

Научная статья/Research Article

УДК 577.112

DOI: 10.36718/1819-4036-2023-2-236-241

Марина Геннадьевна Курбанова^{1✉}, Роман Алексеевич Ворошилин²,
Василий Викторович Матюшев³, Олеся Игоревна Калугина⁴, Мухсин Мухим-заде⁵

^{1,2,4,5}Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

³Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, Россия

⁵КФХ ИП Волков А.П., Кемерово, Россия

¹kurbanova-mg@mail.ru

²rom.vr.22@mail.ru

³don.matyusheff2015@yandex.ru

⁴kasynchik@mail.ru

⁵mukhim-zade@mail.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА *IN SILICO* ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СВОЙСТВ БИОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ

Цель работы – проведение исследований по изучению накопления биоактивных пептидов в процессе созревания полутвердых сыров в зависимости от штаммов микроорганизмов, входящих в заквасочные культуры, методом *in silico*. Задачи: провести выработку модельных полутвердых сыров при участии стартерных культур, содержащих штаммы; определить химический состав модельных полутвердых сыров в возрасте 90 дней, а также их пептидную последовательность; изучить влияние штаммов стартерных культур на биоактивность и другие свойства пептидов модельных полутвердых сортов. Для проведения исследований были использованы модельные образцы полутвердых сыров, выработанные в цехе научно-экспериментальных основ пищевых систем при Технологическом институте пищевой промышленности Кемеровского государственного университета (КемГУ), в двух вариациях: сыр А – использовали заквасочные культуры, состоящие из штаммов микроорганизмов *Lactococcus lactis subs. lactis* и *Lactococcus lactis subs. cremoris*; сыр В – из штаммов микроорганизмов *Lactococcus lactis subs. lactis* и *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*, и культуру, содержащую бактерию *Lactocaseibacillus casei*. Путем оценки биоактивных свойств методом *in silico* определили, что исследуемые образцы пептидов обладают следующими основными свойствами: ингибиторы АПФ, ингибитор DPP-IV и антиоксидантные свойства. В связи с этим можно предположить, что при регулярном употреблении зрелых сыров в рационе питания можно избежать приема фармакологических препаратов.

Ключевые слова: биоактивные пептиды, полутвердые сыры, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactocaseibacillus casei*

Для цитирования: Использование метода *in silico* для прогнозирования свойств биоактивных пептидов / М.Г. Курбанова [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2023. № 2. С. 236–241. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-2-236-241.

Благодарности: работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-4035.2022.4).

Marina Gennadievna Kurbanova^{1✉}, Roman Alekseevich Voroshilin²,
Vasily Viktorovich Matyushev³, Olesya Igorevna Kalugina⁴, Mukhsin Mukhim-zade⁵

^{1,2,4,5}Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

³Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, Russia

⁵KFH IP Volkov A.P., Kemerovo, Russia

¹kurbanova-mg@mail.ru

²rom.vr.22@mail.ru

³don.matyusheff2015@yandex.ru

⁴kasynchik@mail.ru

⁵mukhim-zade@mail.ru

USING THE *IN SILICO* METHOD TO PREDICT THE BIOACTIVE PEPTIDES PROPERTIES

The purpose of the work is to conduct research on the study of the accumulation of bioactive peptides during the ripening of semi-hard cheeses, depending on the strains of microorganisms included in starter cultures using the in silico method. Tasks: to carry out the development of model semi-hard cheeses with the participation of starter cultures containing strains; determine the chemical composition of model semi-hard cheeses at the age of 90 days, as well as their peptide sequence; to study the effect of strains of starter cultures on the bioactivity and other properties of peptides of model semi-solid varieties. For research, model samples of semi-hard cheeses developed in the workshop of scientific and experimental foundations of food systems at the Technological Institute of Food Industry of the Kemerovo State University (KemSU) were used in two variations: cheese A – starter cultures were used, consisting of strains of microorganisms Lactococcus lactis subs. lactis and Lactococcus lactis subs. cremoris; cheese B – from strains of microorganisms Lactococcus lactis subs. lactis and Lactococcus lactis subsp. Cremoris, and a culture containing the bacteria Lactocaseibacillus casei. By evaluating the bioactive properties by the in silico method, it was determined that the studied peptide samples have the following main properties: ACE inhibitors, DPP-IV inhibitor and antioxidant properties. In this regard, it can be assumed that with the regular use of mature cheeses in the diet, pharmacological preparations can be avoided.

