом протеаз (А – CHW (RC); Б – CHW (RC) HD)

Установлено, что наивысшая антиоксидантная активность по методу ТЕАС была зафиксирована в пиковых точках 120 (947 мкМ ТЭ/г белка) и 180 (970 мкМ ТЭ/г белка) мин при гидролизе нативного КСБ, а также 150 (744 мкМ ТЭ/г белка) и 180 (763 мкМ ТЭ/г белка) мин при гидролизе термоденатурированного КСБ комбинацией ферментов субтилизин-химотрипсин в соотношении 75:25.

Таблица 14 – Исследование изменения АПФ-ИА (IC₅₀, мг белка/мл) ГСБ в процессе протеолиза комплексом протеаз

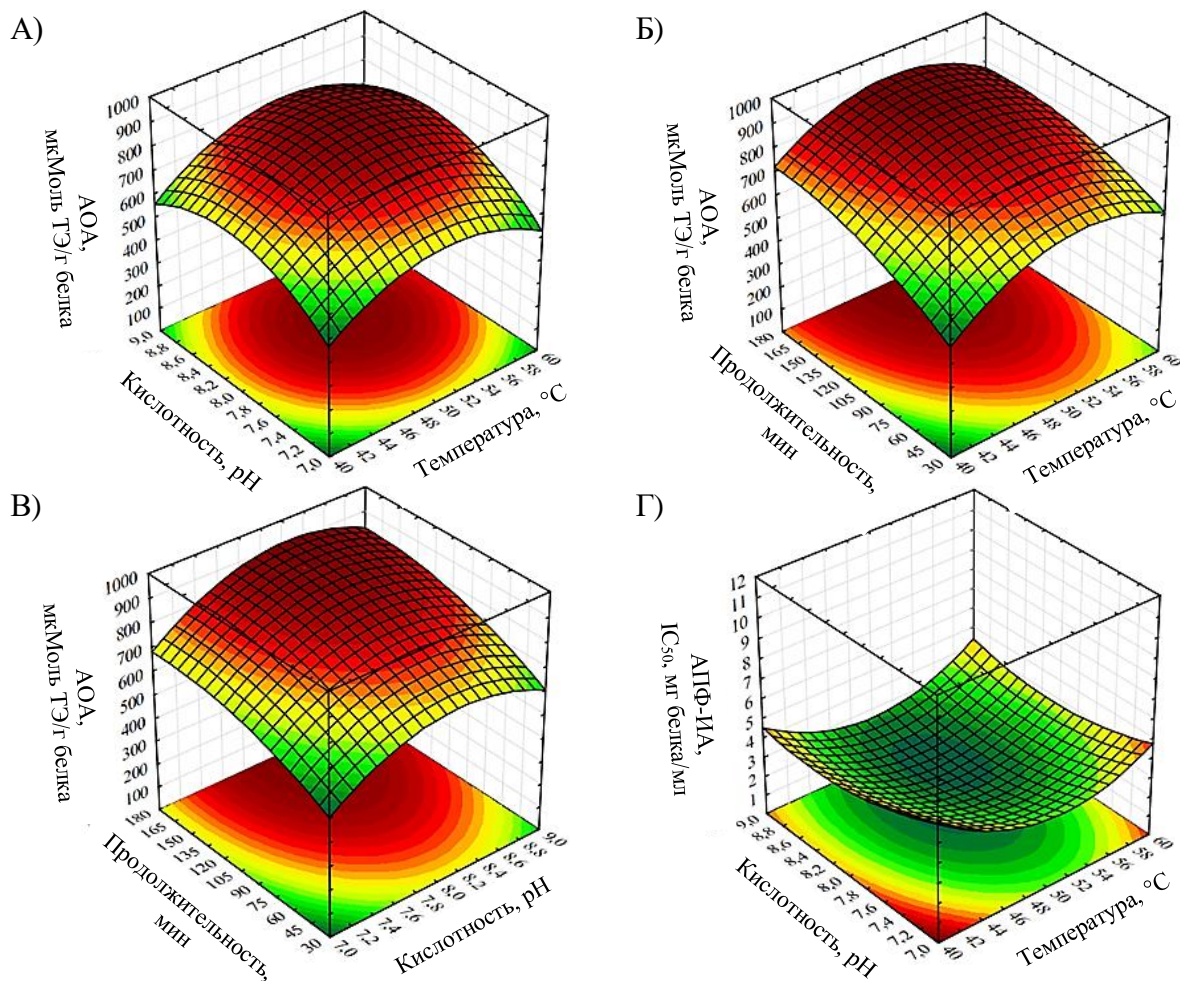
Продолжительность гидролиза, мин	Соотношение субтилизин:химотрипсин, %				
	100:0	75:25	50:50	25:75	0:100
1	2	3	4	5	6
Гидролиз в нативных условиях					
0	17,30±1,22	17,30±1,22	17,30±1,22	17,30±1,22	17,30±1,22

Продолжение таблицы 14

1	2	3	4	5	6
90	4,21±0,36 ^{ab}	3,53±0,31 ^b	3,40±0,35 ^b	5,01±0,42 ^a	3,92±0,30 ^b
180	1,93±0,11 ^a	0,31±0,03 ^d	0,44±0,05 ^{cd}	0,60±0,05 ^{bc}	0,72±0,07 ^b
Гидролиз в денатурирующих условиях					
0	23,62±1,86	23,62±1,86	23,62±1,86	23,62±1,86	23,62±1,86
90	5,51±0,28 ^a	4,83±0,36 ^b	4,20±0,30 ^b	4,84±0,33 ^b	5,91±0,35 ^a
180	3,30±0,19 ^a	0,51±0,04 ^c	0,55±0,05 ^c	0,93±0,07 ^b	1,14±0,09 ^b

Установлено, что соотношение протеаз в биферментной композиции оказывает существенное значение на АПФ-ИА. При использовании для гидролиза нативного и термоденатурированного КСБ комплекса ферментов, АПФ-ИА полученных продуктов возрастает по сравнению с исходным сырьем в 55,8 и 47,2 раза при соотношении протеаз 75:25, в 39,3 и 42,9 раза при соотношении протеаз 50:50, в 28,8 и 28,5 раз (соответственно) при соотношении протеаз 25:75, что превышает значения, полученные при использовании отдельных протеаз.

Для оптимизации условий биокаталитической конверсии белков молочной сыворотки биферментной композицией был проведен полнофакторный эксперимент с 3 переменными параметрами: температура (X_1), pH (X_2), продолжительность гидролиза (X_3). Каждый из параметров варьировали на трех уровнях X_1 (40/50/60)°C, X_2 (7,0/8,0/9,0) pH, X_3 (30/105/180) мин (Рисунок 7).



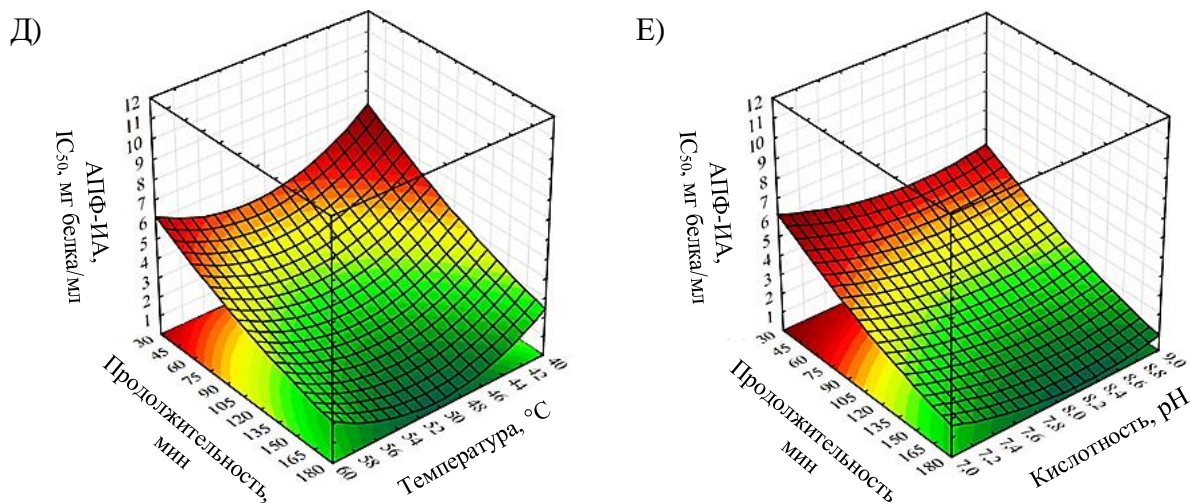


Рисунок 7 – Оптимизация условий гидролиза КСБ CHW (RC)
(А, Б, В – АОА_{ТЕАС}; Г, Д, Е – АПФ-ИА)

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{АОА}} &= -13021,30 + 158,90X_1 - 1,50X_1^2 + 2320,50X_2 - 141,30X_2^2 + 3,50X_3 - 0,01X_3^2 && \text{CHW (RC)} \\
 Y_{\text{АПФ}} &= 112,90 - 1,92X_1 + 0,02X_1^2 - 13,96X_2 + 0,84X_2^2 - 0,05X_3 + 0,0001X_3^2 && \text{CHW (RC)} \\
 Y_{\text{АОА}} &= -10630,70 + 110,00X_1 - 1,10X_1^2 + 1994,20X_2 - 121,60X_2^2 + 3,90X_3 - 0,01X_3^2 && \text{CHW (RC) HD} \\
 Y_{\text{АПФ}} &= 185,02 - 3,04X_1 + 0,03X_1^2 - 22,54X_2 + 1,38X_2^2 - 0,18X_3 + 0,0005X_3^2 && \text{CHW (RC) HD} \\
 Y_{\text{АОА}} &= -5890,18 + 97,28X_1 - 0,95X_1^2 + 884,04X_2 - 54,41X_2^2 + 5,33X_3 - 0,02X_3^2 && \text{CHW (TAC)} \\
 Y_{\text{АПФ}} &= 60,03 - 0,84X_1 + 0,01X_1^2 - 8,43X_2 + 0,52X_2^2 - 0,06X_3 + 0,0002X_3^2 && \text{CHW (TAC)}
 \end{aligned}$$

Исходя из функции желательности для достижения максимальных значений АОА и минимальных значений IC₅₀ АПФ-ИА оптимальными режимами гидролиза КСБ являлись: для сыворотки CHW (RC) T=50,8°C, pH 8,3, t=180 мин; для сыворотки CHW (RC) HD T=51,2°C, pH 8,2, t=171 мин; для сыворотки CHW (TAC) T=51,6°C, pH 8,1, t=153 мин. Результаты исследования биофункциональных свойств ГСБ, полученных при оптимальных условиях гидролиза представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Биофункциональные свойства ГСБ, полученных при оптимальных условиях протеолиза

Наименование показателя	СТW (AC)	СТW (AC) HD	CHW (RC)	CHW (RC) HD	CHW (TAC)	CPW (TCC)
ДН, %	20,9±0,5 ^{bc}	22,0±0,8 ^{ab}	19,5±0,4 ^c	21,4±0,8 ^{abc}	21,9±0,7 ^{ab}	23,3±0,9 ^a
АОА ТЕАС, мкМоль ТЭ/г белка	873±34 ^a	719±30 ^{bc}	961±47 ^a	754±39 ^b	613±24 ^d	641±27 ^{cd}
АПФ-ИА, IC ₅₀ , мг белка/мл	0,42±0,04 ^{bc}	0,65±0,08 ^a	0,30±0,03 ^{cd}	0,55±0,06 ^{ab}	0,19±0,03 ^d	0,23±0,04 ^d
САК, мг/100 г	156±12 ^b	171±19 ^b	147±11 ^b	168±16 ^b	265±22 ^a	284±24 ^a
Содержание иммуно-реактивных белков, мг/кг	1,45±0,21 ^b	<0,05 ^c	1,26±0,15 ^b	<0,05 ^c	3,34±0,41 ^a	2,81±0,33 ^a
Интенсивность горечи, мг КФЭ/100 г	500	375	500	375	750	750

Сравнительный анализ данных таблицы 15 показал относительную попарную схожесть биофункциональных свойств ГСБ CHW (RC) и СТW (AC), CHW (RC) HD и СТW (AC) HD, а также CHW (TAC) и CPW (TCC), что подтверждает влияние на биофункциональные свойства типа коагуляции

молока, а, соответственно, белкового профиля и физико-химических показателей (кислотность, содержание кальция, ионная сила и т.д.) сывороток и конформационного состояния белков. Следует отметить, что несмотря на высокую АПФ-ИА гидролизатов CHW (TAC) и CPW (TCC), АОА для них была в среднем ниже на 33-36%, САК выше на 80-93%, интенсивность горечи выше на 250 мг КФЭ/100 г по сравнению с гидролизатом CHW (RC).

