

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание ученой степени доктора философии (PhD) по специальности 6D070100 – «Биотехнология»

Нармуратова Жанар Бахытовна

**«Технология получения биологически активных пептидов
сывороточного белка кобыльего молока»**

Общая характеристика работы: Сыворотка является побочным продуктом переработки молока. Сывороточные протеины являются источником обменных и необменных аминокислот и биологически активных пептидов. Биологические свойства лактоферрина - белка сыворотки кобыльего молока - антиоксидантные, противомикробные, хелатирующие и др. повышают его усвояемость за счет пептидов, образующихся в результате ферментативного гидролиза в желудочно-кишечном тракте. Это, в свою очередь, зависит от последовательности аминокислот, содержащихся в лактоферрине. Диссертационная работа основана на выделении сывороточного белка кобыльего молока лактоферрина и определении его биологически активных пептидов.

Актуальность темы исследования: Среди всех пищевых веществ белок играет наиболее важную и уникальную роль в жизнедеятельности организма. По белковому составу у домашних животных кобылье молоко наиболее приближено к материнскому. То, что кобылье молоко существенно отличается по своему составу от молока других животных, обусловлено его высокой биологической ценностью и усвояемостью. По сравнению с молоком других млекопитающих доля сывороточного белка в кобыльем молоке составляет около 39%, что выше, чем в коровьем молоке (18%), в связи с чем его относят к типу «альбуминового молока». Высокое содержание сывороточного белка делает его эффективным для питания детей и пожилых людей. Сывороточный протеин является дополнительным источником аргинина, гистидина, триптофана и лейцина, а также незаменимых аминокислот фенилаланина и тирозина в сбалансированных пропорциях. Сывороточные белки можно отнести к белкам, используемым для регенерации белков печени, образования гемоглобина и плазмы крови. В состав сывороточных белков кобыльего молока входят β -лактоглобулин, α -лактальбумин, сывороточный альбумин, иммуноглобулины, лактоферрин, лизоцим. Одним из важных белков, упомянутых выше, является лактоферрин, глобулярный белок, обнаруженный в молоке, слюне, слезах и различных других биологических жидкостях, секретируемых эпителиальными слизистыми клетками организма. Количество лактоферрина в кобыльем молоке в несколько раз выше (0,2-2 г/л), чем в коровьем (0,03-0,2 г/л), но уступает только материнскому молоку (1-7 г/л).

В последние годы возросший интерес к лактоферрину связан с его многофункциональными свойствами - антибактериальные, антиоксидантные, иммуномодулирующие, раневые, противоопухолевые, РНК, ДНК,

лактопероксидазная активность, способность катализировать различные биохимические реакции и др., направленными на поддержание гомеостаза организма. Кроме того, он обладает иммуномодулирующими свойствами, основанными на способности регулировать уровень свободного железа и связываться с клеточными рецепторами.

Белки поступают в организм нативным путем сначала в кровь в виде пептидов или отдельных аминокислот (заменимых/незаменимых), образующихся под действием пищеварительных ферментов микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Усвояемость образующихся пептидов связана с их аминокислотным составом. В последние годы, по мнению японских ученых, пептиды, образующиеся при протеолизе, обладают более высокими биологическими свойствами, чем нативные белки. Следовательно, биологические свойства лактоферрина могут зависеть от входящих в него пептидов. Лактоферрин и его биологически активные пептиды повышают иммунитет, поддерживают нормальное артериальное давление, контролируют воспалительные процессы и т. д.

На основе пептидных комплексов открывается путь получения новых пищевых, лечебных и профилактических веществ. Для пищевой промышленности пептиды разной длины в виде ди-, три- и полипептидов могут быть важнейшим элементом стратегии рационального питания людей. Длительный недостаток белка или некоторых аминокислот в ежедневном рационе приводит к ряду заболеваний. Поэтому в результате изучения структурных и функциональных свойств пептидов возникает необходимость идентификации биологически активных пептидов. Современные научные работы сосредоточены в основном на профилактике развития различных хронических заболеваний, применении пептидных препаратов для повышения иммунитета организма, однако сведений об их профилактическом действии не приводится. В связи с этим, представляет большой интерес на основе биологически активных свойств пептидов разработка лечебно-профилактических веществ и пищевых добавок с различными функциональными свойствами, которые будут играть важную роль в профилактике и терапии различных заболеваний.

Пептиды защищают организм от роста патогенной микрофлоры, стимулируют регенерацию и обновление слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и являются не только источником незаменимых для организма аминокислот, но и кальция, железа, цинка и т. д. Они также пользуются большим спросом с точки зрения связывания минеральных элементов и повышения их растворимости и всасывания через энтероциты кишечника. Пептиды проявляют антиоксидантные и иммуномодулирующие свойства за счет ароматических аминокислот.

Решением этой актуальной проблемы станет создание новых эффективных технологий экстракции пептидов из сывороточного белка, включая идентификацию биологически активных пептидов. Полученные результаты способствуют совершенствованию эффективных способов получения фундаментальных знаний о взаимосвязи питания и здоровья при

лечебно-профилактическом назначении пептидов, выделенных из сывороточного белка кобыльего молока.

Цель исследования: Изучение биологически активных свойств белка лактоферрина и его пептидов из сыворотки кобыльего молока и разработка технологии выделения.

Задачи исследования:

1. Определение физико-химических показателей кобыльего молока и классификация белков молочной сыворотки;
2. Выделение белка лактоферрина из сывороточных белков и описание его аминокислотной последовательности;
3. Изучение антиоксидантных, антимикробных и металлосвязывающих (хелатирующих) свойств белка лактоферрина;
4. Ферментативный гидролиз белка лактоферрина и определение биологических свойств пептидов;
5. Разработка технологической схемы производства лактоферрина и его пептидов.