Keywords: bioactive peptides, semi-hard cheeses, Lactococcus lactis, Lactococcus cremoris, Lactocaseibacillus casei

For citation: Using the *in silico* method to predict the bioactive peptides properties / M.G. Kurbanova [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2023;(2): 236–241. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2023-2-236-241.

Acknowledgments: the work has been carried out within the framework of the grant of the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists – candidates of sciences (МК-4035.2022.4).

Введение. В последнее время у научного сообщества растет интерес к открытию новых биоактивных соединений, которые возможно выделить из пищевых продуктов или веществ, что дает большие возможности к получению новых пептидов с фармакологическими эффектами. Биоактивные пептиды – это молекулы, обладающие потенциальной биологической активностью, которая может оказывать влияние на некоторые функции организма и здоровье человека в целом. Они считаются альтернативой для профилактики различных метаболических заболеваний, так как обладают широким спектром действия, менее аллергенны, проявляют высокую биоспецифическую активность и структурное разнообразие. Ввиду того, что различные сыры являются высокобелковыми про-

дуктами, а большинство из них во время созревания подвергается протеолизу различной степени, их можно рассматривать как альтернативный источник для разработки нового поколения функциональных продуктов или биологически активных веществ.

В настоящее время идентифицированы и выделены сотни пептидов с различной биологической активностью из различных пищевых источников, включая молоко, сыворотку, яйца, рыбу, рис, сою, арахис, нут, кукурузу и водоросли [1, 2]. Однако лишь немногие из них представлены на рынке как функциональные продукты нутрицевтики. Например, биоактивные пептиды, полученные из молока и рыбы, широко представлены на современном рынке пищевых ингредиентов по сравнению с пептидами из дру-

гих пищевых источников. Антиоксидантные пептиды обычно содержат в своей структуре гидрофобные аминокислоты и остатки гистидина, фенилаланина, триптофана или тирозина [3, 4].

Цель – провести исследование по накоплению биоактивных пептидов и их свойств в зрелых полутвердых сырах методом *in silico*.

Задачи: провести выработку модельных полутвердых сыров при участии стартерных культур, содержащих штаммы – *Lactococcus lactis subspecies lactis* (далее *Lc. lactis subs. lactis*), *Lactococcus lactis subspecies cremoris* (далее *Lc. lactis subs. cremoris*) и *Lactocaseibacillus casei* (далее *L. casei*); провести определение химического состава модельных полутвердых сыров в возрасте 90 дней, а также их пептидную последовательность; изучить влияние штаммов стартерных культур на биоактивность и другие свойства пептидов модельных полутвердых сыров.

Объекты и методы. Для проведения исследований были использованы модельные образцы полутвердых сыров, полученные в лабораторных условиях. В качестве стартерных культур для контрольного образца сыра (сыр А) использовалась подготовленная бактериальная мезофильная культура MO/032 (фирмы Lyofast), содержащая штаммы – *Lc. lactis subs. lactis* и *Lc. lactis subs. cremoris* – 0,5 % от объема молока; для опытного образца (сыр В) дополнительно использовали культуру LC4P1 (фирмы Lyofast), содержащую бактерии *L. casei*.

Основные параметры производства модельных образцов полутвердого сыра: температура пастеризации нормализованной смеси 74 °С, выдержка 20 с; температура инокуляции 34 °С; время инокуляции 10 мин; мультипликатор флокуляции 3; нарезка кубиков размером 1,0×1,0 см; температура второго нагревания 45 °С; рН при сливе сыворотки 6,2–6,35; ступатура 1,5 ч; срок аффи-

нажа сыров 90 дней при температуре 12–14 °С и относительной влажности воздуха 80–85 %.

