

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

На правах рукописи



БАРКОВСКАЯ ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ
ЙОДА И ЦИНКА БЕЛКОВЫМИ МАТРИЦАМИ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ**

4.3.3 – Пищевые системы

4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:

Доктор технических наук

Кручинин А.Г.

Москва, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ДЕФИЦИТ ЙОДА: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ, МИРОВАЯ ПРАКТИКА И НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ	10
1.1. Роль йода в организме и последствия его дефицита	10
1.2. Метаболизм йода в организме человека.....	14
1.3. Мировая практика в борьбе с дефицитом йода	16
1.4. Разработка новых подходов в профилактике и нивелировании йода	21
Заключение к Главе 1.....	29
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ	31
2.1. Организация исследований и схема проведения экспериментов	31
2.2. Объекты исследований	32
2.3. Методы исследований	33
2.3.1. Стандартизованные методы исследований	33
2.3.2. Общепринятые и адаптированные методы исследований.....	34
2.3.3. Планирование эксперимента и статистическая обработка данных	40
ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВОЙ МАТРИЦЫ И ХЕЛАТИРОВАНИЯ ЦИНКА	42
3.1. Исследование процесса селективного фракционирования белков молочной сыворотки.....	42
3.2. Исследование закономерностей хелатирования цинка белками молочной сыворотки.....	54
Заключение по Главе 3	57
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ СВЯЗЫВАНИЯ ЙОДА С МОДИФИЦИРОВАННОЙ БЕЛКОВОЙ МАТРИЦЕЙ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ	59

4.1. Биоинформатическое моделирование процесса гидролиза сывороточных белков	59
4.2. Исследование закономерностей связывания йода с белками молочной сыворотки.....	68
4.3. Подбор эффективных режимов баромембранной очистки обогащенных белков молочной сыворотки.....	77
4.4. Определение пептидного профиля обогащенного гидролизата сывороточных белков	79
Заключение к Главе 4.....	86
ГЛАВА 5. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОИЗВОДСТВА ОБОГАЩЕННОГО ГИДРОЛИЗАТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ И ОБОГАЩЕННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ.....	88
5.1. Разработка технологии производства обогащенного гидролизата сывороточных белков	88
5.2. Технология питьевого пастеризованного молока, обогащенного гидролизатом сывороточных белков с органическими формами йода и цинка	96
Заключение к главе 5	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	105
СПИСОК ТЕРМИНОВ	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ	128
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Титульные листы документов в области стандартизации.....	129
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Акты промышленной апробации и внедрения результатов НИР	131

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Дефицит йода является распространенной проблемой среди всех слоев населения России и одной из главных причин возникновения алиментарно-зависимых неинфекционных заболеваний эндокринной системы организма, а также связанных с ними патологий. Статистические данные Росстата и Национального медицинского исследовательского центра эндокринологии за последние 15 лет подчеркивают важность вопроса, указывая на динамичный рост количества пациентов, страдающих йододефицитными состояниями, и низкое среднесуточное потребление микроэлемента, составляющее 40–80 мкг в сутки, что в 2-3 раза меньше рекомендаций Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

В настоящее время на государственном уровне активно поднимается вопрос решения проблемы дефицита йода. Так, на территории Российской Федерации (РФ) действуют СанПиН 2.3/2.4.3590-20, согласно которым для приготовления пищи в школьных столовых по всей стране в обязательном порядке предусмотрено использование йодированной соли. Кроме того, разработан проект Федерального Закона «О профилактике заболеваний, вызванных дефицитом йода», находящийся на стадии рассмотрения Правительством РФ. Однако применяемый подход к обогащению пищи неорганической формой йода не является оптимальным в силу ее пониженной стабильности при длительном хранении и термообработке, длительности метаболизма в организме, а также ограниченного потребления соли для некоторых групп населения. В связи с этим, одной из современных стратегий доставки йода в организм является его иммобилизация белковыми матрицами. При этом, ряд исследователей доказали большую эффективность действия органических форм йода при одновременном использовании элементов, сопутствующих его метаболизму (например, цинка). С данной точки зрения использование белков молочной сыворотки (БМС) в качестве субстрата для обогащения эссенциальными микроэлементами

считается перспективным, поскольку строение белковых молекул и их аминокислотная последовательность содержат функциональные участки связывания цинка и йода.

Таким образом, разработка технологических решений к иммобилизации йода и цинка белковой матрицей молочной сыворотки с применением «омиксных» технологий является актуальной областью научных исследований, направленной на профилактику йододефицитных состояний у населения, что в полной мере согласуется с приоритетами Стратегии научно-технологического развития РФ; целями Стратегии экологической безопасности РФ на период до 2025 года; Программой фундаментальных научных исследований в РФ на долгосрочный период (2021–2030 гг); положениями Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации.

Степень разработанности темы. Значимый вклад в исследования свойств вторичного молочного сырья и подходов к обогащению пищевых продуктов эссенциальными микроэлементами внесли Агаркова Е. Ю., Горлов И. Ф., Евдокимов И. А., Жамсаранова С. Д., Зобкова З. С., Кручинин А. Г., Симоненко С. В., Томчани О. В., Тутельян В. А., Чернуха И. М., Chunlei Xiao, Fangjun Wang, Szymandera-Buszka Krystyna, Yan Jin, Zheyi Liu и др.

Целью работы является разработка технологии направленной модификации белков молочной сыворотки, обеспечивающей повышение реакционной способности к специфическому связыванию ионов йода и цинка.

Для достижения поставленной цели сформулированы и реализованы следующие **задачи**:

- исследовать принципы термоселективного фракционирования белков молочной сыворотки и изучить роль хелаторов в повышении эффективности данного процесса;
- исследовать закономерности связывания цинка с декальцинированными БМС в зависимости от технологических параметров процесса;

- осуществить биоинформатическое моделирование ферментативного гидролиза БМС, направленного на сохранение специфичных цинксвязывающих сайтов и повышение доступности функциональных аминокислотных групп, потенциально связывающих йод;
- провести оптимизацию процесса ферментативного гидролиза БМС и изучить зависимости связывания йода с белково-пептидным субстратом;
- исследовать принципы баромембранной очистки белковых систем от неорганических примесей и провести скрининг пептидного профиля гидролизата сывороточных белков (ГСБ) для установления механизма ковалентного связывания ионов йода;
- исследовать влияние процесса распылительной сушки на сохранность концентраций йода и цинка в дегидратированной форме ГСБ, а также оценить технологические свойства в процессе его дальнейшей промышленной переработки;
- разработать технологию и комплект технической документации на производство ГСБ, обогащенного йодом и цинком, и обогащенного питьевого пастеризованного молока.

Научная новизна работы:

- предложена новая концепция обогащения сывороточных белков эссенциальными микроэлементами (йодом и цинком), основанная на их синергетическом взаимодействии и повышении биодоступности;
- установлены зависимости связывания йода и цинка с модифицированными БМС от температуры и кислотности среды, продолжительности иммобилизации, концентрации неорганического источника микроэлемента;
- сформулирован биоинформатический подход к избирательному протеазному скринингу, направленному на сохранение аминокислотного участка связывания ионов двухвалентных металлов и повышение доступности биолигандов, потенциально связывающих йод;

- получены зависимости сохранения концентрации хелатной формы цинка и степени ковалентно связанного йода от технологических параметров процесса биоконверсии БМС;

- получены экспериментальные данные об устойчивости белкового комплекса, обогащенного эссенциальными микроэлементами, в условиях воздействия основных технологических процессов производства молочной продукции.

Практическая значимость работы.

- Проведена оптимизация процесса ферментативного гидролиза белков молочной сыворотки;

- Разработаны технологии производства гидролизата сывороточных белков, обогащенных йодом и цинком, и обогащенного питьевого пастеризованного молока;

- Результаты проведенных исследований позволили разработать комплект документов в области стандартизации (СТО «Гидролизат сывороточного белка сухой, обогащенный йодом и цинком», СТО «Молоко питьевое пастеризованное, обогащенное йодом и цинком»). Разработанные технологии прошли апробацию и внедрены в производство на российских предприятиях молочной отрасли;

- Получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2025661267 «Программа для моделирования процесса йодирования белков молочной сыворотки».

Методология и методы исследования. Исследования проведены на базе ФГАНУ «ВНИМИ» и ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» в рамках выполнения работ по гранту РФФИ № 24-26-00220 от 29.12.2023 г. по теме «Разработка технологии направленной биокаталитической модификации α -лактальбумина с целью повышения реакционной способности к специфическому связыванию ионов йода и цинка для коррекции патологических процессов при йододефицитных состояниях». В процессе выполнения экспериментов использованы стандартизованные методы исследований пищевой продукции и широко применяемые в научных исследованиях.

Основные положения, выносимые на защиту:

- концепция модификации и обогащения БМС йодом и цинком в соотношениях, оптимальных с точки зрения физиологических потребностей человека;
- зависимости изменения концентраций хелатированного цинка и ковалентно связанного йода в белковом матриксе от вариативных факторов процессов иммобилизации и направленного гидролиза субстрата;
- эмпирические данные об устойчивости ГСБ, обогащенных эссенциальными микроэлементами (йодом и цинком), в условиях воздействия физических и биотехнологических факторов, коррелирующих с основными технологическими процессами производства молочной продукции.

Степень достоверности и апробация результатов.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на V Международной научно-практической молодежной конференции, посвященной памяти Р.Д. Поландовой (Москва, 2023), XVIII Всероссийском конгрессе с международным участием «Нутрициология и диетология для здоровьесбережения населения России», посвященном 300-летию Российской академии наук (Москва, 2023), IX Международной научно-технической конференции «Инновационные технологии в пищевой промышленности: наука, образование и производство» (Воронеж, 2023), Международной научно-практической конференции «Стратегии развития АПК России на основе рационального использования региональных генетических и сырьевых ресурсов» (Волгоград, 2024), II Всероссийском научно-практическом Конгрессе «Биотехнология и устойчивое развитие» (Москва, 2024). Работа отмечена Золотой медалью в Международном смотре-конкурсе лучших пищевых продуктов, продовольственного сырья и инновационных разработок на Международной научно-практической конференции «Стратегии развития АПК России на основе рационального использования региональных генетических и сырьевых ресурсов» (Волгоград, 2024). Работа включена в состав победителей конкурного отбора 2025

года на назначение стипендии Президента Российской Федерации для аспирантов и адъюнктов.

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Вклад автора заключается в анализе научной литературы по теме исследования, постановке цели и задач, планировании экспериментов, анализе результатов исследований, обсуждении полученных результатов и формулировании выводов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует пунктам 5, 35 и 36 паспорта научной специальности 4.3.3 «Пищевые системы» (технические науки) и пунктам 7, 15 и 29 паспорта научной специальности 4.3.5 «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ» (технические науки).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 статьи в международных рецензируемых журналах, входящих в базу данных Scopus и Web of Science; 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК (К1-К2); 3 статьи в материалах конференций и журналах РИНЦ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 138 страницах и включает введение, 5 глав, заключение, список сокращений и условных обозначений, список терминов, список литературы и приложения. Диссертация содержит 28 таблиц, 17 рисунков и 3 приложения. Список литературы включает 155 источников.

ГЛАВА 1. ДЕФИЦИТ ЙОДА: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ, МИРОВАЯ ПРАКТИКА И НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ

1.1. Роль йода в организме и последствия его дефицита

Йод – важный эссенциальный микроэлемент, участвующий в синтезе гормонов щитовидной железы (ЩЖ), которые являются ключевыми регуляторами клеточных процессов (рост, метаболизм, дифференциация и др.) [126]. Описанная функция элемента в организме человека определяет необходимость контролирования уровня его потребления и осуществления мероприятий по профилактике йододефицитов (например, информирование граждан о значимости йода в работе организма, разработка подходов в профилактике дефицита йода и др.). Общемировой мониторинг йодной недостаточности показывает, что более 2 млрд человек нуждаются в повышении уровня микроэлемента. При этом, в России йододефициты различной степени унаследованы на всей территории страны [38]. Подобное состояние проблемы обосновано низким среднесуточным потреблением элемента, равным 40-80 мкг/сутки, что в 2-3 раза меньше рекомендуемой дневной нормы (таблица 1.1) [1]. Следует также обратить внимание на различные уровни потребления йода для групп, представленных в таблице 1.1. Данная особенность обоснована отличиями в биохимических и физиологических процессах, происходящих в их организме. Например, в пожилом возрасте, на фоне снижения скорости метаболизма, потребность в микроэлементе меньше, чем у взрослых [144].

Таблица 1.1 – Суточная потребность в йоде, в зависимости от возраста и физиологического состояния [54]

Группа	Потребность в йоде, мкг/сутки
Дети дошкольного возраста: 0-6 лет	90
Дети школьного возраста: 7-12 лет	120
Взрослые и подростки старше 12 лет	150
Пожилые люди	100
Беременные и кормящие женщины	250

Беременные и кормящие женщины больше других возрастных групп нуждаются в йоде по причине полной зависимости развивающегося плода в гормонах щитовидной железы матери (трийодтиронин (Т3) и тироксин (Т4)) с начала эмбриональной фазы и до середины беременности и передаче микроэлемента через грудное молоко новорожденному [145]. Низкое потребление йода во время беременности может привести к низкому нейрокогнитивному и неврологическому развитию ребенка [89]. Это подтверждают мировые исследования [10,56,92,111], отражающие корреляцию адекватного потребления йода беременными женщинами и антропометрическими показателями (вес, размер конечностей и щитовидной железы) новорожденных детей, а также их уровнем развития. Данная особенность связана с тем, что дефицит микроэлемента (даже легкой степени) приводит к снижению уровня синтеза гормонов щитовидной железы, которые напрямую влияют на формирование нервной системы плода, активируя транскрипцию и экспрессию генов, участвующих в развитии аксонов и дендритов, миграции клеток, формировании синапсов и миелинизации [105,123]. Кроме того, автор работы [56] отмечает необходимость поддержания адекватного потребления йода женщинами в период планирования беременности (в возрасте 14-19 лет), так как этот фактор оказывает влияние на улучшение гормонального статуса щитовидной железы и снижение вероятности патологических изменений органа при вынашивании плода.

Для детей и подростков микроэлемент необходим для адекватного соматического роста и развития нервной системы. В этой связи, данная возрастная группа, так же, как беременные и кормящие женщины, наиболее подвержены негативным последствиям дефицита йода в рационе питания. Рядом исследований [21,24,79,93,119] установлена причинно-следственная связь между нормальным потреблением йода у детей и их когнитивным развитием, а также формированием йододефицитных заболеваний. Показано, что недостаток микроэлемента может индуцировать эндемический зоб, задержку роста и развития центральной нервной системы у детей (кретинизм), различные интеллектуальные нарушения [21]. Так,

согласно экспериментальным данным, у детей, испытывающих умеренный недостаток микроэлемента (64 мкг/сутки), в возрасте 6-10 лет время реакции замедленно, в сравнении с ровесниками, потребляющими достаточное количество йода [101].

Недостаток микронутриента у взрослых также ведет к формированию патологических процессов в организме, в число которых входят дисфункции щитовидной железы (тиреоидит, гипотиреоз, тиреотоксикоз, зоб), при которых орган адаптируется к дефициту йода. Орган обеспечивает снижение синтеза тироксина, посредством повышения всасывания йодида и усиления внутреннего метаболизма в результате повышения уровня тиреотропного гормона, что в конечном результате ведет к увеличению размеров железы [1,105,115]. Кроме того, в условиях йодного дефицита возрастает риск развития рака щитовидной и молочной желез, поражений головного мозга и формирования заболеваний сердечно-сосудистой системы [111].

Помимо этого, в работе [153] автор сообщает об «U-образной» зависимости нормального функционирования щитовидной железы от уровня потребления йода. Это означает, что как низкие, так и высокие концентрации потребляемого йода могут привести к дисфункциям систем организма и различным патологиям. При этом, в организме обнаружен защитный механизм (эффект Вольфа-Чайкова), регулирующий процесс избыточного синтеза гормонов щитовидной железы при высоком потреблении йода [109]. Однако, при длительных нарушениях в работе эндокринной и других систем, избыточные концентрации йода в организме потенцируют гипертиреоз и папиллярный рак [105]. Механизм токсичного воздействия избытка йода в настоящее время не определен. Некоторыми исследованиями предложена модель йодиндуцированного синтеза цитокинов и хемокинов, которая способствует транспорту иммунокомпетентных клеток к щитовидной железе, стимулируя развитие тиреоидита. Другие механизмы формирования патологий щитовидной железы представлены утилизацией избытка йода в эпителиальных клетках органа,

приводящей к повышению уровня окислительного стресса, производству токсичных продуктов распада липидов и повреждению тканей железы [136].

Широкая распространенность дефицита йода в России влечет формирование ряда заболеваний, индуцированных нехваткой микроэлемента. Заболевания щитовидной железы занимают второе место среди патологий эндокринной системы, после сахарного диабета [74]. Специалисты Национального медицинского исследовательского центра эндокринологии Минздрава сообщают о более чем 14 млн граждан (на май 2022 года), страдающих заболеваниями щитовидной железы. Рост узловых форм зоба у пожилых людей увеличился с 70,5 до 103,6 случая на 100 тысяч человек, средний ежегодный прирост (за период 2017-2022 гг) составил 3,4%. Медиана ежегодного прироста распространенности тиреоидита составила 15,9 случая на 100 тысяч человек, гипотиреоза – 24,9 случая, тиреотоксикоза – 3,1 случая. Тиреотоксикоз, в свою очередь, может приводить к тахикардии, наджелудочковым аритмиям, ухудшению течения стенокардии и др. У людей, страдающих тиреотоксикозом и фибрилляцией предсердий, повышен риск тромбоэмболий и других эмболических осложнений [76].

Таким образом, выше представленные данные показывают важность нивелирования йододефицита у населения Российской Федерации с целью предотвращения прогрессирования количества граждан с йододефицитными заболеваниями (ЙДЗ), патологий щитовидной железы и сопутствующих осложнений в работе иных систем организма, а также увеличения численности пациентов, страдающих ЙДЗ. При этом, также важно применять подходы, позволяющие предотвратить избыточное потребление йода, способного стимулировать развитие йодиндуцированных дисфункций. В этой связи, ключевым аспектом в разработке подходов к устранению недостатка йода является понимание механизмов метаболизма микроэлемента в организме.

1.2. Метаболизм йода в организме человека

Йод, поступающий из пищи в неорганической форме, всасывается в желудке и верхних отделах кишечника в течение 30 минут, поступая в кровоток в форме йодид-иона [111,115]. Органический йод отщепляется от молекулы носителя в печени и поступает в кровь также в виде йодид-иона [15]. Впоследствии йод из плазмы поглощается щитовидной железой, либо выводится почками. При этом, клиренс микроэлемента почками стабилен, тогда как биотрансформация йода в железе имеет непостоянный характер. Поглощение йода щитовидной железой главным образом зависит от уровня его потребления и концентрации в плазме. Так, при достаточном потреблении йода, органом утилизируется не более 10%, а при низкой концентрации микроэлемента в организме, это значение может превышать 80% [155]. Сообщается, что более 90% микроэлемента в организме поступает в кровоток в виде йодида. Однако, в некоторых случаях метаболизма йодтирозинов, йодированная аминокислота поступает в кровоток без изменений. Данная особенность показана в работе [90] при исследовании переваривания йодированных молочных белков лабораторными животными. Результаты исследования отражают возможность всасывания йодтирозинов в желудочно-кишечном тракте в неизменном виде и накопления аминокислоты в мышечной ткани.

Натрий-йодный симпортер, обнаруженный в базальной мембране клеток щитовидной железы (тироцитов), активно транспортирует йодиды к клеткам щитовидной железы по градиенту концентрации в 20-50 раз выше, чем в плазме. Далее ионы йодида переносятся в коллоид переносчиками пендрином и апикальным транспортером йодида, где фермент тиреоидная пероксидаза (тиропероксидаза) в присутствии перекиси водорода на апикальной поверхности тироцита окисляют йодид до I^0 . Затем йод с участием тиреопероксидазы присоединяется к тирозильным остаткам (около 120 остатков) тиреоглобулина, синтезированного в грубой эндоплазматической сети и перенесенного в коллоид посредством экзоцитоза, образуя

монойодтирозин и дийодтирозин, являющимися предшественниками гормонов щитовидной железы. Тиропероксидаза и перекись водорода катализирует соединение фенольных групп йодтирозинов через диэфирный мостик, создавая гормоны щитовидной железы Т4 и Т3 [88]. Установлено, что процесс синтеза белков тиреоглобулина и тиропероксидазы, а также натрий-йодного симпортера регулирует тиреотропный гормон [115].

Весь комплекс транспортируется в фолликулярную клетку путем эндоцитоза в цитоплазму, в которой под влиянием различных протеаз высвобождаются молекулы тироксина и трийодтиронина, поступающие в кровь через транспортер монокарбоксилата. Т4 является основным секреторным продуктом щитовидной железы: его суточная секреция составляет примерно 80 мкг, тогда как Т3 секретируется в количестве примерно 4-6 мкг/день и в основном вырабатывается в результате превращения из Т4, который является прогормоном. В тканях Т4 дейодинируется в 5'-положении до Т3 при участии ферментов дейодиназы типа 1 или типа 2, или до метаболически неактивного обратного Т3 под влиянием дейодиназы типа 1 или типа 3 [151]. Йод выделяется обратно в плазму в результате тканевого разложения свободных форм гормонов щитовидной железы и может быть повторно трансформирован щитовидной железой в гормоны, а может быть выведен из организма естественным путем [132,155]. При этом, в условиях дефицита микроэлемента, йод из гормонального обмена более эффективно повторно используется щитовидной железой, чем при достаточном его потреблении, а клиренс эссенциального элемента почками, соответственно, снижается [153].

Помимо этого, ряд исследований [86,91,102] отражает участие других веществ и микроэлементов в метаболизме йода в организме. Так, мио-инозитол регулирует усвоение йода в организме и биосинтез гормонов щитовидной железы, посредством участия в регулировании активности тиреотропного гормона и выработке гормонов Т3 и Т4 [91]. Селен экспрессирует специфические селенопротеины (глутатионпероксидаза и йодтирониндейодиназа), принимающие участие в

адекватном функционировании щитовидной железы [102]. Цинк также играет важную роль в синтезе гормонов щитовидной железы, контролируя активность тиреотропн-рилизинг-гормона, дейодирования ферментов и синтез тиреотропного гормона. Цинк формирует структуры важнейших транскрипторных факторов, принимающих участие в синтезе тиреоидных гормонов [86].

Исходя из вышесказанного, йод выполняет ряд жизненно важных функций в организме человека, обеспечивая адекватную работу эндокринной системы. Особенно критична недостаточность потребления микроэлемента для беременных женщин и детей до 12 лет. В связи с этим вопрос нивелирования йодного дефицита посредством разработки новых эффективных подходов приобретает высокую значимость. Наиболее распространенным методом восполнения уровня йода является включение в диету пищевых продуктов и добавок с высоким содержанием микронутриента.

1.3. Мировая практика в борьбе с дефицитом йода

Йододефицитные заболевания являются одними из наиболее распространенных неинфекционных алиментарно-зависимых заболеваний, что объясняет коррекцию дефицита микроэлемента включением в рацион продуктов, содержащих высокие концентрации йода. Обогащение продуктов йодом также считается наиболее эффективным и экономически целесообразным решением для поддержания необходимого уровня нутриента в организме [77]. В связи с чем отечественными и зарубежными учеными разрабатываются различные добавки и технологии продуктов, обогащенных йодом [6,8,100].

В 1994 году ВОЗ призвала все государства внедрить программы всеобщего йодирования соли на законодательном уровне. Реализация масштабного распространения йодированной соли (с 1993 по 2019 гг) показала резкое сокращение числа стран, классифицируемых как йододефицитные: со 116 стран в 1993 году до 19 в 2019 году [71,137]. Так, национальные и международные медицинские

мониторинги, проводившиеся в 2016–2020 гг., оценивали медианные концентрации йода в моче у детей школьного возраста. Нормируемый диапазон, соответствующий достаточному потреблению йода, составляет 100–299 мкг/л. Результаты этих исследований показали, что благодаря программам всеобщего йодирования соли адекватный уровень потребления йода был достигнут в следующих странах: Армения (242 мкг/л), Беларусь (191 мкг/л), Северная Македония (236 мкг/л), Косово (148 мкг/л), Грузия (298 мкг/л), Сербия (187 мкг/л), Монте-Негро (173 мкг/л), Молдова (134 мкг/л), Киргизия (103 мкг/л), Албания (136 мкг/л) [80], Китай (207 мкг/л) [116], Канада (111 мкг/л) [121] и др. Однако, несмотря на значительный положительный эффект от употребления населением планеты йодированной соли, в ряде государств фиксируется как дефицит микроэлемента, так и его избыточное количество.

На Мадагаскаре уровень потребления йода характеризуется как самый низкий, поскольку программа йодирования соли была приостановлена ввиду политической нестабильности (53 мкг/л) [131]. Политическая и экономическая ситуации в Ираке способствовали нарушению внедрения и постоянного мониторинга йодного статуса населения, в связи с чем последние сведения об уровне потребления йода населением зафиксированы в 2012 году (92 мкг/л) [152]. Производство йодированной соли в Камбодже сократилось из-за недостаточного финансирования программы, следствием чего стало усугубление состояния вопроса дефицита йода. Во Вьетнаме снижение потребления йода возникло на фоне ослабления законодательства, обязывающего осуществлять обогащение всего объема реализуемой соли. Количество потребляемой йодированной соли в России варьируется в зависимости от региона, что приводит к различиям уровней потребления йода. В среднем по стране этот показатель составляет 78 мкг/л. [3,154]. В Норвегии медианное значение содержания йода в моче у молодых женщин (18–30 лет) снижено на фоне изменений в питании (включение в рацион заменителей продуктов животного происхождения, обедненные микро- и макронутриентами диеты) [106] и составляет 75 мкг/л [149], что на 25 мкг/л меньше нижнего порога нормы [18]. Кроме того, в результате мониторинга выявлены страны

с избыточным потреблением йода, обусловленным высокими концентрациями йода в питьевой воде и пище, среди которых Южная Корея (449 мкг/л), Джибути (335 мкг/л), Камерун (> 300 мкг/л), Гондурас (356 мкг/л) и Колумбия (407 мкг/л) [71,110].

Следует обратить внимание на тот факт, что Российская Федерация не вводила на законодательном уровне программы всеобщего йодирования соли. Однако, начиная с 1997 года, в различных регионах Правительство проводит мероприятия, направленные на ликвидацию йододефицита. Так, в период 2016–2018 гг были организованы региональные акции «Соль + йод IQ сэкономит», осведомляющие население о важности достаточного потребления микронутриента. При этом, в Рязанской и Тверской областях, Москве, Новосибирске, Магадане, Республике Алтай, а также на приморских территориях и территориях, далеких от моря, профилактические мероприятия не проводили [53]. В марте 2019 г. был разработан проект «О популяционной профилактике заболеваний, связанных с дефицитом йода», в рамках которого был создан проект Федерального Закона «О профилактике заболеваний, вызванных дефицитом йода». Данный проект подразумевает проведение профилактических действий по нивелированию дефицита путем повсеместного распространения пищевой соли, обогащенной йодатом калия. На данный момент проект находится на стадии устранения замечаний и последующего направления на рассмотрение в Правительство РФ [55].

Кроме того, с 2020 года в России в действие вступили СанПиН 2.3/2.4.3590-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации общественного питания населения», согласно которым для приготовления пищи в школьных столовых по всей стране обязательно использование йодированной соли [76]. Наряду с этим, в 2022 году Национальным медицинским исследовательским центром эндокринологии представлен проект Региональной целевой программы «Профилактика йододефицитных заболеваний на 202х–202х годы», целью которой является разработка и обеспечение функционирования системы профилактики, диагностики и лечения заболеваний, обусловленных дефицитом йода, на территории РФ [75].

Несмотря на повсеместное распространение программ йодирования соли, сообщается о недостатках добавки, таких как неорганическая форма йода, употребление которой на постоянной основе, даже в физиологических количествах, может привести к йодизму, риску возникновения токсических повреждений печени, почек и йодиндуцированной патологии ЩЖ [19,81]. Также, она противопоказана лицам, страдающим аутоиммунными поражениями, повышенной чувствительностью к йоду, имеющим злокачественные опухоли ЩЖ. Кроме вышеперечисленных негативных последствий, замена йодированной соли в рационе на другие пищевые продукты, обогащенные микроэлементом, является целесообразным ввиду того, что некоторая часть населения исключает соль из питания, также снижение потребление соли рекомендуется группам населения с нарушениями работы сердечно-сосудистой системы, в том числе гипертоникам [28,77]. При этом, в работе [146] отражен недостаточный уровень потребления йода с йодированной солью беременными и кормящими женщинами, которые особенно подвержены возникновению дефицита йода ввиду высокой потребности в микроэлементе. Однако в исследовании [133] показано, что при обогащении пищевой соли йодом в концентрации 25 мг/кг, кормящие матери и дети до двухлетнего возраста получают необходимое количество йода, что способствует формированию спорности данного вопроса. Кроме того, авторы работ [48,81,90] подчеркивают сниженный уровень утилизации йода из неорганических носителей, в сравнении с органической формой микроэлемента. В связи с этим учеными разрабатываются новые, более эффективные технологии различных добавок и продуктов, содержащих йод в органической форме [7,45,100].

Органическая форма представляет собой йод, связанный с высокомолекулярными носителями, в связи с чем процесс отщепления микроэлемента замедлен. При этом, нет риска передозировки, так как излишний органический йод без метаболических изменений выводится из организма естественным путем [65]. На российском рынке представлен широкий спектр добавок как растительного, так и животного происхождения, обогащенных йодом: препараты на основе морских

водорослей (например, БАД «Ламина Форте») [10,82], «Йодонорм» [62], «Биойод» [43], «Йод-гликозид», «Йодказеин», а также йодированные полисахариды (инулин, арабиногалактан, хитозан, пектин, декстрины, крахмалы, пищевые волокна пшеницы) [49], растительные белки (соя) и белки животного происхождения (коллагенсодержащие белки свиных шкур, гидролизированный эластин) [7,32,60,78,100]. Помимо пищевых добавок, на продовольственном рынке осуществляется продажа обогащенных йодом хлебобулочных и кондитерских [68,72,101,147], мясных [103] и молочных продуктов (питьевое молоко, творог, кефир, молочные консервы) [2,20,22,28-30,62]. Научно-исследовательскими институтами России (НИИ детского питания и ФГАНУ «ВНИМИ») разработан широкий ассортимент молочных продуктов, обогащенных препаратом йодированных сывороточных белков «Биойод»: продукт кисломолочный, бифидокефир, ряженка, ацидофилин, простокваша, варенец под торговой маркой «Истринский(ая) детский(ая)» для дошкольного и школьного питания, а также ассортимент хлебобулочных изделий для детей [43] и колбаса вареная «Детская» [77], а также молоко питьевое, обогащенное йодказеином и «Селексемом» [23].

Представленные выше пищевые добавки имеют ряд недостатков: длительность подготовки перед внесением в пищевой продукт, низкая растворимость, низкое удельное содержание йода, присутствие неорганических форм йода, отсутствие сопутствующих метаболизму йода веществ (например, цинка), а также возможные аллергические реакции [50,60,70]. Кроме того, обогащение молочных белков цинком является наиболее предпочтительным вариантом с точки зрения нутрициологии, поскольку существуют данные о его сниженной биологической активности и снижению всасывания в ЖКТ при связывании с другими макронутриентами (пищевые волокна, растительные компоненты) [148]. В этой связи, актуальным вопросом для специалистов отрасли остается разработка новых подходов в профилактике и нивелировании дефицита йода, в том числе технологий пищевых добавок с использованием органических иммобилизованных матриц (например, белковых

соединений) для эффективной коррекции йододефицитных состояний. При этом, необходимо определить механизм и условия связывания ионов микроэлементов с органическим субстратом в системе. Также немаловажным свойством полученного продукта являются его технологические свойства – устойчивость к высоким температурам, растворимость, отсутствие стимулирования аллергических реакций организма. Помимо этого, важным является выбор источника йода для обогащения субстрата, а также определение этапов внесения препаратов йода и цинка в систему субстрата для получения оптимальных условий обогащения и обеспечение достаточно высокой концентрации связанного микроэлемента.

1.4. Разработка новых подходов в профилактике и нивелировании дефицита йода

На основании данных о состоянии рынка йодсодержащих добавок и ряда их недостатков, рекомендациях по вопросу нивелирования йододефицитных состояний определены ключевые факторы, которые необходимо учесть при разработке новых подходов в терапии дефицита йода:

1. Применение органического носителя микроэлемента;
2. Дополнительное обогащение субстрата веществами, участвующими в метаболизме йода в организме;

3. Использование безопасных источников микроэлементов;

4. Технологическая устойчивость пищевой добавки.

Наиболее подходящими носителями для обогащения йодом являются органические соединения, в том числе белки. При этом, медицинское сообщество подчеркивает более эффективную терапию йододефицитных состояний при употреблении добавок и пищевых продуктов, содержащих не только органические формы микроэлемента, но и сопутствующие его метаболизму вещества, например, цинк [86]. Исходя из этого, перспективным сырьем для обогащения эссенциальными

микроэлементами являются сывороточные белки молока, ввиду наличия значительного количества аминокислотных остатков (глицин, пролин, аргинин, тирозин, фенилаланин, триптофан, метионин и др.), способных связывать йод и хелатировать цинк. Кроме того, α -лактальбумин (α -ЛА) и БСА, как сообщается в [127-128], содержат специфические сайты связывания двухвалентных металлов (KFLDDDLTDD для α -ЛА и ECCHGDLLECADDRA для БСА), что позволяет предположить возможное повышение степени хелатирования цинка сывороточными белками при направленной модификации фракционного состава субстрата посредством селективного разделения. При этом, важно подчеркнуть, что микроэлемент, связанный с белком, беспрепятственно выделяется из пептидной структуры при попадании в ЖКТ [104]. Одновременно с этим, применение сывороточных белков для проектирования новой пищевой добавки позволит расширить направления глубокой переработки молочного сырья, являющейся актуальной проблемой молочной отрасли [17,42].

Кроме того, в исследовании [90] отражена возможность повышения способности молочных белков связывать ионы йода при частичном гидролизе, что может быть ассоциировано с увеличением количества ионогенных групп и сорбционной активности [31]. Наряду с этим, авторами [148] сообщается о формировании металлкоординатных комплексов цинка с пептидами белков животного происхождения. Для подбора ферментного препарата или их комплексов на данный момент наиболее эффективным методом является биоинформатическое моделирование (*in silico*) [39,113]. При этом, в аспекте настоящего исследования ключевым фактором при выборе ферментов является получение пептидов с наибольшей потенциальной способностью к связыванию ионов йода и хелатированию цинка, в том числе сохранение сайтов связывания цинка для α -ЛА и БСА. В связи с этим, необходимо определение механизмов взаимодействия ионов микроэлементов с аминокислотными остатками белковых фрагментов.

Йод обладает специфическим распределением электронов, формирующих область анизотропного электрического потенциала вокруг атома, называемую « δ -hole» (δ -область). Исследованиями [139,141] белок-галогеновые взаимодействия рассматриваются как формирование галогеновой связи с участком « δ -hole» йода, поскольку считается, что именно эта зона способствует образованию нековалентных взаимодействий и реакционноспособных групп белковых соединений, боковые и главные цепи которых состоят из аминокислотных остатков, содержащих Льюисовские основания – S, O, N (карбонил, гидроксил, тиол, ароматическое кольцо, заряженный карбоксилат, группа фосфата или амин) [95,125]. При этом, отмечается, что кислород является наилучшим донором с высокой электронной плотностью, в сравнении с азотом, в особенности для галогенов с большим значением радиуса Ван-дер-Ваальса, таких как йод. Перечень аминокислотных остатков пептидной цепи представлен аланином (A), метионином (M), глицином (G), валином (V), треонином (T), аргинином (R). При этом, сообщается, что прочность галогеновой связи в комплексе йод-белок является самой высокой по отношению к другим галогенам [141]. Перечисленные функциональные участки белковой цепи дополняются в исследованиях [32,69,118] пролином (P), гистидином (H), а также аспарагиновой (D) и глутаминовой (E) кислотами. Для данных аминокислот авторы описывают модель взаимодействия йода с азотом NH_3^+ -группы.

Помимо галогеновых связей, йод способен формировать более прочные ковалентные взаимодействия с ароматическим кольцом аминокислот тирозина (Y), фенилаланина (F) и триптофана (W) [45,47,59,103,118]. Большаковой Л.С. с соавторами описан механизм ковалентного связывания иона йода с аминокислотными остатками ароматических аминокислот в молочных белках, основанный на встраивании галогена в молекулу и одновременным изменением отрицательного заряда на положительный (I^+) с образованием моно- или дийодпроизводных. Реакция в щелочной среде протекает благодаря наличию в молекуле аминокислоты гидроксильной группы, которая является сильным орто-пара-ориентантом,

способствующим протеканию процесса электрофильного замещения [15]. Однако авторами исследования [69] ставится под сомнение возможность присоединения йода к бензольному кольцу, поскольку данное взаимодействие не подтверждено результатами ИК-спектрометрического анализа. Несмотря на подобное утверждение, при прогнозировании связывания иона йода с фрагментами сывороточных белков, ароматические аминокислоты будут также включены в модель, поскольку строение йодированных белковых молекул, представленные в базе данных Protein Data Base, отражают потенциальную возможность формирования ковалентных связей.

