

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТАЦИИ БЕЛКА МОЛОЗИВА КОРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИМИКРОБНЫХ И ПРОТИВОГРИБКОВЫХ ПЕПТИДОВ

Н. В. Мерзлякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, С. В. Шихалев

Настоящая статья посвящена разработке математической модели получения трипсинового гидролизата молозива коров с прогностическим функционалом оценки различных показателей биологической активности, в частности бактериостатической и противогрибковой активности, выделенного из него пептида. В ходе исследования были смоделированы режимы ферментации молозива коров для получения гидролизатов антимикробной направленности, после чего антимикробная активность полученного из гидролизата пептида была подтверждена в ходе экспериментальных исследований. Модельные значения частных оценочных критериев эффективности процесса гидролиза были установлены на уровне: продолжительность гидролиза (4–5 ч.), степень гидролиза (60%), соотношение фермент:субстрат (1:17%), pH (7,8) и t (39 °C). Для полученного и идентифицированного посредством базы данных *Protein NCBI* антимикробного пептида с условным названием T1.2 в ходе эксперимента масс-спектрометрическим методом определена молекулярная масса (22 кДа), аминокислотная последовательность (28 аминокислот, последовательность STKRHRMНАСWRGPLKALSNPRAEFRR), а также методом молекулярного моделирования определены заряд (+7), изоэлектрическая точка (12,49) и гидрофильность (+31,07 Ккал·моль⁻¹). Диско-диффузным методом проверена и доказана антимикробная активность в отношении бактериальных культур *E. coli* и *B. subtilis*, а также противогрибковая активность в отношении грибковой культуры *S. Albicans*. Выявлено, что активность T1.2 существенно ниже по сравнению с действием антибиотика «Канамидин» и противогрибкового препарата «Флуконазол», при этом он может быть рекомендован как синергетик при стандартной протокольной терапии антибактериальными и противогрибковыми препаратами при условии доказательства его биодоступности и отсутствия токсичности.

Ключевые слова: математические модели, пептиды, молозиво коров, антибактериальная активность, антигрибковая активность, молекулярное моделирование.

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой разнообразный класс природных биомолекул, обнаруженных у животных, растений, насекомых и микроорганизмов. Они играют важную роль в защите организма человека от инфекций, так как обладают широким спектром бактерицидного, вирусостатического и фунгицидного действия [1].

АМП действуют на патогенные микроорганизмы, разрушая их клеточные мембраны, нарушая метаболические процессы и вызывая гибель бактерий, вирусов и грибов. Кроме того, пептиды антимикробной направленности способны стимулировать иммунную систему организма человека, модулируя ее защитные функции [2].

Ввиду наличия естественных противомикробных функций АМП могут быть исполь-

зованы в качестве безопасной альтернативы антибиотикам, так как они не вызывают резистентности у микроорганизмов и не имеют побочных эффектов. Кроме того, они могут быть использованы в качестве консервантов в пищевой промышленности, так как они способны предотвращать рост бактерий и грибов в продуктах [3].

Некоторые АМП также проявляют цитотоксичность по отношению к онкоклеткам, что позволяет предположить, что они являются потенциальными источниками терапевтических средств для лечения рака [4]. Это связано с тем, что мутировавшие клетки имеют измененную мембрану, которая может быть более чувствительной к действию АМП, чем мембраны здоровых клеток. Также некоторые АМП могут взаимодействовать с белками, которые играют

важную роль в регуляции роста и деления клеток, что также может способствовать уничтожению онкоклеток [5].

На сегодняшний день более 3400 АМП были идентифицированы из природных источников и занесены в базу данных антимикробных пептидов (Antimicrobial Peptide Database, APD)¹ [6].

Антимикробные и другие биологически активные пептиды выделяют из ферментативных гидролизатов. L.J. Zhang и соавт. [7] доказано, что АМП образуется в результате протеолиза белковых молекул. В исследовании авторов [8] доказана эффективность последовательного гидролиза соевого белка пепсином, а затем трипсином с установлением рациональных параметров процесса для получения каждого используемого биопептида. I.M. Chernukha и соавт. [9] показали возможность выделения биопептидов из мяса и продуктов его переработки. В настоящее время выделены биопептиды из ферментативного гидролизата яичного альбумина [10]. Перспективным источником антимикробных пептидов являются также молочные белки [11].