На следующем этапе исследований ГСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD фракционировали методом ультра- и нанодиафильтрации (полиэфирсульфон с MWCO 0,4 кДа, 5 кДа, 10 кДа) и оценивали вклад каждой фракции в антиоксидантную и АПФ-ингибирующую активность (Таблица 16).

Таблица 16 – Оценка биоактивных свойств пептидных фракций с различной молекулярной массой

Наименование показателя	КСБ	ГСБ	Ретентат белково-пептидных фракций, кДа			
			> 10	5-10	0,4-5	< 0,4
Гидролиз в нативных условиях (CHW (RC))						
АОА _{ТЕАС} , мкМ ТЭ/г БЭ	189±17 ^{dA}	984±51 ^{bA}	271±20 ^{dA}	430±33 ^{cA}	1280±68 ^{aA}	18±5 ^{eA}
АПФ-ИА, IC ₅₀ , мг БЭ/мл	17,61±1,16 ^{aA}	0,27±0,03 ^{dA}	14,33±1,05 ^{bA}	3,73±0,29 ^{cA}	0,10±0,02 ^{dA}	—*
Гидролиз в денатурирующих условиях (CHW (RC) HD)						
АОА _{ТЕАС} , мкМ ТЭ/г БЭ	153±12 ^{dB}	768±36 ^{bB}	217±15 ^{dB}	380±24 ^{cA}	979±48 ^{aB}	15±3 ^{eA}
АПФ-ИА, IC ₅₀ , мг БЭ/мл	22,89±1,63 ^{aB}	0,48±0,06 ^{dB}	16,18±1,13 ^{bA}	5,3±0,47 ^{cB}	0,19±0,03 ^{dB}	—

* «←» - показатель не выявлен

Установлено, что для ГСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD наибольший вклад в формирование биофункциональных свойств вносят пептиды с MW 0,4-5 кДа. Следует отметить, что пептидная фракция с MW 5-10 кДа также проявляла АОА (в 2,6-3,0 раза ниже, чем фракция с MW 0,4-5 кДа) и АПФ-ИА (в 28-37 раз ниже, чем фракция с MW 0,4-5 кДа). Исходя из полученных данных, наиболее эффективным подходом является изоляция из реакционной среды пептидных фракций с MW 0,4-10 кДа с использованием подхода каскадно-селективной ультра-нанодиафильтрации.

Далее исследованы подходы к частичной деминерализации гидролизатов, методом нанодиафильтрации, где на 1 этапе гидролизат концентрировали до ~18% сухих веществ (ГСБ), на 2 и 3 этапе промывали одинарными объемами подкисленной соляной кислотой (ДФ-1) и обратнoосмотической воды со стандартным рН (ДФ-2) соответственно (Таблица 17).

Таблица 17 – Изменение содержания основных минеральных веществ в процессе нанодиафильтрации

Наименование показателя	Содержание основных минеральных веществ (макроэлементов), мг/кг				
	Кальций	Калий	Магний	Натрий	Фосфор
1	2	3	4	5	6
Гидролиз в нативных условиях (ГСБ CHW (RC))					
ГСБ	582±50 ^d	3657±284 ^{bcd}	125±18 ^{ab}	398±30 ^b	569±27 ^{cd}
Ретентат ГСБ	846±85 ^{abc}	4238±302 ^{ab}	173±21 ^a	569±42 ^a	793±42 ^a
Ретентат ДФ-1	791±68 ^{bcd}	3055±235 ^d	155±20 ^{ab}	383±30 ^b	650±35 ^{bc}
Ретентат ДФ-2	747±59 ^{cd}	2009±157 ^e	127±19 ^{ab}	253±25 ^c	564±31 ^{cd}

Продолжение таблицы 17

1	2	3	4	5	6
Гидролиз в денатурирующих условиях (ГСБ CHW (RC) HD)					
ГСБ	716±57 ^{cd}	3913±294 ^{abc}	124±18 ^{ab}	398±31 ^b	534±25 ^d
Ретентат ГСБ	1041±103 ^a	4535±325 ^a	171±21 ^{ab}	569±42 ^a	745±40 ^{ab}
Ретентат ДФ-1	1008±97 ^{ab}	3359±249 ^{cd}	159±20 ^{ab}	430±38 ^b	692±38 ^b
Ретентат ДФ-2	937±96 ^{abc}	2116±164 ^e	118±17 ^b	266±27 ^c	556±33 ^{cd}

Установлено, что при использовании нанодиафильтрации деминерализация гидролизатов сывороточных белков обеспечивается в большей степени за счет удаления одновалентных ионов (Na^+ , K^+) и в меньшей степени двухвалентных ионов (Ca^{2+} , Mg^{2+}) или многовалентных ионов. В результате трехступенчатой нанодиафильтрации удалось добиться решения поставленных задач, а именно сконцентрировать пептидные продукты гидролиза белка без потери их биофункциональных свойств, а также удалить избыток одновалентных ионов при сохранении в системе большего количества важных для функционирования и жизнедеятельности организма двухвалентных ионов кальция и магния.

В результате хромато-масс-спектрометрического анализа и последующего скрининга последовательностей пептидов с помощью баз данных BioPer, ACEperDB, MBPDB, ANTPDB в ГСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD было идентифицировано 81 и 83 видов БАП соответственно. Прекурсорами белковых последовательностей в ГСБ CHW (RC) являлись β -LG (39 видов БАП), β -CN (24 вида БАП), α -LA (7 видов БАП) α S₁- и α S₂-CN (3 и 4 вида БАП соответственно), а также LF (4 вида БАП). Для ГСБ CHW (RC) HD прекурсорами являлись β -LG (56 видов БАП), β -CN (15 видов БАП), α -LA (6 видов БАП) α S₁- и α S₂-CN (2 и 4 вида БАП соответственно). Диапазон молекулярных масс идентифицированных пептидов в ГСБ CHW (RC) составлял 900-2185 Да, а в ГСБ CHW (RC) HD 900-3200 Да. Среди пептидов обоих видов гидролизатов были идентифицированы пептиды с антиоксидантной, антимикробной, АПФ- и ДПП-IV-ингибирующей активностью, а также кальцийсвязывающие пептиды и незначительное количество потенциальных пептидных эпитопов (базы данных AllergenOnline, AlgPred2). Скрининг биоактивных пептидов на наличие токсиноподобных сайтов по базе данных ToxinPred подтвердил безопасность полученных гидролизатов. Тем не менее, полученные результаты исследований требуют подтверждения на лабораторных животных *in vivo*.

В шестой главе рассмотрена взаимосвязь между продолжительностью протеолиза и функционально-технологическими свойствами гидролизатов (растворимость, термоустойчивость, эмульгирующая способность и пр.).

Исследование дегидратированных ГСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD, полученных при классических режимах распылительной сушки ($t_{\text{вх}}=175\pm 5^\circ\text{C}$, $t_{\text{вых}}=75\pm 5^\circ\text{C}$) показали гранулометрическую и морфологическую идентичность образцов, а также относительную схожесть с соответствующими КСБ. Таким образом, биокаталитическая конверсия белка не оказывает значимого влияния на размер и форму агломерированных частиц сухих ГСБ.

Способность сухих ГСБ к полной регидратации является важнейшим из критериев оценки их качества. В связи с этим на следующем этапе работы

проведены исследования по изменению смачиваемости и растворимости сухих ГСБ в зависимости от продолжительности гидролиза (Рисунок 8).

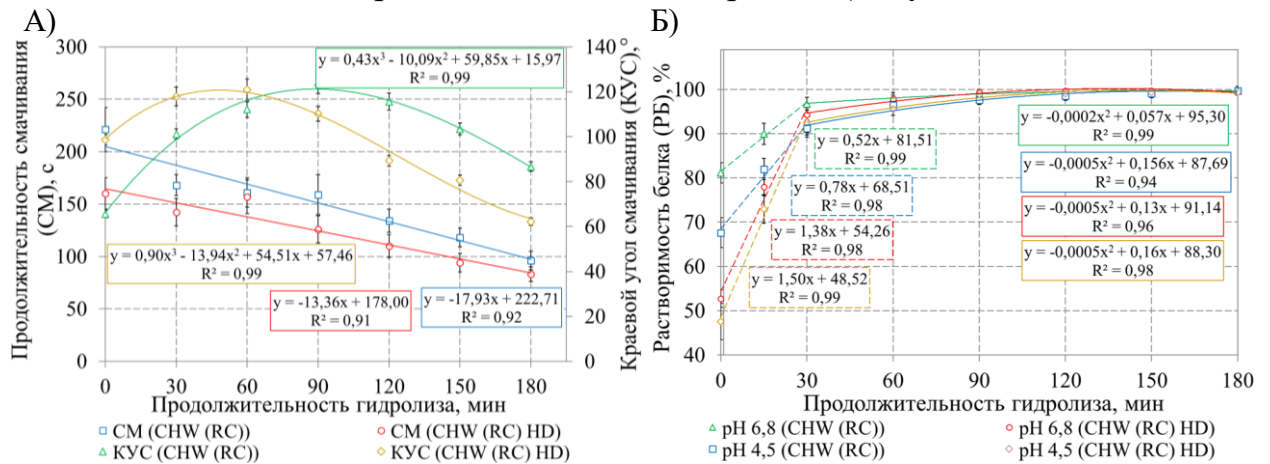
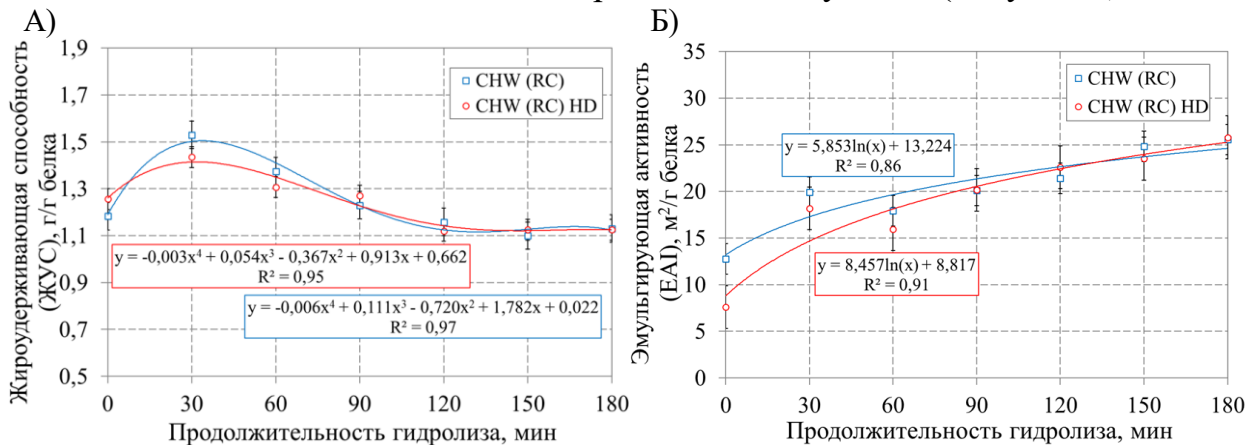


Рисунок 8 – Исследование смачиваемости (А) и растворимости (Б) сухих ГСБ

Анализ краевого угла смачивания показал возрастание гидрофобных свойств сухих ГСБ при продолжительности протеолиза до 90-й мин для CHW (RC) и до 60-й мин для CHW (RC) HD, что для обоих видов субстрата соответствует степени гидролиза 15%. Дальнейший гидролиз приводил к снижению КУС сухих ГСБ. С использованием метода «Лежачей капли» установлено достоверное ($p < 0,05$) снижение продолжительности смачивания образцов ГСБ, зависящее от глубины гидролиза белков молочной сыворотки. Данные, представленные на рисунке 8Б, свидетельствуют о том, что гидролиз положительно влияет на растворимость как нативных, так и термоденатурированных ГСБ. Установлена зависимость, в соответствии с которой в первые 30 мин гидролиза происходит существенное линейное увеличение растворимости белка в сухих ГСБ вне зависимости от кислотности системы. Изменение растворимости белка при дальнейшем гидролизе имело более локальную зависимость, описываемую полиномом второй степени. Установлено, что спустя 90 мин гидролиза ГСБ CHW (RC) и CHW (RC) подвергались практически полному растворению, а первоначальные различия характерные для восстановления сухих образцов в нейтральной и кислой водной среде – нивелировались.