Химический состав молока и сыров определяли по общепринятым методикам: массовую долю жира – кислотным методом Гербера (ГОСТ 5867), массовую долю белка в молоке – рефрактометрическим методом (ГОСТ 251793), массовую долю сухого вещества – по ГОСТ 3623. Массовую долю белка определяли на анализаторе общего азота (белка) RapidN Elementar, работающего по методу Дюма – сжигание пробы с регистрацией общего азота на детекторе теплопроводности. Аминокислотная последовательность пептидов исследуемых образцов гидролизатов была определена методом матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией на приборе MALDI Biotyper, Bruker. Степень биоактивности исследуемых пептидов оценивали методом *in silico* с помощью онлайн-сервера PeptideRanker, который ранжирует пептиды по прогнозируемой вероятности того, что пептид будет биологически активным. Моделирование структуры проводили с помощью сервиса SWISS-MODEL, который включает в себя репозиторий SWISS-MODEL и рабочее пространство SWISS-MODEL. С помощью базы данных биоактивных пептидов молока MBPDB проводили поиск, идентификацию белка и определение свойств исследуемых пептидов.

Экспериментальные исследования проводились на базе кафедры технологии продуктов питания животного Кемеровского государственного университета.

Результаты и их обсуждение. Для исследований были выработаны несколько модельных образцов полутвердого сыра. Аффинаж модельных сыров протекал при температуре 12–14 °С и относительной влажности 80–85 %. Химический состав сыра и активную кислотность определяли через 90 дней (табл. 1).

Таблица 1

Химический состав модельных сыров в возрасте 90 дней, %

Показатель	Сыр А* (контрольный)	Сыр В** (опытный)
Массовая доля сухих веществ	55,16 ± 0,21	54,85 ± 0,23
Массовая доля жира в сухом веществе	48,93 ± 1,95	49,50 ± 1,04
Массовая доля общего белка	20,23 ± 0,28	21,23 ± 0,31
Массовая доля соли	2,34 ± 0,72	3,13 ± 0,55

*Сыр А – использовали закваску, в состав которой входили штаммы микроорганизмов *Lc. lactis subs. lactis*, *Lc. lactis subs. cremoris*.

**Сыр В – использовали закваску, в состав которой входили штаммы микроорганизмов *Lc. lactis subs. lactis*, *Lc. lactis subs. cremoris* – и *L. casei* в соотношении 0,5 + 0,5 %.

Анализ результатов, представленных в таблице 1, показал, что химический состав сыров практически одинаков в модельных образцах. Активная кислотность была ниже у опытных образцов сыра В и составила $4,13 \pm 0,06$ ед., где дополнительно к основной культуре вносили бактерии *L. casei*, в образцах сыра А активная кислотность составляла $4,74 \pm 0,18$ ед.

Протеолитическая активность при созревании сыра зависит от нескольких факторов, таких как тип используемого коагулянта; нативная микрофлора молока и штаммы микроорганизмов, входящих в заквасочные культуры; остаточное действие коагулянта и нативных молочных протеаз, на которые может влиять содержание влаги в сыре, а также температура и относительная влажность сыра, условия аффинажа.

После 90-суточного аффинажа в исследуемых сырах проводили определение пептидных

последовательностей и их биоактивности. В результате определения аминокислотной последовательности всего выявлено 115 пептидных последовательностей, в т. ч. в образце А – 91 пептидная последовательность, в образце В – 64, при этом потенциально биоактивных 20. Данные образцы имеют биоактивность от 0,547239 до 0,870583 единиц. Далее проводили проверку биоактивных свойств выявленных пептидных последовательностей с помощью доступных онлайн-серверов, основанных на общедоступных данных по биоактивным свойствам известных пептидов.

Дальнейшие исследования проводили методом *in silico* с помощью онлайн-ресурсов. В таблице 2 представлена характеристика биоактивных пептидов.