В последние годы разрабатываются различные модели математического прогнозирования получения биологически активных ферментативных гидролизатов белков на основе предсказания пептидных последовательностей с желаемыми [12], в том числе физико-химическими [13] и другими свойствами.

Для прогнозирования биоактивности гидролизатов белка и биопептидов используют различные предиктивные методы, которые могут предсказывать разнородную биологическую активность на основе аминокислотных последовательностей. Так, например, использование кодирования признаков для генерации числовых признаков на основе пептидных последовательностей является одним из методов машинного обучения, который может быть использован для анализа белковых последовательностей. Этот метод позволяет преобразовать пептидные последовательности в числовые векторы, которые могут быть использованы для обучения моделей машинного обучения. После того, как пептидные последовательности были преобразованы в числовые векторы, можно использовать различные алгоритмы машинного обучения, такие как нейронные сети, SVM, решающие деревья

и другие, для обучения моделей и предсказания свойств белков [14].

Согласно V. Singh и соавт. [15], методы кодирования признаков подразделяются на две широкие категории: признаки на уровне пептидов; признаки на уровне аминокислот. На уровне пептидов методы машинного обучения в качестве входных данных используют характеристики последовательностей пептидов. Признаки на уровне пептидов могут включать в себя длину пептида, аминокислотный состав, заряд, изоэлектрическую точку, гидрофобность и другие свойства. На уровне аминокислот методы машинного обучения используют информацию об аминокислотной последовательности белка. Признаки на уровне аминокислот могут включать в себя информацию о физико-химических свойствах аминокислот, таких как заряд, гидрофобность, размер и другие свойства.

Методы машинного обучения могут включать в себя использование различных алгоритмов, таких как SVM (Support Vector Machines), Random Forest, Neural Networks и другие. В целом выбор метода машинного обучения и признаков зависит от конкретной задачи и доступных данных [16, 17].

Цель работы – разработка математической модели получения гидролизата молозива с прогнозируемой антимикробной активностью и экспериментальное подтверждение его свойств на основе выделения противомикробного пептида.

Материалы и методы исследования

Математическую модель получения трипсинового гидролизата молозива с антимикробной активностью разрабатывали с использованием стандартной программной среды Microsoft Excel (табл. 1).

В программную модель заложены оценка прогнозируемой биологической активности пептидов молозива коров, интегрирующая различные показатели с использованием протомных баз данных PeptideCutter, Protein NCBI, BIOPEP и AVPdb.

В качестве критериев эффективности процесса гидролиза использовали (*n*):

- степень гидролиза белка (%);
- соотношение «фермент : субстрат» (%);
- продолжительность гидролиза (ч).

¹ Antimicrobial Peptide Database: <https://aps.unmc.edu>.



Гидролиз проводился при оптимуме активности фермента трипсина ($pH = 7,8$ и $t = 39$ °C).

Обобщенный показатель комплексной оценки гидролизата (D_i) рассчитывали как среднегеометрическое по всем показателям желательности d_i каждого из частных оценочных показателей n по формуле 1:

$$D_i = \sqrt[n]{\prod_1^n d_i}. \quad (1)$$

Значения контуров желательности рассчитывали с использованием функции Харрингтона. В таблице 1 представлены числовые интервалы шкалы Харрингтона.

Объектом исследований являлись трипсиновый гидролизат молозива коров, пептид с условным названием *TI.2*, выделенный из гидролизата.

Молекулярную массу пептида, количество аминокислот и их последовательность определяли масс-спектрометрическим методом на *MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex* («Bruker», Германия).

Идентификацию пептида проводили с использованием базы данных *Protein NCBI*.

Первичную и вторичную структуру, заряд, изоэлектрическую точку и гидрофильность определяли с использованием программы молекулярного моделирования *Schrodinger Maestro* (США).

Антимикробную активность пептида в отношении *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* определяли диско-диффузным методом.