С целью изучения взаимосвязи между характеристиками ГСБ и свойствами эмульсий была исследована жиродерживающая и эмульгирующая способность, а также стабильность образованных эмульсий (Рисунок 9).



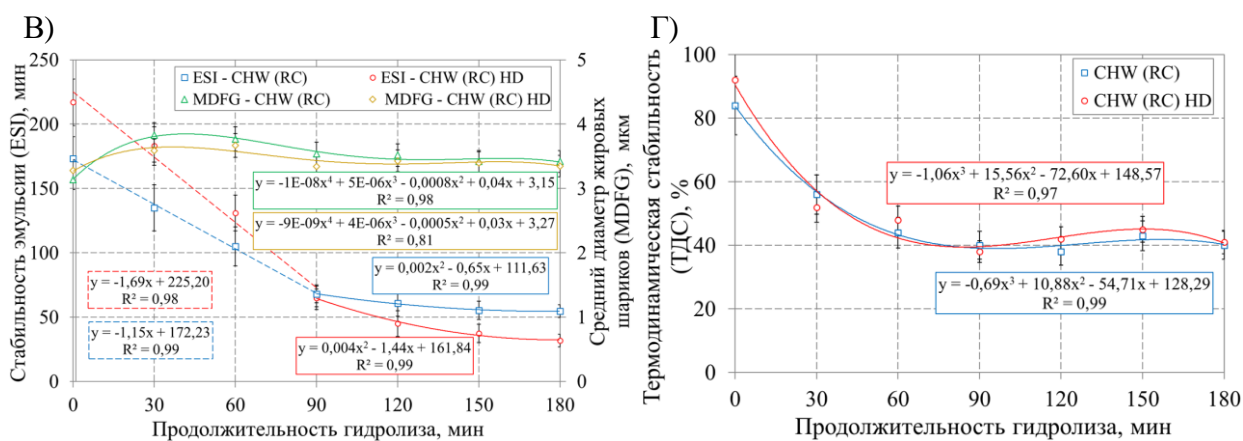


Рисунок 9 – Исследование эмульгирующих (Б) и жиродерживающих (А) свойств, а также стабильности эмульсий (В, Г) с ГСБ

Исследования жиродерживающей способности показали достоверное увеличение ЖУС сухих ГСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD после 30 мин протеолиза на 29,4 и 14,2% по отношению к сухим КСБ соответственно. Дальнейший ферментативный гидролиз оказывал отрицательное влияние, что спустя 180 мин протеолиза привело к снижению ЖУС на 5,5 и 10,4% относительно КСБ. Также установлено, что с повышением продолжительности гидролиза нативных и термоденатурированных белков увеличивается эмульгирующая активность. Так, после 180 мин протеолиза ЕАИ гидролизатов CHW (RC) и CHW (RC) HD соответствовал 25,6 и 25,8 м²/г белка, что в 2 и 3,4 раза выше, чем у соответствующих КСБ. Повышение ЕАИ является результатом увеличения доступности гидрофобных участков, а также уменьшения молекулярной массы пептидов совокупно с увеличением компактности и площади контакта, что облегчает перегруппировку и адсорбцию пептидов на границе раздела фаз. Несмотря на высокую адсорбцию на границе раздела фаз вода-масло, пептиды очевидно не способны к длительной стабилизации эмульсии, что показано на рисунках 9В и 9Г. В зависимости от глубины гидролиза белковой структуры изменяются значения дзета-потенциала образующихся пептидов, что в результате адсорбции на жировых частицах приводит к снижению энергии отталкивания и дальнейшей флокуляции и коалесценции.

Исходя из кинетики изменения антиоксидантных свойств изучено влияние ГСБ, полученных в оптимальных условиях процесса, на окисление молочного жира при соотношении масс экв. белка и жира 1:10 (Таблица 18). Таблица 18 – Исследование антиокислительной способности ГСБ на модели молочного жира

Наименование образца	Продолжительность хранения, сут.					
	0	5	10	20	30	60
1	2	3	4	5	6	7
Перекисное число, ммоль активного кислорода/кг						
КСБ SW(R)	0,08±0,03 ^a	0,27±0,05 ^a	0,75±0,12 ^a	0,90±0,11 ^a	1,81±0,18 ^a	2,45±0,13 ^b
ГСБ SW(R)	0,08±0,02 ^a	0,11±0,07 ^b	0,33±0,05 ^b	0,35±0,08 ^b	0,50±0,14 ^b	0,70±0,10 ^c
КСБ SW(R) HD	0,08±0,02 ^a	0,28±0,04 ^a	0,63±0,09 ^a	0,78±0,13 ^a	1,55±0,15 ^a	3,80±0,29 ^a
ГСБ SW(R) HD	0,08±0,03 ^a	0,11±0,05 ^b	0,34±0,07 ^b	0,40±0,08 ^b	0,60±0,11 ^b	0,95±0,13 ^c

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6	7
Анизидиновое число						
КСБ SW(R)	0,22±0,03 ^a	0,42±0,05 ^a	0,64±0,06 ^a	0,75±0,04 ^a	1,09±0,08 ^a	1,28±0,10 ^b
ГСБ SW(R)	0,22±0,03 ^a	0,24±0,03 ^b	0,46±0,05 ^b	0,54±0,01 ^c	0,57±0,04 ^b	0,82±0,07 ^c
КСБ SW(R) HD	0,23±0,01 ^a	0,47±0,04 ^a	0,53±0,02 ^{ab}	0,62±0,03 ^b	0,98±0,09 ^a	4,30±0,15 ^a
ГСБ SW(R) HD	0,22±0,04 ^a	0,23±0,03 ^b	0,48±0,05 ^b	0,56±0,03 ^{bc}	0,61±0,05 ^b	0,92±0,09 ^c

Экспериментально доказано, что ГСБ способны замедлять окислительную порчу молочного жира. Так, содержание продуктов окисления на основе анализа перекисного числа (на 60 сут.) для КСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD увеличилось в 30,6 и 47,5 раз по сравнению с первоначальными значениями, в то время как для соответствующих ГСБ – в 8,8 и 11,9 раз соответственно. Содержание продуктов окисления гидроперекисей (альдегидов и кетонов) в образцах КСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD повысилось в 5,8 и 18,7 раз, а в образцах ГСБ в 3,7 и 4,2 раза соответственно.

С точки зрения сохранения биофункциональных свойств ГСБ термоустойчивость имеет критическое значение, ввиду непосредственного влияния на агрегацию белков и пептидов, сопровождающуюся изменением конформационной структуры, а, соответственно, доступностью биоактивных сайтов. Исследование термоустойчивости проводили по методу тепловой пробы при температурах пастеризации – $95\pm 2^\circ\text{C}$ и ультрапастеризации – $137\pm 2^\circ\text{C}$ (Рисунок 10).

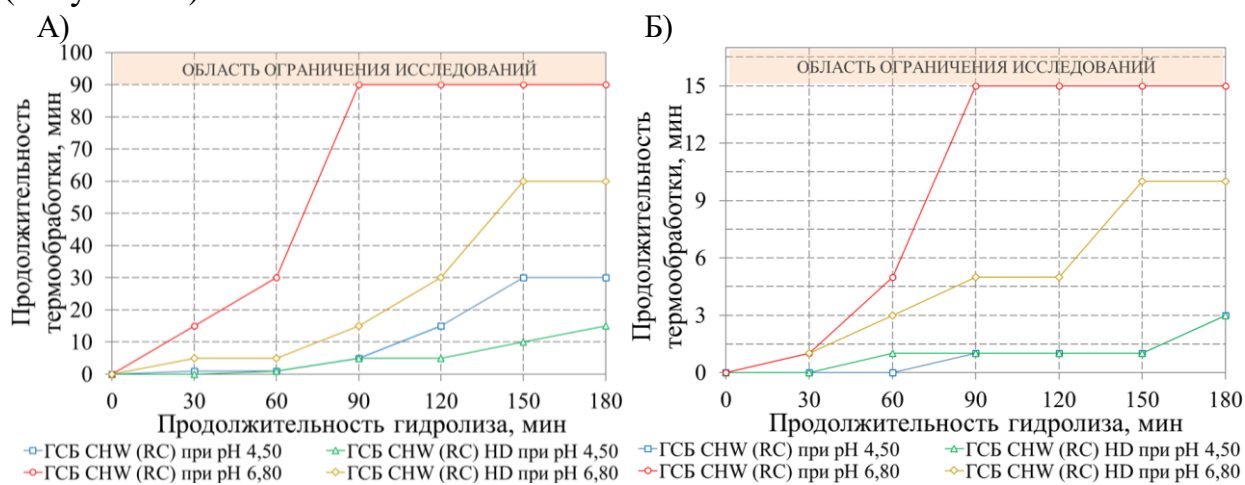


Рисунок 10 – Исследование термоустойчивости ГСБ при температуре тепловой обработки $95\pm 2^\circ\text{C}$ (А) и $137\pm 2^\circ\text{C}$ (Б)

Визуальное детектирование термоустойчивости гидролизатов сывороточных белков не позволило выявить наличие видимых признаков агрегации пептидов, однако проведенные микроскопические исследования позволили установить достоверные различия в термоустойчивости образцов. Установлена зависимость, в соответствии с которой глубина протеолиза положительно влияет на термоустойчивость ГСБ, в то время как понижение рН среды оказывает негативное влияние на исследуемый фактор. Отмечена более низкая термоустойчивость для ГСБ CHW (RC) HD, что обусловлено повышенным содержанием кальция в системе (внесенный CaCO_3 при термоденатурации), а также может являться следствием межмолекулярных взаимодействий, происходящих в результате термоденатурации белка.

Анализ изменения АОА и АПФ-ИА ГСБ, полученных в оптимальных условиях, показал, что пастеризация при температуре $95\pm 2^\circ\text{C}$ с выдержкой до 15 мин и ультрапастеризация при температуре $137\pm 2^\circ\text{C}$ с выдержкой до 3 мин, как в кислой, так и нейтральной среде не приводит к статистически значимому ($p < 0,05$) снижению исследуемых показателей. Более длительная выдержка, особенно в кислой среде, отрицательно влияет на показатели АОА и АПФ-ИА в ГСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD.

Для оценки реакционной способности ГСБ к меланоидинообразованию проведены колориметрические и спектрофотометрические (Рисунок 11) исследования модельных систем (10% раствор СОМ:ГСБ или КСБ в соотношении 50:50 (мас./мас.) по экв. белка), подвергнутых топлению.