Цинк обладает свойством формирования внутрикомплексных соединений (хелатов) с аминокислотными остатками белковых цепей. Способностью к связыванию металла обладают аминокислотные остатки, содержащие кислород, азот или серу, входящие в состав белковой цепи (свободные остатки цистеина (C), не задействованные в формировании дисульфидных связей, гистидин, пролин, серин (S)). В исследованиях [36,46,49,130] также подтверждаются свойства гистидина и цистеина к хелатированию ионов цинка. Мавлоновым Г.Т. с соавторами приведены аффинные свойства цинксодержащего сорбента на основе цинковой формы минерала бетонита по отношению к гистидин-богатым пептидам с применением коммерческих препаратов цинксвязывающих пептидов «Церебролизин» и рекомбинантного инсулина. Авторами показано, что насыщенные Zn^{2+} ионнообменные центры селективно связывали белковые компоненты, содержащие по два остатка аминокислот цистеина и гистидина («цинковые пальцы») [49]. Кутяков В. А. и Салмина А. Б. описали механизм хелатирования цинка цистеином на примере белков металлотioneинов, заключающийся в координации иона двухвалентного металла сульфгидрильными группами [46].

В работе [130] ученые описывают механизм формирования амилоидных агрегатов в мозге при прогрессировании болезни Альцгеймера, ключевую роль в которых играет цинк, связывающийся с боковыми группами одного аминокислотного остатка глутаминовой кислоты в положении 11, аминокислотного остатка аргинина в

5-ом положении и трех аминокислотных остатков гистидина в положениях 6, 13 и 14 полипептидной последовательности бета-амилоида человека. Участие остатков глутаминовой кислоты, наряду с аминокислотными остатками аспарагиновой кислоты, цистеина и метионина, в хелатировании двухвалентных металлов, в том числе цинка, подчеркивается в исследовании [129]. Согласно описанному механизму, в хелатировании цинка участвуют минимум две аминокислоты с двумя функциональными группами: кислород карбоксильной группы и азот аминной группы для глутаминовой кислоты, кислород гидроксильной группы и азот аминной группы для аспарагиновой кислоты, азот аминной группы и кислород карбоксильной группы для метионина. Следует обратить внимание на функциональные группы, участвующие в координации цинка, соответствующие координационному числу четыре, характерному для металла в комплексах с белками и обуславливающему его устойчивость [67].

Помимо вышеперечисленных аминокислот, авторами работы [69] отмечено формирование устойчивого хелатного комплекса цинка с четырьмя аминокислотными остатками R при участии четырех атомов азота аминных групп, находящихся в молекуле кислоты рядом с карбоксильной группой. Кроме R учеными также рассмотрены варианты хелатирования металла аспарагиновой, глутаминовой кислотами и фенилаланином по такой же схеме, как в случае с аргинином. Согласно данным, приведенным в исследовании [27], комплексы цинка с аминными группами аргинина обладают бóльшим значением энергии связи, чем комплексы с азотом фенилаланина, глутаминовой и аспарагиновой кислот. Несмотря на меньшие значения энергии связи, данные аминокислотные остатки будут учитываться при *in silico* моделировании направленного гидролиза сывороточных белков ввиду способности хелатировать цинк, в том числе в комплексе с другими аминокислотными остатками. Кроме того, следует обратить внимание на противоречие данных в работах [129] и [27] в аспекте функциональных групп, участвующих в хелатировании цинка для глутаминовой и аспарагиновой кислот, в связи с чем можно предположить

вероятность участия не только аминного азота, но и кислорода карбоксильной группы в хелатировании цинка аргинином и фенилаланином.

При этом, важно подчеркнуть высокую биодоступность хелатов цинка для организма человека, даже при условии нарушения метаболических процессов [140]. Биодоступность неорганических и органических форм микроэлемента главным образом отличается ввиду способности неорганического цинка формировать нерастворимые соединения с компонентами пищевых продуктов (фитатами, оксалатами и др.), которые не перевариваются в ЖКТ, не высвобождая тем самым ион цинка для дальнейшего транспортирования его белками-переносчиками в ткани [138]. Кроме того, в исследовании [82] показана устойчивость координационных соединений с биолигандами и высокая аффинность взаимодействия с белками катионов Zn^{2+} . Помимо этого, в работах [85,96] сообщается о способности короткоцепочечных (2-13 аминокислотных остатка) отрицательно заряженных (за счет содержания в них аминокислотных остатков D и E) пептидов хелатировать атомы цинка. Подтверждение этому также представили Shi Y. с соавторами [138], описывая в работе коммерческие органические формы цинка: цинк-метионин и цинк, связанный с короткоцепочечными пептидами (RPNHPLK-Zn, RPNHPLSHDL-Zn, LDRLE-Zn и др.) из разного сырья. Эти данные позволяют предположить потенциальную прочность хелата металла, формируемого с аминокислотными остатками белковых гидролизатов сывороточных белков.

Не менее важными факторами при разработке пищевого ингредиента, обогащенного йодом и цинком, являются подбор безопасного источника йода и цинка, а также определение последовательности и условий внесения препаратов микроэлементов в систему для обеспечения максимально возможной степени связывания ионов. По литературным данным наиболее подходящими источниками йода и цинка являются смесь йодида калия и кристаллического йода и сульфат цинка [69]. Кроме того, полученная добавка должна обладать устойчивостью к воздействию термомеханических факторов в условиях производственной среды, сохранять

свойства при хранении как добавки, так и обогащенного добавкой продукта. В работе [82] описана устойчивость белковых веществ, обогащенных йодом, объясняющаяся формированием прочной ковалентной связи C-I, которая при этом беспрепятственно разрывается в процессе переваривания пищевой добавки в организме человека.

Представленные данные однозначно характеризуют белки молочной сыворотки как перспективные носители микронутриентов ввиду большого количества аминокислотных остатков, способных потенциально связать йод и хелатировать цинк. В этой связи представляет интерес оценка потенциала различных видов сыворотки как носителей йода и цинка. Для моделирования теоретических расчетов по связыванию ионов цинка и йода были использованы физико-химические данные (таблица 1.2), опубликованные коллективом авторов ранее в [114], дополненные в соответствии с разработанной классификацией молочных сывороток на основе интегративного подхода [41]. По результатам теоретических расчетов на основе содержания в сыворотках аминокислот, потенциально связывающих йод и цинк, было установлено, что наиболее подходящими субстратами являются сыворотки, полученные в результате сычужной и кислотнo-сычужной коагуляции белков молока при производстве сыра (таблица 1.3).

Таблица 1.2 – Физико-химический состав сывороток в соответствии с предложенной классификацией [41,114]

Наименование показателя	Вид сыворотки								
	MF-CNW	RC-CHW	RC-CNW	A/RC-CTW	A/RC-CHW	AC-CTW	AC- CNW	TAC- CHW	TCC-CPW
М.д. сухих веществ, %	6,51±0,20	7,04±0,15	6,91±0,18	6,19 ± 0,21	6,69 ± 0,19	6,13 ± 0,16	6,61±0,15	7,04 ± 0,22	6,65 ± 0,21
Активная кислотность, ед. рН	6,41±0,07	6,39 ± 0,05	6,42±0,07	5,14 ± 0,05	5,81 ± 0,02	4,55 ± 0,05	4,32±0,03	5,45 ± 0,06	6,82 ± 0,04
М.д. общего белка, %	0,62±0,06	0,92 ± 0,07	0,87±0,07	0,47 ± 0,05	0,83 ± 0,09	0,55 ± 0,05	0,67±0,06	0,30 ± 0,06	0,24 ± 0,02
М.д. β-ЛГ, %	0,29±0,02	0,36±0,04	0,33±0,02	0,24 ± 0,05	0,36±0,03	0,30 ± 0,02	0,32±0,02	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,02
М.д. α-ЛА, %	0,13±0,01	0,15±0,02	0,11±0,02	0,10 ± 0,03	0,16±0,02	0,12 ± 0,01	0,14±0,01	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,03
М.д. БСА, %	0,047±0,005	0,034±0,004	0,036±0,004	0,033 ± 0,005	0,038±0,005	0,021 ± 0,003	0,029±0,003	0,007 ± 0,002	0,005 ± 0,001
М.д. лактозы, %	4,52±0,13	5,03 ± 0,17	5,05±0,12	4,04 ± 0,18	4,46 ± 0,15	3,71 ± 0,19	4,74±0,11	5,21 ± 0,18	5,28 ± 0,12
М.д. минеральных веществ, %	0,56±0,03	0,51 ± 0,02	0,49±0,03	0,61 ± 0,02	0,53 ± 0,04	0,67 ± 0,04	0,72±0,03	0,64 ± 0,04	0,57 ± 0,05
Содержание Са, мг/100 г	50,12±2,30	54,32 ± 3,44	51,39±2,21	78,15 ± 2,92	66,31 ± 2,36	90,98 ± 2,72	108,48±3,63	85,36 ± 3,31	63,05 ± 2,91

М.д. – массовая доля;

MF – микрофльтрация; AC – кислотная коагуляция; RC – сычужная коагуляция; A/RC – кислотно-сычужная коагуляция; TAC – термокислотная коагуляция; TCC – термокальциевая коагуляция;

CNW – казеиновая сыворотка; CHW – подсырная сыворотка; CTW – творожная сыворотка; CPW – копреципитатная сыворотка.

Таблица 1.3 – Теоретическая концентрация максимально возможного связывания ионов цинка и йода с основными белками молочных сывороток (α-ЛА, β-ЛГ, БСА)

Наименование показателя	Вид сыворотки								
	MF-CNW	RC-CHW	RC-CNW	A/RC-CTW	A/RC-CHW	AC-CTW	AC- CNW	TAC- CHW	TCC-CPW
Цинк, мг/100 г сыворотки	2,25	2,62	2,30	1,80	2,69	2,12	2,36	0,56	0,60
в т.ч. α-ЛА	0,61	0,71	0,52	0,47	0,75	0,56	0,66	0,28	0,33
β-ЛГ	1,41	1,75	1,60	1,17	1,75	1,46	1,55	0,24	0,24
БСА	0,23	0,17	0,18	0,16	0,19	0,10	0,14	0,03	0,02
Йод, мг/100 г сыворотки	32,27	37,57	32,98	25,79	38,52	30,46	33,75	7,95	8,47
в т.ч. α-ЛА	8,53	9,85	7,22	6,56	10,50	7,88	9,19	3,94	4,60
β-ЛГ	20,37	25,29	23,18	16,86	25,29	21,07	22,48	3,51	3,51
БСА	3,37	2,44	2,58	2,37	2,72	1,51	2,08	0,50	0,36
α-ЛА-Тур*	0,492	0,567	0,416	0,378	0,605	0,454	0,529	0,227	0,265
β-ЛГ-Тур	0,772	0,958	0,878	0,639	0,958	0,798	0,852	0,133	0,133
БСА-Тур	0,168	0,121	0,129	0,118	0,136	0,075	0,104	0,025	0,018
Фактор концентрирования сыворотки до содержания основных фракций белка 1 г/100 г (УФ-10 кДа)	2,1	1,8	2,1	2,6	1,8	2,3	2,0	8,5	8,0

*- концентрация йода, которая может связаться со всеми тирозиновыми остатками сывороточных белков.

Помимо этого, есть основания полагать, что модификация фракционного состава белковой матрицы путем повышения содержания α -лактальбумина может способствовать повышению уровня хелатирования цинка, поскольку белок является носителем специфического сайта связывания двухвалентных металлов. Кроме того, химические связи соединений с биолигандами являются прочными, что позволяет предполагать получение необходимой технологической устойчивости разрабатываемой пищевой добавки. Биологическая доступность подобной иммобилизованной матрицы также является высокой, в том числе при условии метаболических нарушений в организме человека. При этом, сывороточные белки являются органическими веществами, употребление которых в качестве пищевой добавки, обогащенной эссенциальными микроэлементами, не способно привести к их избыточному уровню в плазме крови [65].

Заключение к Главе 1

В главе проведен анализ современного состояния проблемы йододефицита в России и мире, свидетельствующий о его широкой распространенности и значимых последствиях недостатка йода в организме для здоровья, особенно для наиболее уязвимых групп населения: дети, беременные и кормящие женщины. Несмотря на предпринимаемые мировым сообществом меры по борьбе с недостаточным потреблением йода, сохраняется актуальность разработки более эффективных алиментарных средств устранения дефицита микронутриента.

На основе анализа рынка йодированных пищевых продуктов и добавок сформулирован перечень факторов, которые необходимо учитывать при разработке новых подходов к предупреждению йододефицитных состояний: использование в производстве органических субстратов для обогащения эссенциальными микронутриентами и безопасных источников микроэлементов (йодид калия, сульфат цинка); обогащение матрицы не только йодом, но и веществами, участвующими в

метаболизме йода в организме (например, цинк, селен, мио-инозитол). Кроме того, пищевой ингредиент должен обладать высокой устойчивостью к технологическим нагрузкам при условии ее использования в производстве пищевой продукции.

Сформированный перечень факторов, оказывающих влияние на эффективность действия алиментарных подходов в профилактике дефицита йода, позволяет рассматривать белки молочной сыворотки в качестве перспективного носителя эссенциальных микроэлементов. Это обосновано большим количеством аминокислотных остатков в пептидной последовательности, способных связывать йодид-ионы (A, M, G, V, T, R, P, H, D, E, Y, F и W) и хелатировать цинк-ионы (C, H, P, D, E, R, M, F). Проведены теоретические расчеты потенциала молочных сывороток (CNW; CHW; CTW; CPW) полученных в ходе различных технологических процессов (MF; AC; RC; A/RC; TAC; TCC), к связыванию ионов цинка и йода и определено, что наиболее подходящими субстратами являются сыворотки, полученные в результате микрофльтрации при производстве казеина, а также сычужной и кислотной коагуляции белков молока при производстве сыра. Определена потенциальная возможность повышения степени связывания микроэлементов с сывороточными белками при проведении процесса частичного гидролиза ввиду высвобождения большего количества реакционноспособных групп. Важным фактором также является высокая биодоступность йода и цинка, соединенных с биолигандами, а также их устойчивость к технологическим факторам (температура, pH и т.д.) ввиду формирования прочных химических связей.

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Организация исследований и схема проведения экспериментов

Экспериментальная и теоретическая части работы выполнены на базе Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ») в лаборатории Технологий биотрансформации и консервирования», в испытательной лаборатории «Молоко» и в лаборатории Прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов. Часть исследований проведена на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ЦКП «Протеом человека»). Исследования включали три этапа, на каждом из которых выполнен ряд задач для достижения цели работы, общая схема представлена на рисунке 2.1.

Первый этап (аналитический) подразумевал описание современного состояния проблемы дефицита йода; оценку разнообразия существующих обогащенных йодом пищевых добавок и продуктов, методов коррекции йододефицитных состояний; составление перечня факторов, оказывающих ключевое влияние на эффективность разработки новых алиментарных средств для борьбы с дефицитом йода.

Второй этап (экспериментальный) предполагал исследование принципов термоселективного фракционирования сывороточных белков и изучение роли комплексообразователей в этом процессе; определение закономерностей хелатирования цинка модифицированной матрицей сывороточных белков; осуществление биоинформатического моделирования направленного гидролиза белков и оптимизацию протеолиза подобранным ферментным препаратом или комплексом ферментных препаратов; установление кинетики связывания йода с сывороточными белками и их гидролизатами, обогащенными цинком; выявление рациональных условий баромембранной очистки субстрата от неорганических примесей микроэлементов.

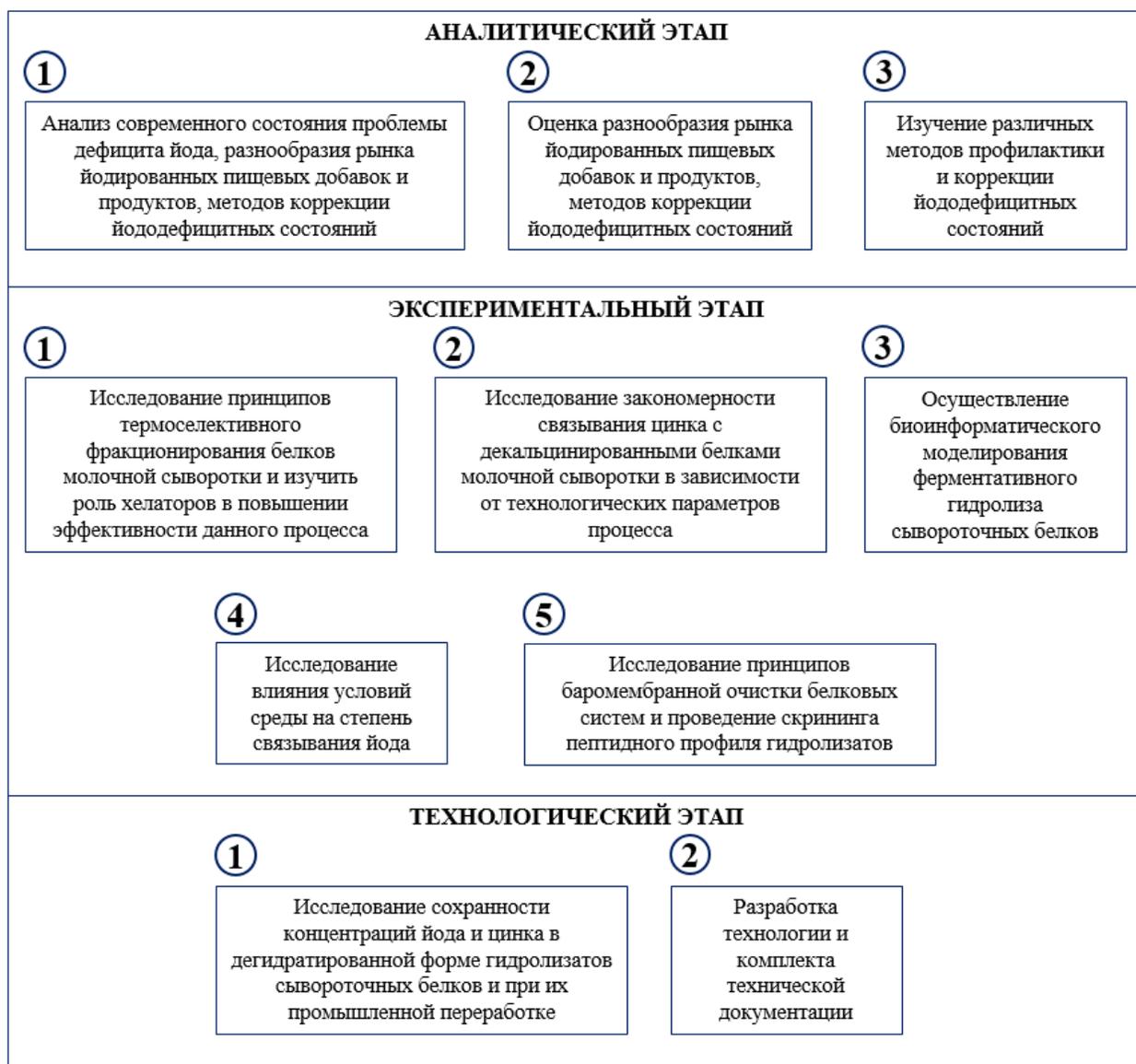


Рисунок 2.1 – Схема проведения исследований

Третий этап (технологический) заключался в определении устойчивости органических форм микроэлементов при их промышленной переработке (гомогенизации, пастеризации и сквашивании); апробации результатов работы на предприятиях молочной отрасли.

2.2. Объекты исследований

На разных этапах исследований объектами являлись: нативные и термоденатурированные сывороточные белки, а также их гидролизаты, обогащенные

йодом и цинком; сухие обогащенные ГСБ; информация о субстратной специфичности пепсина (ЕС 3.4.23.1), протеиназ Р1 (КФ 3.4.21.96) и К (КФ 3.4.21.64), химотрипсина А (КФ 3.4.21.1), панкреатической эластазы (КФ 3.4.21.36), фицина (КФ 3.4.22.3), стим бромелайна (КФ 3.4.22.32), термолизина (КФ 3.4.24.27), папаина (КФ 3.4.22.2), субтилизина (КФ 3.4.21.62), коколизина (КФ 3.4.24.30), химазы (КФ 3.4.21.39), трипсина (КФ 3.4.21.4); коммерческий ферментный препарат панкреатического трипсина (Новозаймс, Дания); вспомогательное сырье и материалы.

2.3. Методы исследований

Для реализации поставленных задач применяли стандартизованные для молочной отрасли методы исследований, а также методики из смежных отраслей пищевой промышленности, адаптированные для объектов исследования. Лабораторные исследования выполняли с применением современной научно-методической и приборной базы, все реактивы характеризовались степенью чистоты не менее 99%, не ниже марки «ч.д.а.», что позволило получить высокую точность, достоверность и воспроизводимость результатов.

2.3.1. Стандартизованные методы исследований

Выполнение работы включало в себя стандартизованные физико-химические методики анализа, представленные в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Стандартизованные методы исследований

№	Наименование показателя	Принцип метода	Библиографическая ссылка
1	2	3	4
1	Отбор проб и подготовка их к испытанию	Методология отбора и подготовка проб к анализу	ГОСТ 26809.1-2014 ГОСТ 31904-2012
2	Массовая доля общего азота	Метод измерения массовой доли общего азота по методу Кьельдаля на Kjeltec-2400 Auto Analyzer (Foss Electric, Дания)	ГОСТ 34454-2018
3	Массовая доля сухих веществ	Метод основан на высушивании навески образца при $(102 \pm 2)^\circ\text{C}$	ГОСТ Р 54668-2011

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4
4	Активная кислотность	Потенциометрический метод определения концентрации ионов водорода с помощью лабораторного рН-метра inoLab pH Level 1 (WTW, Германия)	ГОСТ 32892-2014
5	Органолептический анализ	Рекомендуемые методы органолептической оценки молока и молочных продуктов	ГОСТ Р ИСО 22935-2-2011
6	Методы микробиологического анализа	Рекомендуемые методы микробиологического анализа для молока и молочной продукции	ГОСТ 32901-2014
7	Определение дрожжей и плесневых грибов	Метод основан на культивировании микроорганизмов на плотной питательной среде и детектировании видимых характерных колоний на 3-5 сутки при температуре (24±1)°C или (30±1) °C	ГОСТ 33566-2015
8	Определение бактерий рода <i>Salmonella</i>	Метод выявления микроорганизмов в определенной массе или объеме исследуемого продукта	ГОСТ 31659-2012
9	Определение <i>Staphylococcus aureus</i>	Метод выявления микроорганизмов в определенной массе или объеме исследуемого продукта – с предварительным обогащением и без него	ГОСТ 30347-2016
10	Обоснование сроков годности	Алгоритм испытаний и перечень контролируемых показателей для обоснования сроков годности пищевой продукции	МУК 4.2.1847-04

2.3.2. Общепринятые и адаптированные методы исследований

Анализ периодической научной литературы, соответствующей теме исследования, проведен с использованием наукометрических баз данных ScholarGoogle (<https://scholar.google.com/>), Elibrary (<https://elibrary.ru/>), CyberLeninka (<https://cyberleninka.ru/>), ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>) и PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Google Patents (<https://patents.google.com/>) по ключевым словам: «iodine deficiency», «дефицит йода», «iodine deficiency diseases», «йододефицитные заболевания», «amino acid-iodine interaction», «взаимодействие

йода с аминокислотами», «whey production», «производство сыворотки», «protein hydrolysis», «гидролиз белков», «zinc chelation», «хелатирование цинка».

Биоинформатическое моделирование направленного гидролиза (*in silico*) проводили с использованием протеомных баз данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>), BIOPEP UWM (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>), ToxinPred (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/>). Информацию о аминокислотной последовательности сывороточных белков получена баз данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и Uniprot (www.uniprot.org). Моделирование гидролиза аминокислотных последовательностей ферментами с разной протеолитической активностью осуществляли с использованием биоинформатических инструментов BIOPEP-UWM (www.biochemia.uwm.edu.pl) [40].

Фракционный состав матриц сывороточных белков определяли по методу Леммли с использованием электрофорезной камеры Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США) в 12,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) с последующей денситометрией интенсивности окрашивания (кумасси бриллиантовый синий R-250) дорожек [57]. По интенсивности окрашивания белковых пятен определяли приблизительное содержание α -ЛА и β -ЛГ с применением программного обеспечения ImageJ в соответствии с Методическими рекомендациями по анализу результатов одно- и двумерных электрофореграмм «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН [61] с дальнейшим расчетом массовой доли фракции относительно массовой доли общего азота супернатанта. В качестве эталона молекулярной массы белка (5-200 кДа) использовали стандарты Prestained Protein Marker IV (Servicebio, Китай).

Для определения присутствия фосфатов в белковом осадке (после их фракционирования в присутствии хелатора кальция) использовали качественную реакцию на фосфат-ионы с азотнокислым серебром, описанную в ГОСТ 31725-2012 (п. 7.4.3).

Концентрацию цинка, связанного с белковыми компонентами, в рутинных лабораторных исследованиях определяли колориметрическим методом согласно ГОСТ 18293-72 с модификацией в части пробоподготовки. Обогащенные белки подвергали озолению в муфельной печи при 550°C в течение 4 часов, для перевода органической формы микроэлемента в неорганическую, с последующим растворением золы в 100 мкл соляной кислоты (концентрированная соляная кислота : вода – 1:1). Далее определение массовой доли цинка проводили по вышеупомянутой методике на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Санкт-Петербург). Для образцов с наибольшей концентрацией органически связанного цинка производили контрольные измерения с применением метода определения массовой доли цинка с помощью оптической эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ICP-OES) по ГОСТ 34633-2020 на приборе Agilent 5110 ICP-OES (Agilent Technologies, Малайзия).

Массовую долю йода, связанного с белковыми компонентами, определяли колориметрическим методом согласно ГОСТ 26185-84 на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Санкт-Петербург).

Степень гидролиза оценивали спектрофотометрическим методом согласно протоколам, описанным в [84,143], на спектрофотометре-флуориметре Feuond-A400 (Allsheng, Китай) с применением реактива TNBS (2,4,6-тринитробензолсульфоная кислота), специфически реагирующего с первичными аминогруппами с образованием хромофора с максимумом поглощения при длине волны 340 нм. Степень гидролиза (DH) рассчитывают по формуле 2.1:

$$DH = \frac{\frac{(D_{\text{ФПИ}}^{340} - D_{\text{хол.проба}}^{340}) * 30}{F} - \frac{(D_{\text{сырье}}^{340} - D_{\text{хол.проба}}^{340}) * 6}{F}}{\frac{(D_{\text{КГ-ФПИ}}^{340} - D_{\text{хол.проба}}^{340}) * 133,33}{F} - \frac{(D_{\text{сырье}}^{340} - D_{\text{хол.проба}}^{340}) * 6}{F}} * 100, [\%], \quad (2.1)$$

где: $D_{\text{ФПИ}}^{340}$ – величина оптической плотности в образце гидролизата при 340 нм;

$D_{\text{хол.проба}}^{340}$ – величина оптической плотности в холостой пробе при 340 нм;

30 – фактор разбавления гидролизата;

F – тангенс угла наклона калибровочного графика зависимости оптической плотности раствора при 340 нм от концентрации стандарта в пробе;

$D_{\text{сырье}}^{340}$ – величина оптической плотности при 340 нм в пробе сырья;

b – фактор разбавления сырья;

$D_{\text{КГ-ФПИ}}^{340}$ – величина оптической плотности в образце со 100% степенью гидролиза при 340 нм;

133,33 – фактор разбавления образца со 100% степенью гидролиза.

Общее содержание свободных аминокислот в гидролизатах определяли спектрофотометрическим методом согласно [94]. Метод основан на реакции аминогрупп α -аминокислот с 2,4-динитрофторбензолом (DNFB) и последующем детектировании флуоресценции комплекса динитрофенил (DNF)-аминокислота при 420 нм на спектрофотометре-флуориметре Feyond-A400 (Allsheng, Китай). Общее содержание аминокислот (САК) рассчитывают по формуле 2.2:

$$\text{САК} = \frac{(D_{\text{образец}}^{420} - D_{\text{контроль}}^{420}) * 10}{F}, \quad (2.2)$$

где: $D_{\text{контроль}}^{420}$ – величина оптической плотности при 420 нм в контроле;

$D_{\text{образец}}^{420}$ – величина оптической плотности при 420 нм в исследуемом образце;

10 – фактор разбавления исходного образца;

F – тангенс угла наклона калибровочного графика зависимости оптической плотности от концентрации стандарта в пробе.

Горечь гидролизатов сывороточных белков оценивали органолептически в соответствии с методикой [142]. Готовили 100 мл водного раствора исследуемого образца с содержанием 2,4 г гидролизата (в эквиваленте массовой доли общего азота) и определяли горечь в сравнении со стандартными разведениями кофеина, сопоставимыми с 0, 25, 50, 75 и 100% горечью.

Определение пептидного профиля гидролизатов и детектирование ковалентного связывания ионов йода осуществляли с использованием

хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano («Thermo Scientific», США), соединенной с масс-спектрометром Q-exactive HF («Thermo Scientific», США), согласно методике [66]. Перед проведением анализа в образцах обогащенного и необогащенного гидролизата проводили обессоливание и очистку с применением наконечника Pierce™ C18 Tips 100 мкл (Thermo Fisher Scientific, США). Затем 1 мкл пептидной смеси вносили на обогащающую колонку Acclaim μ -Precolumn (0,5 мм × 3 мм, размер частиц – 5 мкм, Thermo Scientific) при скорости потока 15 мкл/мин в течение 1,5 мин в изографическом режиме с использованием буфера «С» (2% раствор ацетонитрила и 0,1% водный раствор муравьиной кислоты) в качестве элюента. Основное разделение белковых фрагментов проходило на ВЭЖХ колонке Peaky Efficiency (100 мкм × 30 см, размер частиц – 1,9 мкм) (Molecta, Россия) в режиме градиентной элюции. Градиент формировали с использованием подвижной фазы «А» (0,1% раствор муравьиной кислоты) и «Б»: (80% раствор ацетонитрила и 0,1% водный раствор муравьиной кислоты) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Начальная стадия процесса включала промывку колонки 2%-ой подвижной фазой «Б» в течение 10 мин, после чего проводили загрузку образца на обогащающую колонку в течение 1,5 мин с постепенным линейным увеличением концентрации подвижной фазы «Б» до 35% в течение 75 мин, затем линейно увеличивали до 99% в течение 4 мин, далее осуществляли процедуру промывки в течение 5 мин, после чего концентрацию линейно снижали до исходных 2% в течение 4,5 мин. Общая длительность анализа составляла 90 мин [66].

Масс-спектрометрический анализ полученных пептидов проводили в режиме положительной ионизации на масс-спектрометре Q-Exactive HF-X с использованием источника NESI («Thermo Scientific», США). Использовали следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 2,1 кВ, температура капилляра 240°C. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс 300-1500 m/z, при разрешении 60,000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15000 в диапазоне масс от 130 m/z до верхней границы, которая определяется автоматически, исходя из массы

прекурсора. Окно изоляции прекурсоров ионов соответствовало ± 1 Да, граница отсечения для выбора прекурсора для тандемного анализа – 5×10^5 ед., нормализованная энергия соударения – 29, максимальное число разрешённых для изоляции ионов в режиме MS2 – не более 20. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от $z = 2+$ до $z = 5+$ по зарядному состоянию. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов 25 мс. Величину автоматической регулировки усиления для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали 1×10^6 и 1×10^5 соответственно. Повторное сканирование измеренных прекурсоров исключали из тандемного MS/MS анализа на 40 с [66].

Идентификацию пептидов осуществляли с использованием программного обеспечения MaxQuant v. 2.0.3.0 и поискового алгоритма Andromeda. Для идентификации белков использовали базу данных протеома человека в UniProtKB (UP000005640). Поисковые параметры имели следующие характеристики: протеаза – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов – ± 5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS – ± 20 ppm, возможность пропуска двух сайтов расщепления трипсином. Окисление метионинов, ацетилирование N-конца белка были учтены как возможные модификации пептидов. Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM (Peptide-Spectrum Matches), идентификации пептидов и идентификации белков использовали величину FDR (False Discovery Rate) не более 1% [66].

Определение термостойчивости по тепловой пробе проводили на приборе УКТ-150 (ФГАНУ «ВНИМИ», Россия), согласно [12] при $95 \pm 2^\circ\text{C}$ (с выдержкой от 1 до 90 минут) и $137 \pm 2^\circ\text{C}$ (с выдержкой от 1 до 15 минут) в кислой (pH 4,5) и нейтральной (pH 6,8) среде. Для определения термостойчивости гидролизатов использовали их водные растворы с массовой долей общего азота 3%. Детектирование денатурации гидролизатов сывороточных белков осуществляли на микроскопе «МИКМЕД-6» с камерой МС-8,3 (АО «ЛОМО», Россия), как описано в работе [40].

Смачиваемость определяли по методу изменения краевого угла смачивания (КУС) «лежащей капли» во времени [37] на анализаторе DSA25 (Krüss, Германия). Согласно методики, из образца сухого гидролизата формировали слой толщиной 5 мм с ровной поверхностью без лишнего уплотнения, на его поверхность наносили каплю дистиллированной воды (10 мкл), фиксировали начальные значения КУС и продолжительность снижения КУС до 0° (полное смачивание).

Растворимость гидролизатов сывороточных белков определяли в диапазоне pH 4-7 с интервалом 1 ед. pH по методу [124]. 2,6 г образца растворяли в 27,4 мл деионизированной воды. pH регулировали с использованием 0,1 М растворов соляной кислоты и гидроксида натрия. Полученную смесь гомогенизировали при температуре (40±2)°С с применением погружного лабораторного гомогенизатора САТ Х120 с насадкой Т10 (Ingenieurburo САТ М.Zipperer GmbH, Германия) при 10000 об/мин в течение 5 мин. Восстановленную смесь центрифугировали при 6000 g в течение 15 мин на центрифуге ОПН-8 (ОАО «ТНК «Дагестан», Россия), после чего определяли массовую долю общего азота в образце и фугате [40]. Растворимость рассчитывали по формуле 2.3:

$$\text{Растворимость} = \frac{\text{общий азот в фугате}}{\text{общий азот в образце}} * 100, [\%] \quad (2.3)$$

2.3.3. Планирование эксперимента и статистическая обработка данных

Планирование экспериментов по оптимизации исследуемых процессов, последующий анализ данных и их визуализации осуществляли с использованием пакета программ «Statistica 2010» (Statsoft, США) и «Microsoft Excel» (Microsoft, США). Статистическую обработку массивов данных проводили с использованием интерактивной среды разработки RStudio (Posit Software, США). Измерения и исследования проводили в 3-5 повторностях с последующим определением стандартного отклонения (±) и последующего статистического анализа для

подтверждения воспроизводимости результатов и их достоверности. На графиках стандартное отклонение представлено в виде относительных величин, выраженных в процентах от среднего значения. Надстрочные буквы (a-f) обозначают значимость различий между полученными результатами. За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВОЙ МАТРИЦЫ И ХЕЛАТИРОВАНИЯ ЦИНКА

3.1. Исследование процесса селективного фракционирования белков молочной сыворотки

В работе сформирована гипотеза о необходимости повышения в белковом субстрате концентрации α -лактальбумина, содержащего сайт связывания двухвалентных металлов, для увеличения степени хелатирования цинка. Селективное фракционирование сывороточных белков и, в частности, α -ЛА в молочной отрасли осуществляют с применением комплексных подходов, основанных на индивидуальных особенностях белков, таких как изоэлектрическая точка и термолабильность, молекулярная масса, способность к образованию димеров и ренатурации и пр. [150]. Так, для разделения молочных белков описаны технологии мембранного и хроматографического фракционирования [26], направленного гидролиза одной из фракций протеазами с ограниченной субстратной специфичностью, осаждение отдельных белков под действием температуры, кислотности, солей-дестабилизаторов [26,57,117], водной двухфазной флотации [108], обработки молочной сыворотки высоким давлением [134]. Представленные выше подходы к селективному разделению белков имеют ряд недостатков, не позволяющих применить их для фракционирования α -ЛА. Так, например, мембранные технологии, хотя и считаются наиболее «чистыми» для фракционирования различных веществ, не позволят выделить α -лактальбумин из сыворотки из-за относительной схожести молекулярных масс с β -лактоглобулином (14 и 18 кДа соответственно) [117]. Использование методов ионообменной хроматографии и хроматографии гидрофобного взаимодействия для разделения белковых фракций сыворотки является нецелесообразным из-за их высокой

стоимости [26,57]. Применение методики двухфазной флотации по [108] является трудо- и времязатратным процессом, поскольку выделение белка происходит с использованием газообразного азота, специализированного оборудования и различных реактивов (ПЭГ-1000, тринатрийцитрат, лимонная кислота и пр.), что требует дополнительных подготовительных действий. В этой связи, в качестве наиболее релевантного метода выделения α -лактальбумина выбрано селективное термокислотное осаждение с последующей ренатурацией белка для иммобилизации эссенциальных микронутриентов. Для исследования процесса фракционирования сывороточного белка с использованием пакета программ «Statistica 2010» (Statsoft, США) сформирован полный факторный план с четырьмя переменными параметрами: массовая доля белка (X_1), температура (X_2), pH (X_3), продолжительность (X_4). Каждый из параметров варьировался на трех уровнях (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Уровни вариации независимых параметров при многофакторных экспериментах по оптимизации условий селективной термоденатурации белка

Параметр	Переменная	Уровень варьирования		
		-1	0	1
Массовая доля белка, %	X_1	1	3	5
Температура, °С	X_2	45	65	85
Активная кислотность, ед. pH	X_3	3	6	9
Продолжительность, мин	X_4	30	75	120

В соответствии с полным факторным планом эксперимента была сформирована матрица эксперимента, включающая в себя 81 комбинацию варьируемых параметров, и проведена оптимизация (таблицы 3.2-3.3, рисунок 3.1) Функция желательности оптимизации сформирована исходя их максимального значения содержания в осадке α -ЛА и минимального значения содержания β -ЛГ. Результаты статистической оценки влияния варьируемых факторов на массовую долю фракций сывороточных белков представлены в таблицах 3.2-3.3.

