

УДК 636.03

## Прогнозирование антимикробной активности пищевого пептида и оценка его эффективности *in vitro*

Н. В. Мерзлякова, С. Л. Тихонов\*, Н. В. Тихонова, И. Г. Пестова, Е. П. Кулагова

\*Уральский государственный аграрный университет, г. Екатеринбург, Россия;

e-mail: tihonov75@bk.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

Информация о статье Реферат

Поступила  
в редакцию  
28.06.2023;

получена  
после доработки  
22.08.2023;

принята  
к публикации  
28.08.2023

Ключевые слова:

антимикробный пептид,  
структура,  
заряд,  
аминокислотная  
последовательность,  
молекулярная масса

Пищевые антимикробные пептиды (АМП) актуальны при лечении бактериальных инфекций и имеют ряд преимуществ в сравнении с лекарственными средствами: более медленное возникновение резистентности у штаммов бактерий, высокая активность в отношении антибиотикопленки и иммуномодулирующие свойства. К физико-химическим свойствам, обуславливающим антимикробные свойства, относятся: катионный заряд, гидрофобность, молекулярная масса и аминокислотная последовательность. Перспективным источником АМП являются молочные белки, в частности, белки молозива коров. Цель работы – выделение из пепсинового гидролизата молозива коров пептида, прогнозирование его антимикробной активности с использованием биоинформационного подхода и подтверждение его эффективности *in vitro*. Молекулярно-массовое распределение пептида оценивали масс-спектрометрическим методом. Микросеквенирование осуществляли с использованием секвенатора MiSeq. Моделирование пространственной структуры выделенного пептида – с помощью программы молекулярного моделирования Schrodinger Maestro. Антимикробную активность пептида изучали диско-диффузионным методом на грамположительных и грамотрицательных бактериях. Из пепсинового гидролизата молозива коров выделен пептид, который отсутствует в известных протеомных базах Protein NCBI и AVPdb и, соответственно, биологическая активность и функции его не исследованы. Полученный пептид относится к линейным альфа-спиральным пептидам, состоит из 11 аминокислот ANRKLRLANKSR, молекулярная масса – 8,2 кДа, изоэлектрическая точка на уровне 12,79, заряд +5 (катионный), гидрофильность (гидрофобность) +20,84 Ккал\*моль<sup>-1</sup>. В результате исследований *in vitro* установлено, что выделенный пептид обладает антимикробной активностью в отношении *E. coli* ATCC 25922 и *B. subtilis* и противогрибковым действием к *C. albicans*.

Для цитирования

Мерзлякова Н. В. и др. Прогнозирование антимикробной активности пищевого пептида и оценка его эффективности *in vitro*. Вестник МГТУ. 2023. Т. 26, № 3. С. 232–241. DOI: <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2023-26-3-232-241>.

## Prediction of antimicrobial activity of a food peptide and evaluation of its effectiveness *in vitro*

Natalia V. Merzlyakova, Sergey L. Tikhonov\*, Natalia V. Tikhonova,

Inga G. Pestova, Ekaterina P. Kulagova

\*Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia;

e-mail: tihonov75@bk.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

Article info

Received  
28.06.2023;

received  
in revised form  
22.08.2023;

accepted  
28.08.2023

Key words:

antimicrobial peptide,  
structure,  
charge,  
amino acid sequence,  
molecular weight