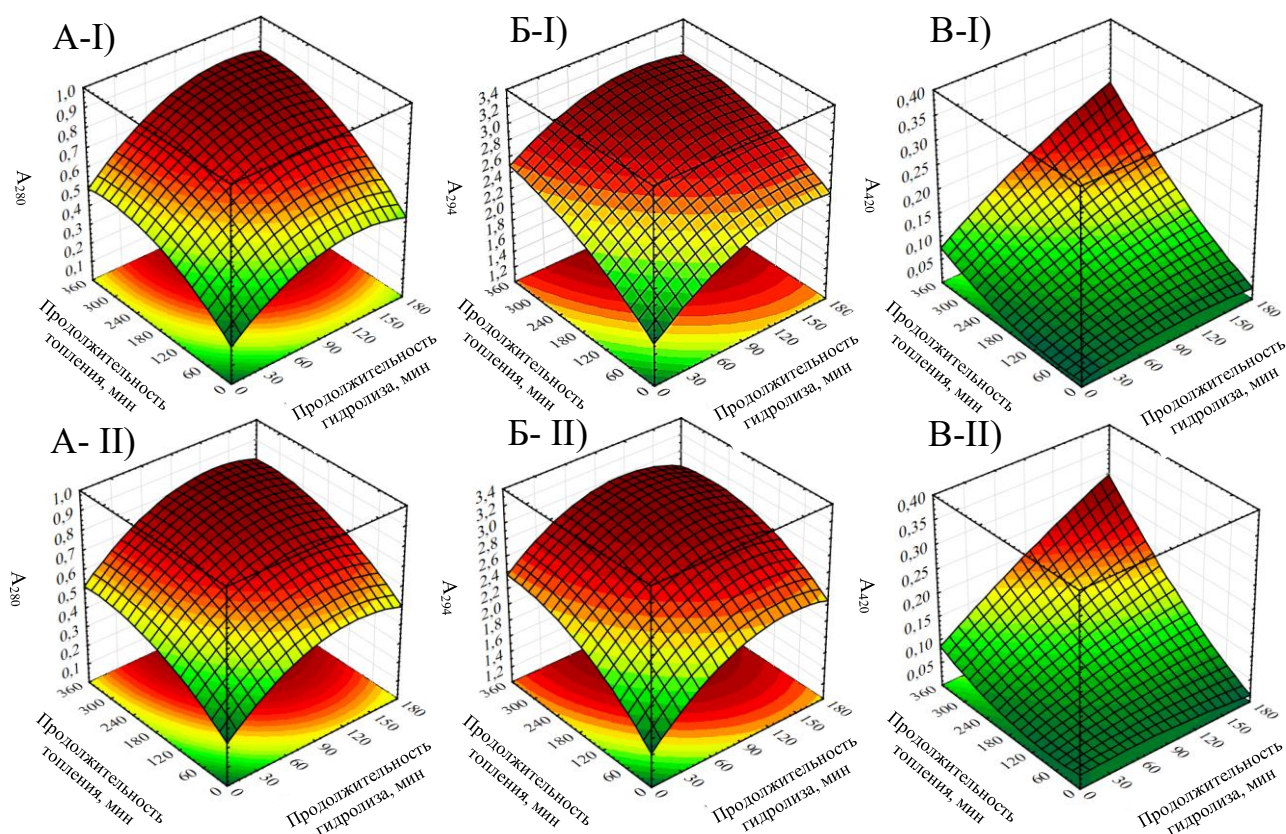


Рисунок 11 – Исследование кинетики образования промежуточных и конечных продуктов реакции Майяра (А – абсорбция при 280 нм; Б – абсорбция при 294 нм; В – абсорбция при 420 нм; I – CHW (RC); II – CHW (RC) HD)

Установлено, что продолжительность гидролиза оказывает положительное влияние на скорость образования промежуточных продуктов реакции Майяра. При этом спустя 240 мин топления смеси происходит замедление изменения абсорбции образцов при 280 и 294 нм, что связано с увеличением скорости преобразования промежуточных продуктов реакции Майяра в меланоидины, детектируемые при 420 нм. Данная зависимость полностью коррелирует с изменением желтизны и красноты образцов (детализация колориметрического профиля в цветовом пространстве CIELAB), с учетом дисбаланса образованных и преобразованных в конечные коричневые соединения промежуточных продуктов реакции Майяра. Более высокая скорость меланоидинообразования в ГСБ объясняется с одной стороны доступностью свободных α -аминогрупп, а с

другой стороны, накоплением промежуточных продуктов реакции Майяра в процессе гидролиза.

В седьмой главе представлены данные тестирования ГСБ на лабораторных животных (*in vivo*), позволяющие интерпретировать с научной точки зрения заявления о безопасности и физиологических механизмах их влияния на гипертензивные состояния и антиоксидантный статус организма.

В результате проведенных исследований установлено отсутствие острой и субхронической токсичности при внутрижелудочном введении ГСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD. Потребление тестируемых продуктов в соответствующих дозировках не приводило к гибели животных, нарушению их общего состояния, изменению показателей клинического и биохимического анализа крови. Результаты макро- и микроскопического изучения аутопсийного материала демонстрировали отсутствие патологии у животных экспериментальных групп. Представленные выводы были характерны для крыс обоих полов.

Исследование аллергенных свойств проводили на модели крыс линии Wistar, разделенных на 6 групп: (I) интактная; (II) контрольная (ежедневно 2 мг/гол овальбумина, растворенного в 0,5 мл воды); (IIIa и IIIb) опытные (ежедневно 2 мг/гол КСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD, растворенного в 0,5 мл воды); (IVa и IVb) опытные (ежедневно 2 мг/гол ГСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD, растворенного в 0,5 мл воды). На 28 сут. проводили провокационный тест для контроля степени сенсибилизации, путем введения образцов подкожно в ушную раковину в дозе 0,1 мл/гол (концентрации 200 мг/мл). После внутрикожного введения оценивали симптомы анафилактического шока (через 1 ч.) и развития реакции гиперчувствительности – регистрировали выраженность эритемы и отека, учитывали время сохранения эффектов (Таблица 19). На 35 и 42 сут. эксперимента проводили провокационные тесты II (завершение основной части эксперимента) и III (повторное введение образца после недельного перерыва). По завершению провокационных тестов отбирали кровь для анализа концентрации аллерген-специфических антител IgE (Рисунок 12).

Таблица 19 – Тест на сенсибилизацию к пищевому аллергену

Группа	Провокация на 28-е сутки	
	Эритема, ч	Отек, ч
I	0,20±0,06 ^c	0,20±0,06 ^b
II	0,40±0,23 ^c	0,40±0,23 ^b
IIIa	96,00±26,00 ^a	24,00±11,00 ^a
IVa	24,00±9,00 ^b	24,00±2,10 ^a
IIIb	24,00±2,00 ^b	13,00±6,00 ^a
IVb	21,00±1,50 ^b	2,00±1,36 ^b

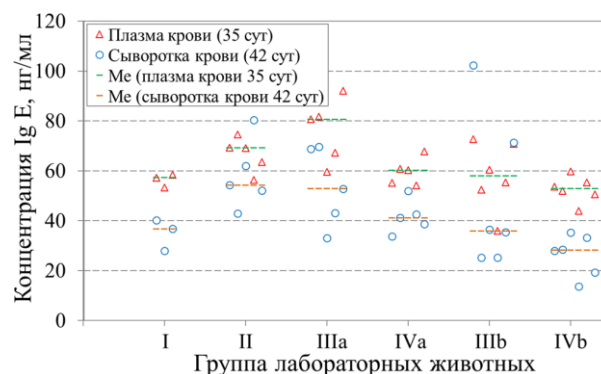


Рисунок 12 – Изменение концентрации IgE в крови лабораторных животных

С момента начала и до завершения эксперимента лабораторные животные всех групп стабильно набирали массу тела. При этом в первые 12 сут.

эксперимента в каждой из групп II, IIIa и IVa отмечена гибель по одной особи лабораторного животного. Согласно результатам вскрытия гибель животных была связана с развитием воспалительных процессов в легких, что может являться следствием гиперергических иммунных реакций на исследуемые объекты, характерных для индивидуальных животных. У остальных животных, задействованных в экспериментах не выявлено каких-либо отклонений от нормы в физиологическом состоянии на протяжении всей продолжительности исследования. По итогам теста на сенсibilизацию к пищевому аллергену у особей всех исследуемых групп не было зафиксировано симптомов анафилактического шока, что указывает на отсутствие тяжелых аллергических реакций к исследуемым белковым продуктам. Наивысшая длительность проявления эритемы (в среднем 96 ч) и отека ушной раковины (в среднем 24 ч) наблюдалась в группе IIIa, сенсibilизированной КСБ CHW (RC). Продолжительность проявления эритемы в группах IIIb, IVa и IVb находилась на сопоставимом уровне и достоверно отличалась ($p < 0,05$) от группы IIIa, а также групп контроля. При этом в группе IVb продолжительность сохранения симптомов отека ушной раковины статистически значимо не отличалась от контрольных групп, в то время как группы IIIa, IIIb, IVa имели достоверные отличия ($p < 0,05$) от групп контроля. Внутрикожные провокационные тесты в группе положительного контроля (группа II) не позволили достоверно ($p \geq 0,05$) установить острой и замедленной аллергической реакции на сенсibilизацию овальбумином, что может быть связано с развитием клинической толерантности в предшествующий провокационному тесту период. Уровень IgE был повышен у лабораторных крыс сенсibilизированных КСБ CHW (RC) и овальбумином, как после основного периода исследований, так и повторной сенсibilизации. В группе IVa отмечено повышенное содержание IgE, характерное для одной особи, что может быть связано с сохранением в ГСБ CHW (RC) антигенных детерминант, способных запускать реакцию иммунного ответа. В тоже время в группе IVb на фоне первичного и вторичного периода сенсibilизации ГСБ CHW (RC) HD не обнаружено достоверного повышения уровня IgE ($p \geq 0,05$). Таким образом, учитывая сохранность групп, а также иммунную реакцию организма на сенсibilизацию белком молочной сыворотки в исследуемых группах животных установлено, что ГСБ CHW (RC) HD не вызывает побочных иммунных ответов, связанных с IgE-опосредованными реакциями гиперчувствительности.

Исследование антиоксидантной активности и гепатопротекторных свойств ГСБ проводили на модели крыс линии Wistar с антиоксидантной патологией печени, индуцированной CCl_4 . Для проведения исследований из самцов крыс были сформированы группы: (I) интактная; (II) контрольная (0,5 мл/кг CCl_4 +масло в 1 и 14 день); (IIIa и IIIb) опытные (0,5 мл/кг CCl_4 +масло в 1 и 14 день, а также 1 мл восстановленного КСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD (дозировка 100 мг БЭ/кг) ежедневно; (IVa и IVb) опытные (0,5 мл/кг CCl_4 +масло в 1 и 14 день, а также 1 мл восстановленного ГСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD (дозировка 100 мг БЭ/кг). Длительность исследований составляла 28 дней.

Биохимический анализ крови крыс позволил достоверно подтвердить клиническую этиологию гепатоцеллюлярного повреждения печени. Далее

проведен анализ АОА(Е) и маркеров окислительного стресса в сыворотке крови и тканевых экстрактах гомогената печени лабораторных крыс (Таблица 21).

Таблица 21 – Исследование АОА(Е) и маркеров окислительного стресса

Наименование показателя	№ группы					
	I	II	IIIa	IVa	IIIb	IVb
Сыворотка крови						
АОА _{ТЕАС} , мМ ТЭ	13,9±0,9 ^b	9,8±0,8 ^c	10,3±0,7 ^c	16,7±1,1 ^a	10,8±0,6 ^c	15,1±0,9 ^{ab}
АОЕ _{ОРАС} , мМ ТЭ	8,3±0,5 ^b	5,5±0,3 ^c	5,8±0,3 ^c	11,9±0,7 ^a	6,2±0,4 ^c	10,8±0,9 ^a
Активность СОД, Ед./мл	49,3±2,3 ^a	31,8±1,5 ^b	35,9±1,7 ^b	52,4±2,5 ^a	37,2±1,9 ^b	48,6±2,3 ^a
Активность ГПО, Ед./г белка	128,2±11,7 ^{ab}	92,8±9,4 ^c	103,7±10,6 ^{bc}	136,8±12,0 ^a	105,4±9,7 ^{bc}	131,1±11,9 ^{ab}
Активность каталазы, Ед./мл	14,6±1,5 ^a	9,3±0,9 ^b	10,1±1,1 ^b	15,3±1,8 ^a	9,7±1,1 ^b	14,9±1,4 ^a
ТВАРS, мкМ экв. МДА/л	2,9±0,3 ^{bc}	4,1±0,4 ^a	3,7±0,3 ^{ab}	2,0±0,5 ^c	3,6±0,3 ^{ab}	2,2±0,4 ^c
Концентрация изопростана F8, пг/мл	67,8±4,7 ^b	136,8±12,1 ^a	119,2±10,3 ^a	59,6±4,2 ^b	125,4±11,2 ^a	65,3±3,9 ^b
Тканевый экстракт гомогената печени						
Коэффициент массы печени	29,4±1,0 ^c	40,5±1,9 ^a	36,2±1,5 ^b	29,7±1,2 ^c	35,3±1,4 ^b	30,3±1,0 ^c
АОА _{ТЕАС} , мкМ ТЭ/г ткани	37,1±2,4 ^a	31,3±1,9 ^b	33,9±1,7 ^{ab}	39,9±2,6 ^a	34,7±2,0 ^{ab}	38,7±2,2 ^a
АОА _{ОРАС} , мкМ ТЭ/г ткани	21,8±1,4 ^{ab}	17,8±0,9 ^c	18,4±1,0 ^{bc}	23,1±1,7 ^a	19,4±1,3 ^{abc}	22,5±1,7 ^a
Активность СОД, Ед./мг ткани	36,3±1,7 ^a	20,1±1,0 ^c	24,6±1,1 ^b	34,7±2,0 ^a	26,1±1,1 ^b	33,6±1,8 ^a
Активность ГПО, Ед./г белка	18,0±2,0 ^a	11,9±0,9 ^c	13,3±1,2 ^{bc}	17,1±1,8 ^{ab}	12,8±1,4 ^{bc}	16,7±2,0 ^{ab}
Активность каталазы, Ед./мг ткани	29,7±2,4 ^a	17,4±1,5 ^b	20,1±1,8 ^b	26,3±2,5 ^a	20,4±2,0 ^b	27,5±2,2 ^a
ТВАРS, нМ экв. МДА/г	39,7±4,1 ^b	73,0±6,2 ^a	63,8±5,7 ^a	34,1±4,3 ^b	61,5±5,2 ^a	36,9±4,8 ^b