Объекты исследования: Кобылье молоко, лактоферрин, пептиды.

Методы исследования: В работе использованы биотехнологические, биохимические, микробиологические, молекулярно-генетические, физико-химические и статистические методы.

Научная новизна исследования:

Сыворотка является побочным продуктом производства молочных продуктов; белки и их пептиды характеризуются высоким уровнем биологической активности. Лактоферрин - один из сывороточных белков, обладающий антипатогенными и иммуномодулирующими свойствами. Впервые из казахского кобыльего молока выделен сывороточный белок лактоферрин. Определена аминокислотная последовательность лактоферрина кобыльего молока и изучены его биологически активные свойства (антиоксидантные, противомикробные, хелатирующие). Экстрагированы активные пептиды лактоферрина и определено их антимикробное и связывающее свободные ионы железа действие. В результате ферментативной обработки трипсином всего было получено 56 катионных, анионных и нейтральных пептидов. Среди них идентифицировано 28 пептидов, связывающих ионы железа.

В результате научно-исследовательской работы представлена схема технологии получения лактоферрина и его пептидов.

Теоретическая значимость работы:

Сывороточный протеин и его биологически активные пептиды обладают антиоксидантной активностью, очищают организм от свободных радикалов. Кроме того, они участвуют в улучшении усвоения и биодоступности минеральных элементов в организме. Пептиды, содержащие гистидин, цистеин, серин, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, связывают ионы двухвалентных металлов (кальция, железа, цинка, магния и др.) и в результате образуют растворимый пептид-металлический комплекс, тем самым снижая риск недостатка минеральных элементов.

Пептиды также могут использоваться в качестве источника натуральных ингредиентов для создания новых функциональных пищевых продуктов, полезных для организма. Согласно результатам научных работ, из молочной сыворотки можно получить важные биологически активные пептиды.

Практическая значимость работы:

Учитывая определенные в научной работе биологические свойства лактоферрина кобыльего молока и его пептидов, результаты исследований могут быть использованы для создания физиологически эффективных препаратов медицинского, косметического и пищевого назначения.

На основе переработки сывороточных белков кобыльего молока разработана технологическая схема выделения лактоферрина. По результатам работы получен патент Республики Казахстан «Способ выделения и очистки лактоферрина из кобыльего молока», № 6702 от 26.11.2021, а также авторское право на сушку молока. Получено свидетельство о внесении данных в государственный реестр прав на объекты «Технология производства сухого молока (техническая инструкция)», №6859 от 22.04.2021.

По результатам исследований усовершенствованы методы выделения чистых белков из молочной сыворотки и определения чистоты выделенных белков. Подготовлены протоколы определения антимикробных, антиоксидантных, металлосвязывающих методов лактоферрина и его пептидов. На основании правил и понятий научно-исследовательской работы рекомендуется издать методическое пособие для студентов (студентов и магистрантов) по дисциплинам «Пищевая биотехнология», «Биохимия», «Микробиология».

Полученные результаты имеют коммерческий потенциал.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Определены физико-химические показатели кобыльего молока и идентифицированы сывороточные белки.
2. Из сывороточных белков выделен белок лактоферрин и охарактеризована его аминокислотная последовательность.
3. Изучены антиоксидантные, антимикробные и металлосвязывающие (хелатирующие) свойства белка лактоферрина.
4. Проведен ферментативный гидролиз белка лактоферрина и определены биологические свойства полученных пептидов.
5. Разработана технологическая схема получения белка лактоферрина и его пептидов.

Личный вклад автора:

Все эксперименты и результаты диссертационной работы проводились при личном участии диссертанта. Автор работы изучил литературные данные, определил цели и задачи работы, выбрал объект и концепцию исследования, а также провел и планировал проведение экспериментальных исследований, статистическую обработку и анализ полученных результатов, написание статей и патентов.

Апробация научной работы: Основные положения и результаты исследований диссертации были представлены и обсуждены на следующих международных научных конференциях и симпозиумах:

- Международная научная конференция «Мир Фараби» для студентов и молодых ученых (9-10 апреля 2019 г., Алматы, Казахстан).

- The International Scientific conference of young scientists. “Fundamental research and innovations in molecular biology, biotechnology, and biochemistry” dedicated to the 80th anniversary of academician Murat Aitkhozhin (28-29 ноября 2019 г., г. Алматы, Казахстан).

- 8th IDF International Symposium on sheep, goat, and other non-cow milk (4-6 ноября 2020 г., Бельгия).

- Международная научная конференция «Мир Фараби» для студентов и молодых ученых (6-8 апреля 2021 г., Алматы, Казахстан).

- Polysac 2nd International Conference, Chelation of divalent metals and antioxidant activities of equine lactoferrine (11-13 декабря 2021 г., Тунис (Tunisia)).

- The 3rd International Scientific and practical conference dedicated to the 85th anniversary of the Tashkent Pharmaceutical Institute «Modern pharmaceuticals: actual problems and prospects» (2 ноября 2022 г., Ташкент, Узбекистан).

Публикации. Результаты исследовательской работы опубликованы в 14 научных работах, в том числе в журнале LWT-Food Science and Technology (Q1), входящем в базу *Web of Science* и *Scopus* – 1 статья, в научных журналах, представляемых комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан – 3 статьи, в сборниках международных конференций и симпозиумов – опубликовано 8 тезисов. Кроме того, подготовлен 1 Патент и 1 авторское свидетельство.

Структура диссертации. Диссертация написана на 114 страницах текста и состоит из обозначений и сокращений, нормативных ссылок, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключительных разделов, 189 ссылок, 11 таблиц, 39 рисунков.