Таблица 3.2 – Влияние варьируемых факторов на степень термоденатурации α -ЛА

Фактор	Эффект	Ст. откл.	t(66)	p	-95,%	+95,%
Сред/Св.член	0,663	0,030	21,851	0,000	0,602	0,723
X ₁ (L)	0,891	0,074	11,992	0,000	0,742	1,039
X ₁ (Q)	-0,047	0,064	-0,734	0,465	-0,176	0,081
X ₂ (L)	-0,520	0,074	-7,006	0,000	-0,669	-0,372
X ₂ (Q)	0,073	0,064	1,131	0,262	-0,056	0,201
X ₃ (L)	0,365	0,074	4,912	0,000	0,217	0,513
X ₃ (Q)	0,078	0,064	1,218	0,228	-0,050	0,207
X ₄ (L)	-0,109	0,074	-1,471	0,146	-0,258	0,039
X ₄ (Q)	-0,051	0,064	-0,786	0,435	-0,179	0,078
X ₁ (L) на X ₂ (L)	-0,532	0,091	-5,850	0,000	-0,714	-0,351
X ₁ (L) на X ₃ (L)	0,417	0,091	4,586	0,000	0,236	0,599
X ₁ (L) на X ₄ (L)	-0,117	0,091	-1,289	0,202	-0,299	0,064
X ₂ (L) на X ₃ (L)	0,237	0,091	2,602	0,011	0,055	0,418
X ₂ (L) на X ₄ (L)	-0,166	0,091	-1,826	0,072	-0,348	0,016
X ₃ (L) на X ₄ (L)	0,026	0,091	0,287	0,775	-0,156	0,208

Сред/Св.член – среднее значение отклика (целевой переменной) при нулевых значениях всех факторов; **эффект** – вклад каждого фактора (или их взаимодействий) в изменение целевой переменной; **t(66)** – t-критерий Стьюдента; **p** – значение уровня значимости фактора; **-95,%** и **+95,%** – доверительный интервал 95%; **(L)** и **(Q)** – линейное и квадратичное влияние фактора на целевую переменную.

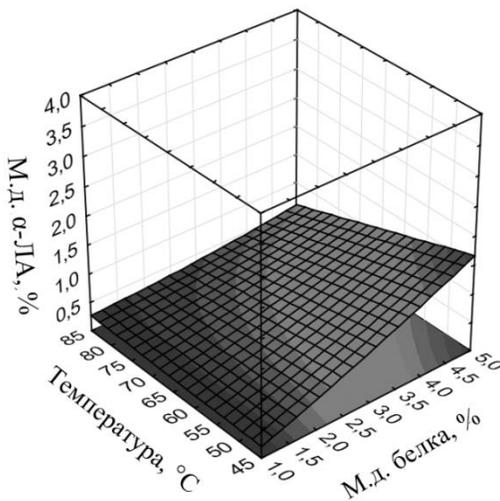
Таблица 3.3 – Влияние варьируемых факторов на степень термоденатурации β -ЛГ

Фактор	Эффект	Ст. откл.	t(66)	p	-95,%	+95,%
Сред/Св.член	1,565	0,057	27,533	0,000	1,451	1,678
X ₁ (L)	1,544	0,139	11,089	0,000	1,266	1,822
X ₁ (Q)	0,398	0,121	3,299	0,002	0,157	0,638
X ₂ (L)	-0,529	0,139	-3,796	0,000	-0,806	-0,251
X ₂ (Q)	0,063	0,121	0,521	0,604	-0,178	0,303
X ₃ (L)	0,441	0,139	3,169	0,002	0,163	0,719
X ₃ (Q)	-0,025	0,121	-0,207	0,836	-0,266	0,216
X ₄ (L)	-0,263	0,139	-1,886	0,064	-0,541	0,015
X ₄ (Q)	-0,114	0,121	-0,945	0,348	-0,355	0,127
X ₁ (L) на X ₂ (L)	-0,736	0,171	-4,314	0,000	-1,076	-0,395
X ₁ (L) на X ₃ (L)	0,584	0,171	3,425	0,001	0,243	0,924
X ₁ (L) на X ₄ (L)	-0,393	0,171	-2,304	0,024	-0,733	-0,052
X ₂ (L) на X ₃ (L)	0,525	0,171	3,079	0,003	0,185	0,865
X ₂ (L) на X ₄ (L)	-0,169	0,171	-0,991	0,326	-0,509	0,172
X ₃ (L) на X ₄ (L)	0,307	0,171	1,799	0,077	-0,034	0,647

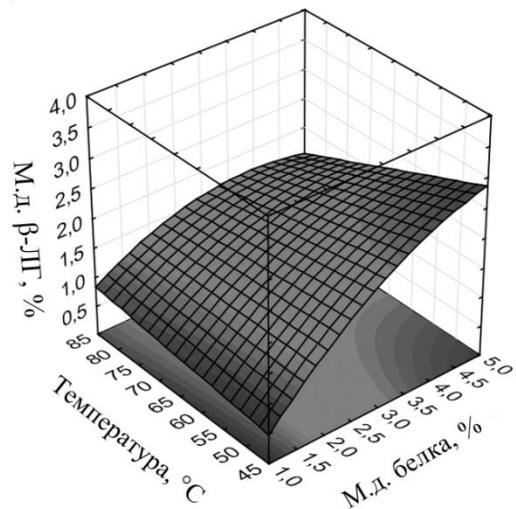
Сред/Св.член – среднее значение отклика (целевой переменной) при нулевых значениях всех факторов; **эффект** – вклад каждого фактора (или их взаимодействий) в изменение целевой переменной; **t(66)** – t-критерий Стьюдента; **p** – значение уровня значимости фактора; **-95,%** и **+95,%** – доверительный интервал 95%; **(L)** и **(Q)** – линейное и квадратичное влияние фактора на целевую переменную.

Анализ таблиц 3.2-3.3 показал значимое ($p < 0,05$) положительное линейное влияние массовой доли белка (X_1) и кислотности (X_3) и их совместное воздействие, а также совместное влияние температуры (X_2) и кислотности (X_3) на термоденатурацию α -ЛА. Помимо этого, значимое отрицательное линейное влияние на контролируемый показатель оказала температура (X_2) и совместное воздействие массовой доли белка (X_1) и температуры (X_2). На термоденатурацию β -ЛГ значимое положительное линейное и квадратичное влияние оказывает массовая доля белка (X_1), линейное влияние оказывает кислотность (X_3), а также совокупное воздействие массовой доли белка (X_1) и кислотности (X_3), температуры (X_2) и кислотности (X_3). Отрицательное линейное значение оказывают температура (X_2), совокупное воздействие массовой доли белка (X_1) и температуры (X_2), массовой доли белка (X_1) и продолжительности осаждения (X_4). Анализ данных позволяет сделать вывод об относительной схожести влияния варьируемых параметров на термоденатурацию белковых фракций. Однако установлена разница в эффекте продолжительности осаждения белков в части значимого влияния на термоденатурацию β -лактоглобулина. Поверхности отклика влияния варьируемых параметров эксперимента на термоденатурацию сывороточных белков представлена на рисунке 3.1.

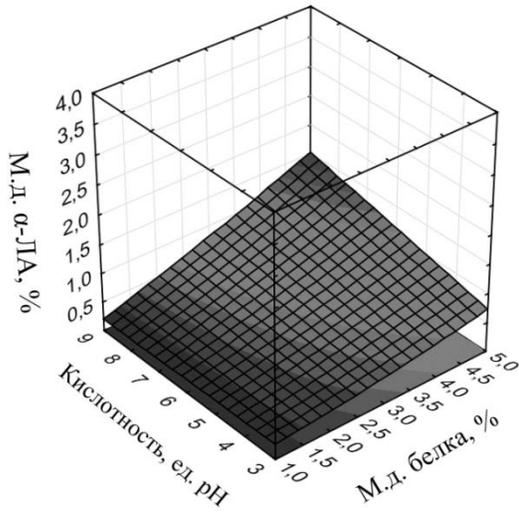
А-I)



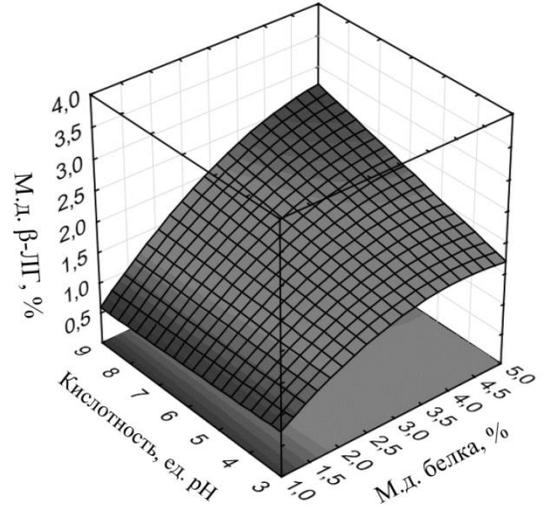
А-II)



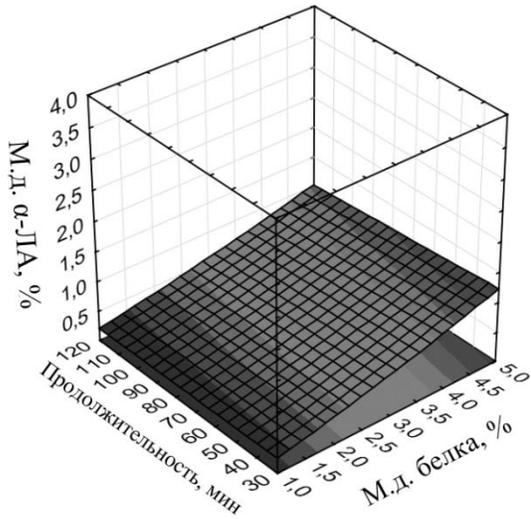
Б-I)



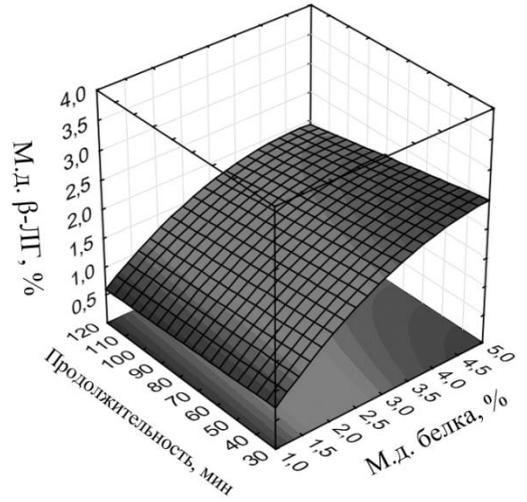
Б-II)



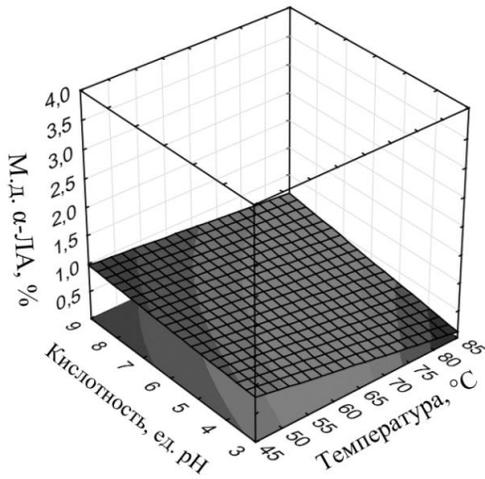
В-I)



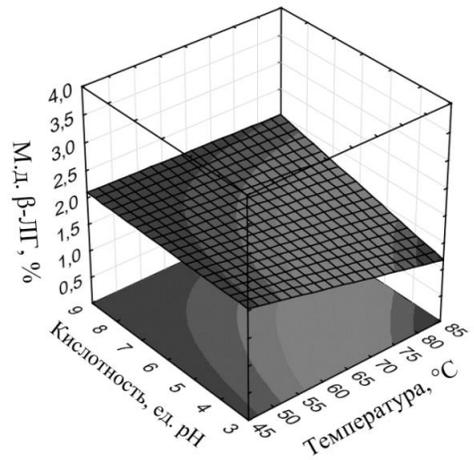
В-II)



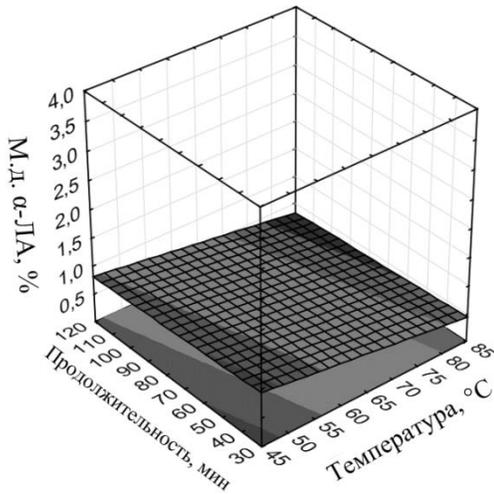
Г-I)



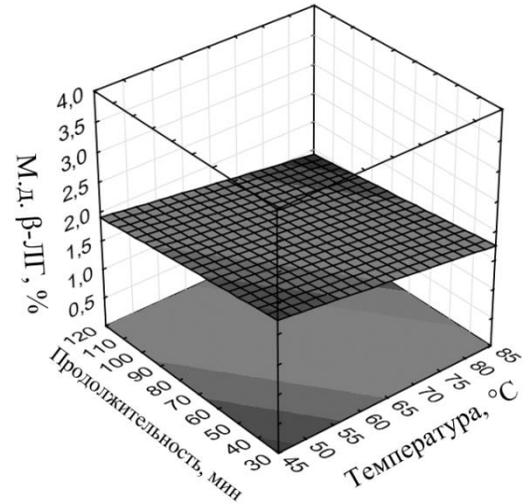
Г-II)



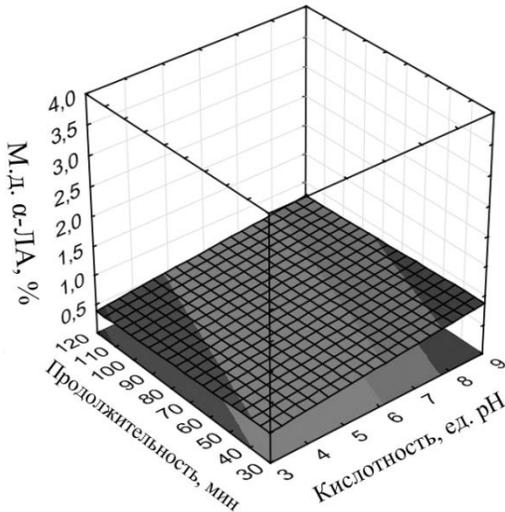
Д-I)



Д-II)



Е-I)



Е-II)

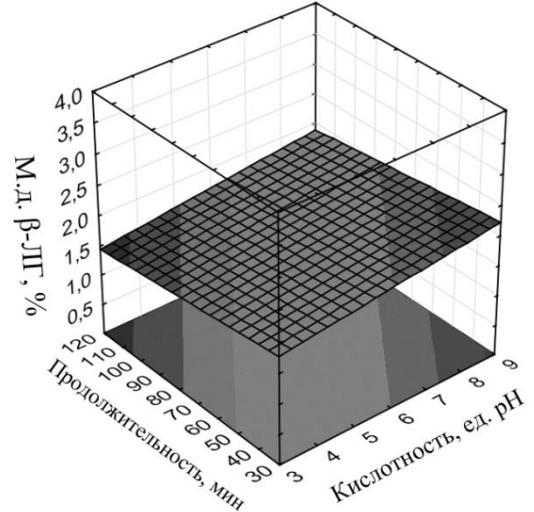


Рисунок 3.1 – Оптимизация условий термоденатурации (I – α-ЛА, II-β-ЛГ)

Получены уравнения 3.1-3.2, описывающие зависимости термоденатурации альбумина и глобулина от варьируемых параметров:

$$Y_{\alpha\text{-ЛА}} = -0,573 + 0,447X_1 - 0,005X_2 - 0,172X_3 - 0,007X_1X_2 + 0,035X_1X_3 + 0,002X_2X_3 \quad (3.1)$$

$$Y_{\beta\text{-ЛГ}} = 0,21 + 1,466X_1 - 0,099X_1^2 - 0,282X_3 - 0,011X_1X_2 + 0,049X_1X_3 - 0,001X_1X_4 + 0,003X_2X_3 \quad (3.2)$$

Установлены оптимальные параметры среды для термокислотной денатурации α-ЛА, которые соответствуют массовой доле белка 3,56%, температуре осаждения 85°C, pH среды 3,0 и продолжительности тепловой обработки 30 минут. Подобные

условия снижают содержание белка в супернатанте относительно начальной концентрации на 51%, а начальное содержание α -ЛА примерно на 79% (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Результаты оптимизации условий селективной термоденатурации с учетом функции желательности

X_1	X_2	X_3	X_4	М.д. β -ЛГ в фильтрате, %	М.д. α -ЛА в фильтрате, %	Желательность, %
3,56	85	3	30	1,53	0,2	59,8

Присутствие высокоаффинного участка связывания кальция в структуре α -ЛА обосновывает полученные результаты, поскольку ион двухвалентного металла значительно влияет на термостабильность белковой молекулы. Так, при температуре, близкой к 70°C в условиях активной кислотности молока (значение pH 6,0-7,0) α -лактальбумин денатурирует, сохраняя способность к высокому уровню ренатурации после охлаждения молока (до 90%) [107,128]. В связи с этим, для повышения селективности процесса фракционирования, снижения негативного термического воздействия на белок при 85°C, эффекта соосаждения β -ЛГ и ренатурации α -ЛА представляется интересным изучение роли хелаторов с целью декальцинирования молекулы α -ЛА. В связи с этим, на следующем этапе оптимизированы условия процесса селективного фракционирования альбумина в присутствии хелатора кальция гексаметафосфат натрия (ГМФ). Для исследования процесса фракционирования сывороточного белка сформирован полный факторный план с четырьмя переменными параметрами: массовая доля ГМФ (X_1), температура (X_2), pH (X_3), продолжительность (X_4). Каждый из параметров варьировался на трех уровнях (таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Уровни вариации независимых параметров при многофакторных экспериментах по оптимизации условий селективной термоденатурации α -ЛА в присутствии ГМФ

Параметр	Переменная	Уровень варьирования		
		-1	0	1
Массовая доля ГМФ, %	X_1	0,050	0,175	0,300
Температура, °C	X_2	45	65	85
Активная кислотность, ед. pH	X_3	3	6	9
Продолжительность, мин	X_4	30	75	120

В соответствии с полным факторным планом эксперимента была сформирована матрица эксперимента, включающая в себя 81 комбинацию варьируемых параметров, и проведена оптимизация (таблицы 3.6-3.7, рисунок 3.2). Функция желательности оптимизации сформирована исходя из минимального значения содержания в супернатанте α -ЛА и максимального значения содержания β -ЛГ. Результаты статистической оценки влияния варьируемых факторов на массовую долю фракций сывороточных белков представлены в таблицах 3.6-3.7.

Таблица 3.6 – Влияние варьируемых факторов на степень селективной термоденатурации α -ЛА в присутствии ГМФ

Фактор	Эффект	Ст. откл.	t(66)	p	-95,%	+95,%
Сред/Св.член	0,482	0,013	36,516	0,000	0,456	0,508
X ₁ (L)	-0,075	0,032	-2,325	0,023	-0,140	-0,011
X ₁ (Q)	0,023	0,028	0,827	0,411	-0,033	0,079
X ₂ (L)	-0,235	0,032	-7,274	0,000	-0,300	-0,171
X ₂ (Q)	0,014	0,028	0,509	0,612	-0,042	0,070
X ₃ (L)	0,410	0,032	12,670	0,000	0,345	0,474
X ₃ (Q)	0,290	0,028	10,371	0,000	0,234	0,346
X ₄ (L)	-0,092	0,032	-2,841	0,006	-0,156	-0,027
X ₄ (Q)	-0,047	0,028	-1,693	0,095	-0,103	0,008
X ₁ (L) на X ₂ (L)	0,112	0,040	2,834	0,006	0,033	0,191
X ₁ (L) на X ₃ (L)	0,192	0,040	4,854	0,000	0,113	0,271
X ₁ (L) на X ₄ (L)	0,062	0,040	1,571	0,121	-0,017	0,141
X ₂ (L) на X ₃ (L)	-0,119	0,040	-3,002	0,004	-0,198	-0,040
X ₂ (L) на X ₄ (L)	-0,036	0,040	-0,912	0,365	-0,115	0,043
X ₃ (L) на X ₄ (L)	0,033	0,040	0,828	0,411	-0,046	0,112

Сред/Св.член – среднее значение отклика (целевой переменной) при нулевых значениях всех факторов; **эффект** – вклад каждого фактора (или их взаимодействий) в изменение целевой переменной; **t(66)** – t-критерий Стьюдента; **p** – значение уровня значимости фактора; **-95,%** и **+95,%** – доверительный интервал 95%; **(L)** и **(Q)** – линейное и квадратичное влияние фактора на целевую переменную.

Таблица 3.7 – Влияние варьируемых факторов на степень селективной термоденатурации β -ЛГ в присутствии ГМФ

Фактор	Эффект	Ст. откл.	t(66)	p	-95,%	+95,%
1	2	3	4	5	6	7
Сред/Св.член	1,669	0,037	45,229	0,000	1,595	1,742
X ₁ (L)	0,049	0,090	0,545	0,587	-0,131	0,230
X ₁ (Q)	0,074	0,078	0,949	0,346	-0,082	0,230
X ₂ (L)	-0,458	0,090	-5,074	0,000	-0,639	-0,278
X ₂ (Q)	0,360	0,078	4,605	0,000	0,204	0,517
X ₃ (L)	0,001	0,090	0,008	0,993	-0,180	0,181
X ₃ (Q)	0,131	0,078	1,680	0,098	-0,025	0,288

Продолжение таблицы 3.7

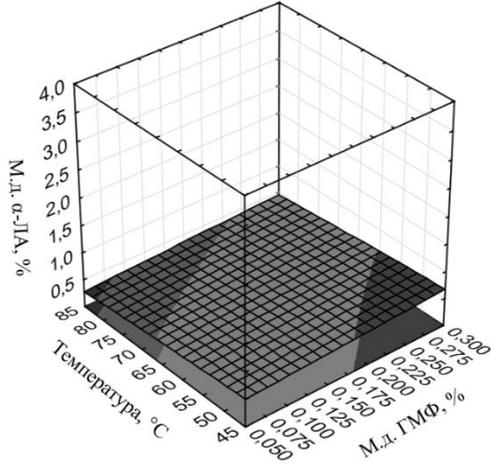
1	2	3	4	5	6	7
X ₄ (L)	0,002	0,090	0,020	0,984	-0,179	0,182
X ₄ (Q)	-0,055	0,078	-0,698	0,488	-0,211	0,102
X ₁ (L) на X ₂ (L)	0,034	0,111	0,306	0,760	-0,187	0,255
X ₁ (L) на X ₃ (L)	0,269	0,111	2,434	0,018	0,048	0,490
X ₁ (L) на X ₄ (L)	0,026	0,111	0,236	0,814	-0,195	0,247
X ₂ (L) на X ₃ (L)	0,185	0,111	1,676	0,098	-0,035	0,406
X ₂ (L) на X ₄ (L)	-0,129	0,111	-1,169	0,246	-0,350	0,091
X ₃ (L) на X ₄ (L)	-0,078	0,111	-0,708	0,482	-0,299	0,143

Сред/Св.член – среднее значение отклика (целевой переменной) при нулевых значениях всех факторов; **эффект** – вклад каждого фактора (или их взаимодействий) в изменение целевой переменной; **t(66)** – t-критерий Стьюдента; **p** – значение уровня значимости фактора; **-95,%** и **+95,%** – доверительный интервал 95%; **(L)** и **(Q)** – линейное и квадратичное влияние фактора на целевую переменную.

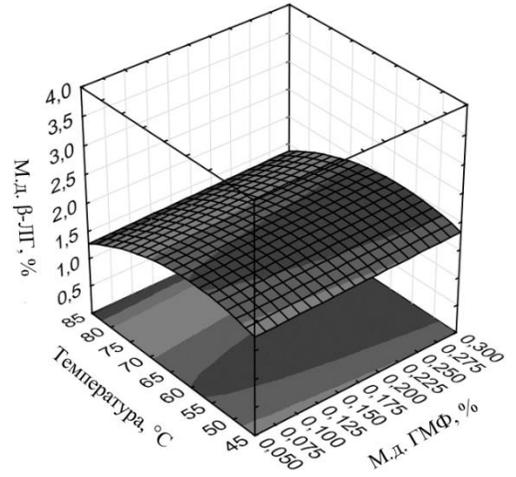
Анализ таблиц 3.6-3.7 показал значимое ($p < 0,05$) положительное линейное и квадратичное влияние кислотности (X_3), а также совместное положительное линейное влияние массовой доли ГМФ (X_1) и температуры (X_2), массовой доли ГМФ (X_1) и кислотности (X_3) на термоденатурацию α -ЛА. Помимо этого, значимое отрицательное линейное влияние на контролируемый показатель оказала массовая доля ГМФ (X_1), температура (X_2), продолжительность (X_4) и совместное воздействие температуры (X_2) и кислотности (X_3). На термоденатурацию β -ЛГ значимое положительное квадратичное влияние оказывает температура (X_2) и совокупное воздействие массовой доли ГМФ (X_1) и кислотности (X_3). Значимое отрицательное линейное влияние на осаждение β -ЛГ оказывают температуры (X_2) и кислотности (X_3). Отрицательное линейное значение оказывает температура (X_2). Анализ данных позволяет сделать вывод о более значимом влиянии варьируемых параметров и их совместного воздействия при использовании ГМФ на термоденатурацию α -ЛА, в то время как на термоденатурацию β -ЛГ влияние оказывают меньшее количество факторов, что обосновывает эффект его меньшего соосаждения, в сравнении с предыдущим экспериментом по оптимизации процесса термоселективного фракционирования. Поверхности отклика влияния варьируемых параметров

эксперимента на термоденатурацию сывороточных белков представлены на рисунке 3.2.

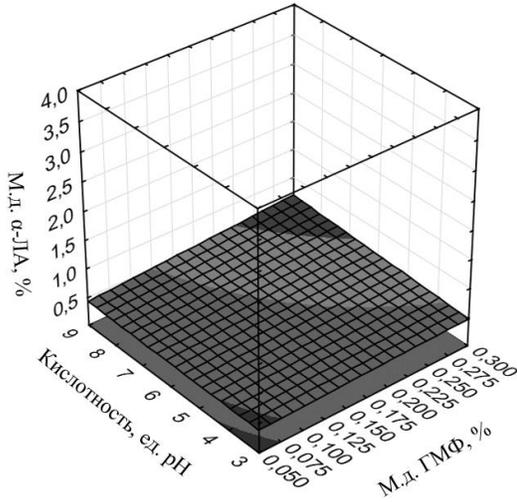
А-I)



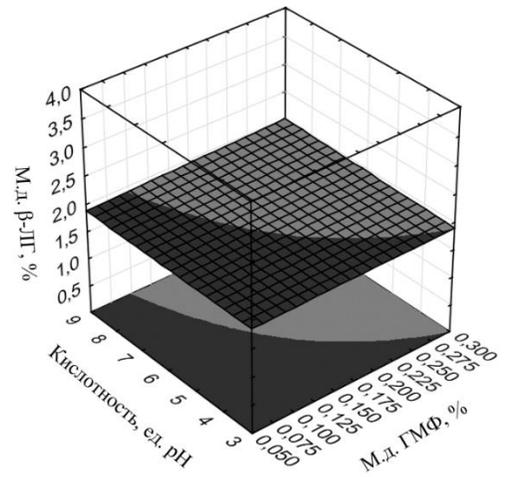
А-II)



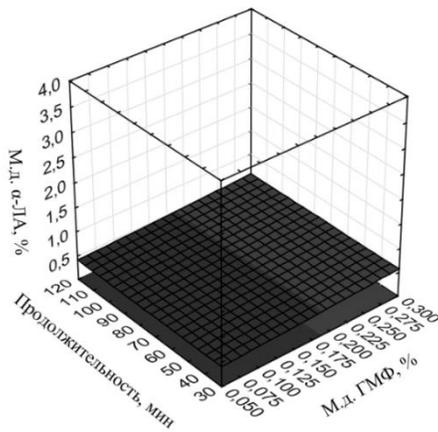
Б-I)



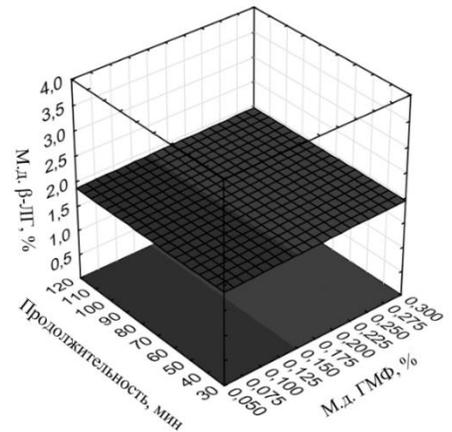
Б-II)



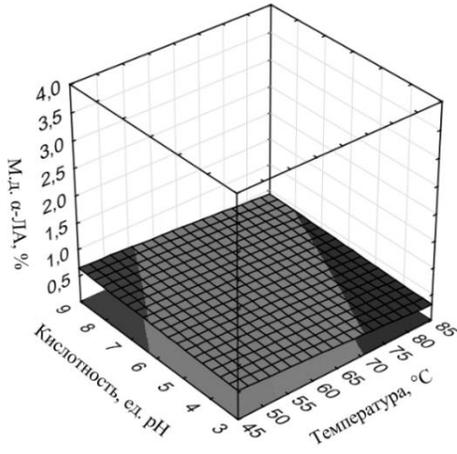
В-I)



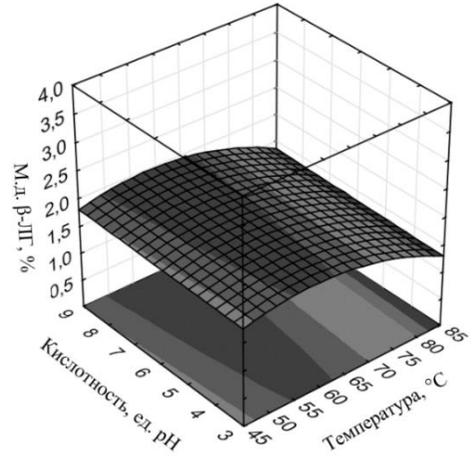
В-II)



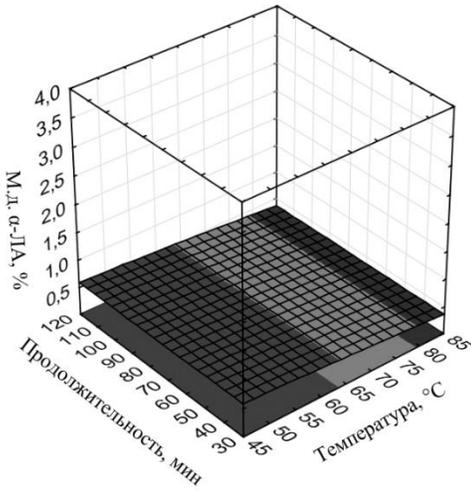
Г-I)



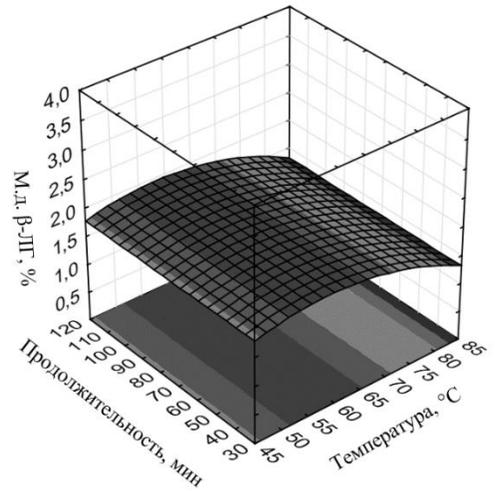
Г-II)



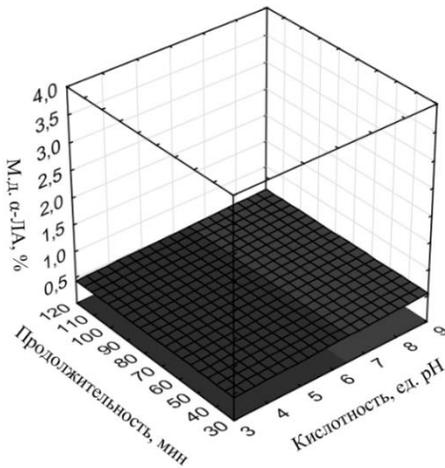
Д-I)



Д-II)



Е-I)



Е-II)

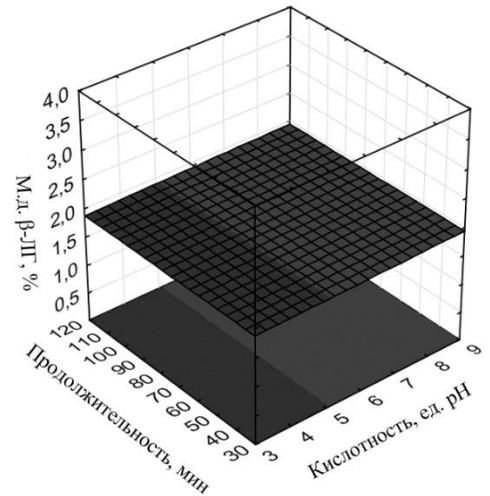


Рисунок 3.2 – Оптимизация условий селективной термоденатурации в присутствии ГМФ (I - α -ЛА, II- β -ЛГ)

Получены уравнения 3.3-3.4, описывающие зависимости термоденатурации α -лактальбумина и β -лактоглобулина от варьируемых параметров:

$$Y_{\alpha\text{-ЛА}} = -0,246 - 3,297X_1 - 0,004X_2 + 0,475X_3 - 0,032X_3^2 - 0,001X_4 + 0,022X_1X_2 + 0,256X_1X_3 - 0,001X_2X_3 \quad (3.3)$$

$$Y_{\beta\text{-ЛГ}} = -1,211 + 0,106X_1 - 0,001X_1^2 + 0,056X_1X_3 \quad (3.4)$$

Результаты оптимизации позволили установить параметры процесса, которые соответствуют массовой доле ГМФ 0,2%, температуре осаждения 58°C, pH среды 3,0 и продолжительности тепловой обработки 120 минут (таблица 3.8). Выявленные параметры осаждения коррелируют с литературными данными о температуре денатурации α -ЛА (~60°C) [122]. Оптимальные условия снижают содержание белка в супернатанте относительно начальной концентрации на 42%, а начальное содержание α -ЛА примерно на 83%. При этом, соотношение фракций β -ЛГ к α -ЛА в результате процесса изменилось с 2,2 к 1 (для нативного концентрата) до 0,7 к 1 (рисунок 3.3). Частичное осаждение β -лактоглобулина, согласно McGuffey M. K. с соавторами [122], может быть связано с усилением их агрегации ввиду изменения структуры под действием температуры и формирования дисульфидных связей с α -лактальбумином и другими сывороточными белками.

Таблица 3.8 – Результаты оптимизации условий селективной термоденатурации в присутствии хелатора с учетом функции желательности

X_1	X_2	X_3	X_4	М.д. β -ЛГ в фильтрате, %	М.д. α -ЛА в фильтрате, %	Желательность, %
0,2	58	3	120	1,85	0,16	67,0

По результатам проведенных исследований подтверждена гипотеза об увеличении выхода альбумина при использовании веществ-хелаторов и установлены оптимальные параметры (массовая доля ГМФ 0,2%, температура 58°C, pH среды 3,0 и продолжительность тепловой обработки 120 минут) выделения α -ЛА из системы молочной сыворотки с использованием ГМФ в качестве хелатирующего вещества, позволяющего удалить из структуры белка ион кальция, стабилизирующий молекулу.

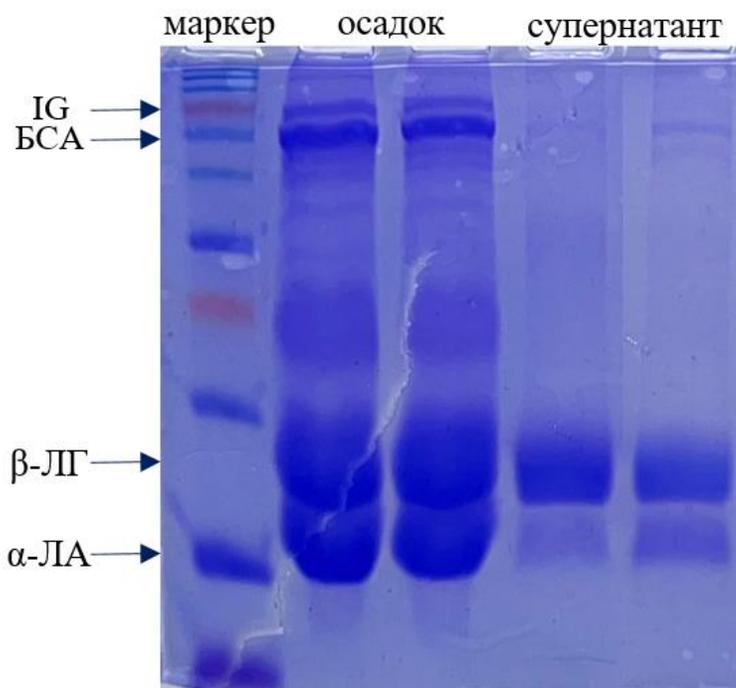


Рисунок 3.3 – Электрофореграмма продуктов селективной термоденатурации в присутствии хелатора кальция

Кроме того, полученные в ходе эксперимента данные фракционирования белков позволяют сделать вывод о том, что для модификации белковой матрицы, планируемой к использованию при обогащении эссенциальными микроэлементами, можно применять творожную сыворотку, поскольку низкое значение начальной активной кислотности сырья снижает затраты на его дополнительное подкисление до рН 3. Данный факт открывает новые возможности для переработки творожной сыворотки, пользующейся меньшей востребованностью в молочной промышленности, чем подсырная, ввиду особенностей физико-химических показателей.