Проведенные исследования *in vivo* на модели крыс с CCl₄-индуцированным повреждением печени показали, что ГСБ в достаточной степени могут нивелировать последствия острого повреждения печени. Представленные данные показывают, что антиоксидантные пептиды, входящие в состав ГСБ, могут участвовать в тушении высокореактивных свободных радикалов (например, трихлорметильный радикал (CCl₃•)), образующихся в печени крыс при биотрансформации CCl₄ через систему цитохрома P-450. Раннее тушение свободных радикалов предотвращает окислительный стресс, образование высокореактивных АФК и перекисное окисление липидов, что, в свою очередь, препятствует некрозу клеток и нарушению функции печени.

Исследование гипотензивных свойств ГСБ (Таблица 22) проводили на линии крыс со спонтанной гипертензией (SHR), разделённых на 6 групп: (I) отрицательная контрольная (1 мл воды), (II) положительная контрольная (1 мл воды + 10 мг/кг Каптоприл (KRKA, Словения), (IIIa и IIIb) опытные (1 мл восстановленного КСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD (дозировка 100 мг БЭ/кг) ежедневно; (IVa и IVb) опытные (1 мл восстановленного ГСБ CHW (RC) и CHW (RC) HD (дозировка 100 мг БЭ/кг). Длительность исследований составляла 42 дня.

Таблица 22 – Исследование изменения САД и ДАД крыс линии SHR

№ группы	Систолическое артериальное давление, мм рт.ст.			Диастолическое артериальное давление, мм рт.ст.		
	0 сутки	42 сутки	ΔР	0 сутки	42 сутки	ΔР
Гипертензивная модель (крысы линии SHR)						
I	184±7 ^{aA}	197±9 ^{aA}	+13	130±4 ^{aA}	137±5 ^{aA}	+7
II	188±8 ^{aA}	143±6 ^{dB}	-45	134±5 ^{aA}	102±3 ^{eB}	-32
IIIa	185±8 ^{aA}	182±8 ^{abA}	-3	129±3 ^{aA}	130±4 ^{abA}	+1
IVa	181±7 ^{aA}	152±4 ^{cdB}	-29	130±6 ^{aA}	110±3 ^{deB}	-20
IIIb	179±5 ^{aA}	173±7 ^{bA}	-6	126±4 ^{aA}	125±5 ^{bcA}	-2
IVb	187±6 ^{aA}	166±7 ^{bcB}	-21	132±4 ^{aA}	116±5 ^{cdB}	-16

Установлено, что ежедневная внутрижелудочная инфузия КСБ на протяжении 42 суток не оказывала существенного влияния ($p>0,05$) на изменение САД в гипертензивных группах животных IIIa и IIIb. В тоже время в результате продолжительного систематического введения гидролизатов сывороточных белков (группы IVa и IVb) в организм лабораторных животных, установлено статистически значимое снижение ($p<0,05$) САД ($\Delta P_{\text{сист}}$) на 29 и 21 мм рт.ст., а также ДАД ($\Delta P_{\text{диаст}}$) на 20 и 16 мм рт.ст., относительно соответствующих групп.

Для понимания механизма снижения АД, индуцированного введением крысам (SHR) ГСБ, изучено (Таблица 23) изменение компонентов ренин–ангиотензин–альдостероновой системы (РААС).

Таблица 23 – Исследование влияния долгосрочного систематического потребления КСБ и ГСБ на изменение компонентов РААС у крыс линии SHR

Наименование показателя	№ группы					
	I	II	IIIa	IVa	IIIb	IVb
Концентрация ренина в сыворотке крови, пг/мл	182,4±17,7 ^a	216,4±23,7 ^a	203±21,9 ^a	187±19,7 ^a	194±23,3 ^a	178±17,0 ^a
Концентрация ангиотензина I в сыворотке крови, пг/мл	31,3±2,5 ^b	81,9±6,3 ^a	42,1±4,8 ^b	78,3±6,9 ^a	40,4±3,5 ^b	76,9±6,4 ^a
Концентрация ангиотензина II в сыворотке крови, пг/мл	46,8±3,0 ^a	27,4±2,4 ^c	44,9±4,1 ^a	35,4±3,2 ^{bc}	42,7±3,2 ^{ab}	34,1±3,1 ^{bc}
Активность АПФ в сыворотке крови, Ед./л	59,4±5,1 ^a	34,9±3,9 ^c	52,3±4,8 ^{ab}	42,3±4,2 ^{bc}	54,2±5,3 ^{ab}	44,1±4,5 ^{bc}
Активность АПФ в тканях аорты, Ед./мг ткани	3,2±0,4 ^{ab}	2,3±0,3 ^c	3,4±0,4 ^a	2,4±0,2 ^{bc}	3,1±0,3 ^{abc}	2,7±0,2 ^{abc}
Концентрация альдостерона в сыворотке крови, пг/мл	830,7±53,7 ^a	404,9±35,6 ^b	784,3±47,1 ^a	509,1±40,9 ^b	748,5±60,4 ^a	486,7±47,2 ^b

Полученные данные свидетельствуют, что для ГСБ характерна относительно схожая с Каптоприлом (лекарственный препарат с доказанным механизмом антигипертензивного действия через конкурентное ингибирование активности АПФ) тенденция изменения компонентов РААС, что свидетельствует об активации механизма ингибирования АПФ с последующим зависимым снижением ангиотензина II и альдостерона.

В восьмой главе представлены практические аспекты технологии таргетированной биокаталитической конверсии полипептидных комплексов

вторичных сырьевых ресурсов молочной промышленности, а также интенсифицированные технологии молочных продуктов, с включением в состав гидролизованных сывороточных белков с доказанной АОА, АПФ-ИА. Сформированный научно-технический задел, приведённый в предыдущих главах, позволил разработать технологию дегидратированного ГСБ (СТО 00419785–039–2018), представленную на рисунке 13.



Рисунок 13 – Технологическая схема производства КСБ и ГСБ

Расчет основных экономических показателей производства ГСБ, выявил, что его ориентировочная стоимость составляла 1320 руб./кг (в пересчете на изолированные пептидные фракции – 3300 руб./кг экв. белка). В то же время цена на ГСБ (производство Россия) без аннотированных биофункциональных свойств 3421 руб./кг экв. белка, а на ГСБ PER2DIA (производство Франция) с антидиабетическим действием 18130 руб./кг экв. белка (136 € за кг ГСБ с м.д. экв. белка 75%). Кроме того, анализ рынка показал отсутствие ниши продуктов (ГСБ) с доказанными антиоксидантными и гипотензивными, а также гипоаллергенными свойствами. Таким образом, в условиях введенных санкций и параллельного импорта продукции производство ГСБ по разработанной технологии на территории РФ экономически обосновано.

Масштабирование в условиях промышленного производства технологии ГСБ позволило перейти к интенсификации технологий молочных

продуктов различных ассортиментных групп. Сформулирована концепция обогащения молочных продуктов гидролизованными сывороточными белками, которая представляет собой инновационный нутрициологический подход к повышению биологической ценности продуктов, профилактике и снижению выраженности негативных последствий при гипертензивных состояниях, аллергических реакциях на белки молока, а также при нарушении антиоксидантного статуса организма. С учетом потребительских предпочтений целевой аудитории, общепринятых подходов к обогащению пищевой продукции функциональными ингредиентами, а также обеспечения требуемых функционально-технологических свойств сформирована оптимальная ассортиментная структура молочной продукции с включением в состав ГСБ с доказанным биологическим действием, предназначенная для реализации в различных сегментах рынка. Концентрация гидролизатов сывороточных белков в молочных продуктах подобрана с учетом обеспечения доказанных биологических эффектов при порционном потреблении (250 мл для жидких продуктов и 180 г для структурированных продуктов) два раза в сутки, а также сохранения приемлемых потребительских характеристик. Для нивелирования горького привкуса ГСБ в зависимости от вида продукции исследованы и внедрены технологические подходы «вкусовой иллюзии» по принципу подобия (апельсин, грейпфрут, клюква, горький шоколад, кофе, горчица пр.), аэрирования и инкорпорации азота, краткосрочной криоанестезии рецепторов (замороженные десерты), а также маскировки вкуса (продукты с повышенным содержанием сахара и жиров, использование наполнителей черника, вишня и пр.). Основные научно-технические решения, полученные в рамках реализации программы комплексных исследований, отражены в интенсифицированных технологиях молочных продуктов с добавлением в качестве функционально-технологического компонента гидролизованных сывороточных белков (Таблица 24).

Таблица 24 – Основные научно-технические разработки

№	Наименование	Техническая документация
1	Смесь молочная для приготовления кислородных коктейлей	ТУ 10.51.55–065–00419785–2020
2	Пудинг молочный	СТО 00419785–063–2022
3	Продукт молочный сгущенный с сахаром	СТО 00419785–064–2022
4	Продукты кисломолочные для диетического профилактического питания	ТУ 9222–512–00419785–2017
5	Коктейль молочный стерилизованный	СТО 00419785–065–2022
6	Сыры творожные аэрированные	СТО 00419785–066–2022
7	Напиток молочно-соковый «Фрутнео»	СТО 00419785–067–2023
8	Соус молочный с пряными травами	СТО 00419785–068–2023
9	Крем молочно-фруктовый	СТО 00419785–069–2023
10	Десерт молочный замороженный «Снежный бриз»	СТО 00419785–070–2023
11	Продукты кисломолочные топленые «Пеп-Актив»	СТО 00419785–071–2023

Результаты работы прошли апробацию и внедрены в производство на 12 предприятиях молочной промышленности стран-членов СНГ.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработана и реализована на практике методология количественного анализа структуры мирового и, в частности, российского рынка производства молочной сыворотки. По результатам количественного анализа установлено, что потенциальный объем мирового и российского рынка молочной сыворотки за 2020 г. составляет 190,05 и 7,97 млн т (соответственно) с прогнозируемой тенденцией к росту. На основе международного научного опыта проведен протеомный анализ основных белков молока с учетом генетической изменчивости, ассоциированной со структурой и технологическими свойствами молочного сырья. Ввиду того, что κ -CN играет решающую роль в стабилизации мицелл казеина, оказывает ключевое влияние на их средний диаметр, скорость сычужной коагуляции и плотность сгустка, отмечена перспективность исследования полиморфизма гена *CSN3* как молекулярно-генетического маркера, способного оказывать влияние на формирование белкового профиля молочной сыворотки. Теоретически обоснованы современные методологические подходы к ферментативному высвобождению из структуры молочных белков биоактивных пептидов, произведена оценка распространенности неинфекционных алиментарно-зависимых заболеваний в мировом масштабе и рассмотрены механизмы действия биоактивных пептидов на основные органы-мишени.