Таблица 2

Характеристика потенциальных биоактивных пептидов

Вид сыра	Пептидная последовательность	Биоактивность*	Потенциальные биоактивные свойства**
А, В	PSGAW	0,870583	Ингибиторы АПФ
А, В	MKPWI	0,853622	Ингибиторы АПФ
В	SCDKFL	0,844337	Ингибиторы АПФ
А, В	PPTVMF	0,826762	Ингибитор DPP-IV
А	TFPGPI	0,774112	Ингибитор DPP-IV
А	PSYGL	0,748397	Опиоид
А	MMKSF	0,730558	Ингибиторы АПФ
А	PEWVCTTF	0,703949	Ингибиторы АПФ
А	NNQFL	0,693175	Ингибитор DPP-IV
А	PKYPVEPF	0,630562	Антиоксидант
А, В	GGVSLPEW	0,628953	Ингибиторы АПФ
В	SFNPTQL	0,619614	Ингибиторы АПФ
В	CKDDQNPSSNICNI	0,61108	Антимикробный
А	PVEPF	0,604782	Опиоид, ингибитор DPP-IV, антиоксидант
А	QWQVL	0,584037	Иммуномодулирующие
А, В	SDIPNPI	0,573163	Стимулирующие рост
А	PSFSDI	0,547239	Противораковый, антимикробный

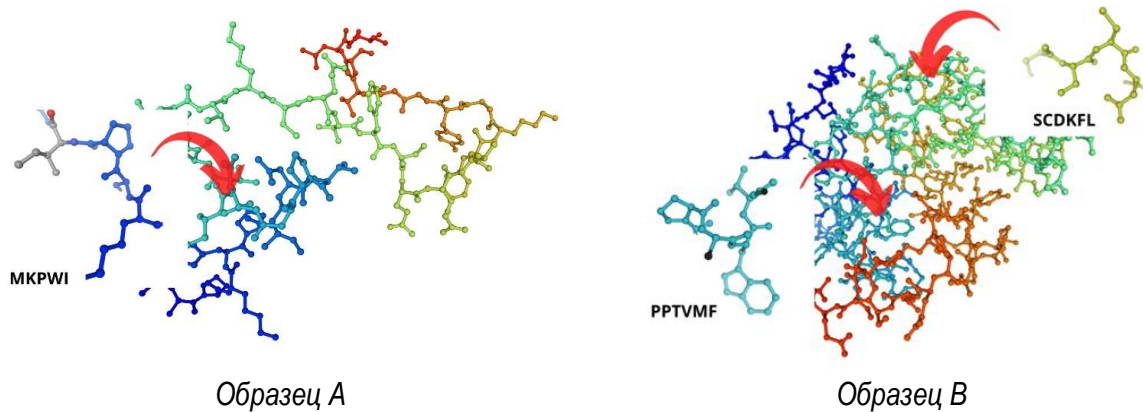
* Оценивали методом *in silico* с помощью онлайн-сервера PeptideRanker.

** Базы данных биоактивных пептидов молока MBPDB.

Из результатов оценки биоактивных пептидов (табл. 2) видно, что исследуемые образцы обладают следующими основными свойствами: ингибиторы АПФ, ингибитор DPP-IV и антиоксидантные свойства. Можно отметить, что по результатам исследований *in silico* исследуемые штаммы микроорганизмов *Lc. lactis subs. lactis* и *Lc. lactis subs. cremoris*, которые использовались для производства контрольного образца сыра, в большей степени влияют на образование биоактивных пептидов. Так, у сыров контрольного образца было образовано 13 биоактивных пептидных последовательностей, при этом у сыра опытного образца В, содержащего бактерии *L. Casei*, – 7. Анализируя данные биоактивности пептидов в зрелых образцах модельного сыра можно остановиться на пептидной последовательности SCDKFL с высокой биоактивностью пептидов 0,8444337, которая встречается только в сыре В, где наряду с традиционными штаммами микроорганизмов использовали «сырную палочку» *L. casei*. Для сравнения интерес представляли также пептидные последовательности, которые встречались в контрольных (А) и опытных (В) образцах сыра и имели высокую биоактивность пептидов – МКРWI и PSGAW, с активностью 0,853622 и 0, 870583 соответственно.

Далее, с помощью онлайн-ресурсов, были разработаны модели структуры белков исследуемых сыров (рис.). Также на рисунке представлены обнаруженные участки структуры биоактивных пептидов исследуемых образцов сыра А и В.

Далее, с помощью онлайн-ресурсов, были разработаны модели структуры белков исследуемых сыров (рис.). Также на рисунке представлены обнаруженные участки структуры биоактивных пептидов исследуемых образцов сыра А и В.