3.2. Исследование закономерностей хелатирования цинка белками молочной сыворотки

Согласно эмпирическим данным, последовательность обогащения белков по схеме цинк→йод является наиболее оптимальной, поскольку в противном случае

наблюдается снижение концентрации цинка, обоснованное величиной энергии активации реакции координации микроэлемента [69]. В связи с этим, далее в работе исследованы закономерности связывания цинка на модельных с интактным распределением белков (WPC) и модельных системах, в которых α -ЛА является преобладающим белком (WPC- α). Однако, перед проведением экспериментов, необходимо было определить содержание возможных продуктов гидролиза ГМФ с целью исключения ложноположительных результатов. В литературных данных описаны физико-химические свойства ГМФ, среди которых отмечено, что нагревание добавки в условиях проведения спланированного эксперимента (58°C и pH 3) провоцирует ее разложение на ортофосфаты, которые могут препятствовать корректному определению степени связывания микроэлемента с белком, поскольку образуют с сульфатом цинка нерастворимое в воде соединение [135]. Для определения присутствия фосфатов в полученном осадке использовали качественную реакцию на фосфат-ионы с азотнокислым серебром, описанной в ГОСТ 31725-2012 (п. 7.4.3), в результате которой установлено отсутствие соединений, способных образовать нерастворимый осадок с сульфатом цинка.

Для определения влияния факторов среды на степень хелатирования цинка сывороточными белками, проведен ряд экспериментов с переменными параметрами: pH среды (4,0; 6,0; 8,0 ед. pH), температура (2; 10; 20; 30; 40°C), концентрация ионов цинка (1,5; 9 и 15 мМ) на модельных системах (WPC и WPC- α) с массовой долей белка 3%. В качестве источника цинка для проведения экспериментов выбран концентрированный раствор сульфата цинка (содержание ионов Zn^{2+} 80 1223,7 мМ). Результаты исследования кинетики хелатирования металла представлены на рисунке 3.4.

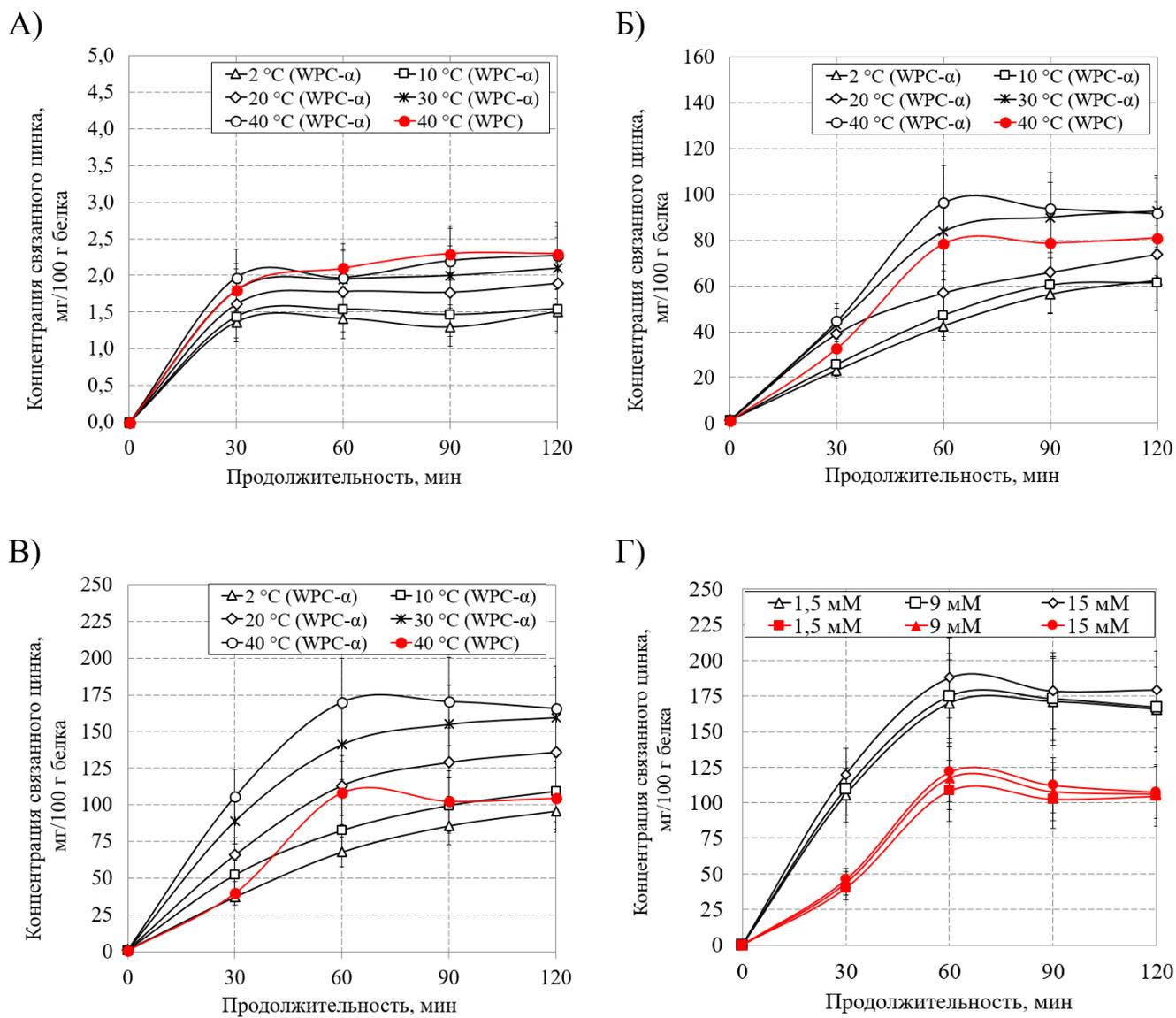


Рисунок 3.4 – Кинетика хелатирования цинка концентратами белков молочной сыворотки (WPC- α – термоденатурированный белковый концентрат с преобладанием α -ЛА, WPC – контрольный концентрат с нативным распределением белковых фракций; А – pH 4, Б – pH 6, В – pH 8, Г – зависимость от концентрации цинка)

Анализ полученных данных позволил определить наиболее эффективный режим, соответствующий температуре 40°C, pH 8 и продолжительности хелатирования 60 минут, что соответствует наибольшей концентрации органически связанного цинка – $169,8 \pm 27,3$ мг цинка на 100 г белка. Выявлено, что матрица с повышенным содержанием α -ЛА связала в 1,6 раза больше микроэлемента, чем

сыворотка с нативным распределением белков. Данная особенность может быть обусловлена как наличием отдельных сайтов, содержащих аспарагиновую и глутаминовую кислоты, цистеин, метионин и пр., способных координировать ион цинка [46,127-128], так и наличием специфических сайтов связывания двухвалентных металлов α -ЛА и БСА (KFLDDDLTDD и ECCHGDLLECADDRA соответственно), декальцинированных в процессе термоденатурации белков [127-128]. Установлено отсутствие влияния концентрации вносимых в систему ионов цинка (в исследуемых пределах) на концентрацию хелатированного белками цинка. Выявленные зависимости связывания цинка с белками молочной сыворотки коррелируют с зависимостями, определенными ранее в работах [9,48]. Однако концентрация органически связанного с молочными белками микроэлемента в исследовании [9] значительно выше, чем в настоящем исследовании: $72,2 \pm 7$ мг в 1 г белка. Вероятно, разница в эффективности режимов хелатирования цинка обоснована разными характеристиками белкового субстрата. Предварительное проведение термоденатурации и декальцинирования α -ЛА и БСА в присутствии ГМФ могло повлиять на структуру белковых молекул, а также на формирование межмолекулярных взаимодействий белков в матрице, в связи с чем хелатирование цинка белками молочной сыворотки при pH 4 было наименее эффективным, чем при pH 8 [5,35,98]. Таким образом, можно сделать вывод о том, что при определении рациональных условий хелатирования ионов металлов сывороточными белками, важно обращать внимание на его начальные структурные характеристики.

Заключение по Главе 3

По результатам проведенных исследований подтверждена гипотеза об увеличении массовой доли α -ЛА в белковом концентрате после процесса термоселективного фракционирования при использовании хелаторов и установлены оптимальные параметры термокислотного осаждения α -ЛА: массовая доля ГМФ

0,2%, температура осаждения 58°C, рН среды 3,0 и продолжительность тепловой обработки 120 минут. Оптимальные условия снижают содержание белка в супернатанте относительно начальной концентрации на 42%, а начальное содержание α -ЛА примерно на 83%. При этом, соотношение фракций β -ЛГ к α -ЛА в результате процесса изменилось с 2,2 к 1 до 0,7 к 1. Полученные в ходе эксперимента данные о фракционировании белков молочной сыворотки позволяют сделать вывод о том, что для модификации белковой матрицы, планируемой к использованию при обогащении эссенциальными микроэлементами, можно применять творожную сыворотку.

Изучение кинетики хелатирования цинка белками молочной сыворотки позволило выявить наиболее эффективный режим, соответствующий температуре 40°C, рН 8 и продолжительности хелатирования 60 минут, что соответствует наибольшей концентрации органически связанного цинка – $169,8 \pm 27,3$ мг на 100 г белка. Подтверждена гипотеза о повышении концентрации органически связанного цинка при модификации белкового профиля и использовании субстрата с повышенным содержанием α -ЛА. Экспериментальная матрица связала в 1,6 раза больше микроэлемента, чем сыворотка с нативным распределением белков.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ СВЯЗЫВАНИЯ ЙОДА С МОДИФИЦИРОВАННОЙ БЕЛКОВОЙ МАТРИЦЕЙ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ

4.1. Биоинформатическое моделирование процесса гидролиза сывороточных белков

Ключевым критерием протеазного скрининга являлся выбор ферментного препарата (или комплекса ферментных препаратов), обладающего способностью к высвобождению пептидов, способных связывать йод в большей степени, в сравнении с нативными белками. При этом важным аспектом являлось сохранение максимальной концентрации цинка, связанного с нативными белками до процедуры гидролиза. Поддержание максимальной концентрации цинка при моделировании протеолиза ассоциировано с целостностью аминокислотного участка связывания ионов Ca^{2+} (KFLDDDLTDD в α -ЛА и ECCHGDLLECADDRA в БСА). Кроме того, немаловажными критериями протеазного скрининга являлись минимизация количества свободных аминокислот и фрагментов, обуславливающих горечь. Для моделирования гидролиза выбраны протеазы (таблица 4.1), представленные на российском рынке.

Таблица 4.1 – Протеазный скрининг и моделирование гидролиза сывороточных белков

Наименование фермента	Теоретическая степень гидролиза, %	Количество пептидов, потенциально хелатирующих ионы цинка, ед.	Количество пептидов, потенциально связывающих ионы йода, ед.	Количество свободных аминокислот, ед.	Количество фрагментов, обуславливающих горечь, ед.
1	2	3	4	5	6
α-лактальбумин					
Пепсин (рН > 2) КФ 3.4.23.1	68,3	0	13	62	29

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6
Протеиназа P1 КФ 3.4.21.96	39,7	5	15	30	17
Панкреатическая эластаза КФ 3.4.21.36	42,1	5	19	24	9
Фицин КФ 3.4.22.3	38,9	5	19	22	16
Стим бромелайн КФ 3.4.22.32	36,5	4	18	21	13
Протеиназа К КФ 3.4.21.67	32,5	4	20	12	15
Термолизин КФ 3.4.24.27	30,2	3	21	9	9
Папаин КФ 3.4.22.2	28,6	5	18	11	7
Субтилизин КФ 3.4.21.62	28,6	4	22	7	9

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6
Химотрипсин КФ 3.4.21.1	28,6	5	19	9	6
EQL - TK CEVF - REL - KDL - KGY - GGVSL - PEW - VCTTF - H - TSGY - DTQAIVQN - N - DSTEY - GL - F - QIN - N - KIW - CKDDQN - PH - SSN - ICN - ISCD KF - L - DDDL - TDDIM - CVKKIL - DKVGIN - Y - W - L - AH - KAL - CSEKL - DQW - L - CEKL					
Коколизин КФ 3.4.24.30	25,4	3	19	7	6
EQ - LTK CEV - FRE - LKD - LKG - YGGVS - L PEWVCTT - FHTSG - YDTQ - A - IVQNN DSTE - YG - L - FQ - INNK - IWCKDDQNPHSSN - ICN - ISCD K - F - LDDD - LTDD - IMCVKK - I - LDKVG - IN - YW - L - AHK - A - LCSEK - LDQW - LCEK - L					
Химаза КФ 3.4.21.39	19,1	5	17	5	8
EQL - TK CEVF - REL - KDL - KGY - GGVSL - PEW - VCTTF - HTSGY - DTQAIVQN NDS TEY - GL - F - QINN KIW - CKDDQNPHSSNICNISCDK - L - DDDL - TDDIM CVKKIL - DKVGIN Y - W - L - AHKAL - CSEKL - DQW - L - CEKL					
Трипсин КФ 3.4.21.4	10,3	6	12	2	2
EQLTK - - CEVFR - - ELK - - DLK - G YGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAIVQNNDS TEYGLFQINN - - IWCK - DDQNPHSSNICNISCDK - FLDDDLTDDIM CVK - K - ILDK - VGINYWLAHK - ALCSEK - LDQWLCEK - L					
β-лактоглобулин					
Пепсин (рН > 2) КФ 3.4.23.1	73,3	0	22	85	45
L - I - VT - Q - T - M - K - G - L - D - IQ - K - VA - G - T - WY - SL - A - M - A - A - SD - ISL - L - D - A - Q - SA - PL - R - VY - VE - E - L - K - PT - PE - G - D - L - E - IL - L - Q - K - WE - N - G - E - CA - Q - K - K - I - IA - E - K - T - K - IPA - VF - K - ID - A - L - N - E - N - K - VL - VL - D - T - D - Y - K - K - Y - L - L - F - CM - E - N - SA - E - PE - Q - SL - A - CQ - CL - VRT - PE - VD - D - E - A - L - E - K - F - D - K - A - L - K - A - L - PM - H - IRL - SF - N - PT - Q - L - E - E - Q - CH - I					
Протеиназа P1 КФ 3.4.21.96	49,1	2	29	50	38
L - IV - T - Q - TMKG - L - DI - Q - KV - AGTWY - S - L - AMAA - SDI - S - L - L - DA - Q - SA - P - L - RV - YV - EE - L - K - P - T - P - EGD - L - EI - L - L - Q - KWENG ECA - Q - KKIIA EKTKI - P - AV - FKIDA - L - NENKV - L - V - L - DTDYKKY - L - L - FCMEN - SAE - P - E - Q - S - L - AC - Q - C - L - V - RT - P - EV - DDEA - L - EKFDKA - L - KA - L - P - MHIR - L - SFN - P - T - Q - L - EE - Q - CHI					
Панкреатическая эластаза КФ 3.4.21.36	47,3	7	33	38	27
L - I - V - T - QT - MKG - L - DI - QKV - A - G - T - WY - S - L - A - MA - A - S - DI - S - L - L - DA - QS - A - PL - RV - Y - V - EEL - KPT - PEG - DL - EI - L - L - QKWENG - ECA - QKKI - I - A - EKT - KI - PA - V - FKI - DA - L - NENKV - L - V - L - DT - DY - KKY - L - L - FCMENS - A - EPEQS - L - A - CQCL - V - RT - PEV - DDEA - L - EKFDKA - L - KA - L - PMHI - RL - S - FNPT - QL - EEQCHI					
Фицин КФ 3.4.22.3	37,0	6	29	25	24

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6
L - IVTQTMK - G - L - DIQK - VAG - TWY - S - L - AMAAS - DIS - L - L - DAQS - APL - R - VY - VEEL - K - PTEG - DL - EIL - L - QK - WENG - ECAQK - K - ИАЕК - TK - IPAVF - K - IDAL - NENK - VL - VL - DTDY - K - K - Y - L - L - F - CMENS - AEPEQS - L - ACQCL - VR - TPEVDDEAL - EK - F - DK - AL - K - AL - PMH - IR - L - S - F - NPTQL - EEQCH - I					
Стим бромелайн КФ 3.4.22.32	43,6	6	29	36	24
L - IV - T - QT - MKG - L - DIQKV - A - G - T - WYS - L - A - MA - A - S - DIS - L - L - DA - QS - A - PL - R - V - YV - EEL - KPT - PEG - DL - EIL - L - QKWENG - ECA - QKKIIA - EKT - KIPA - V - F - KIDA - L - NENKV - L - V - L - DT - DYKKYL - L - F - CMENS - A - EPEQS - L - A - CQCL - V - R - T - PEV - DDEA - L - EK - DKA - L - KA - L - PMHIR - L - S - F - NPT - QL - EEQCHI					
Протеиназа К КФ 3.4.21.67	37,6	7	31	22	23
L - I - V - TQTM - KGL - DI - QKV - AGTW - Y - SL - AM - AASDI - SL - L - DAQSAP - L - RV - Y - V - EEL - KP - TP - EGD - EI - L - L - QKW - ENGECAQKKI - I - AEKTKI - P - AV - F - KIDAL - NENKV - L - V - L - DTDY - KKY - L - L - F - CM - ENSAEP - EQSL - ACQCL - V - RTP - EV - DDEAL - EK - DKAL - KAL - P - M - HI - RL - SF - NP - TQL - EEQCH					
Термолизин КФ 3.4.24.27	38,2	8	28	26	19
L - I - VTQTMKG - LD - IQK - V - AGTW - YS - L - AM - A - ASD - IS - L - LD - AQS - AP - LR - V - Y - VEE - LKPTPEGDL - LE - I - L - LQKWENGEC - AQKK - I - I - AEKTK - IP - A - V - FK - ID - A - LNENK - V - L - V - LDTD - YKK - Y - L - L - FCMENS - AEPEQS - L - ACQC - L - VRTPE - VDDE - A - LEK - FDK - A - LK - A - LPMH - IR - LS - FNPTQ - LEEQCH - I					
Папаин КФ 3.4.22.2	36,4	3	35	15	12
L - IVT - QT - MKG - L - DI - QKV - AG - T - WYSL - AM - A - ASDISL - L - D - A - QS - APL - R - VYVEEL - KPT - PEG - DL - EIL - L - QKWENG - EC - A - QKKII - AEKT - KIP - AVF - KID - AL - NENKVL - VL - DT - DYKKYL - L - F - CMENS - AEPE - QSL - AC - QCL - VR - T - PEVDDE - AL - EK - FDK - AL - K - AL - PMHIR - L - SF - NPT - QL - EE - QCHI					
Субтилизин КФ 3.4.21.62	27,3	9	26	15	15
L - I - VTQTMKGL - DIQK - VAGTW - Y - S - L - AMAAS - DIS - L - L - DAQS - APL - R - VY - VEEL - KPTPEGDL - EIL - L - QKW - ENGECAQKKIIAEKTKIPA - VF - KIDAL - NENK - VL - VL - DTDY - KKY - L - L - F - CMENS - AEPEQS - L - ACQCL - VRTPE - VDDEAL - EK - FDKAL - KAL - PMHIRL - S - F - NPTQL - EEQCHI					
Химотрипсин КФ 3.4.21.1	26,1	7	26	11	9
L - IVTQTM - KGL - DIQKVAGTW - Y - SL - AM - AASDISL - L - DAQSAPL - RVY - VEEL - KPTPEGDL - EIL - L - QKW - EN - GECAQKKIIAEKTKIPAVF - KIDAL - N - EN - KVL - VL - DTDY - KKY - L - L - F - CM - EN - SAEPEQSL - ACQCL - VRTPEVDDEAL - EK - FDKAL - KAL - PM - H - IRL - SF - N - PTQL - EEQCH - I					
Коколизин КФ 3.4.24.30	32,7	7	30	17	11
L - IVTQTMKG - LD - IQKV - AGTW - YS - L - AM - A - ASD - IS - L - LD - AQS - AP - LRV - YVEE - LKPTPEGDL - LE - I - L - LQKWENGEC - AQKK - I - I - AEKTK - IP - AV - FK - ID - A -					

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6
LNENKV - LV - LDTD - YKK - Y - L - L - FCMENS - AEPEQS - L - ACQC - LVRTPEVDDE - A - LEK - FDK - A - LK - A - LPMH - IR - LS - FNPTQ - LEEQCH - I					
Химаза КФ 3.4.21.39	19,4	8	22	7	8
L - IVTQTMKGL - DIQKVAGTW - Y - SL - AMAASDISL - L - DAQSAPL - RVY - VEEL - KPTPEGDL - EIL - L - QKW - ENGECAQKKIIAEKTKIPAVF - KIDAL - NENKVL - VL - DTDY - KKY - L - L - F - CMENSAEPEQSL - ACQCL - VRTPEVDDEAL - EKF - DKAL - KAL - PMHIRL - SF - NPTQL - EEQCHI					
Трипсин КФ 3.4.21.4	10,9	11	15	2	2
LIVTQTMK - GLDIQK - VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR - VYVEELK - PTEGDL EILLQK - WENGECAQK - K - IAEK - TK - IPAVFK - IDALNENK - VLVLDTDYK - K - YLLFCMENSAEPEQSLACQCLVR - TPEVDDEALEK - FDK - ALK - ALPMHIR - LSFNPTQLEEQCHI					
BCA					
Пепсин (pH > 2) КФ 3.4.23.1	68,5	5	85	281	105
RG - VF - RRD - T - HK - SE - IA - HRF - K - D - L - G - E - E - HF - K - G - L - VL - IA - F - SQ - Y - L - Q - Q - CPF - D - E - H - VK - L - VN - E - L - T - E - F - A - K - T - C - VA - D - E - SHA - G - CE - K - SL - HT - L - F - G - D - E - L - CK - VA - SL - RE - T - Y - G - D - M - A - D - CCE - K - Q - E - PE - RN - E - CF - L - SHK - D - D - SPD - L - PK - L - K - PD - PN - T - L - CD - E - F - K - A - D - E - K - K - F - WG - K - Y - L - Y - E - IA - RRHPY - F - Y - A - PE - L - L - Y - Y - A - N - K - Y - N - G - VF - Q - E - CCQ - A - E - D - K - G - A - CL - L - PK - IE - T - M - RE - K - VL - A - SSA - RQ - RL - RCA - S - IQ - K - F - G - E - RA - L - K - A - WS - VA - RL - SQ - K - F - PK - A - E - F - VE - VT - K - L - VT - D - L - T - K - VHK - E - CCHG - D - L - L - E - CA - D - D - RA - D - L - A - K - Y - ICD - N - Q - D - T - ISSK - L - K - E - CCD - K - PL - L - E - K - SHC - IA - E - VE - K - D - A - IPE - N - L - PPL - T - A - D - F - A - E - D - K - D - VCK - N - Y - Q - E - A - K - D - A - F - L - G - SF - L - Y - E - Y - SRRHPE - Y - A - VS - VL - L - RL - A - K - E - Y - E - A - T - L - E - E - CCA - K - D - D - PHA - CY - ST - VF - D - K - L - K - HL - VD - E - PQ - N - L - IK - Q - N - CD - Q - F - E - K - L - G - E - Y - G - F - Q - N - A - L - I - VRY - T - RK - VPQ - VST - PT - L - VE - VSRSL - G - K - VG - T - RCCT - K - PE - SE - RM - PCT - E - D - Y - L - SL - IL - N - RL - C - VL - HE - K - T - P - VSE - K - VT - K - CCT - E - SL - VN - RRPCF - SA - L - T - PD - E - T - Y - VPK - A - F - D - E - K - L - F - T - F - HA - D - ICT - L - PD - T - E - K - Q - IK - K - Q - T - A - L - VE - L - L - K - HK - PK - A - T - E - E - Q - L - K - T - VM - E - N - F - VA - F - VD - K - CCA - A - D - D - K - E - A - CF - A - VE - G - PK - L - V - VST - Q - T - A - L - A					
Протеиназа P1 КФ 3.4.21.96	41,7	29	72	153	112
RGV - FRRDTHK - SEIAHRFKD - L - GEEHFKG - L - V - L - IAF - S - Q - Y - L - Q - Q - C - P - FDEHV - K - L - V - NE - L - TEFAKTCV - ADE - SHAGCEK - S - L - HT - L - FGDE - L - CKV - A - S - L - RETYGDMADCCEK - Q - E - P - ERNECF - L - SHKDD - S - P - D - L - P - K - L - K - P - D - P - NT - L - CDEFKADEKKFWGKY - L - YEIARRH - P - YFYA - P - E - L - L - YYANKYNGV - F - Q - ECC - Q - AEDKGAC - L - L - P - KIETMREKV - L - A - S - SAR - Q - R - L - RCA - SI - Q - KFGERA - L - KAW - SV - AR - L - S - Q - KF - P - KAEFV - EV - TK - L - V - TD - L - TKV - HK - ECCHGD - L - L - ECADDRAD - L - AKYICDN - Q - DTI - S - SK - L - KECCDK - P - L - L - EK - SHCIAEV - EKDAI - P - EN - L - P - P - L - TADFAEDKDV - CKNY - Q - EAKDAF					

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6
<p>- G - DEL - CKV - A - S - L - R - ET - YG - DMA - DCCEKQEPER - NECF - L - S - HKDDS - PDL - PKL - KPDPNT - L - CDEF - KA - DEKKF - WG - KYL - YEIA - R - R - HPYF - YA - PEL - L - YYA - NKYNG - V - F - QECCQA - EDKG - A - CL - L - PKIET - MR - EKV - L - A - S - S - A - R - QR - L - R - CA - S - IQKF - G - ER - A - L - KA - WS - V - A - R - L - S - QKF - PKA - EF - V - EV - T - KL - V - T - DL - T - KV - HKECCHG - DL - L - ECA - DDR - A - DL - A - KYICDNQDT - IS - S - KL - KECCDKPL - L - EKS - HCIA - EV - EKDA - IPENL - PPL - T - A - DF - A - EDKDV - CKNYQEA - KDA - F - L - G - S - F - L - YEYS - R - R - HPEYA - V - S - V - L - L - R - L - A - KEYEA - T - L - EECCA - KDDPHA - CYS - T - V - F - DKL - KHL - V - DEPQNL - IKQNCDQF - EKL - G - EYG - F - QNA - L - IV - R - YT - R - KV - PQV - S - T - PT - L - V - EV - S - R - S - L - G - KV - G - T - R - CCT - KPES - ER - MPCT - EDYL - S - L - IL - NR - L - CV - L - HEKT - PV - S - EKV - T - KCCT - ES - L - V - NR - R - PCF - S - A - L - T - PDET - YV - PKA - F - DEKL - F - T - F - HA - DICT - L - PDT - EKQIKKQT - A - L - V - EL - L - KHKPKA - T - EEQL - KT - V - MENF - V - A - F - V - DKCCA - A - DDKEA - CF - A - V - EG - PKL - V - V - S - T - QT - A - L - A</p>					
Протеиназа К КФ 3.4.21.67	32,0	29	99	65	65
<p>RGV - F - RRDTHKSEI - AHRF - KDL - GEEHF - KGL - V - L - I - AF - SQY - L - QQCP - F - DEHV - KL - V - NEL - TEF - AKTCV - ADESHAGCEKSL - HTL - F - GDEL - CKV - ASL - RETY - GDM - ADCCEKQEP - ERNECF - L - SHKDDSP - DL - P - KL - KP - DP - NL - CDEF - KADEKKF - W - GKY - L - Y - EI - ARRHP - Y - F - Y - AP - EL - L - Y - Y - ANKY - NGV - F - QECCQAEDKGACL - L - P - KI - ETM - REKV - L - ASSARQRL - RCASI - QKF - GERAL - KAW - SV - ARL - SQKF - P - KAEF - V - EV - TKL - V - TDL - TKV - HKECCHGDL - L - ECADDRADL - AKY - I - CDNQDTI - SSKL - KECCDKP - L - L - EKSHCI - AEV - EKDAI - P - ENL - P - P - L - TADF - AEDKDV - CKNY - QEAKDAF - L - GSF - L - Y - EY - SRRHP - EY - AV - SV - L - L - RL - AKEY - EATL - EECCA - KDDP - HACY - STV - F - DKL - KHL - V - DEP - QNL - I - KQNCDQF - EKL - GEY - GF - QNAL - I - V - RY - TRKV - P - QV - STP - TL - V - EV - SRSL - GKV - GTRCCTKP - ESERM - P - CTEDY - L - SL - I - L - NRL - CV - L - HEKTP - V - SEKV - TKCCTESL - V - NRRP - CF - SAL - TP - DETY - V - P - KAF - DEKL - F - TF - HADI - CTL - P - DTEKQI - KKQTAL - V - EL - L - KHKP - KATEEQ - KT - V - M - ENF - V - AF - V - DKCCAADDKEACF - AV - EGP - KL - V - V - STQTAL - A</p>					
Термолизин КФ 3.4.24.27	34,2	32	102	79	57
<p>RG - V - FRRDTHKSE - I - AHR - FKD - LGEEH - FKG - L - V - L - I - A - FSQ - Y - LQQCP - FDEH - VK - L - VNE - LTE - F - AKTC - V - ADESH - AGCEKS - LHT - L - FGDE - LCK - V - AS - LRET - YGDM - ADCCEKQEPERNEC - F - LSHKDDSPD - LPK - LKPDPNT - LCDE - FK - ADEKK - FWGK - Y - L - YE - I - ARRHP - Y - F - Y - APE - L - L - Y - Y - ANK - YNG - V - FQECCQ - AEDKG - AC - L - LPK - IETMREK - V - L - ASS - ARQR - LRC - AS - IQK - FGER - A - LK - AWS - V - AR - LSQK - FPK - AE - F - VE - VTK - L - VTD - LTK - VHKECCHGD - L - LEC - ADDR - AD - L - AK - Y - ICDNQDT - ISSK - LKECCDKP - L - LEKSHC - I - AE - VEKD - A - IPEN - LPP - LT - AD - F - AEDKD - VCKN - YQE - AKD - A - F - LGS - F - L - YE - YSRRHPE - Y - A - VS - V - L - LR - L - AKE - YE - AT - LEECC - AKDDPH - AC - YST - V - FDK - LKH - L - VDEPQN - L - IKQNCDQ - FEK - LGE - YG - FQN - A - L - I - VR - YTRK - VPQ - VSTPT - L - VE - VSRS - LGK - VGTRCCTKPESERMPC TED - Y - LS - L - I - LN - LC - V - LHEKTP - VSEK - VTKCCTES - L - VNRRPC - FS - A - LTPDET - Y - VPK - A - FDEK - L - FT - FH - AD - ICT - LPDTEKQ - IKKQT - A - L - VE - L - LKHKPK - ATEEQ - LKT - VMEN - F - V - A - F - VDKCC - A - ADDKE - AC - F - A - VEGPK - L - V - VSTQT - A - L - A</p>					

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6
Папаин КФ 3.4.22.2	34,8	29	120	39	56
R - G - VF - R - R - DT - HKSEI - AHR - F - KDL - G - EEHF - KG - L - VL - I - AF - S - QYL - Q - QC PF - DEHVKL - VNEL - T - EF - AKT - CV - ADESH - AG - CEKSL - HT - L - F - G - DEL - CKV - ASL - R - ET - YG - DM - ADCCEK - QEPER - NECF - L - SHKDDSPDL - PKL - KPDPNT - L - CDEF - K - ADEKKF - WG - KYL - YEI - AR - R - HPYF - Y - APEL - L - YY - ANKYNG - VF - QECC - Q - AEDKG - ACL - L - PKIET - MR - EKVL - ASS - AR - QR - L - R - C - ASI - QKF - G - ER - AL - K - AWSV - AR - L - S - QKF - PK - AEF - VEV - KL - VT - DL - T - KVHK - ECCHG - DL - L - EC - ADDR - ADL - AKYICDN - QDT - ISSKL - KECCDKPL - L - EKSHCI - AEVEKD - AIPENL - PPL - T - ADF - AEDKDVCKNY - QE - AKD - AF - L - G - SF - L - YEYSR - R - HPEY - AVSVL - L - R - L - AKEYE - AT - L - EECC - AKDDPH - ACYST - VF - DKL - KHL - VDEP - QNL - IK - QNCD - QF - EKL - G - EYG - F - QN - AL - IVR - YT - R - KVP - QVST - PT - L - VEVSR - SL - G - KVG - T - R - CCT - KPESER - MPCT - EDYL - SL - IL - NR - L - CVL - HEKT - PVSEKVT - KCCT - ESL - VNR - R - PCF - S - AL - T - PDET - YVPK - AF - DEKL - F - T - F - H - ADICT - L - PDT - EK - QIKK - QT - AL - VEL - L - KHKPK - AT - EE - QL - KT - VMENF - V - AF - VDKCC - A - ADDKE - ACF - AVEG - PKL - VVST - QT - AL - A					
Субтилизин КФ 3.4.21.62	26,8	34	96	43	35
RG - VF - RRDTHKS - EIAHRF - KDL - GEEHF - KGL - VL - IAF - S - QY - L - QQCPF - DEH - VKL - VNEL - TEF - AKTC - VADES - HAGCEKS - L - HTL - F - GDEL - CK - VAS - L - RETY - GDMADCCEKQEPERNECF - L - S - HKDDS - PDL - PKL - KPDPNTL - CDEF - KADEKKF - W - GKY - L - Y - EIARRHPY - F - Y - APEL - L - Y - Y - ANKY - NG - VF - QECCQAEDKGACL - L - PKIETMREK - VL - AS - S - ARQRL - RCAS - IQKF - GERAL - KAW - S - VARL - S - QKF - PKAEF - VE - VTKL - VTDL - TK - VHKECCHGDL - L - ECADDRADL - AKY - ICDNQDTIS - S - KL - KECCDKPL - L - EKS - HCIAE - VEKDAIPENL - PPL - TADF - AEDKD - VCKNY - QEAKDAF - L - GS - F - L - Y - EY - S - RRHPEY - A - VS - VL - L - RL - AKEY - EATL - EECCA KDDPHACY - S - T - VF - DKL - KHL - VDEPQNL - IKQNCDQF - EKL - GEY - GF - QNAL - I - VRY - TRK - VPQ - VS - TPTL - VE - VS - RS - L - GK - VGTRCCTKPES - ERMPC TEDY - L - S - L - IL - NRL - C - VL - HEKTP - VS - EK - VTKCTES - L - VNRRPCF - S - AL - TPDETY - VPKAF - DEKL - F - TF - HADICTL - PDTEKQIKKQTAL - VEL - L - KHKPKATEEQ - L - KT - VMENF - VAF - VDKCCAADDKEACF - A - VEGPKL - V - VS - TQTAL - A					
Химотрипсин КФ 3.4.21.1	24,2	30	92	33	31
RGVF - RRDTH - KSEIAH - RF - KDL - GEEH - F - KGL - VL - IAF - SQY - L - QQCPF - DEH - VKL - VN - EL - TEF - AKTCVADESH - AGCEKSL - H - TL - F - GDEL - CKVASL - RETY - GDM - ADCCEKQEPERN - ECF - L - SH - KDDSPDL - PKL - KPDPN - TL - CDEF - KADEKKF - W - GKY - L - Y - EIARRH - PY - F - Y - APEL - L - Y - Y - AN - KY - N - GVF - QECCQAEDKGACL - L - PKIETM - REKVL - ASSARQRL - RCASIQKF - GERAL - KAW - SVARL - SQKF - PKAEF - VEVTKL - VTDL - TKVH - KECCH - GDL - L - ECADDRADL - AKY - ICDN - QDTISSKL - KECCDKPL - L - EKSH - CIAEVEKDAIPEN - L - PPL - TADF - AEDKDVCKN - Y - QEAKDAF - L - GSF - L - Y - EY - SRRH - PEY - AVSVL - L - RL - AKEY - EATL - EECCA KDDPH - ACY - STVF - DKL - KH - L - VDEPQN - L - IKQN - CDQF - EKL - GEY - GF - QN - AL - IVRY - TRKVPQVSTPTL - VEVSRSL - GKVGT RCCTKPESERM - PCTEDY - L - SL - IL - N - RL - CVL - H - EKTPVSEKVT KCCTESL - VN - RRPCF - SAL - TPDETY - VPKAF					