2. Разработана система классификации молочной сыворотки на основе интегративного подхода, учитывающая механизмы коагуляции белков молока и получаемые при этом целевые продукты. Подтверждено первостепенное влияние на белковый профиль сыворотки типа коагуляции молока и вида коагулирующего агента. Установлена взаимосвязь гена *CSN3* с формированием белкового профиля сывороток. Генотип *CSN3 BB* оказывает достоверное положительное влияние на содержание общего белка в сыворотках, полученных при сычужной, кислотнo-сычужной коагуляциях и негативное влияние на содержание казеиновых фракций при термокислотной коагуляции, что в целом коррелирует с достоверно большим содержанием κ -CN, кальция, магния в цельном молоке и меньшим средним размером мицелл казеина. Установлено, что белковый профиль сывороток в основном представлен сывороточными белками β -LG, α -LA, BSA, LF и в зависимости от типа коагуляции, вида коагулирующего агента, а также полиморфизма гена *CSN3* (кроме кислотной коагуляции) в сыворотке были идентифицированы GMP и фракции казеина (κ -CN, β -CN, α S₁-CN) и реже α S₂-CN.

3. Разработан алгоритм гибридной стратегии биоинформатического моделирования таргетированного ферментативного высвобождения биоактивных пептидов, который основывается на получении аналитических данных о белковом профиле сырья и аминокислотной последовательности белков с последующим скринингом биоактивных аминокислотных участков, подборе оптимальных протеаз, моделировании гидролиза с последующей оценкой биоактивности и безопасности пептидов с использованием протеомных баз данных. Реализация биоинформационного подхода позволила обосновать выбор функций (АПФ-ИА и АОА) исходя из частоты встречаемости биоактивных фрагментов в субстрате и их потенциальной биологической

активности. Установлено, что максимальная эффективность совокупного высвобождения пептидов с АОА и АПФ-ИА с учетом ранжирования соотношения белков в протеомной матрице наблюдается при гидролизе смесью химотрипсин (ЕС 3.4.21.2) - субтилизин (ЕС 3.4.21.62).

4. Проведено биоинформатическое моделирование процесса биокаталитической конверсии с использованием принципа «цифровых двойников» и разработано программное обеспечение, позволяющее осуществлять прогностическую оценку потенциальной концентрации различных типов пептидов (биоактивных, токсиноподобных и аллергенных), высвобождаемых из переменных белковых матриц молочных сывороток под действием комплекса протеаз. Установлено, что наибольшим потенциалом совокупного высвобождения биоактивных пептидов с антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностью обладают сыворотки, полученные кислотной, кислотно-сычужной и сычужной коагуляцией белков молока. Моделирование *in silico* деградации БАП в ЖКТ показало полную деградацию пептидов с антиоксидантными функциями, а также деградацию 48,3-56,9% и 51,6–55,1% пептидов с АПФ- и ДПП-IV-ингибирующими активностями.

5. Разработан и оптимизирован процесс ферментативного гидролиза нативных и термоденатурированных белков, где м.д. белка в реакционной среде составляет 3,4%, E/S 1/1000 CPROT (г/г), соотношение ферментов субтилизин/химотрипсин – 75/25, рН-статирование 5М КОН. Для достижения максимальных значений АОА и минимальных значений IC₅₀ АПФ-ИА оптимальными режимами гидролиза КСБ явились: для сыворотки СНW (RC) T=50,8°C, рН 8,3, t=180 мин; для сыворотки СНW (RC) HD T=51,2°C, рН 8,2, t=171 мин; для сыворотки СНW (TAC) T=51,6°C, рН 8,1, t=153 мин.

6. С точки зрения эффективности фракционирования БАП обосновано использование каскадно-селективной фильтрации, где на стадии ультрафильтрации (MWSO 10 кДа) из реакционной среды удаляются высокомолекулярные белковые фрагменты и протеазы, а на стадии нанодиафильтрации (с подкисленной водой) происходит концентрирование БАП, раскисление и деминерализация, а также частичное удаление свободных аминокислот. В результате хромато-масс-спектрометрического анализа и последующего скрининга последовательностей пептидов с помощью протеомных баз данных в очищенных ГСБ СНW (RC) и СНW (RC) HD идентифицировано 64 и 71 вид БАП с АПФ-ИА, 34 и 33 вида БАП с ДПП-IV-ИА, 15 и 18 видов БАП с АОА, 18 и 14 видов с антимикробной активностью соответственно. При этом 43 и 39 видов БАП соответственно обладали двумя и более активностями.

7. Установлена гранулометрическая и морфологическая идентичность агломерированных частиц сухих гидролизатов нативных и термоденатурированных сывороточных белков. По результатам исследований аминокислотного состава доказано, что ГСБ обладают высокой биологической ценностью и сбалансированностью по незаменимым аминокислотам. Установлена зависимость, в соответствии с которой протеолиз КСБ до степени гидролиза 15% приводит к повышению гидрофобности поверхности дегидратированных ГСБ, в то время как более глубокий протеолиз приводит к повышению гидрофильности поверхности сухих

частиц. Установлена зависимость, в соответствии с которой в первые 30 мин гидролиза происходит существенное линейное увеличение растворимости белка в сухих ГСБ вне зависимости от кислотности системы. Доказано, что таргетированная биоконверсия сывороточных белков оказывает разнонаправленное влияние на жирудерживающую способность и положительное влияние на эмульгирующую способность, однако с повышением продолжительности гидролиза снижается стабильность эмульсий, что в конечном счете приводит к флокуляции с последующей коалесценцией. В технологическом аспекте детализирована АОА ГСБ, замедляющая (в среднем в 3 раза) процесс окислительной порчи молочного жира. Установлена зависимость, в соответствии с которой глубина (продолжительность) протеолиза положительно влияет на термоустойчивость ГСБ. Доказано, что пастеризация при температуре $95\pm 2^\circ\text{C}$ с выдержкой до 15 мин и ультрапастеризация при температуре $137\pm 2^\circ\text{C}$ с выдержкой до 3 мин, как в кислой, так и нейтральной среде не приводит к термоиндуцированной агрегации пептидов и не оказывает статистически значимого влияния на биофункциональные свойства ГСБ. Установлена зависимость, в соответствии с которой глубина гидролиза и продолжительность термообработки оказывают положительное влияние на скорость протекания реакции меланоидинообразования.

8. В экспериментах *in vivo* установлено отсутствие острой ($\text{LD}_{50} > 2000$ мг БЭ/кг) и субхронической токсичности (500 мг БЭ/кг) при внутрижелудочном введении ГСБ. Доказано, что гидролизат термоденатурированных сывороточных белков не вызывает побочных иммунных ответов, связанных с IgE-опосредованными реакциями гиперчувствительности. Также доказано, что профилактическое потребление гидролизатов нативных и термоденатурированных сывороточных белков (100 мг БЭ/кг) в достаточной степени может нивелировать последствия острого повреждения печени, вызванного окислительным стрессом организма, а также снижать артериальное давление на 29 и 21 мм рт.ст. (соответственно) по механизму ингибирования АПФ при артериальной гипертензии.

9. Разработана и экономически обоснована технология производства сухих гидролизатов сывороточных белков с доказанной АОА и АПФ-ИА. На основе трансфера научных решений интенсифицированы промышленные технологии молочных продуктов с включением в состав гидролизованных сывороточных белков. В результате проведенных исследований разработано 12 комплектов технической документации. Разработанные технологии масштабированы и внедрены в производственный процесс на 12 предприятиях молочной отрасли.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

Главы в монографиях и учебниках

1. Агаркова, Е.Ю. Современные технологические подходы к обогащению молочных продуктов / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**, К.А. Рязанцева // Инновационные технологии обогащения молочной продукции (теория и практика). – Москва: Франтера, 2016. – С. 110-142.

2. Технологии и оборудование функциональных цельномолочных продуктов и молочных консервов / В.Д. Харитонов, Д.В. Харитонов, И.А. Макеева, Г.А. Донская, И.А. Радаева, Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** [и др.] // Современные технологии функциональных пищевых продуктов. – Москва: ДеЛи плюс, 2018. – С. 99-132.

3. Современные и инновационные технологии концентрирования сырья и производства сухих молочных продуктов / И.А. Радаева, **А.Г. Кручинин**, В.К. Семипятный [и др.] // Идеи академика Владимира Дмитриевича Харитонова в наукоемких технологиях переработки молока. – Москва: ФГАНУ «ВНИМИ», 2021. – С. 129-157.

Статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus

4. Влияние нового кисломолочного продукта с гидролизатом сывороточных белков на переносимость и динамику проявлений атопического дерматита у детей с аллергией на белки коровьего молока / 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. Малошенок, В.А. Ревякина, О.В. Георгиева, Н.В. Пономарева, Е.И. Мельникова [и др.] // Вопросы питания. – 2015. – Т. 84, № 5. – С. 56-63.

5. Cheese whey catalytic conversion for obtaining a bioactive hydrolysate with reduced antigenicity / A. Torkova, K. Ryazantzeva, E. Yu. Agarkova, M. Tsentalovich, **A. Kruchinin** [et al.] // Current Research in Nutrition and Food Science. – 2016. – Vol. 4, № SI 2. – P. 182-196. – DOI: 10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue-October.24

6. Rational design of enzyme compositions for the production of functional hydrolysates of cow milk whey proteins / A.A. Torkova, K.A. Ryazantseva, E. Yu. Agarkova, **A.G. Kruchinin** [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2017. – Vol. 53, № 6. – P. 669-679. – DOI: 10.1134/S0003683817060138.

7. Whey protein hydrolysate and pumpkin pectin as nutraceutical and prebiotic components in a functional mousse with antihypertensive and bifidogenic properties / E. Yu. Agarkova, **A.G. Kruchinin**, O.A. Glazunova, T.V. Fedorova // Nutrients. – 2019. – Vol. 11, № 12. – P. 2930. – DOI: 10.3390/nu11122930.

8. Processing cottage cheese whey components for functional food production / E. Yu. Agarkova, **A.G. Kruchinin**, N.A. Zolotaryov [et al.] // Foods and Raw Materials. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 52-59. – DOI: 10.21603/2308-4057-2020-1-52-59.

9. 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, № 2. – С. 306-318. – DOI: 10.21603/2074-9414-2020-2-306-318.

10. Regarding the biopolymers heat stability formation / **A.G. Kruchinin**, R.R. Vafin, I.A. Radaeva [et al.] // News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of Geology and Technical Sciences. – 2020. – Vol. 4, № 442. – P. 77-85. – DOI: 10.32014/2020.2518-170X.87.

11. κ -casein polymorphism effect on technological properties of dried milk / R.R. Vafin, I.A. Radaeva, **A.G. Kruchinin** [et al.] // Foods and Raw Materials. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P.95-105. – DOI: 10.21603/2308-4057-2021-1-95-105.

12. Hypotensive and hepatoprotective properties of the polysaccharide-

stabilized foaming composition containing hydrolysate of whey proteins / **A.G. Kruchinin**, O.S. Savinova, O.A. Glazunova [et al.] // *Nutrients*. – 2021. – Vol. 13, № 3. – P. 1031. – DOI: 10.3390/nu13031031.

13. Baromembrane technologies as a prospective alternative to vacuum evaporation in the dry milk production / **A.G. Kruchinin**, E.E. Illarionova, A.V. Bigaeva, S.N. Turovskaya // *News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series Chemistry and Technology*. – 2021. – Vol. 1, № 445. – P.133-138. – DOI: 10.32014/2021.2518-1491.17.

14. Influence of k-casein genotype on heat stability and cheese making properties of milk powder / **A.G. Kruchinin**, E.E. Illarionova, A.V. Bigaeva, S.N. Turovskaya // *Mljekarstvo*. – 2021. – Vol. 71, № 4. – P.269-280. – DOI: 10.15567/mljekarstvo.2021.0406.

15. Оценка влияния полиморфизма гена к-казеина в сухом молоке на технологические свойства кислотно-индуцированных молочных гелей / **А.Г. Кручинин**, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева // *Техника и технология пищевых производств*. – 2021. – Т. 51, № 1. – С. 53–66. – DOI: 10.21603/2074-9414-2021-1-53-66.