Abstract

Food antimicrobial peptides are increasingly relevant in the treatment of bacterial infections and have a number of advantages in comparison with drugs: slower emergence of resistance in bacterial strains, high activity against antibiotic films and immunomodulatory properties. The physico-chemical properties causing antimicrobial properties include: cationic charge, hydrophobicity, molecular weight and amino acid sequence. Promising sources of antimicrobial peptides are milk proteins, in particular, cow colostrum proteins. The aim of the work is to extract a peptide from the pepsin hydrolysate of cow colostrum, predict its antimicrobial activity using a bioinformatic approach and confirm its effectiveness *in vitro*. The molecular mass distribution of the peptide was evaluated by mass spectrometric method. The analysis of mass spectra was carried out using the Mascot program, the Peptide Fingerprint option – using the Protein NCBI database. Microsequencing was performed using a MiSeq sequencer. Modeling of the spatial structure of the isolated peptide was carried out using the Schrodinger Maestro molecular modeling program. The antimicrobial activity of the peptide was studied by the disco-diffusion method on gram-positive and gram-negative bacteria. The peptide has been isolated from the pepsin hydrolysate of cow colostrum, which is absent in the known proteomic bases Protein NCBI and AVPdb and, accordingly, its biological activity and functions have not been studied. The resulting peptide belongs to linear alpha-helical peptides consists of 11 amino acid sequences ANRKLRLANKSR with a molecular weight of 8.2 kDa, an isoelectric point at 12.79, a charge of +5 (cationic), hydrophilicity (hydrophobicity) +20.84 Kcal\*mol<sup>-1</sup>. As a result of *in vitro* studies, it was found that the isolated peptide has antimicrobial activity against *E. coli* ATCC 25922 and *B. subtilis* and antimicrobial action against *C. albicans*.

For citation

Merzlyakova, N. V. et al. 2023. Prediction of antimicrobial activity of a food peptide and evaluation of its effectiveness *in vitro*. Vestnik of MSTU, 26(3), pp. 232–241. (In Russ.) DOI: <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2023-26-3-232-241>.

## Введение

Пищевые антимикробные пептиды (АМП) становятся более актуальными при лечении бактериальных инфекций и имеют ряд преимуществ в сравнении с лекарственными средствами: медленное возникновение резистентности у штаммов бактерий, высокая активность в отношении антибиотикопленки и иммуномодулирующие свойства. Поскольку АМП имеют белковую природу, их можно относительно легко спроектировать и синтезировать. В качестве недостатка использования АМП следует отметить низкую стабильность к действию протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта (*Magana et al., 2020*).

Антимикробная активность пептидов связана с физико-химическими свойствами, в частности, катионным зарядом и гидрофобностью (*Lee et al., 2018*). Положительный заряд улучшает взаимодействие с отрицательно заряженной поверхностью клетки, а высокая гидрофобность позволяет пептидам проходить сквозь мембраны бактериальных клеток. Важным фактором, влияющим на антимикробную активность пептидов, является аминокислотная последовательность (*Porto et al., 2018*).

Целесообразно кратко рассмотреть механизм действия АМП, который по данным (*Silva et al., 2017*) заключается в следующем:

- разрушение бактериальной мембраны с образованием пор или с помощью электропорации;
- взаимодействие с бактериальными компонентами и индукция гибели клеток;
- ингибирование биосинтеза клеточной стенки.

Следует отметить, что АМП эффективно действуют в комбинации с другими лекарственными средствами (*Magana et al., 2020; Gaglione et al., 2020; Mehta et al., 2022*).

Для прогнозирования биологической активности пептидов, в том числе АМП, применяют биоинформационный подход, основанный на использовании протеомных баз данных, в частности, PeptideCutter, Protein NCBI, BIOPEP, AVPdb и других.

В качестве источника АМП используется ферментированный пепсином или трипсином соевый белок (*Соколов и др., 2023*), белок мяса и мясopодуков (*Chernukha et al., 2020*), белок яичного альбумина (*Жамсаранова и др., 2021*), ферменты бактериофагов (*Peng et al., 2017*).

Одним из перспективных источников АМП являются молочные белки, в частности, белки молозива коров (*Flom et al., 2019; Yang et al., 2019*). Следует отметить, что нативные молочные белки – казеин (CN),  $\beta$ -лактоглобулин (BLG) и  $\alpha$ -лактальбумин (ALA) – могут вызывать пищевую аллергию (*Hattori et al., 2004*).

После ферментативного гидролиза молочного белка полученные пептиды, как правило, не содержат эпитопы аллергенов (*Picariello et al., 2013*).

Важным фактором, обуславливающим использования молозива коров в качестве источника АМП, является то, что оно содержит пептиды и белки с прямым противомикробным действием (*Stelwagen et al., 2009*).

Целью работы является выделение из пепсинового гидролизата молозива коров пептида, прогнозирование его антимикробной активности с использованием биоинформационного подхода и подтверждение его эффективности *in vitro*.