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6
- DEKL - F - TF - H - ADICTL - PDTEKQIKKQTAL - VEL - L - KH - KPKATEEQL - KTVM - EN - F - VAF - VDKCCAADDKEACF - AVEGPKL - VVSTQTAL - A					
Коколизин КФ 3.4.24.30	28,2	33	100	51	33
RGV - FRRDTHKSE - I - AHR - FKD - LGEEH - FKG - LV - L - I - A - FSQ - Y - LQQCP - FDEHVK - LVNE - LTE - F - AKTCV - ADESH - AGCEKS - LHT - L - FGDE - LCKV - AS - LRET - YGDM - ADCCEKQEPERNEC - F - LSHKDDSPD - LPK - LKPDNT - LCDE - FK - ADEKK - FWGK - Y - L - YE - I - ARRHP - Y - F - Y - APE - L - L - Y - Y - ANK - YNGV - FQECCQ - AEDKG - AC - L - LPK - IETMREKV - L - ASS - ARQR - LRC - AS - IQK - FGER - A - LK - AWSV - AR - LSQK - FPK - AE - FVEVTK - LVTD - LTKVHKECCHGD - L - LEC - ADDR - AD - L - AK - Y - ICDNQDT - ISSK - LKECCDKP - L - LEKSHC - I - AEVEKD - A - IPEN - LPP - LT - AD - F - AEDKDVCKN - YQE - AKD - A - F - LGS - F - L - YE - YSRRHPE - Y - AVSV - L - LR - L - AKE - YE - AT - LEECC - AKDDPH - AC - YSTV - FDK - LKH - LVDEPQN - L - IKQNCQ - FEK - LGE - YG - FQN - A - L - IVR - YTRKVPQVSTPT - LVEVRS - LGKVGTRCCTKPESERMPCTED - Y - LS - L - I - LNR - LCV - LHEKTPVSEKVTKCCTES - LVNRRPC - FS - A - LTPDET - YVPK - A - FDEK - L - FT - FH - AD - ICT - LPDTEKQ - IKKQT - A - LVE - L - LKHKPK - ATEEQ - LKTVMEN - FV - A - FVDKCC - A - ADDKE - AC - F - AVEGPK - LVVSTQT - A - L - A					
Химаза КФ 3.4.21.39	18,3	33	79	22	22
RGVF - RRDTHKSEIAHRF - KDL - GEEHF - KGL - VL - IAF - SQY - L - QQCPF - DEHVKL - VNEL - TEF - AKTCVADESHAGCEKSL - HTL - F - GDEL - CKVASL - RETY - GDMADCCCEKQEPERNECF - L - SHKDDSPDL - PKL - KPDPNTL - CDEF - KADEKKF - W - GKY - L - Y - EIARRHPY - F - Y - APEL - L - Y - Y - ANKY - NGVF - QECCQAEDKGACL - L - PKIETMREKVL - ASSARQRL - RCASIQKF - GERAL - KAW - SVARL - SQKF - PKAEF - VEVTKL - VTDL - TKVHKECCHGDL - L - ECADDRADL - AKY - ICDNQDTISSKL - KECCDKPL - L - EKSHCIAEVEKDAIPENL - PPL - TADF - AEDKDVCKNY - QEAKDAF - L - GSF - L - Y - EY - SRRHPEY - AVSVL - L - RL - AKEY - EATL - ECCAADDPHACY - STVF - DKL - KHL - VDEPQNL - IKQNCQF - EKL - GEY - GF - QNAL - IVRY - TRKVPQVSTPTL - VEVSRL - GKVGTRCCTKPESERMPCTEDY - L - SL - IL - NRL - CVL - HEKTPVSEKVTKCCTESL - VNRRPCF - SAL - TPDETY - VPKAF - DEKL - F - TF - HADICTL - PDTEKQIKKQTAL - VEL - L - KHKPKATEEQL - KTVMENF - VAF - VDKCCAADDKEACF - AVEGPKL - VVSTQTAL - A					
Трипсин КФ 3.4.21.4	13,7	46	68	7	4
R - GVFR - R - DTHK - SEIAHR - FK - DLGEEHFK - GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK - LVNELTEFAK - TCVADESHAGCEK - SLHTLFGDELCK - VASLR - ETYGDMADCCCK - QEPER - NECFLSHK - DDSPDLPK - LK - PDPNTLCDEFK - ADEK - K - FWGK - YLYEIAR - R - HPYFYAPELLYYANK - YNGVFQECCQAEDK - GACLLPK - IETMR - EK - VLISSAR - QR - LR - CASIQK - FGER - ALK - AWSVAR - LSQK - FPK - AEFVEVTK - LVTDLTK - VHKECCHGDLLECADDR - ADLAK - YICDNQDTISSK - LK - ECCDK - PLEK - SHCIAEVEK - DAIPENLPLTADFAEDK - DVCK - NYQEAK - DAFLGSFLYEYSR - R - HPEYAVSVLLR - LAK - EYEATLEECCA - DDPHACYSTVFDK - LK - HLVDPEQNLIK - QNCQFEK - LGEYGFQNALIVR - YTR - K - VPQVSTPTLVEVSR - SLGK - VGTR - CCTK - PESER - MPCTEDYLSLILNR - LCVLHEK - TPVSEK - VTK - CCTESLVNR - R - PCFSALTPDETYVPK -					

Продолжение таблицы 4.1

AFDEK - LFTFHADICTLPDTEK - QIK - K - QTALVELLK - НК - PK - ATEEQLK - TVMENFVAFVDK - CCAADDK - EACFAVEGPK - LVVSTQTALA
КРАСНЫЕ – АК, одновременно координирующие Zn и связывающие I (E; R; D; F) ГОЛУБЫЕ – АК, координирующие Zn (C; H; M) ЗЕЛЕНый – АК, связывающие I (G; Y; P; W; A) Желтым цветом выделены сайты связывания двухвалентных металлов: KFLDDDLTDD в α -ЛА, ECCHGDLLECADDRA в БСА

Максимальное количество пептидов, потенциально связывающих ионы йода, наблюдалось при гидролизе Термолизинном и Субтилизином (для α -ЛА), Папаином и Панкреатической эластазой (для β -ЛГ), Папаином и Фицином (для БСА). В то же минимальное количество свободных аминокислот (2 для α -ЛА и β -ЛГ, 7 для БСА) и аминокислот, обладающих горьким вкусом (2 для α -ЛА и β -ЛГ, 4 для БСА), наблюдалось при гидролизе сывороточных белков Трипсином, при этом количество пептидов, потенциально связывающих йод находилось на высоком уровне: 12 для α -ЛА, 15 для β -ЛГ, 68 для БСА. Кроме того, следует отметить, что Трипсин является единственной протеазой, которая критически не подвергает деградации сайт связывания кальция KFLDDDLTDD в α -ЛА, а также крупный аминокислотный участок ECCHGDLLECADDRA связывания цинка и кальция по принципу сродства (данные Uniprot) в БСА. Таким образом, для дальнейшего гидролиза *in vitro* наиболее рациональной протеазой является Трипсин, поскольку отвечает ключевым параметрам характеристики ферментного препарата для гидролиза модифицированной белковой матрицы молочной сыворотки, обогащенной цинком, сформулированным в начале подглавы.

4.2. Исследование закономерностей связывания йода с белками молочной сыворотки

На данном этапе работы необходимо было первоначально определить эффективные условия гидролиза (активная кислотность, температура,

продолжительность гидролиза) белкового сырья Трипсином *in vitro*. Для оптимизации параметров проводили полнофакторный эксперимент с 3 переменными параметрами, варьируемыми на 3 уровнях: температура (X_1), активная кислотность (X_2), продолжительность гидролиза (X_3) (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Уровни вариации независимых параметров при многофакторных экспериментах по оптимизации условий гидролиза WPC- α трипсином

Параметр	Переменная	Уровень варьирования		
		-1	0	1
Активная кислотность, ед. рН	X_1	7	8	9
Температура, °С	X_2	30	40	50
Продолжительность, мин	X_3	30	105	180

Функция желательности соответствовала максимальной степени гидролиза субстрата трипсином, что было ассоциировано с доступностью аминокислотных сайтов для связывания йода. Результаты статистической оценки влияния варьируемых параметров на степень гидролиза WPC- α трипсином представлены в таблице 4.3.

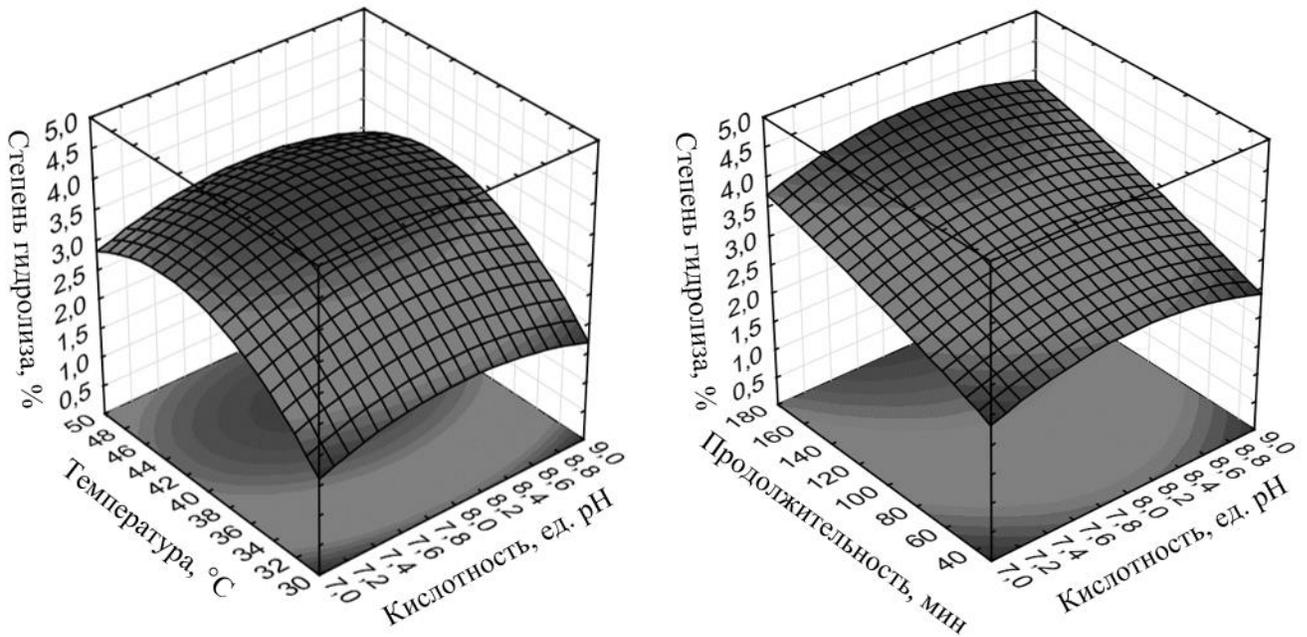
Таблица 4.3 – Влияние варьируемых факторов на степень гидролиза WPC- α трипсином

Фактор	Эффект	Ст. откл.	t(66)	p	-95,%	+95,%
Сред/Св.член	2,637	0,028	93,600	0,000	2,578	2,696
X_1 (L)	0,091	0,069	1,323	0,203	-0,054	0,237
X_1 (Q)	0,428	0,060	7,165	0,000	0,302	0,554
X_2 (L)	1,210	0,069	17,534	0,000	1,064	1,356
X_2 (Q)	0,897	0,060	15,013	0,000	0,771	1,023
X_3 (L)	1,387	0,069	20,094	0,000	1,241	1,532
X_3 (Q)	0,086	0,060	1,443	0,167	-0,040	0,212
X_1 (L) на X_2 (L)	0,017	0,085	0,200	0,844	-0,161	0,195
X_1 (L) на X_3 (L)	0,024	0,085	0,279	0,784	-0,155	0,202
X_2 (L) на X_3 (L)	0,318	0,085	3,758	0,002	0,139	0,496

Сред/Св.член – среднее значение отклика (целевой переменной) при нулевых значениях всех факторов; **эффект** – вклад каждого фактора (или их взаимодействий) в изменение целевой переменной; **t(66)** – t-критерий Стьюдента; **p** – значение уровня значимости фактора; **-95,%** и **+95,%** – доверительный интервал 95%; **(L)** и **(Q)** – линейное и квадратичное влияние фактора на целевую переменную.

Установлено значимое ($p < 0,05$) положительное линейное влияние температуры (X_2) и продолжительности гидролиза (X_3), а также их совокупного воздействия на степень гидролиза. Кроме того, показано значимое положительное квадратичное влияние кислотности (X_1) и температуры (X_2) на степень гидролиза WPC- α . Таким

образом, можно сделать вывод о значимом влиянии температуры и продолжительности гидролиза на степень расщепления белковых молекул, при этом следует учитывать, что увеличение значений параметров процесса выше оптимума может негативно отражаться на кинетике, поскольку квадратичные составляющие переменных указывают на существование их оптимальных диапазонов. Поверхности отклика влияния варьируемых параметров эксперимента на степень гидролиза представлена на рисунке 4.1.



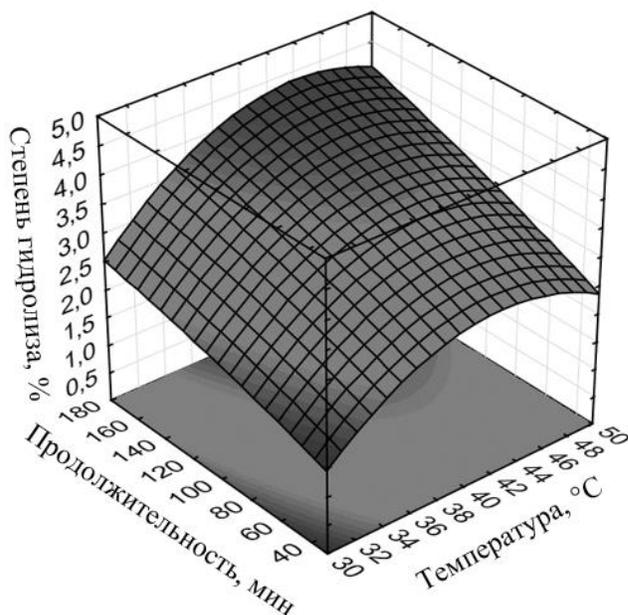


Рисунок 4.1 – Оптимизация условий процесса гидролиза WPC-α трипсином

По результатам проведенной оптимизации получено уравнение 4.1, включающее факторы, оказывающие значимое влияние на степень гидролиза WPC-α трипсином.

$$Y_{DH} = -40,816 + 6,846X_1 - 0,428X_1^2 + 0,749X_2 - 0,009X_2^2 + 0,003X_3 + 0,002X_2X_3 \quad (4.1.)$$

По результатам оптимизации параметров процесса гидролиза WPC-α трипсином определены оптимальные режимы протеолиза: pH - 8,0; температура - 44°C; продолжительность – 180 мин (таблица 4.4), что обеспечивает степень гидролиза 4,35%.

Таблица 4.4 – Результаты оптимизации процесса гидролиза WPC-α трипсином

X ₁	X ₂	X ₃	Степень гидролиза, %	Желательность, %
8	44	180	4,35	95,4

Дальнейший этап исследования заключался в определении оптимальных параметров связывания йода с нативными белками и гидролизатами, полученными при определенных оптимальных параметрах гидролиза. Ранее для связывания йода с белковыми субстратами применяли различные параметры среды: pH 6,0, 50°C, 24 часа, 4,5 мМ йодид-ионов [99]; 30±5°C, 0,5 или 1 М хлорида йода [73]; 18-25°C, pH

6,5-8,9, 4-8 часов, соотношение йодида калия и белкового сырья – 1:7-1:9 [58]; рН 6,5-7,5, раствор йодида калия концентрацией 0,002 М, соотношение белкового сырья и раствора йодида калия – 1:1, йодирование в течение 24 часов [60]; рН 7, 0-4°C, 20 часов, концентрация йода 50-100 мкг/1 г белка [31]. В этой связи, были изучены зависимости связывания йода с гидролизатами (HWPC- α) и нативными белками (WPC) от температурного (2; 10; 20; 30; 40°C) и кислотного (6,0; 7,0; 8,0 ед. рН) факторов, продолжительности процесса (6; 12; 18; 24 ч) и концентрации ионов молекулярного йода (0,8; 1,6; 2,4 М). В качестве источника йода использовали концентрированный раствор смеси молекулярного йода и йодида калия (содержание молекулярного йода 0,315 М). По результатам исследований, проведенных на негидролизированных белках, установлено, что при значениях рН 6 и 7 йод не связывался с белками, что может быть обосновано установленными ранее условиями связывания йода с ароматическими аминокислотами в щелочной среде, как сообщается в [73,87]. Данная особенность обоснована тем, что гидроксильная группа тирозина, связанная с ароматическим кольцом, в щелочной среде является сильнейшим орто-пара-ориентантом (заместитель, направляющий электрофильную атаку в орто- и пара-положения бензольного кольца), что создаёт условия для прохождения реакции замещения водорода на йод [8]. Эффекты йодирования гидролизатов белкового гидро модуля, полученные при рН 8,0, различных температурах и продолжительности, а также зависимость степени связывания галогена с белковыми фрагментами от его концентрации, представлены на рисунке 4.2.

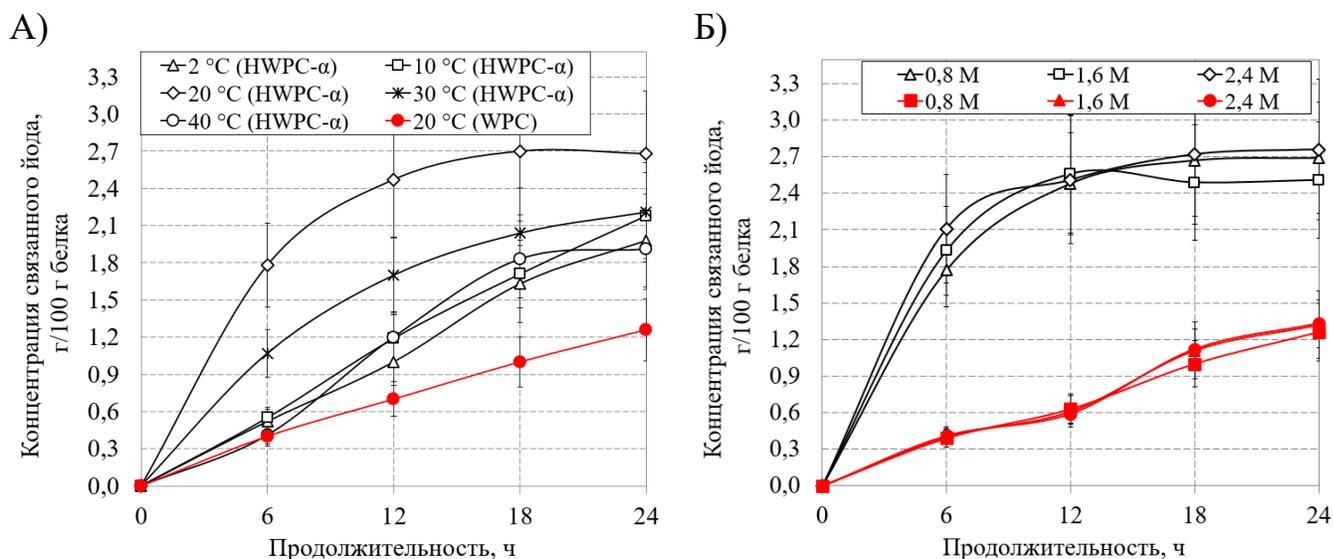


Рисунок 4.2 – Кинетика связывания йода гидролизатом белков молочной сыворотки (HWPC- α – гидролизат термоденатурированных белков с преобладанием α -ЛА) и концентратом белков молочной сыворотки (WPC – контрольный концентрат с интактным распределением белковых фракций); А – зависимость от температуры и продолжительности процесса, Б – зависимость от концентрации йода и продолжительности процесса)

По результатам исследований, проведенных с нативными белками, установлено, что при значениях рН 6,0 и рН 7,0 йод не связывался с белками, что, согласно литературным данным, может быть обусловлено спецификой формирования ковалентной связи йода с ароматическими аминокислотами в щелочной среде. Установлено, что при 20°C, рН 8,0 и продолжительности йодирования 24 часа нативные сывороточные белки связывали наибольшее количество микроэлемента, равное $1,3 \pm 0,3$ г йода на 100 г белка. Анализ полученных данных позволяет выделить параметры среды, соответствующие 20°C, рН 8,0 и продолжительности йодирования 12 часов как наиболее оптимальные, при которых концентрация органического йода, связанного с гидролизатом, составила $2,5 \pm 0,5$ г йода на 100 г белка, в то время как концентрация органически связанного с нативными белками йода за 12 часов составила $0,7 \pm 0,1$ г йода на 100 г белка. Таким образом, подтверждено, что ферментативный гидролиз повышает степень связывания белка с йодом, которое, вероятно, может быть обосновано увеличением количества доступных функциональных групп, способных иммобилизовать микроэлемент [31].

На второй стадии изучения кинетики связывания йода с модифицированной матрицей сывороточных белков проведены исследования, направленные на оценку изменения участков связывания цинка и сайтов связывания йода в зависимости от продолжительности гидролиза субстрата (15; 30; 45; 60; 90; 120; 150 и 180 минут) и фермент-субстратного соотношения (1/75; 1/100; 1/500 СPROT г/г). В качестве контролируемых параметров также исследовали: степень гидролиза, концентрацию свободных аминокислот и интенсивность горечи. Результаты представлены на рисунках 4.3-4.4.

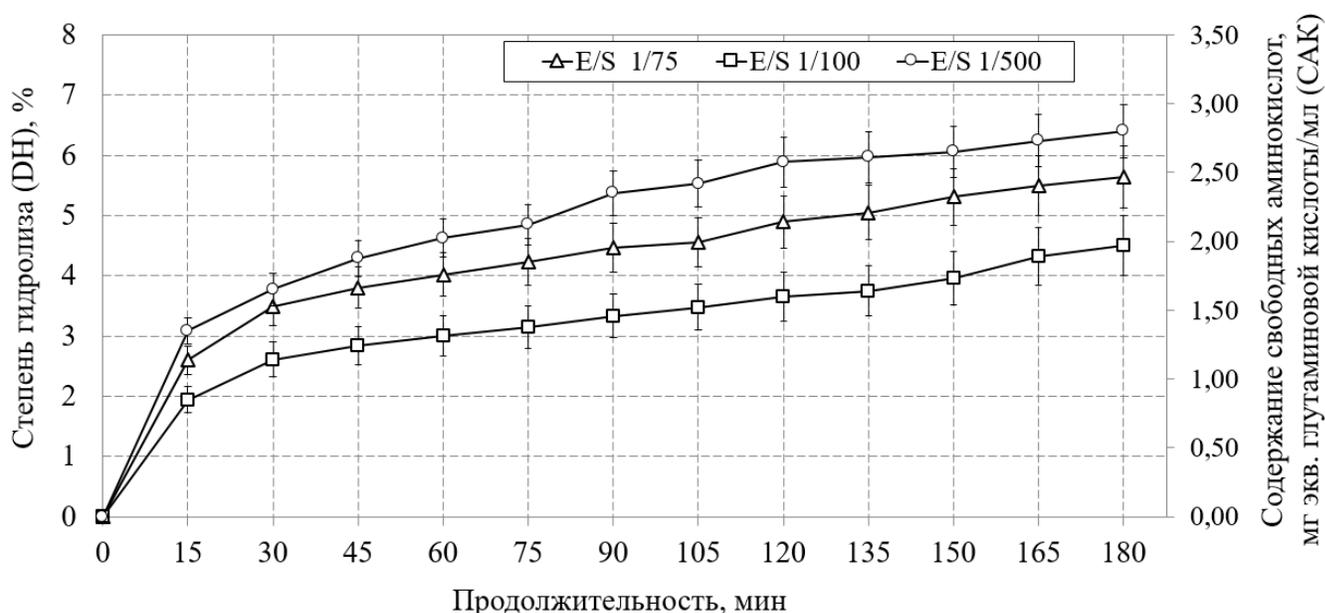
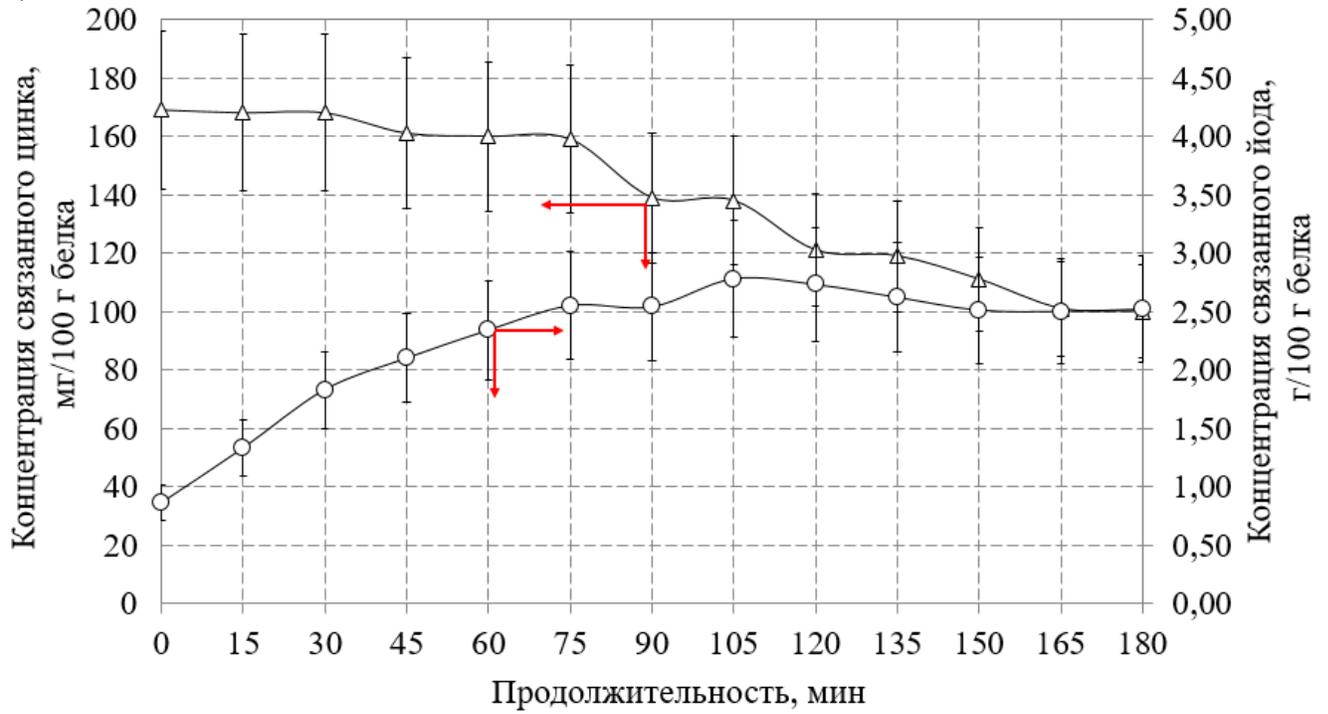
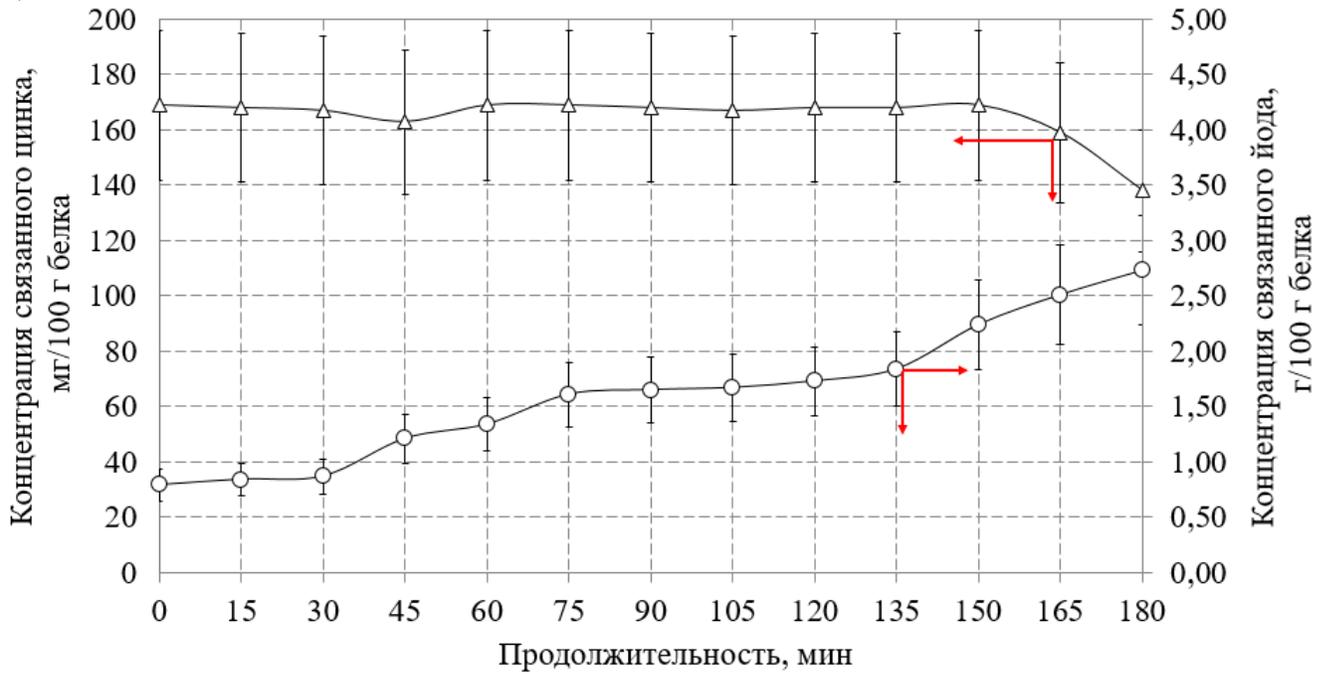


Рисунок 4.3 – Динамика изменения степени гидролиза и накопления свободных аминокислот в зависимости от фермент-субстратного в процессе гидролиза WPC- α трипсином

А)



Б)



В)

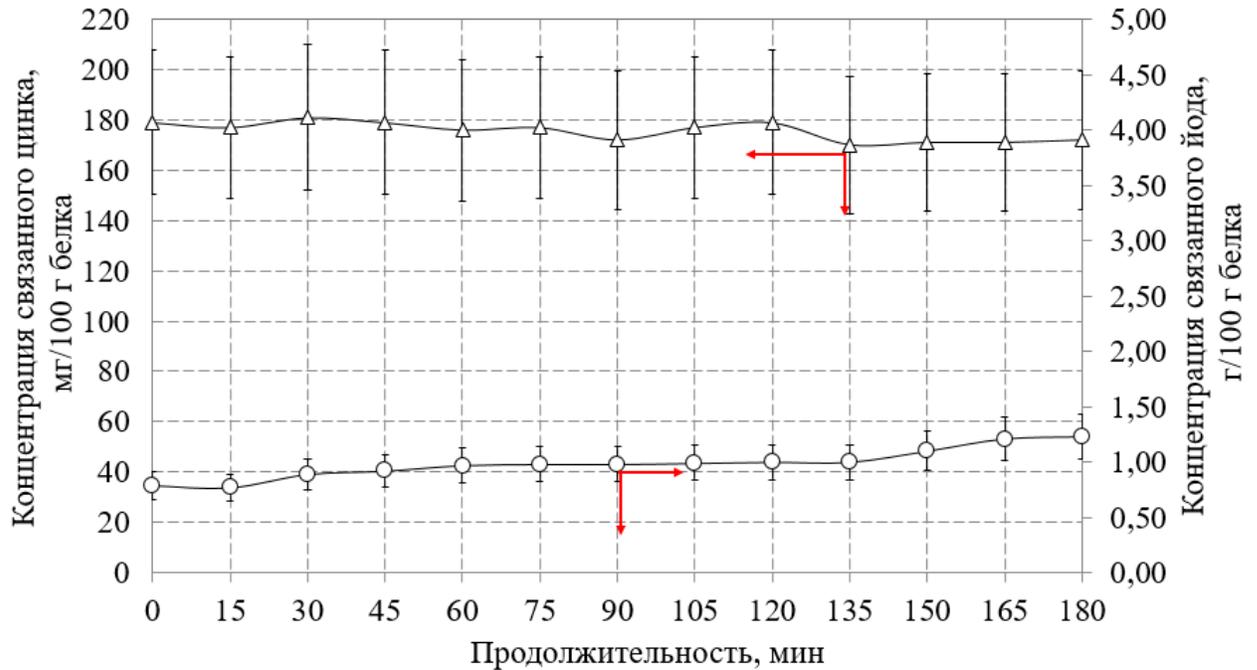


Рисунок 4.4 – Зависимость изменения концентраций органически связанных цинка и йода от фермент-субстратного соотношения и продолжительности гидролиза WPC-α трипсином (А – E/S 1/75, Б – E/S 1/100, В – E/S 1/500)

Установлено, что рациональным следует считать E/S 1/100 CPROT г/г, так как при гидролизе WPC-α, обогащенного цинком, концентрация микроэлемента статистически значимо не изменялась ($161,7 \pm 26,7$ мг/100 г белка) на протяжении 165 минут гидролиза ($DN = 4,4 \pm 0,3\%$), а концентрация связанного йода при такой степени гидролиза белка достигала максимума ($2,5 \pm 0,4$ г/100 г белка). Гидролизаты сывороточных белков характеризовались отсутствием горечи и концентрацией САК $1,8 \pm 0,2$ мг экв. глутаминовой кислоты/мл. Степень гидролиза по результатам исследования ниже теоретической ($\sim 11\%$), что может быть обосновано такой характеристикой ферментов, как вторичная специфичность (чувствительность фермента к соседним аминокислотам на сайте расщепления) [97] и подобранным фермент-субстратным соотношением.

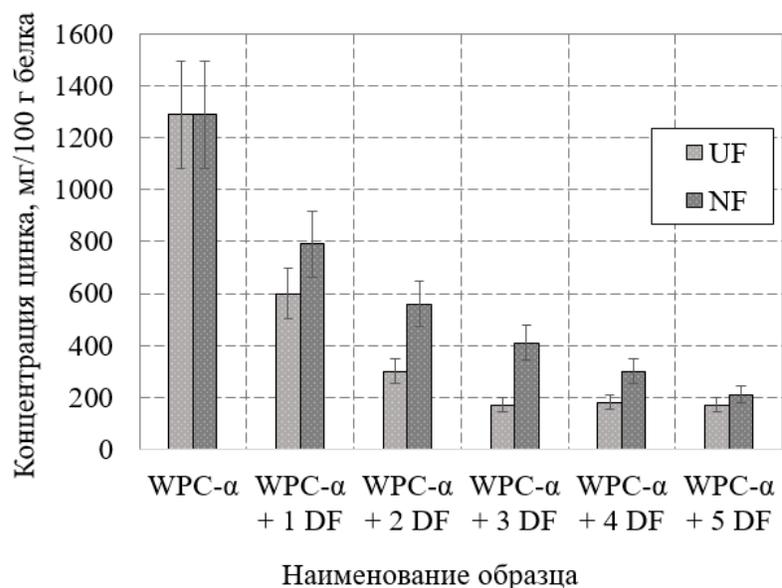
Таким образом, определены оптимальные параметры гидролиза сывороточных белков трипсином (pH 8; 44°C; 165 минут; E/S 1/100), позволяющие получить степень деградации белковых компонентов, равную $4,4 \pm 0,3\%$, сохранение начального уровня

связанного с нативными белками цинка ($161,7 \pm 26,7$ мг/100 г белка) и максимальную степень связывания йода с гидролизатами ($2,5 \pm 0,4$ г/100 г белка), а также отсутствие веществ, обуславливающих горечь, и низкое содержание САК.

4.3. Подбор эффективных режимов баромембранной очистки обогащенных белков молочной сыворотки

Исследование эффективных режимов баромембранной очистки обогащенных белков молочной сыворотки от неорганического йода и цинка осуществляли на пилотной установке AL 362 (ООО «Альтаир», Россия) с блоком мембранных элементов, изготовленных из полиэфирсульфона с порогом задержки 5 и 0,6 кДа (ультрафильтрация и нанофильтрация для удаления несвязанного цинка и йода, кальция, хелатирующих фосфатных солей). Диафильтрацию проводили путем разбавления субстрата сопоставимым объемом обратноосмотической воды с последующим концентрированием при температуре (10 ± 2) °С. Определение эффективности очистки проводили по массопереносу белковых веществ и йода в ретентате и пермеате. Результаты сравнения режимов очистки гидролизатов методом ультра- и нанофильтрацией представлены на рисунке 4.5.

А)



Б)

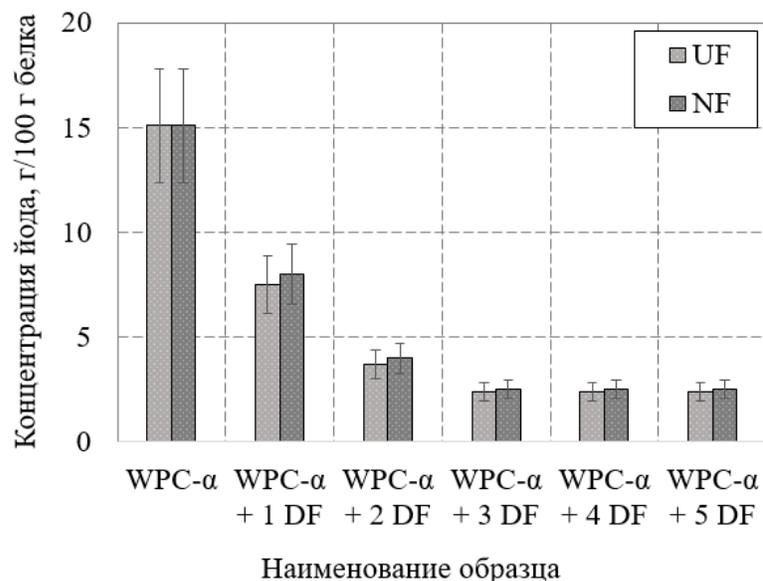


Рисунок 4.5 – Исследование баромембранного удаления несвязанных с белком цинка (А) и йода (Б) из обогащенного субстрата методом ультра- (UF) и нанофильтрации (NF) с использованием диафильтрации (DF)

Исследование принципов баромембранной очистки WPC-α от неорганического цинка (рисунок 4.5.А) показало, что при использовании нанофильтрационного мембранного элемента процесс очистки WPC-α от несвязанного с белком микроэлемента достигается только после 5-кратной диафильтрации, в то время как при ультрафильтрации после 3-кратной диафильтрации концентрация цинка уменьшилась до $168,0 \pm 26,3$ мг/100 г и при последующем диализе не изменялась, что указывает на присутствие хелатной формы, связанной с белком, который не проходит сквозь поры мембранного элемента. При очистке HWPC-α от неорганического йода (рисунок 4.5.Б) установлено, что после 3-кратной нанодиафильтрации концентрация йода достигла показателя $2,5 \pm 0,3$ г/100 г и в дальнейшем статистически значимо не изменялась. Несмотря на то, что ранее для очистки гидролизата сывороточных белков с ковалентно связанным йодом от неорганических примесей микроэлементов применяли ультрафильтрацию [14], в настоящем исследовании при ультрафильтрации наблюдался переход через мембрану части гидролизованных белковых веществ, а соответственно потеря связанного йода.