Результаты и обсуждение

Программная среда *Microsoft Excel* позволяет проводить оптимизацию процесса гидролиза с возможностью выбора целевой биологической активности и используемого фермента.

Разработанная нами модель позволяет спрогнозировать параметры ферментативного гидролиза молозива коров ферментами трипсином, пепсином и папаином для получения от 2 до 6 заданных биологических активностей (антиоксидантная, антимикробная, антидиабетическая, противоопухолевая, антивирусная, пребиотическая). В частности, согласно разработанной модели, для получения гидролизата молозива с высокими антиоксидантными и противомикробными свойствами при воздействии трипсина и пепсина параметры гидролиза молозива графически представлены на рисунке 1.

Определение оптимальных параметров ферментативного гидролиза для получения гидролизата с заданной биологической активностью проводили с использованием контуров «желательности» в зависимости от значений этих параметров.

Для получения гидролизата с антимикробной активностью определен следующий режим гидролиза (рис. 1):

- продолжительность гидролиза – 4–5 ч;
- степень гидролиза – 60%;
- соотношение фермент : субстрат – 1:17%;
- $pH = 7,8$ и $t = 39$ °C.

Разработка зависимостей для перевода опытных значений оценочных показателей в кодовые для шкалы Y проводилась также с использованием среды *Microsoft Excel* (табл. 2).

Полученные результаты, представленные в таблице 2, позволяют проводить обобщенную оценку «желательности» влияния параметров гидролиза молозива коров при различных значениях заданной биологической активности.

Смоделированные режимы ферментации молозива коров для получения гидролизатов антимикробной направленности были в дальнейшем подтверждены экспериментальными исследованиями антимикробной и противогрибковой активности пептида, выделенного из гидролизата.

Таблица 1 – Числовые интервалы шкалы Харрингтона

Оценка	Интервалы значений функции желательности d_i	Практическая характеристика уровня
Очень хорошо	1,00–0,80	Допустимый и превосходный уровень
Хорошо	0,80–0,63	Допустимый и хороший уровень
Удовлетворительно	0,63–0,37	Допустимый и достаточный уровень
Плохо	0,37–0,20	Недопустимый уровень
Очень плохо	0,20–0,00	Недопустимый уровень