16. Методы оценки свертываемости белков молока как часть системы прогнозирования технологических свойств/ Е.Е. Илларионова, **А.Г. Кручинин**, С.Н. Туровская, А.В. Бигаева // *Техника и технология пищевых производств*. – 2021. – Т. 51. – № 3. – С. 503-519. – DOI: 10.21603/2074-9414-2021-3-503-519.

17. **Kruchinin, A.G.** Kinetics of changes in the granulometric composition of thermodenatured whey proteins / **A.G. Kruchinin**, E.I. Bolshakova, A.V. Bigaeva // *Carpathian Journal of Food Science and Technology*. – 2022. – Vol. 14, № 3. – P.116-127. – DOI: 10.34302/crpfst/2022.14.3.10.

18. **Kruchinin, A.G.** Hybrid strategy of bioinformatics modeling (*in silico*): biologically active peptides of milk protein / **A.G. Kruchinin**, E.I. Bolshakova // *Food Processing: Techniques and Technology*. – 2022. – Vol. 52. – № 1 – P. 46-57. – DOI: 10.21603/2074-9414-2022-1-46-57

19. **Kruchinin, A.G.** Bioinformatic modeling (*in silico*) of obtaining bioactive peptides from the protein matrix of various types of milk whey / **A.G. Kruchinin**, E.I. Bolshakova, I.A. Barkovskaya // *Fermentation*. – 2023. – Vol. 9, № 4. – P. 380. – DOI: 10.3390/fermentation9040380.

20. Effect of *CSN3* gene polymorphism on the formation of milk gels induced by physical, chemical, and biotechnological factors / **A.G. Kruchinin**, E.E. Illarionova, A.G. Galstyan [et al.] // *Foods*. – 2023. – Vol. 12, № 9. – P. 1767. – DOI: 10.3390/foods12091767.

Статьи в журналах, входящих в базу данных RSCI

21. Перспективы использования динамического мембранного модуля фильтрации UF-RDM для концентрирования белков подсырной сыворотки / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**, А.А. Агарков, В.Д. Харитонов // *Сыроделие и маслоделие*. – 2019. – № 6. – С. 54-56. – DOI: 10.31515/2073-4018-2019-6-54-56.

22. Агаркова, Е.Ю. Белки молочной сыворотки как источник антиоксидантных пептидов / Е.Ю. Агаркова, К.А. Рязанцева, **А.Г. Кручинин** // *Сыроделие и маслоделие*. – 2020. – № 2. – С. 57-58. – DOI: 10.31515/2073-4018-2020-2-55-56.

23. **Кручинин, А.Г.** Интегративный подход к классификации молочной сыворотки / **А.Г. Кручинин**, Е.И. Мельникова, И.А. Барковская // *Сыроделие и маслоделие*. – 2024. – №1. – С.93-98. – DOI: 10.21603/2073-4018-2024-1-7.

Статьи в журналах из перечня ВАК, относящихся к категории К1- К2

24. Применение баромембранных процессов в технологии йогурта функциональной направленности / К.А. Рязанцева, **А.Г. Кручинин**, Е.Ю.

Агаркова, В.Д. Харитонов // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2015. – № 5. – С. 36-41.

25. Агаркова, Е.Ю. Ферментативная конверсия как способ получения биологически активных пептидов / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** // Вестник МГТУ. Труды Мурманского государственного технического университета. – 2018. – Т. 21, № 3. – С. 412-419. – DOI: 10.21443/1560-9278-2018-21-3-412-419.

26. Агаркова, Е.Ю. Разработка процесса биокаталитической конверсии компонентов молочной сыворотки / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** // Пищевая промышленность. – 2019. – № 4. – С. 16-17. – DOI:10.24411/0235-2486-2019-10006.

27. Сравнение полиморфизма генов молочных белков козьего и овечьего молока: мировой опыт / **А.Г. Кручинин**, А.В. Бигаева, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова // Пищевая промышленность. – 2020. – №8. – С. 36-40. – DOI: 10.24411/0235-2486-2020-10083.

28. **Кручинин, А.Г.** Биологически активные пептиды молока: обзор / **А.Г. Кручинин**, Е.Ю. Агаркова // Пищевая промышленность. – 2020. – № 12. – С. 92-96. – DOI: 10.24411/0235-2486-2020-10151.

29. Электрофоретические методы изучения белковых систем / **А.Г. Кручинин**, А.В. Бигаева, Е.Г. Лазарева [и др.] // Молочная промышленность. – №6. – 2020. – С. 16-18. – DOI: 10.31515/1019-8946-2020-06-16-18.

30. Влияние полиморфных вариантов гена *CSN3* на технологические свойства молока / А.В. Бигаева, **А.Г. Кручинин**, И.А. Радаева [и др.] // Молочная промышленность. – 2020. – №4. – С. 54-55. DOI: 10.31515/1019-8946-2020-04-54-55.

31. Молекулярно-генетические модификации к-казеина / **А.Г. Кручинин**, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева // Известия вузов. Пищевая технология. – 2020. – №4. – С.12-16. – DOI: 10.26297/0579-3009.2020.4.3.

32. Влияние способов концентрирования на технологические свойства сухого молока / **А.Г. Кручинин**, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева, С.Н. Туровская // Вестник КрасГАУ. – 2021. – №2. – С.135-142. – DOI: 10.36718/1819-4036-2021-2-135-142.

33. Исследование воздействия молокосвертывающих ферментов различного происхождения на формирование молочных сгустков / Е.Е. Илларионова, **А.Г. Кручинин**, Д.Н. Калугина, С.Н. Туровская // Пищевая промышленность. – 2021. – №9. – С. 27-29. – DOI: 10.52653/PP1.2021.9.9.008.

34. Разработка методических подходов к оценке формирования сычужно-индуцированных молочных гелей с применением метода ротационной вискозиметрии / **А.Г. Кручинин**, Е.А. Юрова, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова // Пищевая промышленность. – 2021. – №8. – С.58-60. – DOI: 10.52653/PP1.2021.8.8.015.

35. Особенности ультрафильтрации молока, полученного от коров с полиморфизмом гена *CSN3* / **А.Г. Кручинин**, Е.Е. Илларионова, С.Н. Туровская, А.В. Бигаева // Пищевая промышленность. – 2021. – №8. – С.33-35. – DOI: 10.52653/PP1.2021.8.8.008.

36. Ассоциация полиморфизмов в биокластере генов казеина и сывороточных белков с технологическими свойствами молочного сырья / Е.Е. Илларионова, **А.Г. Кручинин**, С.Н. Туровская, А.В. Бигаева // Молочная промышленность. – 2021. – №3. – С.60-62. – DOI: 10.31515/1019-8946-2021-03-60-62.

37. Сравнительная оценка коагулянтов белков молока различного происхождения / **А.Г. Кручинин**, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева // Известия вузов. Пищевая технология. – 2021. – №1. – С.6-11. – DOI: 10.26297/0579-3009.2021.1.1.

38. Современное состояние рынка вторичных сырьевых ресурсов молочной промышленности / **А.Г. Кручинин**, А.В. Бигаева, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова // Ползуновский вестник. – 2022. – №4(1). – С. 140-149. – DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2022.04.018.

39. Реологические характеристики молочных систем с промежуточной влажностью в аспекте нежелательного пенообразования / Е.Е. Илларионова, **А.Г. Кручинин**, С.Н. Туровская, А.В. Бигаева // Ползуновский вестник. – 2022. – №4(1). – С.114-120. – DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2022.04.014.

40. **Кручинин, А.Г.** Сравнение структурно-механических характеристик ферментированных молочных концентратов / **А.Г. Кручинин**, Е.Е. Илларионова // Вестник КрасГАУ. – 2022. – №3. – С.162-170. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-3-162-170.

41. **Кручинин, А.Г.** Пептидомика в молочной промышленности: систематический обзор / **А.Г. Кручинин**, С.Н. Туровская // Вестник КрасГАУ. – 2022. – №2. – С. 173–181. – DOI: 10.36718/1819-4036-2022-2-173-181.

42. Исследование влияния белкового профиля на кристаллообразование в модельных молочных системах с промежуточной влажностью / С.Н. Туровская, **А.Г. Кручинин**, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева // Вестник КрасГАУ. – 2022. – №12. – С.237-247. – DOI: 10.36718/1819-4036-2022-12-237-247.

43. **Кручинин, А.Г.** Исследование структурно-механических характеристик полипептидного комплекса концентрированных молочных систем в процессе ферментирования / **А.Г. Кручинин** // Пищевая промышленность. – 2022. – №3. – С.32-35. – DOI: 10.52653/PPI.2022.3.3.008.

44. **Кручинин, А.Г.** Особенности молекулярно-массового фракционирования молока, полученного от коров с полиморфизмом гена *CSN3* / **А.Г. Кручинин**, Е.И. Большакова // Пищевая промышленность. – 2022. – №2. – С.32-35. – DOI: 10.52653/PPI.2022.2.2.007.

45. **Кручинин, А.Г.** Мониторинг структурообразования сгущенного молока с сахаром в процессе длительного хранения / **А.Г. Кручинин**, Е.Е. Илларионова, С.Н. Туровская // Ползуновский вестник. – 2023. – № 1. – С. 129-136. – DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.016.

46. **Кручинин, А.Г.** Повышение термодинамической стабильности концентрированных молочных систем с промежуточной влажностью / **А.Г. Кручинин**, Е.Е. Илларионова, С.Н. Туровская // Пищевая промышленность. – 2023. – №2. – С. 31-35. – DOI: 10.52653/PPI.2023.2.2.007.

47. Исследование влияния белкового профиля на структурно-механические параметры молочных биосистем с промежуточной влажностью / **А.Г. Кручинин**, Е.Е. Илларионова, С.Н. Туровская, А.В. Бигаева // Пищевая промышленность. – 2023. – №1. – С.59-62. – DOI: 10.52653/PPI.2023.1.1.017.

Публикации в журналах, индексируемых в РИНЦ и материалах конференций

48. Агарков, А.А. Использование ферментативного гидролиза пептидного комплекса молока для получения белковых функциональных ингредиентов / А.А. Агарков, **А.Г. Кручинин**, Н.Г. Машенцева // День науки: Сборник материалов научной конференции молодых учёных и специалистов, Москва, 21–22 апреля 2015 г. Том VI. – Москва: ФГБОУ ВПО «МГУПП», 2015. – С. 13-15.

49. Особенности трансформации биополимеров эмульсионных систем при их направленной биокаталитической конверсии и двустадийной мембранной фильтрации / В.Д. Харитонов, Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** [и др.] // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VIII Московского международного конгресса, Москва, 17–20 марта 2015 г. / ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. Том 1. – Москва: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», 2015. – С. 425-426.

50. Агаркова, Е.Ю. Разработка стабилизационного комплекса для обеспечения стойкости аэрированных эмульсионных систем на основе гидролизованных пептидов / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**, К.А. Рязанцева // Инновации в интенсификации производства и переработки сельскохозяйственной продукции: материалы Международной научно-практической конференции, Волгоград, 17–18 июня 2015 г. / ГНУ НИИММП; ВолгГТУ. – Волгоград: ООО «Сфера», 2015. – С. 496-500.

51. Рязанцева, К.А. Использование белков молочной сыворотки как функционального пищевого ингредиента в технологии кисломолочного напитка / К.А. Рязанцева, Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** // Современные достижения биотехнологии. Актуальные проблемы молочного дела: материалы V Международной научно-практической конференции, Ставрополь, 21–23 октября 2015 г. / СКФУ. – Ставрополь: СКФУ, 2015. – С. 347-349.

52. Исследование стабильности белковых аэрированных систем на основе гидролизованных пептидов / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**, К.А. Рязанцева, О.Б. Федотова // Пищевые инновации и биотехнологии: материалы Международной научной конференции, Кемерово, 28 апреля 2015 года / ФГБОУ ВО «КемТИПП». – Кемерово: КемТИПП, 2015. – С. 15-17.

53. Кручинин, А.Г. Использование протеолиза белков молока при разработке молочных продуктов со сниженной аллергенностью / **А.Г. Кручинин**, К.А. Рязанцева, Е.Ю. Агаркова // Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти В.М. Горбатова. – 2015. – № 1. – С. 289-291.