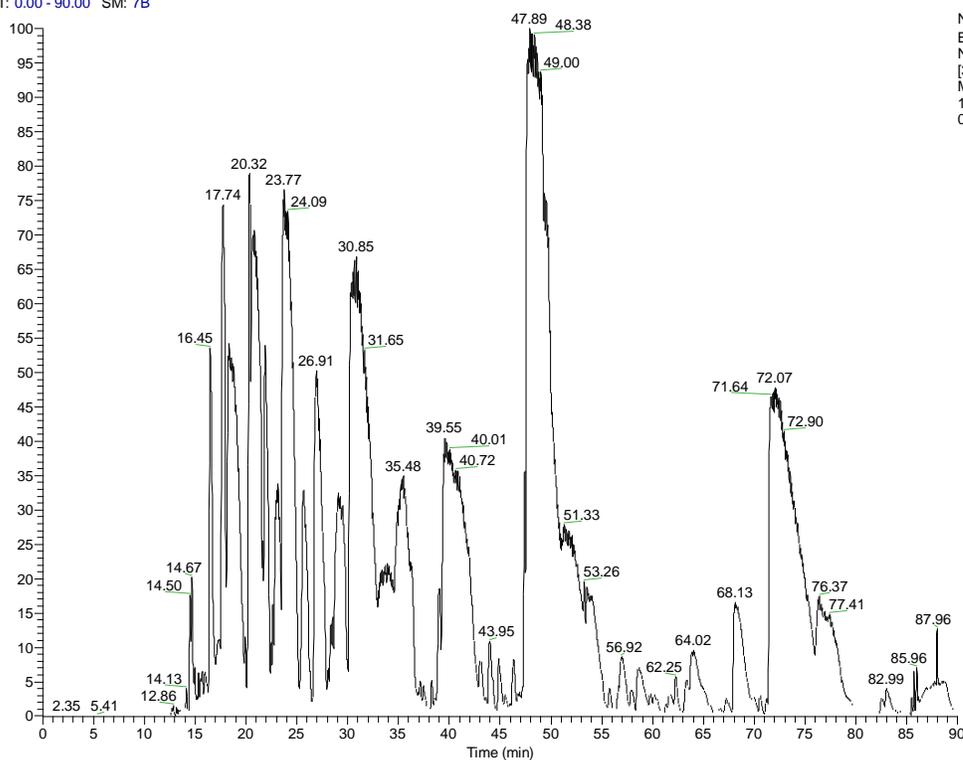
Таким образом, в результате проведения подбора эффективных режимов мембранной очистки обогащенных йодом и цинком белковых компонентов от неорганических примесей микроэлементов, рациональными следует считать 3-кратную ультрадиализацию для WPC-α с органически связанным цинком и 3-кратную нанодиализацию для HWPC-α с органически связанным йодом. Подобные режимы удаления неорганических примесей позволяют получить белковый субстрат с концентрацией цинка и йода $168,0 \pm 26,3$ мг/100 г и $2,5 \pm 0,3$ г/100 г соответственно.

4.4. Определение пептидного профиля обогащенного гидролизата сывороточных белков

При анализе пептидного профиля гидролизата сывороточных белков помимо стандартных модификаций, для проведения поиска возможных модификаций аминокислотного остатка йодом, в таблицу настроек программного пакета MaxQuant были внесены изменения – добавлены аминокислотные модификации, соответствующие одному и двум йодированным остаткам тирозина, фенилаланина и триптофана с изменением молекулярной массы относительно свободных не йодированных аминокислот. Данные аминокислоты, согласно проведенному в работе литературному поиску [44,46,58,102,118], способны формировать ковалентные связи с ароматическим кольцом аминокислот сывороточных белков. В полученных гидролизатах дополнительно проводили идентификацию биоактивных пептидов с использованием биоинформационных инструментов баз данных BioPer (<https://biochemia.uwm.edu.pl>), MBPDB (<https://mbpdb.nws.oregonstate.edu/>), AlgPred2 (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/algpred2>), ToxinPred (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred>). Результаты хроматографического исследования пептидов без йода и фрагментов, обогащенных микроэлементом, представлены на рисунке 4.6.

A)

RT: 0.00 - 90.00 SM: 7B



B)

RT: 0.00 - 90.00 SM: 7B

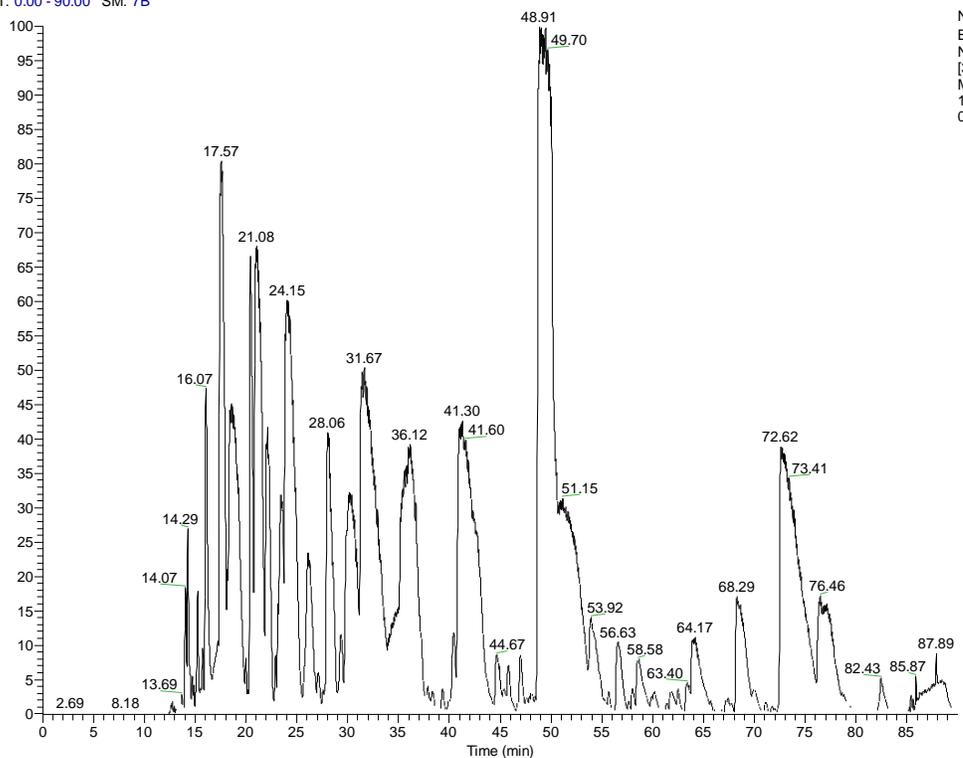


Рисунок 4.6 – Хроматограммы пептидов, полученных после гидролиза белков.
(А) – пептиды до обогащения йодом; (Б) – пептиды после обогащения йодом

В результате хромато-масс-спектрометрического анализа очищенного НWPC- α (после удаления минорных белковых последовательностей) было достоверно идентифицировано 59 валидированных пептидов (в т.ч. биоактивных), принадлежащих 7 основным белкам молока (рисунок 4.6 и таблица 4.5). Прекурсорами белковых последовательностей для 21 вида пептидов являлся β -ЛГ, для 20 – БСА, 8 – ЛФ, 5 – α S₁-КН, 2 – α -ЛА, 2 – α S₂-КН, 1 – β -КН.

Таблица 4.5 – Результаты скрининга пептидов, идентифицированных в гидролизате сывороточных белков, обогащенных йодом

Аминокислотная последовательность пептида	Белок-предшественник	Местоположение	Биологическая активность
1	2	3	4
LIVTQTMK	β -ЛГ	1-8	Стимулирует пролиферацию спленоцитов
LIVTQTMKGLDIQK	β -ЛГ	1-14	-
LIVTQTMKGLDIQKVAGT WYSLAMAASDISLLDAQSA PLR	β -ЛГ	1-40	-
ALKALPMHIR	β -ЛГ	139-148	Стимулирует пролиферацию спленоцитов
ALPMHIR	β -ЛГ	142-148	Антигипертензивный эффект путем снижения высвобождения вазоконстрикторэндотелина-1
IDALNENK	β -ЛГ	84-91	Антимикробный эффект по отношению к <i>L. monocytogenes</i> и <i>S. aureus</i>
IDALNENKVLVLDTDYK	β -ЛГ	84-100	-
IDALNENKVLVLDTDYKK	β -ЛГ	84-101	-
ПАЕКТКИPAVFK	β -ЛГ	71-83	-
IPAVFKIDALNENK	β -ЛГ	78-91	-
LSFNPTQLEEQCHI	β -ЛГ	149-162	-
TKIPAVFK	β -ЛГ	76-83	-
TKIPAVFKIDALNENK	β -ЛГ	76-92	-
TPEVDDEALEK	β -ЛГ	125-135	Антимикробный эффект по отношению к <i>L. monocytogenes</i> и

Продолжение таблицы 4.5

1	2	3	4
			<i>S. aureus</i> Антидиабетический эффект путем ингибирования ДПП-IV (IC ₅₀ 319,5 мкМ)
TPEVDDEALEKFDK	β-ЛГ	125-138	-
TPEVDDEALEKFDKALK	β-ЛГ	125-141	-
VAGTWYSLAMAASDISLL DAQSAPLR	β-ЛГ	15-40	-
VLVLDTDY(I)K	β-ЛГ	92-100	Антимикробный эффект по отношению к <i>E. Coli</i> и <i>B. Subtilis</i> Антидиабетический эффект путем ингибирования ДПП-IV (IC ₅₀ 424,4 мкМ)
VLVLDTDY(I)KK	β-ЛГ	92-101	-
VY(I)VEELKPTPEGDLEILL QK	β-ЛГ	41-60	Гипохолестеремический эффект путем регуляции уровня холестерина
PTPEGDLEILLQK	β-ЛГ	48-60	-
ALCSEK	α-ЛА	109-114	-
ILDKVGINYWLAHK	α-ЛА	95-108	Антидиабетический эффект путем ингибирования ДПП-IV (IC ₅₀ 23,1 мкМ)
AEFVEVTK	БСА	231-238	-
AEFVEVTKLVTDLTK	БСА	231-245	-
ALKAWSVAR	БСА	215-223	-
AWSVAR	БСА	218-223	-
DAIPENLPPLTADFAEDK	БСА	301-318	-
DLGEEHFK	БСА	19-26	-
FKDLGEEHFK	БСА	17-26	-
FPKAEFVEVTK	БСА	228-238	-
HLVDEPQNLIK	БСА	384-394	-
HPEYAVSVLLR	БСА	343-353	-
KQTALVELLK	БСА	530-539	-
LGEYGFQNALIVR	БСА	403-415	-
LGEYGFQNALIVRYTR	БСА	403-418	-
LVNELTEFAK	БСА	48-57	-
LVVSTQTALA	БСА	580-589	-
RHPEYAVSVLLR	БСА	342-353	-
TVMENFVAFVDK	БСА	551-562	-

Продолжение таблицы 4.5

1	2	3	4
KVPQVSTPTLVEVSR	БСА	419-433	-
LVTDLTK	БСА	239-245	-
VPQVSTPTLVEVSR	БСА	420-433	-
DIGSESTEDQAMEDIK	αS_1 -КН	43-58	Кальций связывающий пептид
FFVAPFPEVFGK	αS_1 -КН	23-34	Гипотензивный эффект путем ингибирования АПФ (IC ₅₀ 18,0 мкМ)
HQGLPQEVLENLLR	αS_1 -КН	8-22	-
VPQLEIVPNSAEER	αS_1 -КН	106-119	-
YLGYLEQLLR	αS_1 -КН	87-96	Нейропептид с успокаивающим эффектом
ALNEINQFYQK	αS_2 -КН	81-91	Гипотензивный эффект путем ингибирования АПФ (IC ₅₀ 264,0)
NAVPIPTLNR	αS_2 -КН	114-125	-
FQSEEQQQTEDELQDK	β -КН	33-48	Кальций связывающий пептид
APVDAFK	ЛФ	237-243	-
DSALGFLR	ЛФ	302-309	-
EDLIWK	ЛФ	264-269	Антимикробный эффект по отношению к вирусу простого герпеса типа 1
ETTVFENLPEK	ЛФ	211-221	-
GSNFQLDQLQGR	ЛФ	101-112	-
LGGRPTYEEYLGTEYVTAI ANLK	ЛФ	651-673	-
LGGRPTYEEYLGTEYVTAI ANLKK	ЛФ	651-674	-
SVDGKEDLIWK	ЛФ	259-269	-

Скрининг аминокислотных модификаций, соответствующих одному и двум йодированным остаткам тирозина, фенилаланина и триптофана с изменением молекулярной массы относительно свободных не йодированных аминокислот, позволил выявить 3 пептида, йодированных по тирозину (рисунки 4.7-4.9).

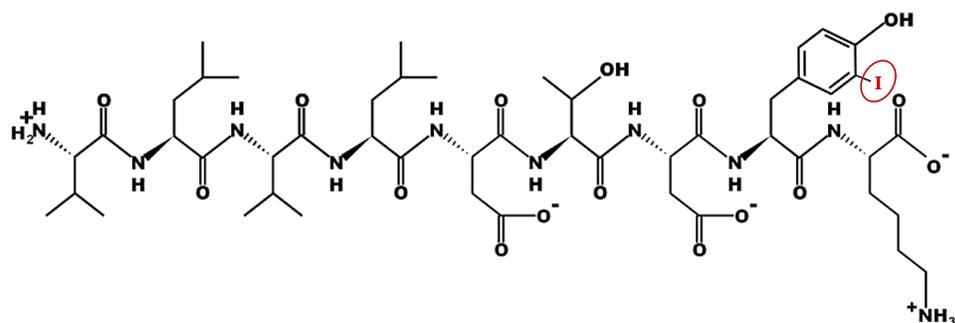


Рисунок 4.7 – Линейная структура йодированного пептида VLVLDTDY(I)K

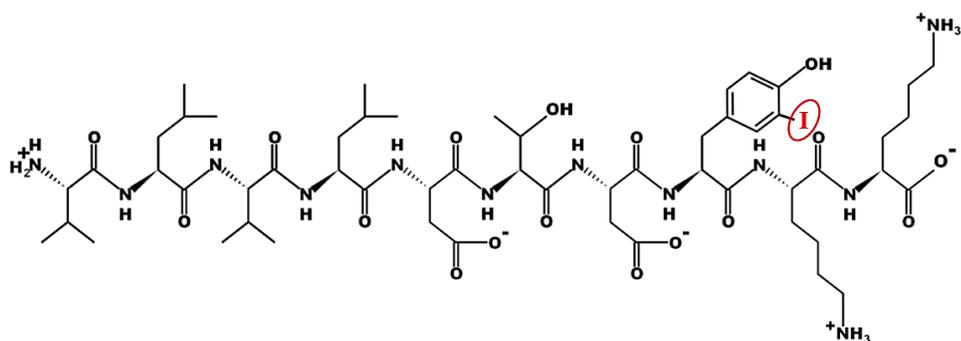


Рисунок 4.8 – Линейная структура йодированного пептида VLVLDTDY(I)KK

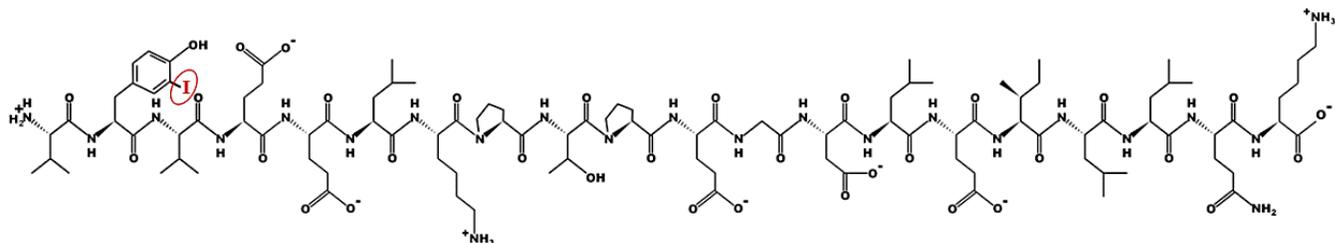


Рисунок 4.9 – Линейная структура йодированного пептида VY(I)VEELKPTREGDLEILLQK

Таким образом, помимо связанного с тирозином йода вероятно другая его часть может находиться в связанной форме с атомами серы, находящимися в составе аминокислот, содержащих сульфгидрильную группу или быть связанной в результате ионных и гидрофобных взаимодействий [95,125], что является сложно детектируемым для данной методики. Анализ пептидов позволил построить пептидную карту гидролиза α -ЛА (рисунок 4.10.А), β -ЛГ (рисунок 4.10.Б), БСА (рисунок 4.10.В). Установлено, что β -ЛГ и БСА (в меньшей степени) подверглись наиболее полному гидролизу, в сравнении с α -ЛА, что полностью коррелирует с результатами работ [96,120].

- А) **EQLTKCEVFRELKDLKGYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAIVQNNDESTYGLFQINNKIWCK**
DDQNPSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKK - **ILDKVGINYWLAHK** - **ALCSEK** -
LDQWLCEKL
- Б) **LIVTQTMK** - **GLDIQK** - **VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR** - **VYVEELK** -
PTPEGDLEILLQK - **WENGECAQKK** - **IIAEK** - **TK** - **IPAVFK** - **IDALNENK** - **VLVLDTDYK** - **K** -
YLLFCMENSAEPEQSLACQCLVR - **TPEVDDEALEK** - **FDK** - **ALK** - **ALPMHIR** -
LSFNPTQLEEQCHI
- В) **RGVFRRDTHKSEIAHR** - **FKDLGEEHFK** - **GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK** - **LVNLTEFAK** -
TCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCCKQEPERNECFLSHKDDSPDL
PKLKPDPNTLCDEFKADEKKFWGKYLYEIARRHPYFYAPELLYANKYNGVFQECCQAED
KGACLLPKIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGER - **ALKAWSVAR** - **LSQK** - **FPK** -
AEFVEVTK - **LVTDLTK** - **VHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLK**
ECCDKPLLEKSHCIAEVEK - **DAIPENLPPLTADFAEDK** - **DVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSR**
- **RHPEYAVSVLLR** - **LAKEYEATLECCA KDDPHACYSTVFDK LK** - **HLVDEPQNLIK** -
QNC DQFEK - **LGEYGFQNALIVRYTR** - **KVPQVSTPTLVEVSR** -
SLGKVGTRCCTKPESE RMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRR
PCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDEKQIK - **KQTALVELLK** - **HKPKATEEQ LK** -
TVMENFVA FVDK - **CCAADDKEACFAVEGPK** - **LVVSTQTALA**

Рисунок 4.10 – Схема гидролиза сывороточных белков, согласно идентифицированным пептидам. Оранжевым цветом выделены идентифицированные пептиды; желтым – сайты связывания двухвалентных металлов α -ЛА и БСА. А – схема гидролиза α -ЛА; Б – схема гидролиза β -ЛГ; В – схема гидролиза БСА

В гидролизатах не обнаружено аминокислотных остатков, относящихся к сайтам связывания двухвалентных металлов в α -ЛА и БСА, в связи с чем можно предположить, что данные участки не были подвергнуты воздействию протеазы в ходе биохимического процесса, либо сохранялись в форме крупных олигопептидов, которые не ионизировались в электрическом поле и, таким образом, не были обнаружены. С данной позиции объясняется сохранение начальной концентрации цинка, органически связанного с белками до протеолиза, в процессе установленной продолжительности гидролиза.

Заключение к Главе 4

Проведенный протеазный скрининг установил, что для всех белковых фракций наибольшее количество пептидов, потенциально связывающих ионы йода, а также минимальное количество свободных аминокислот и аминокислот, обладающих горьким вкусом, наблюдалось при моделировании протеолиза Трипсином. Трипсин является единственной протеазой, которая критически не подвергает деградации сайты связывания кальция KFLDDDLTDD в α -ЛА, а также крупный аминокислотный участок ECCHGDLLECADDRA связывания цинка и кальция в БСА.

Определены оптимальные параметры гидролиза модифицированной белковой матрицы, обогащенной цинком, трипсином (рН 8; 44°C; 165 минут; E/S 1/100), позволяющие получить степень деградации белковых компонентов, равную $4,4 \pm 0,3\%$, отсутствие веществ, обуславливающих горечь, и низкое содержание САК ($1,8 \pm 0,2$ мг экв. глутаминовой кислоты/мл), сохранение начальной концентрации цинка, связанного с нативным белком ($161,7 \pm 26,7$ мг/100 г белка).

Установлены эффективные параметры процесса йодирования, соответствующие 20°C, рН 8 и продолжительности 12 часов, при которых концентрация органического йода, связанного с белковыми фрагментами, составила $2,5 \pm 0,5$ г йода на 100 г белка, что в 2 раза больше, в сравнении с йодированием нативных белков ($0,7 \pm 0,1$ г йода на 100 г белка). Подтверждено, что ферментативный гидролиз повышает степень связывания белка с йодом.

Исследование принципов баромембранной очистки WPC- α от неорганического цинка показало, что оптимальные параметры процесса достигаются при использовании 3-кратной ультрадильтрации, при которой концентрация органически связанного цинка составила $168,0 \pm 26,3$ мг/100 г белка. Оптимальные параметры очистки HWPC- α от неорганического йода соответствуют 3-х кратной нанодиафильтрации, при которой концентрация йода достигла показателя $2,5 \pm 0,4$ г/100 г.

По результатам хромато-масс-спектрометрического анализа HWPС- α , обогащенного йодом, достоверно идентифицировано 59 валидированных пептидов, принадлежащих 7 основным белкам молока: β -ЛГ, БСА, ЛФ, α S₁-КН, α -ЛА, α S₂-КН, β -КН. Скрининг йодированных аминокислотных остатков позволил выявить 3 пептида, йодированных по тирозину: VLVLDTDY(I)K; VLVLDTDY(I)KK; VY(I)VEELKPTREGDLEILLQK. Исследование пептидов отражает полное сохранение сайтов связывания двухвалентных металлов для α -ЛА и БСА.

ГЛАВА 5. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОИЗВОДСТВА ОБОГАЩЕННОГО ГИДРОЛИЗАТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ И ОБОГАЩЕННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

5.1. Разработка технологии производства обогащенного гидролизата сывороточных белков

Сухие молочные продукты характеризуются рядом технологических свойств, таких как растворимость, смачиваемость и др. [25,51]. Известно, что основным фактором, влияющим на показатели сухих концентратов, является режим их дегидратации [25]. В связи с этим, настоящая часть работы посвящена определению рациональных условий распылительной сушки обогащенного гидролизата сывороточных белков на основе результатов пяти режимов сушки: $T_{\text{вх}} = (155 \pm 5)^\circ\text{C}$, $T_{\text{вых}} = (55 \pm 5)^\circ\text{C}$ – образец Г155; $T_{\text{вх}} = (165 \pm 5)^\circ\text{C}$, $T_{\text{вых}} = (65 \pm 5)^\circ\text{C}$ – образец Г165; $T_{\text{вх}} = (175 \pm 5)^\circ\text{C}$, $T_{\text{вых}} = (75 \pm 5)^\circ\text{C}$ – образец Г175; $T_{\text{вх}} = (185 \pm 5)^\circ\text{C}$, $T_{\text{вых}} = (85 \pm 5)^\circ\text{C}$ – образец Г185; $T_{\text{вх}} = (195 \pm 5)^\circ\text{C}$, $T_{\text{вых}} = (95 \pm 5)^\circ\text{C}$ – образец Г195. В полученных сухих продуктах определены важные технологические свойства, такие как растворимость в диапазоне рН 4-7 (интервал значений составлял 1 ед. рН) (рисунок 5.1), смачиваемость, а также физико-химические характеристики, такие как массовая доля сухих веществ и массовая доля йода и цинка. В качестве образца для сравнения показателей использовали концентрат сывороточных белков (КСБ).

Визуализация данных на рисунке 5.1 отражает изменение растворимости сухих обогащенных гидролизатов, находящуюся в диапазоне от $94,55 \pm 0,81\%$ до $98,58 \pm 1,66\%$, что значительно больше, чем для КСБ – от $70,81 \pm 0,86$ до $72,68 \pm 0,91\%$. Полученный результат может быть связан с повышенной растворимостью белковых компонентов после проведения гидролиза, что так же подчеркивают авторы работ [44,112]. При этом, в результате анализа данных не удалось установить четкой

корреляции между температурой распылительной сушки, значения активной кислотности и растворимостью сухого концентрата. Однако, следует обратить внимание на то, что, с технологической точки зрения, температура распылительной сушки выше 185°C является нежелательной, поскольку в процессе удаления из обогащенных гидролизатов влаги, наблюдалось большое количество пригорелых частиц.

Смачиваемость гидролизатов так же, как и растворимость, характеризовалась лучшими показателями, чем КСБ (таблица 5.1). Показатели краевого угла смачивания отражают статистически незначимые различия между образцами и находятся в диапазоне $101,12 \pm 2,26 - 102,77 \pm 2,06^\circ$.

Таблица 5.1 – Изменение смачиваемости сухих гидролизатов в зависимости от режимов сушки

Наименование образца	Смачиваемость	
	КУС, °	Время изменения КУС до 0°, сек
КСБ	$101,12 \pm 2,26^a$	$480,80 \pm 4,44^a$
Г155	$101,38 \pm 2,18^a$	$66,00 \pm 2,24^f$
Г165	$102,16 \pm 1,61^a$	$72,20 \pm 2,59^e$
Г175	$102,77 \pm 2,06^a$	$85,40 \pm 2,30^d$
Г185	$102,54 \pm 1,47^a$	$120,60 \pm 3,65^c$
Г195	$101,94 \pm 1,17^a$	$187,80 \pm 2,39^b$

Наименьшей смачиваемостью, согласно оценке времени изменения КУС до 0°, обладает КСБ ($480,80 \pm 4,44$ секунд), что может быть связано с размером частиц порошка и их формой [16,52]. Данный анализ позволил установить статистически значимую разницу между временем смачиваемости сухих гидролизатов, высушенных при меньших и больших температурах: $66,00 \pm 2,24$ с и $187,80 \pm 2,39$ с для образцов, высушенных при 155 и 195°C соответственно. Можно предположить, что полученные результаты связаны с тем, что морфология сухих частиц гидролизата сывороточных белков отличается от частиц КСБ, как это было показано в исследовании [40].

Далее в работе были исследованы физико-химические показатели сухих обогащенных гидролизатов сывороточных белков (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Изменение показателей массовой доли йода, цинка и сухих веществ в зависимости от температурных режимов распылительной сушки

Наименование образца	Содержание Zn, мг/100 г белка	Содержание йода, г/100 г белка	Массовая доля сухих веществ, %
Гидролизат обогащенный, очищенный (до дегидратации)	174,5±31,20 ^a	2,4±0,4 ^a	12,61±0,33
Г155	172,2±32,17 ^a	2,3±0,3 ^a	94,55±0,81
Г165	169,4±33,20 ^a	2,3±0,3 ^a	94,92±0,86
Г175	168,9±38,11 ^a	2,3±0,4 ^a	96,48±0,47
Г185	168,9±34,97 ^a	2,1±0,4 ^a	96,58±0,66
Г195	169,9±33,67 ^a	2,2±0,4 ^a	96,41±0,68

По результатам проведенных исследований не было установлено статистически значимого снижения массовой доли йода и цинка при дегидратации обогащенных гидролизатов. Полученные данные подтверждают наличие прочно связанного с белковой матрицей йода и коррелируют с другими исследованиями по выявлению потерь микроэлемента, связанного с белками молока, при температурной обработке [11,13]. Уровень сохранности йода после термической обработки соотносится с результатами, полученными в работах [11,13], авторами которых было показано содержание йода в обогащенном продукте после термической обработки на уровне 98% для пищевой добавки «Йодказеин» (режим – 115-117°C, 15-20 минут) [11] и пищевой добавки «Биойод» (90%) (при термической обработке мяса) [13]. При этом важно обратить внимание на массовую долю сухих веществ, составляющую менее 95% для температурных режимов распылительной сушки 155±5°C и 165±5°C, что, в совокупности с ранее отмеченным большим количеством пригорелых частиц при режимах удаления влаги 185±5°C и 195±5°C, выделяет условия дегидратации обогащенного гидролизата при $T_{вх} = (175±5)°C$ и $T_{вых} = (75±5)°C$ как самые оптимальные.

Помимо выбора эффективных режимов дегидратации, важно, чтобы гидролизат содержал физиологичное соотношение микроэлементов в зависимости от суточной потребности в них (12 мг – для цинка и 150 мкг – для йода). Для этой цели разработано программное обеспечение с алгоритмом математических расчетов, основанном на определенных ранее закономерностях связывания йода с белками

(<https://observablehq.com/d/4ad6697eefde057e>). Концентрацию органически связанного с гидролизатом сывороточных белков йода рассчитывали исходя из концентрации хелатированного белками цинка (~170 мг цинка на 100 г белка), в результате чего было получено 2,1 мг йода на 100 г белка. С помощью программного обеспечения определено количество молекулярного йода, которое нужно внести в субстрат (рН 8; 20°C; продолжительность связывания – 6 часов) для обеспечения заданной конечной концентрации органического йода, составляющее 0,01 М (рисунок 5.1). Для подтверждения достоверности расчетов произведены выработки обогащенного гидролизата сывороточных белков в трех независимых повторностях, в результате чего выявлено конечное содержание органически связанного йода в сухом гидролизате $2,2 \pm 0,5$ мг на 100 г белка при сохраняющейся концентрации цинка $168,9 \pm 27,5$ мг на 100 г белка.

М.д.б. в обогащаемой системе - 3%.

Кол-во внесенного молекулярного йода - 0.8 М

- HWPC-α - гидролизованная сыворотка с измененным соотношением β-ЛГ - α-ЛА (0,7 к 1)
- WPC - нативная сыворотка со "стандартным" соотношением β-ЛГ - α-ЛА (2,2 к 1)

Вид белкового субстрата HWPC-α WPC

Температура связывания 2°C 10°C 20°C 30°C 40°C

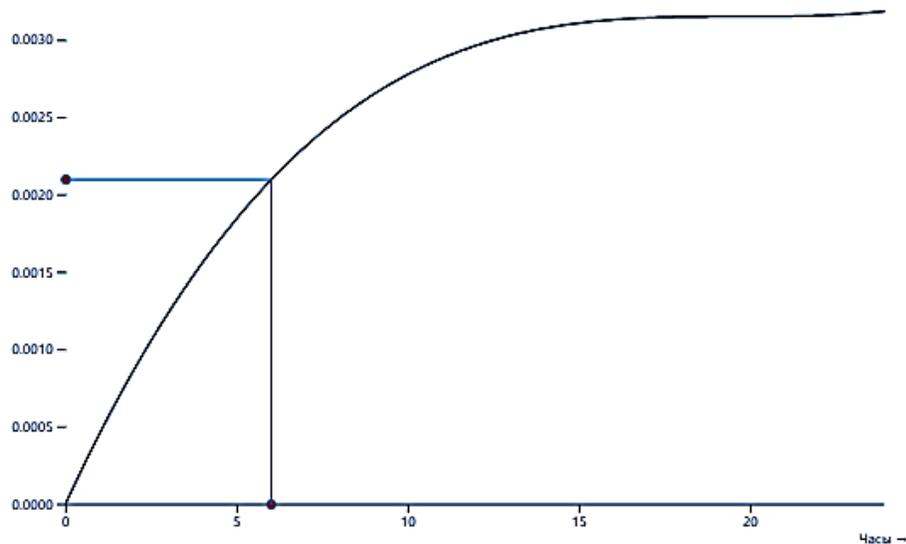
Параметры программы

Время, ч

Концентрация связанного йода, г/100г белка

Динамика связывания йода

г/100г белка



Требуется внесение **0.01** Моль йода

Рисунок 5.1 - Визуализация программы для расчета необходимого количества молекулярного йода для связывания с субстратом заданного количества йода

На основе массива проведенных исследований по разработке технологических решений для иммобилизации йода и цинка белковыми матрицами молочной сыворотки, разработан СТО 00419785-081/2-2024 «Гидролизат сывороточного белка сухой, обогащенный йодом и цинком» и разработана технологическая схема

производства сухого гидролизата сывороточных белков, обогащенного йодом и цинком (рисунок 5.2).

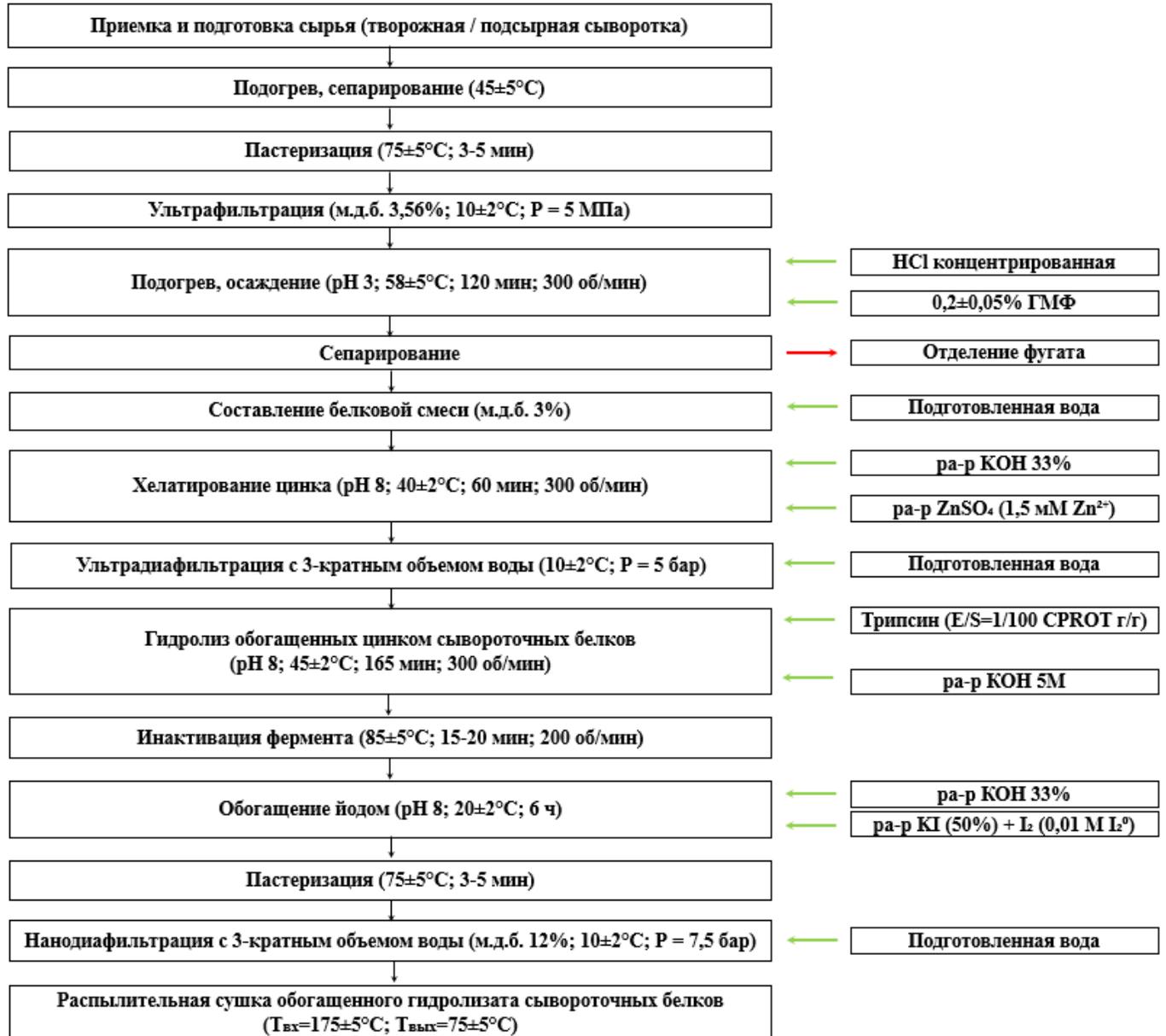


Рисунок 5.2 – Технологическая схема производства сухого гидролизата сывороточных белков, обогащенного йодом и цинком

По органолептическим, физико-химическим, микробиологическим показателям продукт должен соответствовать требованиям, представленным в таблицах 5.3-5.5.