## Материал и методы

Для выделения пептида использовали молозиво коров черно-пестрой породы, отобранное через 4 часа после отела (агрокомплекс Аверино, Свердловская область).

В качестве белка-предшественника использовали лактоферрин. Гидролиз белков молозива проводили по следующим параметрам: продолжительность – 4,5 ч, количество фермента (пепсин, КФ 3.4.23.1, активность 1 200 ЕД (Сигма, Германия)) – 3,6 %, pH = 1,6;  $t = 39$  °С. Математическое моделирование процесса гидролиза белков молозива и прогнозирование биологической активности полученных пептидов проводили с помощью программы Microsoft Excel 2021 с учетом авторской программы исследователей (*Азаркова и др., 2023*) и с использованием баз данных белков APD, BIOPEP, Protein NCBI, PeptideCutter, противовирусных пептидов CSIR и других.

Для исследования пептидного состава ферментативного гидролизата молозива коров удаляли осадок центрифугированием при 3 900 об/мин в течение 5 мин и работали с надосадочной жидкостью и осадком. Надосадочную жидкость разделяли методом препаративной хроматографии на силикагеле 60 PF 254, элюэнт PBS и EtOH в изократическом соотношении 9 : 1.

Далее изучение белкового состава надосадочной жидкости ферментативного гидролизата молозива проводили осаждением белков сульфатом аммония. После осаждения образцы центрифугировали (3 900 об/мин в течение 5 мин) и собирали белковый осадок. Белковый осадок гидролизата, полученный при центрифугировании гидролизата молозива, и осадок надосадочной жидкости очищали от солей и неорганических примесей на колонке с Amberlit XAD2, элюэнт: Буфер А: 10 mM CH<sub>3</sub>COONa pH = 6; 10 mM CH<sub>3</sub>COONa pH = 4; 10 mM KCl/HCl pH = 1,5 с градиентом соли буфер А + 0,2 %, 0,4 %, 1 % NaCl.

Фракции каждого образца изучали на наличие белка методом Брэдфорда. Полученные фракции пептидов из раствора образцов были разделены методом препаративной хроматографии на силикагеле, элюэнт PBS и EtOH в изократическом соотношении 9 : 1 соответственно.

В результате гидролиза было получено 9 пептидов с содержанием (мг/мл гидролизата) и чистотой более 95,4 %: LREGIKNK (1,9), ANRKLANKSR (3,4), MANRKLARSR (1,6), MRKAKCCIR (1,7), YKTVTWCVCLNDFFPKDSLDYVLK (1,6), PAFAASSKA (1,4), IRHGRCVSCSR (2,2), EKLAKNKLARGLRK (2,1), LRQLSVVVAYKGGKDVGLNDCEEADRHKSSHRDEVSSFRNSYSIYENHGP SAKCAREVGR (0,8).

При прогнозировании антимикробной активности пептидов с использованием баз данных Protein NCBI и AVPdb установлено, что пептид ANRKLANKSR, возможно, обладает антимикробными свойствами. В связи с этим он был использован для дальнейших исследований.

Молекулярно-массовое распределение пептида оценивали масс-спектрометрическим методом и идентифицировали методом MALDI-TOF на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex (Bruker, Германия). Анализ масс-спектров проводили с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint (Matrix Science, США) с использованием базы данных Protein NCBI. Микросеквенирование – с использованием секвенатора MiSeq (Illumina, США) и системы для высокопроизводительного секвенирования PGM Ion Torrent и системы спектрофотометрической оценки качества образца (Life Technologies, США).

Моделирование пространственной структуры выделенного пептида осуществляли с помощью программы молекулярного моделирования Schrodinger Maestro (США).