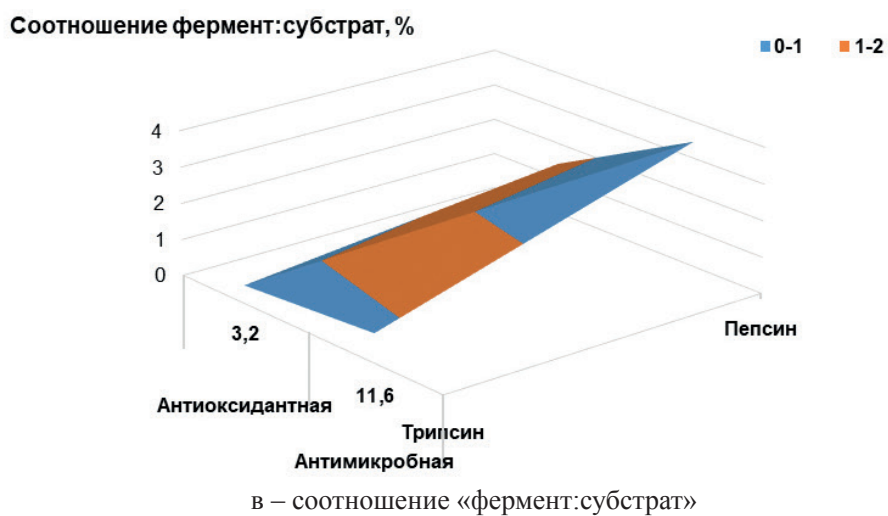
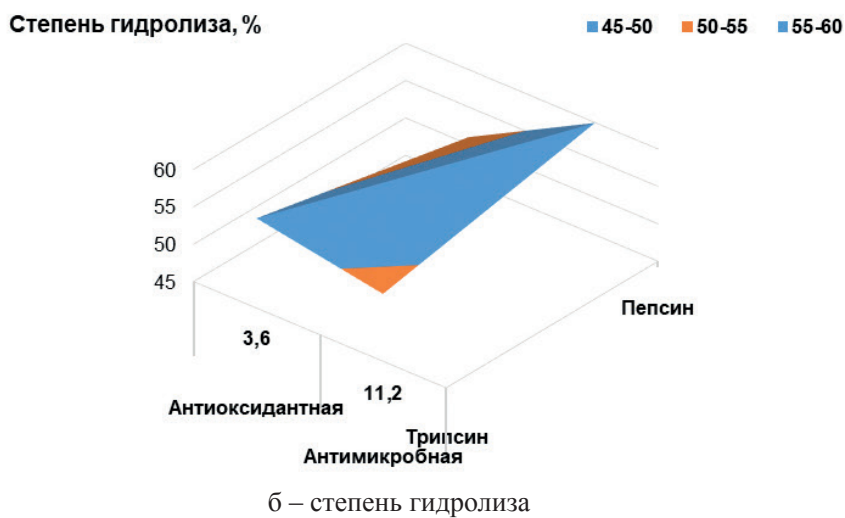
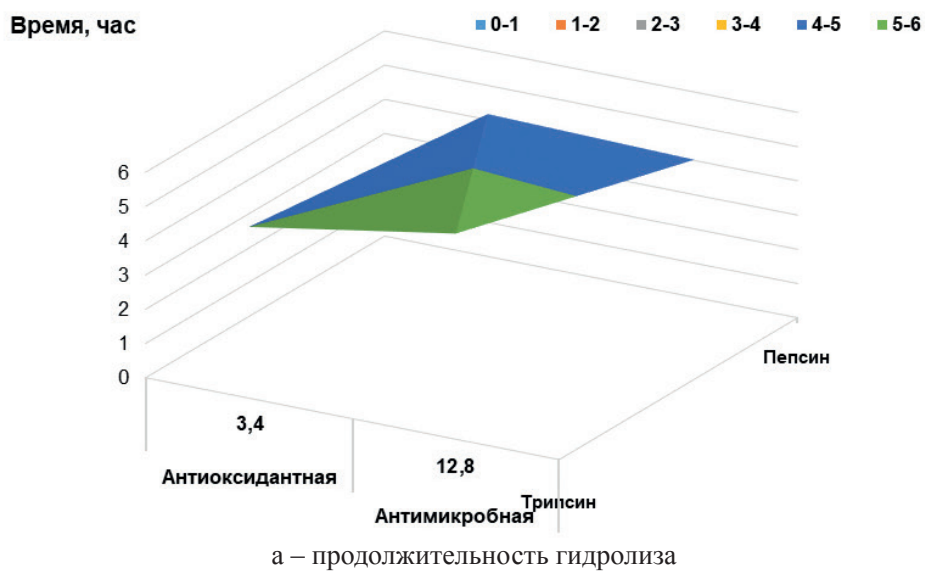


Рис. 1. Оптимальные параметры ферментного расщепления молозива коров для получения гидролизата с антиоксидантными и противомикробными свойствами



Из полученного трипсинового гидролизата молозива коров выделен пептид *Tl.2* с молекулярной массой 22 кДа, состоящий из 28 аминокислот со следующей пептидной последовательностью:

STKRHRMHACSWRGPLKALSNPRAEFRR.

Пептид *Tl.2* по базе данных *Protein NCBI* идентифицирован как пептид «BAMA, *Bos taurus*», обладающий антимикробными свойствами RIKTVTSFDLPALRFLKL.

Специфические последовательности пептидов имеют решающее значение для антимикробной активности. В последовательности аминокислот исследуемого АМП присутствуют сочетания аминокислот *LK* и *AL*, что согласно данным [15, 18] обосновывает его антимикробные свойства.

Смоделированная первичная и вторичная структура пептида *Tl.2* представлена на рисунке 2.