Таблица 5.3 – Требования к органолептическим показателями сухого гидролизата сывороточных белков, обогащенного йодом и цинком

Наименование показателя	Характеристика
Внешний вид, консистенция	Мелкий порошок. Допускается незначительное количество комочков, рассыпающихся при легком механическом воздействии
Вкус и запах	Чистые, свойственные для данного вида продукции, без посторонних привкусов и запахов. Без горечи
Цвет	От белого до светло-желтого, однородный по всей массе

Таблица 5.4 – Физико-химические характеристики сухого гидролизата сывороточных белков, обогащенного йодом и цинком

Наименование показателя	Норма
Массовая доля белка, %, не менее	78,0
Массовая доля влаги, %, не более	5,0
Массовая доля цинка, мг на 100 г гидролизата, не менее	131,0
Массовая доля йода, мг на 100 г гидролизата, не менее	1,8

Таблица 5.5 – Микробиологические показатели безопасности сухого обогащенного гидролизата сывороточных белков

Наименование показателя	Значение показателя	
КМАФАнМ, КОЕ/см ³ (г), не более	5·10 ³	
Масса продукта (г), в которой не допускается	БГКП (колиформы)	1
	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы	25
	S. aureus	1

Сроки годности обогащенного гидролизата сывороточных белков составляют 6 месяцев при температуре 25±5°С и относительной влажности воздуха 85%. Исследования в соответствии с МУК 4.2.1847-04.4.2. выявили, что концентрация йода на момент окончания срока годности снизилась на 4% относительно начального значения, концентрация цинка статистически значимо не изменилась.

Экономический расчет себестоимости (таблица 5.6) сухого гидролизата сывороточных белков, обогащенного йодом и цинком, производился исходя из стоимости молока базисных показателей (46,9 рублей за литр) [64] и вытекающей стоимости молочной сыворотки: 7,035 рублей за литр (15% от стоимости молока), согласно «Инструкции по калькулированию себестоимости продукции на предприятиях молочной, маслосыродельной и молочноконсервной

промышленности» [34]. Стоимость энергоресурсов соответствовала среднестатистическим ценам (по Московской области): электроэнергия – 7,33 руб. за кВт·ч, водоснабжение – 49,83 руб. за м³, пар – 370 руб. за т, холод – 6 руб. за тыс. ккал. [39].

Таблица 5.6 – Себестоимость производства 1 тонны сухого гидролизата сывороточных белков, обогащенного йодом и цинком

Статья расходов	Затраты (тыс.руб)
Сыворотка молочная	120,63
Реактивы и вспомогательный материалы (ГМФ, соляная кислота, гидроксид калия, Трипсин, йодид калия, сульфат цинка, кристаллический йод)	1 751,64
Топливо и энергия на технологические цели	18,39
Расходы на оплату труда рабочих	264,00
Отчисления от фонда оплаты труда	79,20
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования	39,60
Общепроизводственные и общехозяйственные расходы	158,40
Расходы на реализацию продукции	25,00
Себестоимость 1 тонны сухого обогащенного гидролизата сывороточных белков	2 456,86
Отпускная цена	2 948,23

Таким образом, согласно экономическому расчету себестоимости обогащенного гидролизата сывороточных белков, 1 кг продукта будет стоить 2 948,23 рублей. Продукт не имеет аналогов на рынке, поскольку совокупно с йодом в гидролизате содержит цинк, в связи с чем продукт необходимо выпускать с физиологическим соотношением микроэлементов, предполагающим значительно меньшую концентрацию органически связанного йода. Согласно перечисленным факторам, стоимость разработанного гидролизата с органическими формами микроэлементов дороже, в сравнении с йодированными сывороточными белками, не содержащих цинк, таких как пищевая добавка «Биойод». Однако, эффект при его использовании может иметь потенциально лучшие показатели. При этом, известно [40], что гидролиз сывороточных белков повышает их усвояемость и снижает аллергенность, что является безусловным преимуществом обогащенного гидролизата.

Помимо экономической целесообразности, следует учитывать социальный эффект при внедрении технологий обогащенных гидролизатом пищевых продуктов, заключающийся в повышении общего состояния здоровья населения.

5.2. Технология питьевого пастеризованного молока, обогащенного гидролизатом сывороточных белков с органическими формами йода и цинка

В аспекте обогащения пищевых продуктов, в том числе молочных, гидролизатом сывороточных белков с органическими формами йода и цинка, важно определить технологические характеристики компонента [63], помимо представленных ранее в предыдущей главе. В связи с этим, данный раздел работы посвящен определению термоустойчивости гидролизата при значениях рН 4,5 и 6,8, при температуре $95\pm 2^\circ\text{C}$ до 90 минут и $137\pm 2^\circ\text{C}$ до 15 минут (таблица 5.7), изучению сохранности концентрации органически связанных микроэлементов в процессе основных технологических операций, используемых в молочной промышленности (гомогенизация, пастеризация и сквашивание).

Таблица 5.7 – Определение термоустойчивости обогащенного йодом и цинком гидролизата

Образец	Продолжительность выдержки при $T = (95\pm 2)^\circ\text{C}$, мин						Продолжительность выдержки при $T = (137\pm 2)^\circ\text{C}$, мин				
	1	5	15	30	60	90	1	3	5	10	15
КСБ (рН 4,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
КСБ (рН 6,8)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Г (рН 4,5)	-*	-	-	-	-	-	-*	-	-	-	-
Г (рН 6,8)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
(-) – в образце детектированы агломераты коагулированного белка;											
(+) – образец выдержал температурную нагрузку в течение установленного времени;											
(-*) – все образцы ГСБ образовывали агломераты коагулированного белка при рН среды 4,5 (без тепловой нагрузки).											

Таким образом, определено влияние кислотного и температурного факторов на стабильность обогащенного гидролизата и установлено, что при рН 4,5 происходит агломерирование белковых фрагментов без температурного воздействия, а при рН 6,8 гидролизат выдерживает нагревание в течение 90 минут при $95\pm 2^\circ\text{C}$ и 3 минуты при

137±2°C. Гидролизат сывороточных белков, в сравнении с КСБ, обладает большей термоустойчивостью, однако, только в нейтральной среде. В исследовании [40] сообщается о повышении термоустойчивости гидролизатов сывороточных белков (как в нейтральной, так и в кислой среде) при глубокой деградации полипептидной цепи, в связи с чем можно предположить, что полученный результат может быть ассоциирован с низкой степенью гидролиза белкового сырья трипсином. Характеристика термоустойчивости обогащенного гидролизата отражает возможность его использования для обогащения пищевых продуктов, активная кислотность которых приближена к значению нейтральной, в том числе и в производстве обогащенного питьевого молока и кисломолочных продуктов.

Для изучения влияния технологических режимов гомогенизации (15, 20, 25 МПа, 65°C), пастеризации и стерилизации (таблица 5.8), сквашивания (чистые культуры молочнокислых организмов: ацидофильная и болгарская палочка, закваска «Тонус» в количестве 5%) в молоко вводили 3% (количество вводимой добавки обосновано достоверностью получаемых данных) обогащенного гидролизата и фиксировали массовую долю микроэлементов в системе после обработки. Исследуемые заквасочные микроорганизмы получены из коллекции Лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ». Образцы подвергали 3-х кратной нанодиафильтрации с целью удаления неорганических форм микроэлементов, которые могли появиться в процессе технологической обработки ввиду разрушения связей белок-микроэлемент.

По результатам проведенных исследований определено отсутствие статистически значимого влияния режимов гомогенизации, пастеризации и стерилизации на массовую долю цинка в обогащенном молоке, что может быть обосновано формированием прочных связей хелатного комплекса в процессе получения гидролизата сывороточных белков. Сквашивание с внесением обогащенного гидролизата сывороточных белков не оказывало влияния на рост микроорганизмов и концентрацию микроэлементов. Выявлено статистически

значимое влияние времени пастеризации на содержание йода в молоке: наименьшее значение концентрации йода определены в образцах молока, стерилизованном при режиме 120°C в течение 20 минут (снижение концентрации йода на 16%).

Таблица 5.8 – Влияние пастеризации и стерилизации на содержание йода и цинка в продукте

Наименование образца	Содержание цинка, мг/100 г белка	Содержание йода, мг/100 г молока
Сырое молоко	3,9±0,9 ^a	52,1±12,3 ^a
Пастеризация (65°C; 30 мин)	3,3±0,8 ^a	50,3±12,1 ^a
Пастеризация (72°C; 20 сек)	3,9±0,9 ^a	46,7±12,2 ^{ab}
Пастеризация (80°C; 20 мин)	3,8±0,9 ^a	47,3±12,2 ^{ab}
Пастеризация (85°C; 20 сек)	3,7±0,9 ^a	45,9±12,0 ^{ab}
Пастеризация (95°C; 5 мин)	3,8±0,9 ^a	47,3±11,8 ^{ab}
Пастеризация (95°C; 4 ч)	3,8±0,9 ^a	48,6±11,9 ^{ab}
Стерилизация в автоклаве (120°C; 20 мин)	3,7±0,9 ^a	43,7±12,1 ^b

Надстрочные буквы (a–b) отражают значительные различия между группами при p<0,05

По результатам исследований технологических свойств гидролизата сывороточных белков предложена технология обогащенного пастеризованного молока с массовой долей жира 2,5 и 3,2% и разработано СТО 00419785-081/2.1-2024 «Молоко питьевое пастеризованное, обогащенное йодом и цинком». Для обогащения пищевых продуктов, согласно ГОСТ Р 52349-2005 «Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения», количество вводимого функционального пищевого ингредиента составляет не менее 15% от суточной потребности в одной порции продукта. Кроме того, при обогащении продуктов эссенциальными микроэлементами важно учитывать их начальное содержание в сырье: молоко в среднем содержит 0,4 мг цинка и 9 мкг йода [4]. Исходя из этого, максимальное количество сухого гидролизата сывороточных белков, необходимое для обогащения питьевого молока и соответствующее содержанию микроэлементов в количестве 17,4% (по йоду) и 15,0% (по цинку) от физиологической суточной потребности (150 мкг и 12 мг, соответственно [54]) в 200 г молока, равно 5,3 кг на 1 тонну молока. Готовый продукт по органолептическим, физико-химическим и

микробиологическим характеристикам соответствует требованиям, представленным в таблицах 5.9-5.11.

Таблица 5.9 – Требования к органолептическим показателями питьевого пастеризованного молока, обогащенного йодом и цинком

Наименование показателя	Характеристика
Внешний вид	Непрозрачная жидкость
Консистенция	Жидкая, однородная не тягучая. Без хлопьев белка и сбившихся комочков жира
Вкус и запах	Характерные для молока, без посторонних привкусов и запахов, с легким привкусом кипячения
Цвет	Белый

Таблица 5.10 – Физико-химические характеристики питьевого пастеризованного молока, обогащенного йодом и цинком

Наименование показателя	Норма	
	2	3
1		
Массовая доля жира, %, не менее	2,5	3,2
Плотность, кг/м ³ , не менее	1028,0	1027,0
Массовая доля белка, %, не менее	3,0	
Кислотность, °Т, не более	21,0	
Массовая доля сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО), %, не менее	8,2	
Фосфатаза и пероксидаза	Не допускается	
Группа чистоты, не ниже	I	
Массовая доля цинка, мг на 100 г продукта, не менее	0,9	
Массовая доля йода, мкг на 100 г продукта, не менее	13,0	
Температура продукта при выпуске с предприятия, °С	4±2	

Таблица 5.11 – Микробиологические показатели безопасности питьевого пастеризованного молока, обогащенного йодом и цинком

Наименование показателя	Значение показателя	
КМАФАнМ, КОЕ/см ³ (г), не более	1·10 ⁵	
Масса продукта (г), в которой не допускается	БГКП (колиформы)	0,01
	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы	25
	<i>S. aureus</i>	1
	<i>L. monocytogenes</i>	25

При производстве питьевого пастеризованного молока сухой гидролизат сывороточных белков рекомендуется вносить в сырье на этапе нормализации, а затем

направлять на гомогенизацию ($12,5 \pm 2,5$ МПа; 65°C) и пастеризацию ($85 \pm 2^\circ\text{C}$, 20 сек). Срок хранения готового продукта составляет 14 дней. Гидролизированные белки характеризуются высокой растворимостью ($95,4 \pm 1,2$ - $97,9 \pm 0,6\%$ в диапазоне pH 6-7), что упрощает процесс равномерного распределения добавки в объеме продукта. С учетом потерь при пастеризации, в готовом продукте содержание микроэлементов составляет 1,8 мг цинка и 26,1 мкг йода на разовую порцию (200 г), что обеспечивает 15,0 и 17,4% от суточной потребности организма соответственно. При необходимости можно производить перерасчет количества вносимого гидролизата сывороточных белков, в зависимости от степени дефицита йода в разных регионах.

Заключение к главе 5

Разработано программное обеспечение, позволяющее определять необходимую концентрацию внесения в субстрат молекулярного йода для связывания заданного количества йода с белками молочной сыворотки, в зависимости от условий реакционной среды. Подобраны рациональные режимы распылительной сушки обогащенного гидролизата сывороточных белков: $T_{\text{вх}} = 175 \pm 5^\circ\text{C}$, $T_{\text{вых}} = 75 \pm 5^\circ\text{C}$, обеспечивающие получение дегидратированной формы гидролизата с массовой долей сухих веществ $96,48 \pm 0,47\%$, растворимость (при значениях pH в интервале 4-7) от $94,55 \pm 0,81\%$ до $96,58 \pm 0,66\%$, смачиваемость $85,40 \pm 2,30$ с. Разработана технологическая схема производства сухого гидролизата сывороточных белков, обогащенного йодом и цинком и СТО 00419785-081/2-2024 «Гидролизат сывороточного белка сухой, обогащенный йодом и цинком». Готовый продукт характеризуется массовой долей белка не менее 78%, массовой долей йода и цинка $2,2 \pm 0,5$ мг на 100 г белка и $168,9 \pm 27,5$ мг на 100 г белка соответственно, срок годности составляет 6 месяцев. Рассчитана себестоимость производства белкового компонента: производство и реализация 1 кг продукта стоит 2 948,23 рублей.

Определены технологические свойства гидролизата в аспекте производства обогащенных молочных продуктов с его использованием. Выявлено отсутствие статистически значимого влияния режимов гомогенизации, пастеризации и стерилизации на массовую долю цинка. Сквашивание с внесением обогащенного гидролизата сывороточных белков не оказывало влияния на рост микроорганизмов и концентрацию микроэлементов в продукте. Выявлено статистически значимое влияние времени температурной обработки на содержание йода в молоке: концентрация йода снижается на 16% при стерилизации (120°C в течение 20 минут). Установлено, что при pH 4,5 происходит агрегирование белковых фрагментов без температурного воздействия, а при pH 6,8 гидролизат выдерживает нагревание в течение 90 минут при $95\pm 2^\circ\text{C}$ и 3 минуты при $137\pm 2^\circ\text{C}$, что предполагает возможность его использования для обогащения пищевых продуктов, активная кислотность которых приближена к значению нейтральной, в том числе и в производстве обогащенного питьевого молока и кисломолочных продуктов. Предложена технология обогащенного питьевого пастеризованного молока с массовой долей жира 2,5 и 3,2% со сроком годности 14 суток и разработан СТО 00419785-081/2.1-2024 «Молоко питьевое пастеризованное, обогащенное йодом и цинком». Технология предполагает внесение 5,3 кг сухого обогащенного гидролизата на 1 тонну молока, обеспечивая при этом содержание микроэлементов в количестве 17,4% (по йоду) и 15,0% (по цинку) от физиологической суточной потребности при употреблении разовой порции (200 г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенного комплекса исследований разработана концепция направленной модификации белков молочной сыворотки для повышения реакционной способности к специфическому связыванию ионов йода и цинка в соотношениях, оптимальных с точки зрения физиологических потребностей человека. Результаты исследований направлены на решение двух фундаментальных проблем: глубокой переработки вторичного молочного сырья и профилактики йододефицитных состояний, через обогащение продуктов массового спроса органическими формами микроэлементов, иммобилизованных белковой матрицей молочной сыворотки.

1. Определено влияние ГМФ на повышение эффективности процесса термоселективного фракционирования α -ЛА из системы молочной сыворотки, обусловленное декальцинированием молекулы белка и понижением порога его температурной денатурации, а также снижением соосаждения β -ЛГ. Установлены оптимальные условия процесса (массовая доля белка – 3,56%; активная кислотность среды – 3,0 ед. рН; температура – 58°C; продолжительность процесса – 120 минут; массовая доля ГМФ – 0,2%), позволяющие получить концентрат с соотношением β -ЛГ – α -ЛА 0,7 к 1.

2. Установлены закономерности влияния технологических параметров на эффективность связывания цинка с декальцинированными белками, на основании которых определены рациональные условия процесса, соответствующие температуре 40°C; концентрации ионов цинка 1,5 мМ; активной кислотности среды 8,0 ед. рН; продолжительности 60 минут. Доказано, что модифицированная белковая матрица хелатирует $169,8 \pm 27,3$ мг цинка на 100 г белка, что в 1,6 раза больше, чем нативные белки.

3. На основе проведенного биоинформатического моделирования установлено, что наиболее подходящей протеазой для направленного гидролиза, с учетом дескрипторной модели, является трипсин. Гидролиз сывороточных белков трипсином критически не затрагивает сайты связывания двухвалентных металлов α -ЛА и БСА, при этом потенциальные продукты гидролиза характеризуются приемлемым количеством йодсвязывающих пептидов, низким содержанием свободных аминокислот и горьких пептидов.

4. Оптимизированы параметры процесса гидролиза WPC- α трипсином: активная кислотность – 8,0 ед. рН; температура – 44°C; продолжительность – 180 минут, что обеспечивает максимальную степень гидролиза 4,4%. Установлены зависимости ковалентного связывания йода с белково-пептидным субстратом от технологических факторов среды и определены режимы процесса, обеспечивающие максимальное ковалентное связывание йода ($2,5 \pm 0,4$ г/100 г йода): температура 20°C; концентрация ионов йода 4 мМ; активная кислотность среды 8,0 ед. рН; продолжительность 12 часов. Доказано, что гидролизат WPC- α способен связывать в 2 раза большую концентрацию йода, чем нативные белки с интактным распределением фракций.

5. Доказано, что для очистки WPC- α от нехелатированного цинка перспективно использование ультрафильтрации (5 кДа) с 3-кратной диафильтрацией, а с точки зрения сохранения пептидов и очистки HWPC- α от неорганического йода перспективнее использовать нанофильтрацию (0,6 кДа) с 3-кратной диафильтрацией. Скрининг аминокислотных модификаций очищенного HWPC- α , полученных в результате хромато-масс-спектрометрического анализа, позволил установить механизм ковалентного связывания ионов йода по тирозину для трех видов пептидов, локализованных в белке-предшественнике β -ЛГ.

6. Установлено, что воздействие температурных факторов в процессе распылительной сушки не приводит к снижению концентрации йода и цинка в дегидратированной форме ГСБ. Выявлена зависимость снижения концентрации йода

в обогащенном молоке при его стерилизации до 16%, при этом бóльшее влияние оказывает продолжительность тепловой нагрузки на продукт.

7. Разработана технология и комплект технической документации на производство ГСБ, обогащенного йодом и цинком, обогащенного питьевого молока (СТО 00419785-081/2-2024 «Гидролизат сывороточного белка сухой, обогащенный йодом и цинком», СТО 00419785-081/2.1-2024 «Молоко питьевое пастеризованное, обогащенное йодом и цинком»). Разработанные технологии апробированы и внедрены в промышленное производство на предприятиях молочной отрасли.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЩЖ – щитовидная железа;

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;

ЙДЗ – йододефицитные заболевания;

м.д. – массовая доля;

α -ЛА – α -лактальбумин;

β -ЛГ – β -лактоглобулин;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ГМФ – гексаметафосфат натрия;

Сред/Св.член – среднее значение отклика (целевой переменной) при нулевых значениях всех факторов;

Эффект – вклад каждого фактора (или их взаимодействий) в изменение целевой переменной; $t(66)$ – t -критерий Стьюдента;

p – значение уровня значимости фактора;

-95,% и +95,% – доверительный интервал 95%;

(L) и (Q) – линейное и квадратичное влияние фактора на целевую переменную;

WPC- α – концентрат сывороточных белков с соотношением β -ЛГ к α -ЛА 0,7 к 1;

WPC – концентрат сывороточных белков с соотношением β -ЛГ к α -ЛА 2,2 к 1;

ДН – степень гидролиза;

НWPC- α – гидролизат концентрата сывороточных белков с соотношением β -ЛГ к α -ЛА 0,7 к 1;

САК – свободные аминокислоты;

E/S – фермент-субстратное соотношение.

СПИСОК ТЕРМИНОВ

Термоселективное фракционирование – технологический процесс разделения белков молочной сыворотки (подсырной или творожной), основанный на избирательной денатурации под воздействием температуры и дестабилизирующих факторов.

Модифицированные белки молочной сыворотки – белковые компоненты, структура и свойства которых в процессе технологической обработки были подвергнуты направленным изменениям для иммобилизации йода и цинка, а также с целью улучшения их функционально-технологических свойств (растворимость, способность к гелеобразованию, эмульгирующая способность, пенообразующая способность).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулхабирова, Ф. М. Клинические рекомендации «Заболевания и состояния, связанные с дефицитом йода» / Ф. М. Абдулхабирова, О. Б. Безлепкина, Д. Н. Бровин, Т. А. Вадина, Г. А. Мельниченко и др. // Проблемы эндокринологии. – 2021. – Т. 67, № 3. – С. 10–25. DOI: 10.14341/probl12750.

2. Абрамова, Т. В. Продукты прикорма на овощной основе в питании детей раннего возраста / Т. В. Абрамова, В. И. Куркова, И. Я. Конь // Вопросы детской диетологии. – 2009. – Т. 7, № 4. – С. 35–38.

3. Адельмурзина, А. И. Результаты скрининга на врожденный гипотиреоз и транзиторные формы гипотиреоза у новорожденных в условиях йододефицитного региона – Республики Башкортостан / А. И. Адельмурзина, В. В. Викторов, Ф. С. Билалов, Е. А. Тимофеева // Медицина. Социология. Философия. Прикладные исследования. – 2023. – № 2. – С. 9–13.

4. Алексеева, Н. Ю. Состав и свойства молока как сырья для молочной промышленности: справочник / Н. Ю. Алексеева, В. П. Аристова, А. П. Патратий и др.; под ред. к.т.н. Я. И. Костина. – М.: Агропромиздат, 1986. – 239 с.

5. Алкадур, М. И. Влияние термизации и пастеризации на качество сухого молока / М. И. Алкадур, Н. С. Пряничникова, Е. А. Юрова, А. Н. Петров // Техника и технология пищевых производств. – 2024. – Т. 54, № 2. – С. 275–284. DOI: 10.21603/2074-9414-2024-2-2506.

6. Антипова, Л. В. Новая органическая форма йода для профилактики микроэлементозов / Л. В. Антипова, А. Р. Салихов // Вестник биотехнологии. – 2006. – № 1. – С. 18–24.

7. Антипова, Л. В. Обеспечение безопасности и функциональности пищевых систем на основе сорбционных свойств коллагеновых белков / Л. В. Антипова, М. И.

Чубирко, Н. Г. Кульнева, С. А. Стурблевцев // Гигиена и санитария. – 2018. – Т. 97, № 8. – С. 772–777. DOI: 10.18821/0016-9900-2018-97-8-772-777.

8. Барковская, И. А. Дефицит йода в России: современное состояние проблемы, мировая практика и новые подходы к терапии / И. А. Барковская, А. Г. Кручинин, И. В. Рожкова // Пищевые системы. – 2024. – Т. 7, № 2. – С. 238–245. DOI: 10.21323/2618-9771-2024-7-2-238-245.

9. Баяржаргал, М. Получение и экспериментальная оценка новых пищевых источников органических форм цинк : диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / М. Баяржаргал. – Москва, 2007. – 109 с.

10. Беспалов, В. Г. Дефицит йода в питании как мультидисциплинарная проблема / В. Г. Беспалов, И. А. Туманян // Лечащий врач. – 2019. – № 3. – С. 8.

11. Бирюкова, З. А. Сохранность йода в молоке при стерилизации и хранении / З. А. Бирюкова, О. Г. Пантелеева, Е. А. Юрова, А. Я. Гончарова // Молочная промышленность. – 2014. – № 10. – С. 54–56.

12. Большакова, Е. И. Влияние белкового профиля на технологические свойства молочных консервов с сахаром / Е. И. Большакова, М. Н. Стрижко // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2023. – № 1(391). – С. 107–113. DOI: 10.26297/0579-3009.2023.1.17.

13. Большакова, Л. С. Обогащение йодом пищевых продуктов / Л. С. Большакова, Д. Е. Лукин, Е. Г. Меркулова, Н. Н. Толкунова // Здоровьесберегающие технологии в ВУЗе: состояние и перспективы. – Орел: Орловский гос. ун-т экономики и торговли, 2018. – С. 96–98.

14. Большакова, Л. С. Исследование профилактической эффективности биологически активной добавки Биойод / Л. С. Большакова, Е. В. Литвинова, А. В. Кузина, А. Б. Лисицын, И. М. Чернуха // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10–11. – С. 2401–2404.

15. Большакова, Л. С. Исследование метаболизма йодтирозинов, входящих в состав молочного йодированного белка, у крыс / Л. С. Большакова, А. Б. Лисицын, И.

М. Чернуха, Ю. Н. Зубцов, Д. Е. Лукин // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87, № 3. – С. 12–17. DOI: 10.24411/0042-8833-2018-10026.

16. Варивода, А. А. Применение КСБ-УФ в качестве технологического и функционального ингредиента в производстве продуктов питания / А. А. Варивода // Инновационные направления интеграции науки, образования и производства. – Керчь: КГМТУ, 2020. – С. 243–246.

17. Галстян, А. Г. Современные подходы к хранению и эффективной переработке сельскохозяйственной продукции / А. Г. Галстян, Л. М. Аксенова, А. Б. Лисицын // Вестник Российской академии наук. – 2019. – Т. 89, № 5. – С. 539–542. DOI: 10.31857/S0869-5873895539-542.

18. Герасимов, Г. А. Моделирование потребления йода с пищевыми продуктами промышленного производства / Г. А. Герасимов, Л. Цуркан, Г. Асланян, И. Шалару, Д. Демишкан // Вопросы питания. – 2021. – Т. 90, № 1. – С. 49–56. DOI: 10.33029/0042-8833-2021-90-1-49-56.

19. Гиро, Т. М. Методические подходы определения органического йода в виде йодтирозинов в пищевых продуктах / Т. М. Гиро и др. // Все о мясе. – 2021. – № 5. – С. 46–48.

20. Голубева, Л. В. Обогащенный консервированный молочный продукт / Л. В. Голубева, Т. Н. А. Хо // Перспективные аграрные и пищевые инновации. – Волгоград: ООО «СФЕРА», 2019. – Т. 2. – С. 3–6.

21. Дедов, И. И. Профилактика йододефицитных заболеваний: в фокусе региональные целевые программы / И. И. Дедов, Е. А. Трошина, Н. М. Платонова, Н. П. Маколина, И. М. Беловалова и др. // Проблемы эндокринологии. – 2022. – Т. 68, № 3. – С. 16–20. DOI: 10.14341/probl13119.

22. Донская, Г. А. Алиментарные средства защиты от радиации / Г. А. Донская, Л. Г. Креккер, Е. В. Колосова, В. М. Дрожжин // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2023. – Т. 193, № 4. – С. 172–179. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-4-172-179.

23. Донская, Г. А. Обогащение селеном молока для питания детей / Г. А. Донская, З. А. Бирюкова, О. Г. Пантелеева, Е. А. Юрова, В. М. Дрожжин // *Переработка молока*. – 2015. – Т. 189, № 7. – С. 36–40.

24. Дракина, С. А. Состояние здоровья организованных детей раннего возраста в зависимости от уровня обеспечения йодом. Возможности коррекции / С. А. Дракина, Н. К. Перевошикова, Е. Ю. Бурмистрова, С. Ф. Зинчук // *Вопросы практической педиатрии*. – 2022. – Т. 17, № 1. – С. 128–134. DOI: 10.20953/1817-7646-2022-1-128-134.

25. Дымар, О. В. Технологические аспекты получения сухих молочных продуктов повышенной растворимости / О. В. Дымар и др. // *Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья*. – 2021. – № 7. – С. 37–47.

26. Дымар, О. В. Методы выделения белков молочной сыворотки / О. В. Дымар, Е. Е. Ныркова, Е. Д. Шегидевич // *Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья*. – 2012. – № 7. – С. 82–91.

27. Жамсаранова, С. Д. Создание гипотетической компьютерной модели органических форм микроэлементов / С. Д. Жамсаранова, Д. В. Лыгденов, Д. В. Соколов, Б. А. Болхонов // *Bulletin of the East Siberian State University of Technology / Vestnik VSGTU*. – 2019. – Т. 74, № 3.

28. Зобкова, З. С. Внедрение и коммерциализация результатов научно-исследовательских работ в цельномолочной отрасли / З. С. Зобкова // *Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством*. – 2020. – Т. 1, № 1. – С. 199–204. DOI: 10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-199-204.

29. Зобкова, З. С. О творожных продуктах, обогащенных компонентами немолочного происхождения / З. С. Зобкова, Д. В. Зенина // *Молочная промышленность*. – 2008. – № 8. – С. 24–25.

30. Зобкова, З. С. Продовольственная безопасность России: один из главных путей – самообеспеченность цельномолочными продуктами / З. С. Зобкова // Молочная промышленность. – 2012. – № 5. – С. 40–44.

31. Ибрагимова, З. Р. Получение и аспекты рационального применения йодированных белков в технологии функциональных продуктов питания / З. Р. Ибрагимова, Е. И. Цопанова, Д. Д. Симеониди // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. – 2015. – № 5(34). – С. 73–77.

32. Ибрагимова, З. Р. Обогащение йодом полуфабрикатов из пресноводной рыбы / З. Р. Ибрагимова, Ф. С. Баэрова // Пищевая промышленность. – 2007. – № 3. – С. 59–60.

33. Сордонова, Е. В. Разработка и характеристика органических производных йода и цинка / Е. В. Сордонова, С. Д. Жамсаранова, Д. В. Лыгденов // Bulletin of the East Siberian State University of Technology / Vestnik VSGTU. – 2018. – Т. 69, № 2.

34. Инструкция по калькулированию себестоимости продукции на предприятиях молочной, маслосырдельной и молочноконсервной промышленности (утв. Минсельхозпродом РФ 19.03.1996 с изменениями от 12.10.1999).

35. Калугина, Д. Н. Характеристики белкового состава в формировании сроков годности молока ультрапастеризованного / Д. Н. Калугина, Е. А. Юрова // Вестник КрасГАУ. – 2021. – № 10. – С. 165–172. DOI: 10.36718/1819-4036-2021-10-165-172.

36. Кельдиева, О. А. Металл-аффинная хроматография. Основы и применение / О. А. Кельдиева, В. Д. Гладилович, Е. П. Подольская // Научное приборостроение. – 2013. – Т. 23, № 1. – С. 74–85.

37. Киселев, М. Г. Определение краевого угла смачивания на плоских поверхностях / М. Г. Киселев, В. В. Савич, Т. П. Павич // Наука и техника. – 2006. – № 1. – С. 38–41.

38. Коденцова, В. М. Обеспеченность населения России микронутриентами и возможности ее коррекции. Состояние проблемы / В. М. Коденцова, О. А.

Вржесинская, Д. В. Рисник, Д. Б. Никитюк, В. А. Тутельян // Вопросы питания. – 2017. – № 4. – С. 113–124. DOI: 10.24411/0042-8833-2017-00067.

39. Кручинин, А. Г. Ферментативный способ производства биоактивных пептидов из молочного белкового сырья: обзор предметного поля / А. Г. Кручинин, Е. И. Большакова // FOOD METAENGINEERING. – 2023. – Т. 1, № 3. DOI: 10.37442/fme.2023.3.24.

40. Кручинин, А. Г. Теория и практика технологии таргетированной биокаталитической конверсии полипептидных комплексов молочной сыворотки : диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук. – Москва, 2024. – 444 с.

41. Кручинин, А. Г. Интегративный подход к классификации молочной сыворотки / А. Г. Кручинин, Е. И. Мельникова, И. А. Барковская // Сыроделие и маслоделие. – 2024. – № 1. – С. 93–97. DOI: 10.21603/2073-4018-2024-1-7.

42. Кручинин, А. Г. Современное состояние рынка вторичных сырьевых ресурсов молочной промышленности / А. Г. Кручинин, А. В. Бигаева, С. Н. Туровская, Е. Е. Илларионова // Ползуновский вестник. – 2022. – № 4. – С. 140–148. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2022.04.018.

43. Кузнецов, В. В. Отдельные подходы к выбору нутриентов для обогащения продуктов детского питания / В. В. Кузнецов, С. Е. Димитриева, Д. Е. Лукин. – 2017.

44. Куликов, Д. С. Биокаталитический и биосинтетический способы получения белковых концентратов из гороха и нута / Д. С. Куликов, М. А. Арюзина // Пищевые системы. – 2021. – Т. 4, № 3S. – С. 160–167. DOI: 10.21323/2618-9771-2021-4-3S-160-167.

45. Куликовский, А. В. Методические аспекты определения органического йода (йодтирозинов) в пищевых продуктах / А. В. Куликовский, А. Б. Лисицын, О. А. Кузнецова, Н. Л. Вострикова, И. Ф. Горлов // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85, № 4. – С. 91–97.

46. Кутяков, В. А. Металлотионеины как сенсоры и регуляторы обмена металлов в клетках / В. А. Кутяков, А. Б. Салмина // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 91–99. DOI: 10.20538/1682-0363-2014-3-91-99.

47. Лескова, С. Ю. Создание обогащенной белково-жировой эмульсии для мясопродуктов / С. Ю. Лескова, М. Б. Данилов, Н. И. Гомбожапова // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 41, № 2. – С. 55–61.

48. Лыгденов, Д. В. Органические формы микроэлементов как перспективные ингредиенты функциональных продуктов здорового питания / Д. В. Лыгденов, С. Д. Жамсаранова // Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. – 2018. – № 1. – С. 148–151.

49. Мавлонов, Г. Т. Активированный цинком бентонит – природный неорганический сорбент для гистидин содержащих пептидов / Г. Т. Мавлонов // Материалы международной научно-практической конференции (67-я годовщина), посвященной 80-летию ТГМУ им. Абуали ибни Сино и «Годам развития села, туризма и народных ремёсел (2019–2021)», Душанбе, Таджикистан, 29 ноября 2019. – С. 185.

50. Мамцев, А. Н. Технология производства кисломолочного напитка, обогащенного йодом / А. Н. Мамцев, В. Н. Козлов, М. В. Динякова // Переработка молока. – 2016. – № 11(205). – С. 42–45.

51. Мельникова, Е. И. Функционально-технологические свойства термостабильного концентрата сывороточных белков / Е. И. Мельникова, Е. Б. Станиславская, Е. Д. Шабалова // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2022. – Т. 84, № 2 (92). – С. 52–56. DOI: 10.20914/2310-1202-2022-2-52-56.

52. Мельникова, Е. И. Особенности получения и применения мицеллярного казеина в технологии молокоемких белковых продуктов / Е. И. Мельникова, Е. Б. Станиславская, Е. В. Богданова, Е. Д. Шабалова // Техника и технология пищевых производств. – 2022. – Т. 52. – № 3. – С. 592–601. DOI: 10.21603/2074-9414-2022-3-2389.

53. Мельниченко, Г. А. Йододефицитные заболевания щитовидной железы в Российской Федерации: современное состояние проблемы. Аналитический обзор публикаций и данных официальной государственной статистики (Росстат) / Г. А. Мельниченко, Е. А. Трошина, Н. М. Платонова и др. // *Consilium Medicum*. – 2019. – Т. 21, № 4. – С. 14–20. DOI: 10.26442/20751753.2019.4.190337.

54. Методические рекомендации МР 2.3.1.0253-21 «Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 22 июля 2021 г.).

55. Министерство здравоохранения Российской Федерации. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://minzdrav.gov.ru/> (дата обращения: 21.05.2024).

56. Мохорт, Т. В. Йодный дефицит и беременность: проблема и решения / Т. В. Мохорт // *Репродуктивное здоровье. Восточная Европа*. – 2021. – Т. 11, № 4. – С. 410–421. DOI: 10.34883/PI.2021.11.4.003.

57. Мухидинов, З. К. Белки молочной сыворотки: анализ компонентного состава в полиакриламидном геле, выделение основных сывороточных белков / З. К. Мухидинов, Г. Ф. Касимова, Ф. Н. Джурраева, Д. Т. Бобокалонов, М. Д. Халикова и др. // *Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение физико-математических, химических, геологических и технических наук*. – 2008. – № 1. – С. 52–57.

58. Патент № 2 826 384 С1 Российская Федерация, МПК А61К 38/16, А61К 33/18, А61Р 39/00, А23J 3/10. Способ получения йодированного мицеллярного казеина, подходящего для применения в составах фармакологических и ветеринарных препаратов, биологически активных добавок и радиопротекторных препаратов, композиция для профилактики йодной недостаточности и оптимизации йодного обмена, композиция для профилактики и защиты от радиационного поражения : № 2024105162 : заявл. 29.02.2024 : опубл. : 09.09.2024 / В. Б. Соловье, М. В. Кальянов ; заявитель В. Б. Соловье, М. В. Кальянов.

59. Патент № 2328878 С2 Российская Федерация, МПК А23L 1/30, А23L 1/304. Биологически активная добавка к пище для профилактики йоддефицитных состояний, оптимизации йодного обмена и способ ее получения : № 2006115630/13 : заявл. 06.05.2006 : опубл. 20.07.2008 / В. М. Молчан ; заявитель ООО «Йодиллия».

60. Патент № 2720200 С2 Российская Федерация, МПК А61К 33/18, А61К 36/48, А61Р 3/00. Способ получения средства для профилактики йоддефицитных состояний и иммунодефицитов : № 2018126264 : заявл. 16.07.2018 : опубл. 27.04.2020 / С. Д. Жамсаранова, Д. В. Лыгденов, Е. В. Сордонова ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления».

61. Полищук, Е. К. и др. Влияние рН на извлечение белков из поджелудочной железы SUS SCROFA / Е. К. Полищук и др. // Пищевые системы. – 2023. – С. 539–546. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-4-539-546.