Антимикробную активность пептида в концентрации изучали диско-диффузионным методом на грамположительных и грамотрицательных бактериях. В качестве тест-штаммов выбраны *Escherichia coli*, грамположительная бактерия *Bacillus subtilis* и гриб *C. albicans*. Культивирование штаммов бактерий проводили на плотной питательной среде LB (агар – 1,5 %, триптон – 1 %, дрожжевой экстракт – 0,5 %, NaCl – 1 %) и жидкой питательной среде LB (триптон – 1 %, дрожжевой экстракт – 0,5 %, NaCl – 1 %) при температуре 37 °С. Тест-штамм высевали на агаризованную питательную среду газонотом. Одновременно на газон помещали пептид в количестве 27 мг, так как указанная концентрация пептидов молозива коров показала высокую эффективность по снижению интернализации лентивируса в геном клетки и взаимодействия с рецепторами для проникновения в мембрану (Тихонов, 2023). В качестве контроля использовался бумажный диск с питательной средой; в качестве препарата сравнения – диск с антибиотиком (канамицин из стандартного набора). Чашки Петри инкубировали при температуре, соответствующей оптимальной температуре роста каждого тест-штамма микроорганизма, в течение  $24,0 \pm 0,5$  ч. Результаты учитывались по наличию и размеру (в мм) прозрачной зоны отсутствия роста микроорганизмов вокруг диска.

### Результаты и обсуждение

Из пепсинового гидролизата молозива коров выделен пептид, который отсутствует в известных протеомных базах Protein NCBI и AVPdb и его биологическая активность и функции не исследованы.

По данным (Moretta et al., 2021) механизмы действия АМП зависят от различных физико-химических свойств: молекулярная масса, заряд, структура, длина аминокислотной последовательности, гидрофобность и аминокислотный состав.

На основании анализа масс-спектра пептида (рис. 1) определены состав аминокислотной последовательности и молекулярная масса пептида.

На рис. 1 представлен масс-спектр пептида.

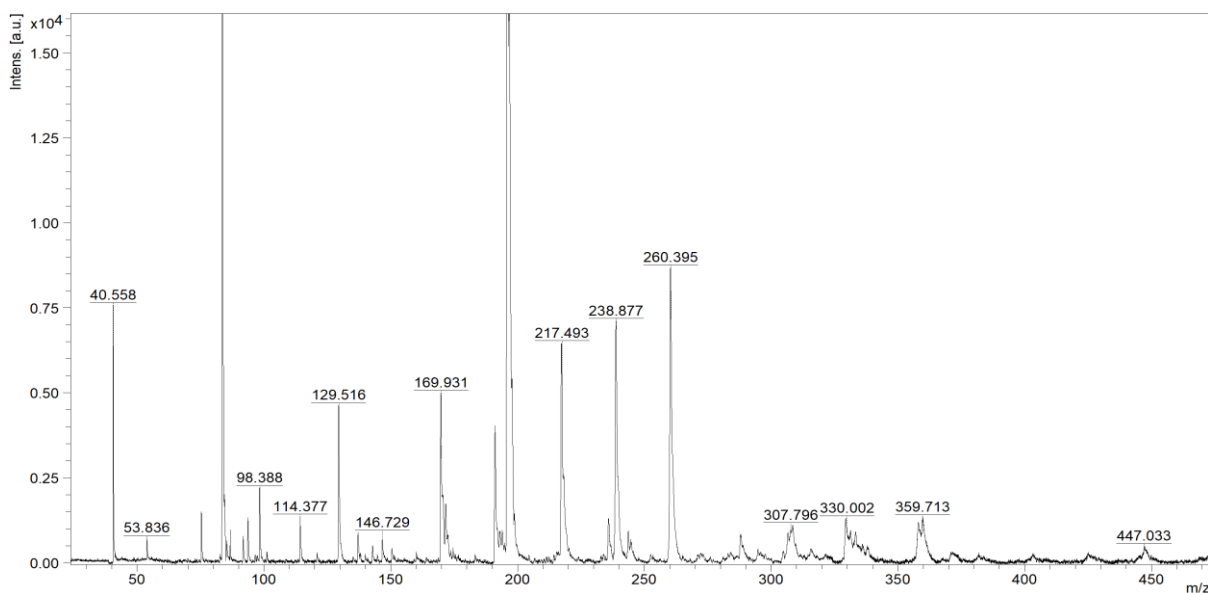


Рис. 1. Масс-спектр пептида  
Fig. 1. Mass spectrum of the peptide

При моделировании структуры пептида (рис. 2) удалось определить его заряд, гидрофобность и изоэлектрическую точку.