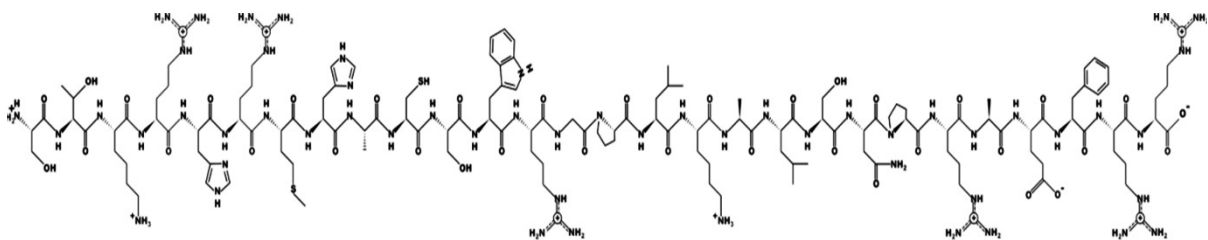
Из анализа первичной и вторичной структуры пептида следует, что у него изоэлектрическая точка на уровне 12,49, заряд +7, гидрофильность (гидрофобность) +31,07 Ккал·моль⁻¹, что подтверждает его антимикробные свойства и согласуется с данными [19, 20], в которых доказано, что АМП имеют катионный положительный заряд при изоэлектрической точке, близкой к нейтральной или щелочной.

В таблице 3 представлены результаты антимикробной и противогрибковой активности пептида *Tl.2*.

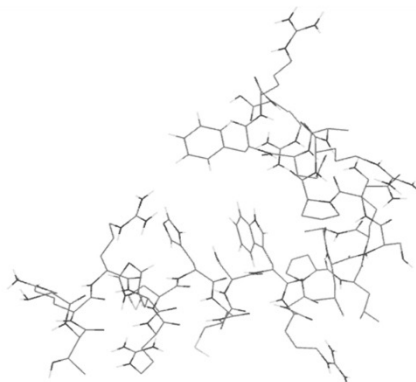
Пептид *Tl.2* обладает выраженной противомикробной активностью в отношении *E. coli*

Таблица 2 – Комплексная оценка процесса гидролиза в кодовых шкалах и с использованием функции Харрингтона

Биологическая активность	Частные оценочные показатели						D_i
	Время гидролиза		Степень гидролиза		Соотношение «фермент : субстрат»		
	Y	d_i	Y	d_i	y	d_i	
Антимикробная активность	0,49	0,54	0,29	0,47	0,42	0,51	0,51



а



б

Рис. 2. Первичная (а) и вторичная (б) структура пептида *Tl.2*

Таблица 3 – Антимикробная и противогрибковая активность пептида T1.2

Наименование образца	Диаметр зоны лизиса, мм		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i>	<i>C. Albicans</i>
T1.2	14	16	17
Контроль	0	0	0
Антибиотик «Канамицин»	22	24	Не исследовали
Противогрибковый препарат «Флуконазол»	Не исследовали	Не исследовали	26

ATCC 25922 и *B. Subtilis*, а также противогрибковой активностью в отношении *C. Albicans*. Следует отметить, что полученные активности пептида существенно ниже по сравнению с действием антибиотика «Канамицин» и противогрибкового препарата «Флуконазол», однако его можно рекомендовать в качестве дополнительного антибактериального и противогрибкового средства при условии доказательства его биодоступности и отсутствия токсичности.

Выводы

Разработанная модель ферментативного гидролиза молозива коров для оптимизации выбора параметров гидролиза учитывает многообразие факторов гидролиза и позволяет проводить комплексную оценку этих параметров.

Программный механизм с помощью среды *Microsoft Excel* универсален и позволяет добавлять дополнительные оценочные параметры процесса гидролиза.

В результате экспериментальных исследований на примере антимикробного действия пептида, выделенного из полученного трипсинового гидролизата, подтверждена эффективность использования разработанной модели.

Список литературы

1. Antimicrobial host defence peptides: Functions and clinical potential / N. Mookherjee [et. al.] // *Nature reviews drug discovery*. – 2020. – № 19. – P. 311–332.
2. Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance / R. Spohn [et. al.] // *Nature communications*. – 2019. – № 10. – P. 4538.
3. In-vitro and MD simulation study to explore physicochemical parameters for antibacterial peptide to become potent anticancer peptide / R. Ma [et. al.] // *Molecular therapy oncolytics*. – 2020. – № 16. – P. 7–19.

4. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education / G. Wang [et. al.] // *Nucleic acids research*. – 2016. – № 44. – P. D1087–D1093.
5. Human antimicrobial peptides and proteins / G. Wang // *Pharmaceuticals*. – 2014. – Vol. 7. – № 5. – P. 545–594.
6. Antimicrobial peptides / L. J. Zhang [et. al.] // *Current biology*. – 2016. – Vol. 26. – № 1. – P. R14–R19.
7. Ферментативный гидролиз соевого белка / Д. В. Соколов, Б. А. Болхонов, С. Д. Жамсаранова [и др.] // *Техника и технология пищевых производств*. – 2023. – Т. 53. – № 1. – С. 86–96.
8. Biologically active peptides of meat and meat product proteins / I. Chernukha [et. al.] // *Theory and practice of meat processing*. – 2020. – Vol. 5. – № 2. – P. 12–19.
9. Selection of working parameters for obtaining egg protein peptides / B. A. Bokhonov [et. al.] // *Bulletin of vsgut*. – 2022. – Vol. 87. – № 4. – P. 15–22.
10. A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species / S. Guha [et. al.] // *Food production, processing and nutrition*. – 2021. – Vol. 3. – № 2.
11. Antimicrobial peptides: a new hope in biomedical and pharmaceutical fields / A. Moretta [et. al.] // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 668632.
12. ACPred-FL: A sequence-based predictor using effective feature representation to improve the prediction of anti-cancer peptides / L. Wei [et. al.] // *Bioinformatics*. – 2018. – V. 34. – P. 4007–4016.
13. CancerPPD: a database of anticancer peptides and proteins / A. Tyagi [et. al.] // *Nucleic acids research*. – 2015. – Vol. 43. – P. D837–D843.
14. StaBle-ABPpred: A stacked ensemble predictor based on biLSTM and attention mechanism for accelerated discovery of antibacterial peptides



/ V. Singh [et. al.] // Briefings in bioinformatics. – 2022. – Vol. 23. – bbab439.

15. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules / K. K. Jensen [et. al.] // Immunology. – 2018. – Vol. 154. – № 3. – P. 394–406.

16. Deep convolutional neural networks for pan-specific peptide-MHC class I binding prediction / Y. Han [et. al.] // BMC bioinformatics. – 2017. – Vol. 18. – № 1. – P. 585.

17. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities / S. E. Blondelle [et. al.] // Biochemistry. – 1992. – Vol. 31. – P. 12688–12694.

18. Antimicrobial peptides and their potential application in antiviral coating agents / E. D. Freitas [et. al.] // Colloids and surfaces B: biointerfaces. – 2022. – Vol. 217. – P. 112693.

19. QSAR modeling and design of cationic antimicrobial peptides based on structural properties of amino acids / Y. Wang [et. al.] // Combinatorial chemistry & high throughput screening. – 2012. – Vol. 15. – P. 347–353.

20. The antimicrobial peptide database provides a platform for decoding the design principles of naturally occurring antimicrobial peptides / G. Wang [et. al.] // Protein science. – 2020. – Vol. 29. – № 1. – P. 8–18.

Мерзлякова Наталия Вадимовна, аспирант кафедры пищевой инженерии, ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет».

E-mail: merzlyakova@xk3.ru.

Тихонов Сергей Леонидович, д-р техн. наук, профессор, директор научно-образовательного центра «Прикладные нанобиотехнологии», ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет».

E-mail: tihonov75@bk.ru.

Тихонова Наталья Валерьевна, д-р техн. наук, проф., зав. кафедрой пищевой инженерии аграрного производства, ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет».

E-mail: tihonov75@bk.ru.

Шихалев Сергей Валерьевич, канд. техн. наук, доцент, доцент кафедры пищевой инженерии, ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет».

E-mail: sershih@rambler.ru.

* * *