62. Поповичева, Н. Н. Функциональный обогащенный кисломолочный напиток с йодированным пищевым композитом / Н. Н. Поповичева // Пищевые системы. – 2021. – Т. 4, № 3S. – С. 228–231. DOI: 10.21323/2618-9771-2021-4-3S-228-231.

63. Радаева, И. А., Кручинин, А. Г., Туровская, С. Н., Илларионова, Е. Е., Бигаева, А. В. Формирование технологических свойств сухого молока / И. А. Радаева и др. // Вестник МГТУ. – 2020. – № 3. DOI: 10.21443/1560-9278-2020-23-3-280-290.

64. Рост стоимости кормов не позволяет снижать себестоимость молока [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://milknews.ru/analitika-rinka-moloka/indeks-rmsi/indeks-rmci-7-marta.html> (дата обращения: 02.02.2025).

65. Савлукова, Ю. О., Ковалева, Е. Г. Получение функционального йогурта, обогащенного йодом в биодоступной форме / Ю. О. Савлукова, Е. Г. Ковалева // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. – 2023. – Т. 11, № 2. – С. 83–92. DOI: 10.14529/food230210.

66. Салихова, Д. И. Нейропротективные свойства нейрональных и глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных

стволовых клеток человека: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Москва, 2020. – 170 с.

67. Скугорева, С. Г., Ашихмина, Т. Я., Фокина, А. И., Лялина, Е. И. Химические основы токсического действия тяжёлых металлов (обзор) / С. Г. Скугорева и др. // Теоретическая и прикладная экология. – 2016. – № 1. – С. 4–13.

68. Славянский, А. А., Грибкова, В. А., Николаева, Н. В., Митрошина, Д. П. Исследование возможности применения гранулированного сахаросодержащего продукта с функциональными добавками при производстве жележных начинок / А. А. Славянский и др. // Техника и технология пищевых производств. – 2021. – Т. 51, № 4. – С. 859–868. DOI: 10.21603/2074-9414-2021-4-859-868.

69. Сордонова, Е. В., Жамсаранова, С. Д., Лыгденов, Д. В. Разработка и характеристика органических производных йода и цинка / Е. В. Сордонова и др. // Вестник ВСГУТУ. – 2018. – Т. 69, № 2. – С. 73–79.

70. Стрижко, М. Н. Антинутриенты в растительных напитках на зерновом сырье: обзор предметного поля / М. Н. Стрижко // FOOD METAENGINEERING. – 2023. – Т. 1, № 1. – С. 63–89. DOI: 10.37442/fme.2023.1.3.

71. Суплотова, Л. А., Макарова, О. Б., Трошина, Е. А. Неонатальный тиреотропный гормон-индикатор мониторинга тяжести йодного дефицита. Что считать «точкой отсечения»? / Л. А. Суплотова и др. // Проблемы эндокринологии. – 2022. – Т. 68, № 6. – С. 12–21. DOI: 10.14341/probl12892.

72. Табаторович, А. Н., Резниченко, И. Ю. Технология и оценка качества пастилы, обогащенной органическим йодом / А. Н. Табаторович, И. Ю. Резниченко // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 40, № 1. – С. 61–67.

73. Томчани, О. В. Разработка технологий йодказеина и молочных продуктов, обогащенных йодированным белком: диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук / О. В. Томчани. – Обнинск, 2002. – 132 с.

74. Трошина, Е. А. Аутоиммунные и йододефицитные заболевания щитовидной железы как «вершина айсберга» полиорганной патологии / Е. А. Трошина //

Терапевтический архив. – 2024. – Т. 96, № 10. – С. 923–931. DOI: 10.26442/00403660.2024.10.202855.

75. Трошина, Е. А., Дедов, И. И., Платонова, Н. М., Маколина, Н. П., Беловалова, И. М. и др. Региональная целевая программа "Профилактика йододефицитных заболеваний на 202X–202X годы" (Проект) / Е. А. Трошина и др. // Проблемы эндокринологии. – 2022. – Т. 68, № 3. – С. 21–29. DOI: 10.14341/probl13120.

76. Трошина, Е. А. Устранение дефицита йода — забота о здоровье нации. Экскурс в историю, научные аспекты и современное состояние правового регулирования проблемы в России / Е. А. Трошина // Проблемы эндокринологии. – 2022. – Т. 68, № 4. – С. 4–12. DOI: 10.14341/probl13154.

77. Устинова, А. В., Дыдыкин, А. С., Федулова, Л. В. Колбасные изделия, обогащенные йодом, для детского питания / А. В. Устинова и др. // Пищевая промышленность. – 2013. – № 12. – С. 20–22.

78. Хотимченко, С. А., Шарафетдинов, Х. Х. О профилактике йоддефицитных состояний. Сообщение 2 / С. А. Хотимченко, Х. Х. Шарафетдинов // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89, № 3. – С. 126–128. DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10037.

79. Цукарева, Е. А., Авчинникова, Д. А. Сравнительная характеристика фактического питания младших школьников с различными показателями пищевого статуса / Е. А. Цукарева, Д. А. Авчинникова // Гигиена и санитария. – 2021. – Т. 100, № 5. – С. 512–518. DOI: 10.47470/0016-9900-2021-100-5-512-518.

80. Цуркан, Л., Герасимов, Г. А., Парванта, И., Тиммер, А. Прогресс в профилактике и устранении йододефицитных заболеваний в регионе Европы и Центральной Азии в 2010–2020 годах / Л. Цуркан и др. // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2021. – Т. 17, № 4. – С. 4–16. DOI: 10.14341/ket12713.

81. Цыб, А. Ф. и др. Функциональная пригодность йодказеина для профилактики йодной недостаточности / А. Ф. Цыб и др. // Вестник РАМН. – 2001. – № 6. – С. 17.

82. Цыб, А. Ф., Тутельян, В. А., Онищенко, Г. Г., Шахтарин, В. В., Силаев, А. В. и др. Новые подходы к решению проблемы ликвидации йоддефицитных состояний / А. Ф. Цыб и др. // Пищевая промышленность. – 2004. – № 11. – С. 84–86.

83. Чекнёв, С. Б. Белки γ -глобулиновой фракции, хелатирующие катионы металлов, в физиологической иммунорегуляции. Сонаправленное действие меди и цинка / С. Б. Чекнёв // Иммунология. – 2021. – Т. 42, № 5. – С. 546–551. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-3-293-300.

84. Adler, Nissen, J. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid / J. Adler Nissen // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1979. – Vol. 27, № 6. – P. 1256–1262. DOI: 10.1021/jf60226a042.

85. Aluko, R. E. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides / R. E. Aluko // Current Opinion in Food Science. – 2015. – Т. 4. – С. 44–50. – DOI: 10.1146/annurev-food-022814-015520.

86. Arias-Borrego, A. Iodine deficiency disturbs the metabolic profile and elemental composition of human breast milk / A. Arias-Borrego, I. Velasco, J. L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera // Food Chemistry. – 2022. – № 371. – С. 131329. – DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131329.

87. Bale, W. F. High specific activity labeling of protein with I131 by the iodine monochloride method / W. F. Bale, et al. // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1966. – Т. 122, № 2. – С. 407–414. – DOI: 10.3181/00379727-122-31148.

88. Barbaro, D. Iodine and myo-inositol: a novel promising combination for iodine deficiency / D. Barbaro, B. Orrù, V. Unfer // Frontiers in Endocrinology. – 2019. – № 10. – С. 457. – DOI: 10.3389/fendo.2019.00457.

89. Bertinato, J. Iodine nutrition: Disorders, monitoring and policies / J. Bertinato // Advances in Food and Nutrition Research. – 2021. – Т. 96. – С. 365–415. – DOI: 10.1016/bs.afnr.2021.01.004.

90. Bolshakova, L. S. Absorption of iodotyrosine from iodized milk protein in animals / L. S. Bolshakova, D. E. Lukin // *Foods and Raw Materials*. – 2020. – T. 8, № 1. – C. 60–66. – DOI: 10.21603/2308-4057-2020-1-60-66.

91. Bonofiglio, D. Effects of iodine intake and nutraceuticals in thyroidology: update and prospects / D. Bonofiglio, S. Catalano // *Nutrients*. – 2020. – T. 12, № 5. – C. 1491. – DOI: 10.3390/nu12051491.

92. Censi, S. The effects of iodine supplementation in pregnancy on iodine status, thyroglobulin levels and thyroid function parameters: results from a randomized controlled clinical trial in a mild-to-moderate iodine deficiency area / S. Censi, S. Watutantrige-Fernando, G. Groccia, J. Manso, M. Plebani, et al. // *Nutrients*. – 2019. – T. 11, № 11. – C. 2639. – DOI: 10.3390/nu11112639.

93. Cesar, A. J. Iodine status of Brazilian school-age children: a national cross-sectional survey / A. J. Cesar, S. I. Santos, E. R. Black, D. M. A. Chrestani, A. F. Duarte // *Nutrients*. – 2020. – T. 12, № 4. – C. 1077. – DOI: 10.3390/nu12041077.

94. Chen, L. A novel colorimetric determination of free amino acids content in tea infusions with 2,4-dinitrofluorobenzene / L. Chen, Q. Chen, Z. Zhang, X. Wan // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2009. – T. 22, № 2. – C. 137–141. – DOI: 10.1016/j.jfca.2008.08.007.

95. Costa, P. J. Halogen bonding in halocarbon-protein complexes and computational tools for rational drug design / P. J. Costa, R. Nunes, D. Vila-Viçosa // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2019. – T. 14, № 8. – C. 805–820. – DOI: 10.1080/17460441.2019.1619692.

96. Daskaya-Dikmen, C. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants / C. Daskaya-Dikmen, et al. // *Nutrients*. – 2017. – T. 9, № 4. – C. 316. – DOI: 10.3390/nu9040316.

97. Deng, Y. Towards predicting protein hydrolysis by bovine trypsin / Y. Deng, et al. // *Process Biochemistry*. – 2018. – T. 65. – C. 81–92. – DOI: 10.1016/j.procbio.2017.11.006.

98. Dissanayake, M. Influence of heat and pH on structure and conformation of whey proteins / M. Dissanayake, L. Ramchandran, C. Piyadasa, T. Vasiljevic // *International Dairy Journal*. – 2013. – T. 28, № 2. – C. 56–61. – DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.08.014.

99. Dolińska, B. Influence of incubation conditions on hydrolysis efficiency and iodine enrichment in baker's yeast / B. Dolińska, et al. // *Biological Trace Element Research*. – 2012. – T. 147. – C. 354–358. – DOI: 10.1007/s12011-011-9318-0.

100. Dydykin, A. S. Modern forms of iodine-containing food components / A. S. Dydykin, Y. N. Zubarev, E. I. Logunova, Y. A. Kuzlyakina // *Theory and Practice of Meat Processing*. – 2023. – T. 8, № 3. – C. 172–182. DOI: 10.21323/2414-438X-2023-8-3-172-182.

101. Eastman, C. J. The iodine deficiency disorders / C. J. Eastman, M. B. Zimmermann. – 2015.

102. Gharibzahedi, S. M. T. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation / S. M. T. Gharibzahedi, S. M. Jafari // *Trends in Food Science & Technology*. – 2017. – № 62. – C. 119–132. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.02.017.

103. Giro, T. M. Production of enriched lamb in biodegradable packaging / T. M. Giro, A. V. Kulikovskiy, S. V. Andreeva, I. F. Gorlov, A. V. Giro // *Foods and Raw Materials*. – 2020. – Vol. 8, № 2. – P. 312–320. DOI: 10.21603/2308-4057-2020-2-312-320.

104. Gołębiowski, A. Functionalization of alpha-Lactalbumin by zinc ions / A. Gołębiowski et al. // *ACS Omega*. – 2022. – T. 7, № 43. – C. 38459–38474. DOI: 10.1021/acsomega.2c03674.

105. Hatch-McChesney, A. Iodine and iodine deficiency: a comprehensive review of a re-emerging issue / A. Hatch-McChesney, H. R. Lieberman // *Nutrients*. – 2022. – T. 14, № 17. – C. 3474. DOI: 10.3390/nu14173474.

106. Henjum, S. Suboptimal iodine status and low iodine knowledge in young Norwegian women / S. Henjum, A. L. Brantsæter, A. Kurniasari, L. Dahl, E. K. Aadland, E. L. F. Gjengedal et al. // *Nutrients*. – 2018. – T. 10, № 7. – Article 941. DOI: 10.3390/nu10070941.

107. Jakopović, K. L. Physiological significance, structure and isolation of α -lactalbumin / K. L. Jakopović, I. Barukčić, M. Božanić // *Mljekarstvo: Časopis Za Unaprjeđenje Proizvodnje i Prerade Mlijeka*. – 2016. DOI: 10.15567/mljekarstvo.2016.0101.

108. Jiang, B. Environmentally-friendly strategy for separation of α -lactalbumin from whey by aqueous two phase flotation / B. Jiang, L. Wang, J. Na, X. Zhang et al. // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2020. – Vol. 13, № 1. – C. 3391–3402. DOI: 10.1016/j.arabjc.2018.11.013.

109. Karbownik-Lewińska, M. Iodine as a potential endocrine disruptor — a role of oxidative stress / M. Karbownik-Lewińska, J. Stępnik, P. Iwan, A. Lewiński et al. // *Endocrine*. – 2022. – T. 78, № 2. – C. 219–240. DOI: 10.1007/s12020-022-03107-7.

110. Koukkou, E. K. Effect of excess iodine intake on thyroid on human health / E. K. Koukkou, N. D. Roupas, K. B. Markou // *Minerva Medica*. – 2017. – T. 108, № 2. – C. 136–146. DOI: 10.23736/S0026-4806.17.04923-0.

111. Krela-Kaźmierczak, I. Is there an ideal diet to protect against iodine deficiency? / I. Krela-Kaźmierczak, A. Czarnywojtek, K. Skoracka, A. M. Rychter, A. E. Ratajczak et al. // *Nutrients*. – 2021. – T. 13, № 2. – C. 513. DOI: 10.3390/nu13020513.

112. Kruchinin, A. Effect of enzymatic degradation of proteins on technological properties of whey powdered products / A. Kruchinin et al. // *International Journal of Dairy Technology*. – 2025. – T. 78, № 2. – C. e70005. DOI: 10.37442/fme.2023.3.24.

113. 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 & Technology*. – 2022. – T. 52, № 1. – C. 46–57. DOI: 10.21603/2074-9414-2022-1-46-57.

114. 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.

115. Lisco, G. Iodine Deficiency and Iodine Prophylaxis: An Overview and Update / G. Lisco, A. De Tullio, D. Triggiani, R. Zupo, V. A. Giagulli et al. // *Nutrients*. – 2023. – T. 15, № 4. – C. 1004. DOI: 10.3390/nu15041004.

116. Liu, P. Prevention and control of iodine deficiency disorders – China, 1995–2020 / P. Liu, L. Fan, F. Meng, X. Su, S. Liu, H. Shen et al. // *China CDC Weekly*. – 2020. – Vol. 2, № 20. – P. 345–349. DOI: 10.46234/ccdcw2020.090.

117. Lucena, M. E. α -Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates / M. E. Lucena, S. Alvarez, C. Menéndez, F. A. Riera, R. Alvarez // *Separation and Purification Technology*. – 2007. – Vol. 52, № 3. – C. 446–453.

118. Luo, P. Photochemical bromination and iodination of peptides and proteins by photoexcitation of aqueous halides / P. Luo, Z. Liu, T. Zhang, X. Wang, J. Liu, Y. Liu, X. Zhou, Y. Chen, G. Hou, W. Dong, C. Xiao, Y. Jin, X. Yang, F. Wang // *Chemical Communications*. – 2021. – T. 57, № 90. – C. 11972–11975. DOI: 10.1039/D1CC04906B.

119. Manousou, S. Iodine deficiency in pregnant women in Sweden: a national cross-sectional study / S. Manousou, M. Andersson, R. Eggertsen, S. Hunziker, L. Hulthén et al. // *European Journal of Nutrition*. – 2020. – № 59. – C. 2535–2545. DOI: 10.1007/s00394-019-02102-5.

120. Mao, Y. Selective hydrolysis of whey proteins using a flow-through monolithic reactor with large pore size and immobilised trypsin / Y. Mao, U. Kulozik // *International Dairy Journal*. – 2018. – Vol. 85. – P. 96–104. DOI: 10.1016/j.idairyj.2018.05.015.

121. Mathiapparanam, S. The prevalence and risk factors associated with iodine deficiency in Canadian adults / S. Mathiapparanam, A. N. de Macedo, A. Mente, P. Poirier, S. A. Lear, A. Wielgosz et al. // *Nutrients*. – 2022. – Vol. 14, № 13. – Article 2570. DOI: 10.3390/nu14132570.

122. McGuffey, M. K. Solubility and aggregation of commercial α -lactalbumin at neutral pH / M. K. McGuffey et al. // *International Dairy Journal*. – 2007. – T. 17, № 10. – C. 1168–1178. DOI: 10.1016/J.IDAIRYJ.2007.04.003.

123. Murcia, M. Iodine intake from supplements and diet during pregnancy and child cognitive and motor development: the INMA Mother and Child Cohort Study / M. Murcia, M. Espada, M. Julvez, J. Llop, S. Lopez-Espinosa et al. // *Journal of Epidemiology & Community Health*. – 2018. – T. 72, № 3. – С. 216–222. DOI: 10.1136/jech-2017-209830.

124. Noman, A. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme / A. Noman, Y. Xu, W. Q. Al-Bukhaiti, S. M. Abed et al. // *Process Biochemistry*. – 2018. – Vol. 67. – P. 19–28. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.01.009.

125. Nunes, R. S. Halogen bonding: an underestimated player in membrane–ligand interactions / R. S. Nunes, D. Vila-Viçosa, P. J. Costa // *Journal of the American Chemical Society*. – 2021. – T. 143, № 11. – С. 4253–4267. DOI: 10.1021/jacs.0c12470.

126. Opazo, M. C. The impact of the micronutrient iodine in health and diseases / M. C. Opazo, I. Coronado-Arrázola, O. P. Vallejos, R. Moreno-Reyes, C. Fardella et al. // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2022. – T. 62, № 6. – С. 1466–1479. DOI: 10.1080/10408398.2020.1843398.

127. P02769 ALBU_BOVIN. UniProt. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02769/variant-viewer>. (дата обращения – 04.02.2024).

128. Permyakov, E. A. α -Lactalbumin, amazing calcium-binding protein / E. A. Permyakov // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, № 9. – Article 1210. DOI: 10.3390/biom10091210.

129. Pinto, L. D. Solution and solid state study of copper (II) ternary complexes containing amino acids of interest for brain biochemistry-2: Homocysteine with aspartate, glutamate or methionine / L. D. Pinto, P. A. L. Puppim, V. M. Behring, O. C. Alves, N. A. Rey, J. Felcman // *Inorganica Chimica Acta*. – 2012. – Vol. 386. – P. 60–67. DOI: 10.1016/J.ICA.2012.01.025.

130. Popov, I. A. ESI-MS identification of the minimal zinc-binding center in natural isoforms of β -amyloid domain 1-16 / I. A. Popov, M. I. Indeikina, A. S. Kononikhin, N. L.

Starodubtseva, E. N. Nikolaev, S. A. Kozin et al. // *Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 47, № 3. – P. 440–445. DOI: 10.7868/s0026898413020122.

131. Randremanana, R. V. First national iodine survey in Madagascar demonstrates iodine deficiency / R. V. Randremanana, A. Bastaraud, L. P. Rabarijaona, P. Piola, D. Rakotonirina, J. O. Razafinimanana et al. // *Maternal and Child Nutrition*. – 2019. – Vol. 15, № 2. – Article e12717. DOI: 10.1111/mcn.12717.

132. Rayman, M. P. Multiple nutritional factors and thyroid disease, with particular reference to autoimmune thyroid disease / M. P. Rayman // *Proceedings of the Nutrition Society*. – 2019. – T. 78, № 1. – C. 34–44. DOI: 10.1017/S0029665118001192.

133. Rodriguez-Diaz, E. Iodine status and supplementation before, during, and after pregnancy / E. Rodriguez-Diaz, E. N. Pearce // *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2020. – T. 34, № 4. – C. 101430. DOI: 10.1016/j.beem.2020.101430.

134. Romo, M. Separation of α -Lactalbumin Enriched Fraction from Bovine Native Whey Concentrate by Combining Membrane and High-Pressure Processing / M. Romo, M. Castellari, D. Fartdinov, X. Felipe // *Foods*. – 2023. – № 12. – C. 480. DOI: 10.3390/foods12030480.

135. Rulliere, C. Heat treatment effect on polyphosphate chain length in aqueous and calcium solutions / C. Rulliere et al. // *Food Chemistry*. – 2012. – T. 134, № 2. – C. 712–716. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.164.

136. Saha, A. Excess iodine-induced lymphocytic impairment in adult rats / A. Saha, S. Mukherjee, A. Bhattacharjee, D. Sarkar, A. Chakraborty et al. // *Toxicology Mechanisms and Methods*. – 2019. – T. 29, № 2. – C. 110–118. DOI: 10.1080/15376516.2018.1528647.

137. Shaaban, E. S. Iodine deficiency and anemia levels of urban and rural Egyptian children; Follow up study / E. S. Shaaban, G. A. N. Yamamah, R. A. Bassuoni, L. Hussien, M. S. Mohamed, M. Gad // *Advances in Public Health Communication and Tropical Medicine*. – 2022. – № 6. – C. 1–7. DOI: 10.37722/APHCTM.2022601.

138. Shi, Y. Dietary zinc supplements: beneficial health effects and application in food, medicine and animals / Y. Shi et al. // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2024. – T. 104, № 10. – C. 5660–5674. DOI: 10.1002/jsfa.13325.

139. Shinada, N. K. Halogens in protein–ligand binding mechanism: a structural perspective / N. K. Shinada, A. G. de Brevern Schmidtke, P. Schmidtke // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – T. 62, № 21. – C. 9341–9356. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01453.

140. Shishkova, V. N. Molecular mechanisms defining application of glycine and zinc combination in correction of stress and anxiety main manifestations / V. N. Shishkova, Y. R. Nartsissov, V. Y. Titova, E. V. Sheshegova // *Pharmacy & Pharmacology*. – 2022. – T. 10, № 5. – C. 404–415. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-404-415.

141. Sirimulla, S. Halogen interactions in protein–ligand complexes: implications of halogen bonding for rational drug design / S. Sirimulla, J. B. Bailey, R. Vegesna, M. Narayan // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2013. – T. 53, № 11. – C. 2781–2791. DOI: 10.1021/ci400257k.

142. Spellman, D. Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins / D. Spellman, G. O’Cuinn, R. J. FitzGerald // *Food Chemistry*. – 2009. – Vol. 114, № 2. – P. 440–446. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.067.

143. Spellman, D. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis / D. Spellman, E. McEvoy, G. O’Cuinn, R. J. FitzGerald // *International Dairy Journal*. – 2003. – Vol. 13, № 6. – P. 447–453. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00053-0.

144. Tattari, S. Nutritional requirements for the elderly in India: A status paper / S. Tattari, S. M. Gavaravarapu, R. Pullakhandam, N. Bhatia, S. Kaur, R. Sarwal, H. Rajkumar, G. B. Reddy // *The Indian Journal of Medical Research*. – 2022. – T. 156, № 3. – C. 411. DOI: 10.4103/ijmr.ijmr_2784_21.

145. Torres-Sánchez, L. Para-occupational exposure to pesticides, PON1 polymorphisms and hypothyroxinemia during the first half of pregnancy in women living in a Mexican

floricultural area / L. Torres-Sánchez, R. Gamboa, S. Bassol-Mayagoitia, C. Huesca-Gómez, M. P. Nava et al. // *Environmental Health*. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 1–10. DOI: 10.1186/s12940-019-0470-x.

146. Trofimiuk-Müldner, M. Current iodine nutrition status in Poland (2017): is the Polish model of obligatory iodine prophylaxis able to eliminate iodine deficiency in the population? / M. Trofimiuk-Müldner, J. Konopka, G. Sokołowski, A. Dubiel, M. Kieć-Klimczak // *Public Health Nutrition*. – 2017. – Т. 23, № 14. – С. 2467–2477. DOI: 10.1017/S1368980020000403.

147. Turianica, I. Symptoms and Prevention of The Iodine Deficiency / I. Turianica, M. Rothová // *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. – 2012. – Т. 2, № 2. – С. 803–812.

148. Udechukwu, M. C. Prospects of enhancing dietary zinc bioavailability with food-derived zinc-chelating peptides / M. C. Udechukwu, S. A. Collins, C. C. Udenigwe // *Food Function*. – 2016. – Vol. 7, № 10. – P. 4137–4144. DOI: 10.1039/c6fo00706f.

149. Vasiljev, V. Overview of iodine intake / V. Vasiljev, A. Subotić, M. M. Glavić, D. Juraga et al. // *Southeastern European Medical Journal*. – 2022. – Vol. 6, № 1. – P. 12–20. DOI: 10.1002/14651858.CD003819.pub2.

150. Vrabie, E. The Recovery of Alpha-Lactalbumin at the Electroactivation of Whey / E. Vrabie, I. Paladii, M. Bologna, N. Țislinscaia et al. // *International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering*. – 2023. – Cham: Springer Nature Switzerland. – P. 514–527. DOI: 10.1007/978-3-031-42775-6_55.

151. Winder, M. The impact of iodine concentration disorders on health and cancer / M. Winder, Z. Kosztyła, A. Boral, P. Kocelak, J. Chudek et al. // *Nutrients*. – 2022. – Т. 14, № 11. – С. 2209. DOI: 10.3390/nu14112209.

152. World Health Organization. Microelements Data Base. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.who.int/health-topics/micronutrients#tab=tab_1. (дата обращения: 28.01.2024).

153. Zimmermann, M. B. Iodine deficiency / M. B. Zimmermann // The thyroid and its diseases: a comprehensive guide for the clinician. – 2019. – P. 101–107. DOI: 10.1007/978-3-319-72102-6_8.

154. Zimmermann, M. B. The remarkable impact of iodisation programmes on global public health / M. B. Zimmermann // Proceedings of the Nutrition Society. – 2023. – Vol. 82, № 2. – P. 113–119. DOI: 10.1017/S0029665122002762.

155. Zimmermann, M. B. Iodine and the iodine deficiency disorders / M. B. Zimmermann // Present Knowledge in Nutrition: Basic Nutrition and Metabolism. – 2020. – Eleventh Edition. – P. 429–441. DOI: 10.1016/B978-0-323-66162-1.00025-1.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Свидетельство о государственной регистрации программы для
ЭВМ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО
о государственной регистрации программы для ЭВМ
№ 2025661267

**«ПРОГРАММА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССА
ЙОДИРОВАНИЯ БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ
СЫВОРОТКИ»**

Правообладатель: **ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (RU)**

Авторы: **Барковская Ирина Александровна (RU), Семипятный
Владислав Константинович (RU), Кручинин Александр
Геннадьевич (RU)**

Заявка № 2025619396
Дата поступления 21 апреля 2025 г.
Дата государственной регистрации
в Реестре программ для ЭВМ 05 мая 2025 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности



Ю. С. Зубов

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Титульные листы документов в области стандартизации

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ»
(ФГАНУ «ВНИМИ»)**

**СТАНДАРТ
Организации**

**СТО
00419785-081/2-2024**

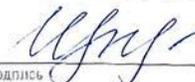
УТВЕРЖДАЮ
Директор
ФГАНУ «ВНИМИ»
А.Г. Галстян
2024 г.



**ГИДРОЛИЗАТ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ СУХОЙ,
ОБОГАЩЕННЫЙ ЙОДОМ И ЦИНКОМ**

РАЗРАБОТАНО:
ФГАНУ «ВНИМИ»

Младший научный сотрудник


И.А. Барковская

Москва
2024

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ»
(ФГАНУ «ВНИМИ»)**

**СТАНДАРТ
ОРГАНИЗАЦИИ**

**СТО
00419785-081/2.1-2024**

УТВЕРЖДАЮ

Директор
ФГАНУ «ВНИМИ»

А.Г. Галстян
2024 г.



**МОЛОКО ПИТЬЕВОЕ ПАСТЕРИЗОВАННОЕ, ОБОГАЩЕННОЕ
ВОДОМ И ЦИНКОМ**

РАЗРАБОТАНО:
ФГАНУ «ВНИМИ»

Младший научный сотрудник

И.А. Барковская
И.А. Барковская

Москва
2024

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Акты промышленной апробации и внедрения результатов НИР



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИМИ»)



ОГРН 1037739374672 | ОКПО 00419785 | ИНН 7705009252 | КПП 770501001
Люсиновская ул., д. 35, к. 7, Москва, 115093, www.vnimi.org, info@vnimi.org, (499) 236-31-64

АКТ

Апробации и внедрения технологии производства гидролизата
сывороточных белков сухого, обогащенного йодом и цинком

Мы, нижеподписавшиеся: директор ФГАНУ «ВНИМИ» Галстян А.Г., младший научный сотрудник лаборатории технологий биотрансформации и консервирования ФГАНУ «ВНИМИ» Барковская И.А., заведующий лабораторией Кручинин А.Г., старший научный сотрудник Туровская С.Н., научный сотрудник Илларионова Е.Е., младший научный сотрудник Блядзе В.Г. составили настоящий акт о том, что на базе ФГАНУ «ВНИМИ» в период с 18 по 22 марта 2024 года проведена опытная выработка гидролизата сывороточных белков сухого, обогащенного йодом и цинком в количестве 2 кг. Готовый продукт содержит $78,2 \pm 1,2$ г белка, $131,8 \pm 27,5$ мг цинка и $1,8 \pm 0,4$ мг йода на 100 г гидролизата.

Продукт хранили в течение 8 месяцев для установлении сроков годности. На момент окончания периода хранения установлено, что обогащенный гидролизат соответствует требованиям, установленным в СТО 00419785-081/2-2024. Продукт предназначен для производства обогащенных молочных продуктов, действие которых направленно на нивелирование йододефицитных состояний.

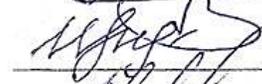
Проведена апробация технологии производства гидролизата сывороточных белков сухого, обогащенного йодом и цинком. Технологический процесс выработки готового продукта осуществляли в соответствии с технологической инструкцией к СТО 00419785-081/2-2024. В результате апробации технологии производства установлено соответствие готового продукта, полученного в лабораторных условиях в период со 2 по 9 декабря 2024 года, показателям качества и безопасности, установленным документацией в области стандартизации, что указывает на возможность масштабирования разработанной технологии. Количество выработанного сухого гидролизата сывороточных белков, обогащенного йодом и цинком, составило 40 кг.

Директор ФГАНУ «ВНИМИ»,
академик РАН



А.Г. Галстян

М.н.с. ЛТБиК ФГАНУ «ВНИМИ»



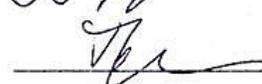
И.А. Барковская

Зав. ЛТБиК ФГАНУ «ВНИМИ»



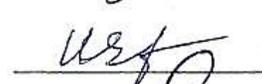
А.Г. Кручинин

С.н.с. ЛТБиК ФГАНУ «ВНИМИ»



С.Н. Туровская

Н.с. ЛТБиК ФГАНУ «ВНИМИ»



Е.Е. Илларионова

М.н.с. ЛТБиК ФГАНУ «ВНИМИ»



В.Г. Блиадзе

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ОАО «Брянский молочный комбинат»

Рябцев А.Г.

«17» марта 2025г.



АКТ

АПРОБАЦИИ И ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждаем апробацию и внедрение технологии производства молока питьевого пастеризованного с массовой долей жира 3,2%, обогащенного йодом и цинком, выработанного по СТО 00419785 - 081/2.1-2024 «Молоко питьевого пастеризованное, обогащенное йодом и цинком» на производственных мощностях ОАО «Брянский молочный комбинат» в период с 27 февраля 2025 года по 03 марта 2025 года.

В указанный период времени была проведена апробация и внедрение технологии производства обогащенного пастеризованного молока в соответствии с технологической инструкцией к СТО 00419785-081/2.1-2024 «Молоко питьевого пастеризованное, обогащенное йодом и цинком».

В результате внедрения технологии производства молока питьевого пастеризованного, обогащенного йодом и цинком, была выработана экспериментальная партия в объеме 1000 литров.

По результатам изучения отделом маркетинга ОАО «Брянский молочный комбинат» потребительского спроса на молоко питьевого пастеризованное, обогащенное йодом и цинком, акционерами ОАО «Брянский молочный комбинат» было принято решение о включении данного вида молока питьевого пастеризованного в ассортиментный перечень выпускаемой

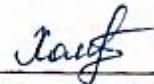
продукции и рассмотрена возможность начала серийного выпуска данного вида молока питьевого пастеризованного в 2025 году.

Производственный план выпуска будет сформирован при наличии устойчивого спроса на молоко питьевое пастеризованное, обогащенное йодом и цинком со стороны потенциальных потребителей (заказчиков). Предполагаемый объем серийного выпуска (производства) составит около 7000 – 12000 литров в месяц.

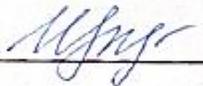
Заместитель Генерального директора
по производству


_____ Е.Н. Повтарь

Руководитель производственной
лаборатории


_____ Е.Н. Хомякова

Младший научный сотрудник
«ЛТБиК» ФГАНУ «ВНИМИ»


_____ И.А. Барковская



ИТАЛЬЯНСКИЕ
ТРАДИЦИИ

**Общество с ограниченной ответственностью
«Итальянские традиции»**

Россия, 115093, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35, корп. 7А, 2 эт., ком. 20
ИНН 7729660696, КПП 770501001, ОГРН 1107746588113

УТВЕРЖДАЮ



Генеральный директор

ООО «Итальянские традиции»

А.Ю. Демченко

27 января 2025 года

АКТ

**Апробации и внедрения технологии производства молока питьевого
пастеризованного с массовой долей жира 2,5%, обогащенного йодом и
цинком**

Настоящий акт составлен для подтверждения проведения апробации и внедрения технологии производства молока питьевого пастеризованного с массовой долей жира 2,5%, обогащенного йодом и цинком, на базе ООО «Итальянские традиции» в период с 13 по 20 января 2025 года.

Технология производства обогащенного молока предполагает внесение в нормализованное молоко сухого гидролизата сывороточных белков, содержащего органические формы йода и цинка. Готовый продукт содержит 26,1 мкг йода и 1,8 мг цинка на 200 г молока при внесении 5,3 кг сухого гидролизата на 1 тонну нормализованного молока. Продукт предназначен для нивелирования йододефицитных состояний у населения и содержит 15-17,4% от суточной потребности в цинке и йоде соответственно.



ИТАЛЬЯНСКИЕ
ТРАДИЦИИ

**Общество с ограниченной ответственностью
«Итальянские традиции»**

Россия, 115093, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35, корп. 7А, 2 эт., ком. 20
ИНН 7729660696, КПП 770501001, ОГРН 1107746588113

Проведена апробация технологии в соответствии с технологической инструкцией к СТО 00419785-081/2.1-2024. В результате апробации технологии показатели качества и безопасности питьевого пастеризованного молока соответствовали параметрам, установленным документацией в области стандартизации к продукту, что подтверждает возможность его производства в промышленных масштабах. Общий объем произведенной и реализованной продукции в период внедрения технологии обогащенного молока составил 1 тонну. По результатам проведения исследований спроса на продукцию, ООО «Итальянские традиции» было принято решение о включении обогащенного молока в ассортимент выпускаемой продукции в 2025 году. Планируемый объем выпуска продукции составляет 5 тонн в месяц на общую сумму 0,5 млн рублей.

Технолог
ООО «Итальянские традиции»

С. Д. Бухарова

М.н.с. ЛТБиК ФГАНУ «ВНИМИ»

И.А. Барковская

М.н.с. ЛТУ ФГАНУ «ВНИМИ»

А.А. Агарков



ПУБЛИЧНОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
МОЛОЧНЫЙ КОМБИНАТ «ВОРОНЕЖСКИЙ»

АКТ

Апробации и внедрения технологии производства молока питьевого пастеризованного с массовой долей жира 2,5% и 3,2%, обогащенного йодом и цинком

Мы, нижеподписавшиеся: главный технолог ПАО Молочный комбинат «Воронежский» Мельникова Е.И., младший научный сотрудник лаборатории технологий биотрансформации и консервирования ФГАНУ «ВНИМИ» Барковская И.А., составили настоящий акт о том, что на базе ПАО Молочный комбинат «Воронежский» в период с 6 по 8 декабря 2024 года проведена апробация технологии производства молока питьевого пастеризованного с массовой долей жира 2,5% и 3,2%, обогащенного йодом и цинком.

Апробация технологии проведена в соответствии с технологической инструкцией к СТО 00419785-081/2.1-2024. По результатам внедрения технологии обогащенного молока, произведено и направлено в ФГАНУ «ВНИМИ» для испытаний 100 единиц продукции каждого вида (объемом 1 литр) из 3-х партий обогащенного молока. Выработанная продукция по показателям качества и безопасности соответствовала требованиям, установленным к ней нормативной документацией. Сроки годности продукции были подтверждены и составляли 14 суток, с учетом коэффициента резерва.

По результатам проведенной апробации и маркетинговых исследований ПАО Молочный комбинат «Воронежский» принято решение

ввести молоко питьевое пастеризованной с массовой долей жира 2,5% и 3,2%, обогащенное йодом и цинком, в ассортимент выпускаемой продукции в 2025 году. Предприятие планирует выпускать продукцию в количестве 10 тонн в месяц для каждого наименования на общую стоимость 1,1 млн рублей.

Главный
Молочный
«Воронежский»

технолог



ПАО

комбинат

Е.И. Мельникова

М.н.с. ЛТБиК ФГАНУ «ВНИМИ»

И.А.Барковская