54. Рязанцева, К.А. Функциональный кисломолочный продукт с сывороточным гидролизатом / К.А. Рязанцева, Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** // Молочная река. – 2016. – № 4(64). – С. 48-49.

55. Агаркова, Е. Ю. Оптимизация состава эмульсионных пастообразных продуктов / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**, К.А. Рязанцева // Молочная промышленность. – 2016. – № 8. – С. 42-44.

56. Агаркова, Е.Ю. Исследование процесса гидролиза молочной сыворотки ферментами группы нейтральных протеаз / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**, К.А. Рязанцева // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов, Москва, 26 апреля 2016 г. / ВНИИПБТ; под редакцией В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. – Москва: ГНУ ВНИИПБТ РАСХН, 2016. – С. 50-56.

57. Агаркова, Е.Ю. Использование гидролизатов молочной сыворотки при разработке функциональных продуктов / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**, К.А. Рязанцева // Переработка молока. – 2017. – № 8(214). – С. 16-19.

58. **Кручинин, А.Г.** Использование мембранных технологий при концентрировании вторичного молочного сырья / **А.Г. Кручинин**, Е.Ю. Агаркова // Переработка молока. – 2017. – № 12(218). – С. 54-55.

59. Влияние модифицированных крахмалов на структуру аэрированных творожных муссов / К.А. Рязанцева, Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** [и др.] // Молочная промышленность. – 2017. – № 9. – С. 54-56.

60. Создание функционального творожного мусса, обогащенного биологически активными гидролизатами сывороточных белков молока / К.А. Рязанцева, Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** [и др.] // Актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи: материалы Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием, Москва, 12–13 октября 2017 года. – Москва: ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 2017. – С. 217-220.

61. **Кручинин, А.Г.** Различные подходы к формированию функциональных свойств молочных продуктов / **А.Г. Кручинин**, Е.Ю. Агаркова // Переработка молока. – 2018. – № 5(223). – С. 36-39.

62. **Кручинин, А.Г.** Использование гидролизатов сывороточных белков коровьего молока при разработке творожного мусса обогащенного АПФ-ингибирующими пептидами / **А.Г. Кручинин** // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы международного форума, Москва, 23–25 мая 2018 года. Том Выпуск 16. – Москва: ООО «Русские Экспо Дни Групп», 2018. – С. 621-623.

63. Разработка аэрированного творожного мусса, обогащенного АПФ-ингибирующими пептидами / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**, Н.С. Пряничникова, Т.В. Федорова // Новые подходы к разработке технологий производства и переработки сельскохозяйственной продукции: Материалы Международной научно-практической конференции, Волгоград, 06–07 июня 2018 года / Под общ. ред. И.Ф. Горлова. – Волгоград: Издательство Волгоградского института управления - филиала РАНХиГС, 2018. – С. 231-235.

64. Агаркова, Е.Ю. Использование биокаталитической конверсии компонентов молока в технологии йогурта / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** // Пища. Экология. Качество: Сборник материалов XVI Международной научно-практической конференции, Барнаул, 24–26 июня 2019 года / Ответственные за выпуск: О.К. Мотовилов, О.А. Высоцкая, К.Н. Нициевская, Л.П. Хлебова. Том 1. – Барнаул: АлтГУ, 2019. – С. 33-36.

65. Агаркова, Е.Ю. Исследования параметров биокаталитической конверсии белково-углеводных систем в зависимости от состава ферментных комплексов / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** // Переработка молока. – 2019. – № 11(241). – С. 48-50. – DOI: 10.33465/2222-5455-2019-11-48-50.

66. Агаркова, Е.Ю. Исследования процесса концентрирования различных видов подсырной сыворотки / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** // Переработка молока. – 2019. – № 3(233). – С. 20-22. – DOI: 10.33465/2222-5455-2019-3-20-22.

67. Агаркова, Е.Ю. Перспективы использования гидролизатов сывороточных белков в рецептурах молочных напитков / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**, Н.Е. Шерстнева // Переработка молока. – 2019. – № 7(237). – С. 10-11. – DOI: <https://doi.org/10.33465/2222-5455-2019-7-10-11>.

68. Рязанцева, К.А. Гидролизаты молочной сыворотки как ингредиенты для повышения функциональных свойств молочных продуктов / К.А. Рязанцева, Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин** // Молочная река. – 2019. – № 4(76). – С. 26-28.

69. Ферментативная обработка как инструмент придания функциональных свойств белкам молочной сыворотки / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**, К.А. Рязанцева, Н.С. Пряничникова // Аграрно-пищевые инновации. – 2019. – № 4(8). – С. 81-88. – DOI: 10.31208/2618-7353-2019-8-81-88.

70. Повышение функциональных свойств белков молочной сыворотки путем ферментативного гидролиза / Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**, К.А. Рязанцева, Н.Е. Шерстнева // Переработка молока. – 2020. – № 2(244). – С. 16-19. – DOI: 10.33465/2222-5455-2020-02-16-18.

71. **Кручинин, А.Г.** Влияние фракционного состава казеина на технологические свойства сырого молока / **А.Г. Кручинин**, А.В. Бигаева, Х.Х. Гильманов // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. – 2020. – Т. 1, № 1(1). – С. 292-297. – DOI: 10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-292-297.

72. **Кручинин, А.Г.** Исследование процесса баромембраной фильтрации подсырной и творожной сывороток / **А.Г. Кручинин**, Е.Е. Шилова // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. – 2020. – Т. 1, № 1(1). – С. 298-305. – DOI: 10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-298-305.

73. **Кручинин, А.Г.** Исследование взаимосвязи размера мицелл казеина с полиморфизмом гена *CSN3* / **А.Г. Кручинин** // Инновационное развитие

аграрно-пищевых технологий: Материалы международной научно-практической конференции, Волгоград, 17–18 июня 2021 г. / Под общей редакцией И.Ф. Горлова. – Волгоград: ООО «СФЕРА», 2021. – С. 17-20.

74. **Кручинин, А.Г.** К вопросу классификации вторичного молочного сырья / **А.Г. Кручинин** // Пищевые инновации и биотехнологии: Сборник тезисов X Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 17 мая 2022 г. / Под общей редакцией А.Ю. Просекова. Т. 1. – Кемерово: КемГУ, 2022. – С. 258-260.

75. К вопросу влияния генетических и биотехнологических факторов на качество сухого молока / С.Н. Туровская, **А.Г. Кручинин**, А.В. Бигаева [и др.] // Переработка молока. – 2022. – № 5(271). – С. 42-45. – DOI: 10.33465/2222-5455-2022-5-42-45.

76. **Кручинин, А.Г.** Оценка влияния полиморфизма *CSN3* на формирование белковой матрицы вторичного молочного сырья / **А.Г. Кручинин** // Материалы Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов отделения сельскохозяйственных наук РАН. – Москва: ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН. – 2022. – № 1. – С. 186-189.

77. Молочная сыворотка: современное состояние рынка / **А.Г. Кручинин**, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева // Переработка молока. – 2023. – № 6(284). – С. 30-33. – DOI: 10.33465/2222-5455-2023-6-30-33.

78. **Кручинин, А.Г.** Ферментативный способ производства биоактивных пептидов из молочного белкового сырья: обзор предметного поля / **А.Г. Кручинин**, Е.И. Большакова // FOOD METAENGINEERING. – 2023. – № 1(3). – DOI: 10.1234/fme.2023.3.24.

79. Барковская, И.А. Полисахарид-контролируемая кристаллизация лактозы в сгущенном молоке с сахаром / И.А. Барковская, **А.Г. Кручинин**, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова [и др.] // FOOD METAENGINEERING. – 2023. – № 1(4). – DOI: 10.37442/fme.2023.4.25.

Результаты интеллектуальной деятельности

80. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022669040 Российская Федерация. Расчет физико-химических показателей и норм расхода сырья при производстве творога: № 2022667489: заявл. 26.09.2022: опублик. 14.10.2022 / В.Г. Блядзе, В.К. Семипятный, А.В. Бигаева, А.Е. Рябова, Н.С. Пряничникова, Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**; заявитель ФГАНУ «ВНИМИ».

81. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022669428 Российская Федерация. Проектирование кисломолочного продукта с обогащающими компонентами: № 2022668656: заявл. 11.10.2022: опублик. 19.10.2022 / З.С. Зобкова, В.К. Семипятный, Е.Г. Лазарева, А.Г. Галстян, Е.Ю. Агаркова, **А.Г. Кручинин**; заявитель ФГАНУ «ВНИМИ».

82. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022668889 Российская Федерация. Программа для расчетов «Точки росы» в хранении для сухого молока в промышленной упаковке: № 2022667493: заявл. 26.09.2022: опублик. 13.10.2022 / А.Е. Рябова, В.К. Семипятный, Н.С. Пряничникова, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова, А.Г. Галстян, **А.Г. Кручинин**, А.В. Бигаева; заявитель ФГАНУ «ВНИМИ».

83. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023663644 Российская Федерация. Расчет содержания потенциально биоактивных пептидов: № 2023662842: заявл. 20.06.2023: опублик. 27.06.2023 / В.К. Семипятный, **А.Г. Кручинин**, И.А. Барковская, Е.И. Большакова, В.Г. Блядзе, Е.Ю. Агаркова; заявитель ФГАНУ «ВНИМИ».

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

A – частота встречаемости пептидов	АД – артериальное давление
AA – активная кислотность	АОА – антиоксидантная активность
A _E – частота высвобождения фрагментов с целевой активностью отдельной протеазой	АП – аллергенные пептиды
B _E – активность фрагментов, потенциально высвобождаемых протеазой	АПФ-ИА – способность ингибировать ангиотензин-1-превращающий фермент
CHW (A/RC) – подсырная сыворотка, полученная кислотно-сычужной коагуляцией	АФК – активные формы кислорода
CHW (RC) – подсырная сыворотка, полученная сычужной коагуляцией	БАП – биологически активные пептиды
CHW (RC) HD – подсырная сыворотка, полученная кислотно-сычужной коагуляцией и подвергнутая термоденатурации белка	БД – база данных
CHW (TAC) – подсырная сыворотка, полученная термокислотной коагуляцией	БЭ – белковый эквивалент
CPW (TCC) – копреципитатная сыворотка, полученная термокальциевой коагуляцией	ГПО – глутатионпероксидаза
CSN3 – ген, кодирующий белок κ-CN	ГСБ – гидролизат сывороточных белков
CTW (A/RC) – творожная сыворотка, полученная кислотно-сычужной коагуляцией	ДАД – диастолическое артериальное давление
CTW (AC) – творожная сыворотка, полученная кислотной коагуляцией	ДПП-IV – способность ингибировать дипептидилпептидазу-IV
DH – степень гидролиза	ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
DHt – теоретическая степень гидролиза	ЖУС – жиродерживающая способность
E/S – субстрат-ферментное соотношение	ИФА – иммуноферментный анализ
EAI – индекс эмульгирующей активности	КРС – крупный рогатый скот
ESI – индекс стабильности эмульсии	КСБ – концентрат сывороточных белков
FRAP – метод оценки антиоксидантной способности по восстановлению железа	КУС – краевой угол смачивания
IC ₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования биологического процесса	м.д. – массовая доля
MDFG – средний диаметр жировых шариков	НИЗ – неинфекционных алиментарно-зависимых заболеваний
MW – молекулярная масса	ПР – продолжительность растворения
MWCO – отсечение по молекулярной массе	ПФНИ – программа фундаментальных научных исследований
NESEI – ионизация наноэлектрораспылением	РААС – ренин–ангиотензин–альдостероновая система
ORAC – метод оценки антиоксидантной активности, основанный на способности поглощения кислородных радикалов	РБ – растворимость белка
SHR – линия крыс со спонтанной гипертензией	САД – систолическое артериальное давление
TBARS – реактивные вещества тиобарбитуровой кислоты	САК – свободные аминокислоты
TEAC – метод определения антиоксидантной активности по сравнению со стандартным веществом - тролоксом	СОД – супероксиддисмутаза
V – относительная активность фрагментов, потенциально высвобождаемых протеазой	СМ – продолжительность смачивания
W – относительная частота высвобождения протеазой фрагментов с целевой активностью	ТДС – термодинамическая стабильность
	ТПП – токсиноподобные пептиды
	ТЭ – Тролокс эквивалент
	ЭС – эмульгирующая способность