Обнаруженные участки структуры биоактивных пептидов
(стрелки указывают на расположение пептидной последовательности
в общей структуре белковой молекулы)

Оценивая структуру данных пептидов, можно сделать вывод о том, что выявленные биоактивные пептиды имеют ароматические кольца, которые в основном представлены аминокислотами триптофан, тирозин и фенилаланин.

Примечательно то, что все эти последовательности по своим биоактивным свойствам являются ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента (АПФ). Для организма человека ингибиторы АПФ обладают многофакторными действиями, такими как, например, расслабление кровеносных сосудов, что снижает артериальное давление.

В медицинской практике доказано, что применение ингибиторов АПФ снижает частоту случаев госпитализации при сердечной недостаточности, повышает продолжительность жизни,

переносимость физической нагрузки и качество жизни в целом [5].

Заключение. В связи с этим можно предположить, что биоактивные пептиды, находящиеся в зрелом сыре, могут выполнять роль ингибиторов АПФ. В свою очередь, при регулярном употреблении зрелых сыров в рационе питания можно избежать приема фармакологических препаратов. Принадлежность к функциональным продуктам самих сыров можно рассматривать в другом разрезе, что и попытались отразить в данной работе. Представленное направление вызывает научный интерес и возможность прогнозировать накопление биоактивных пептидов в разных группах сыров за счет использования различных штаммов микроорганизмов в заквасочных культурах.

Список источников

References

1. *Cunha S.A., Pintado M.E.* Bioactive Peptides Derived from Marine Sources: Biological and Functional Properties // *Trends in Food Science & Technology*. 2022. Vol. 119. P. 348–370. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.08.017.
2. Identifying bioactive peptides from poultry by-products / *R.A. Voroshilin* [et al.] // *Food Processing: Techniques and Technology*. 2022. Vol. 52. № 3. P. 545–554. DOI: 10.21603/2074-9414-2022-3-2387.
3. *Milentyeva I.S., Davydenko N.I., Raschepkin A.N.* Casein Proteolysis in Bioactive Peptide Production: Optimal Operating Parameters // *Food Processing: Techniques and Technology*. 2020. № 4 (50). P. 726–735. DOI: 10.21603/2074-9414-2020-4-726-735.
4. Bioactive Peptides: From Structure to Human Health / *P.A. Trinidad-Calderón* [et al.] // *Journal of Cereal Science*. 2021. Vol. 100. P. 103232. DOI: 10.1016/j.jcs.2021.103232.
5. Improving Human Health with Milk Fat Globule Membrane, Lactic Acid Bacteria, and Bifidobacteria / *E. Kosmerl* [et al.] // *Microorganisms*. 2021. Vol. 9 (2). DOI: 10.3390/microorganisms 9020341.

Статья принята к публикации 30.11.2022 / The article accepted for publication 30.11.2022.

Информация об авторах:

Марина Геннадьевна Курбанова¹, заведующая кафедрой технологии продуктов питания животного происхождения, доктор технических наук, профессор

Роман Алексеевич Ворошилин², доцент кафедры технологии продуктов питания животного происхождения, кандидат технических наук

Василий Викторович Матюшев³, заведующий кафедрой товароведения и управления качеством продукции АПК, доктор технических наук, профессор

Олеся Игоревна Калугина⁴, ассистент кафедры технологии продуктов питания животного происхождения

Мухсин Мухим-заде⁵, аспирант кафедры технологии продуктов питания животного происхождения; инженер по автоматизации и механизации производственных процессов

Information about the authors:

Marina Gennadievna Kurbanova¹, Head of the Department of Food Technology of Animal Origin, Doctor of Technical Sciences, Professor

Roman Alekseevich Voroshilin², Associate Professor at the Department of Food Technology of Animal Origin, Candidate of Technical Sciences

Vasily Viktorovich Matyushev³, Head of the Department of Commodity Research and Quality Management of Agricultural Products, Doctor of Technical Sciences, Professor

Olesya Igorevna Kalugina, Assistant at the Department of Food Technology of Animal Origin

Mukhsin Mukhim-zade⁵, Postgraduate Student at the Department of Food Technology of Animal Origin; Engineer for Automation and Mechanization of Production Processes