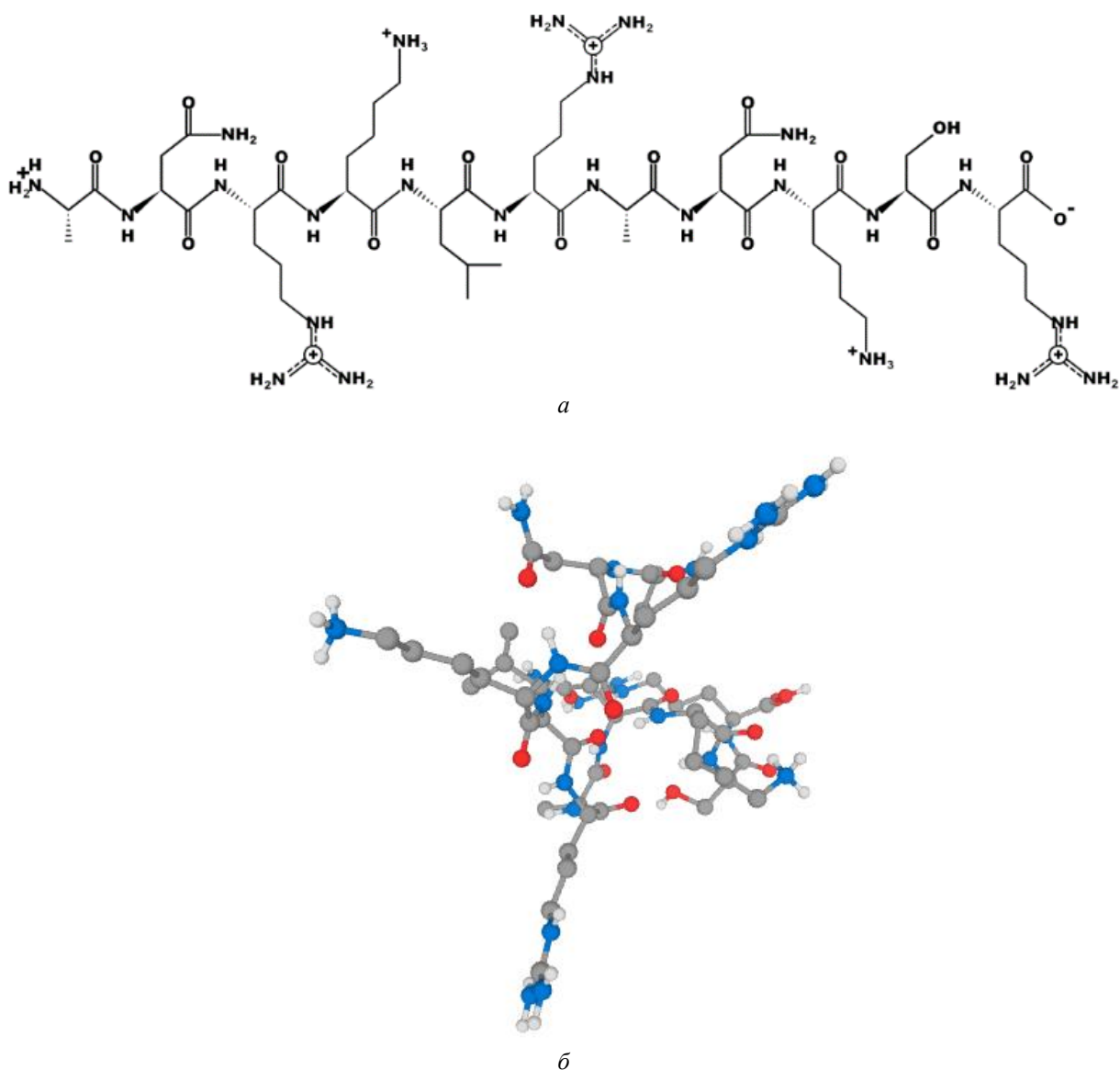


Рис. 2. Двухмерная (а) и трехмерная (б) структура пептида  
Fig. 2. Two-dimensional (a) and three-dimensional (b) structure of the peptide

Полученный пептид относится к линейным альфа-спиральным пептидам и состоит из 11 аминокислотных последовательностей ANRKL RANKSR, его молекулярная масса – 8,2 кДа, изоэлектрическая точка на уровне 12,79, заряд +5 (катионный), гидрофильность (гидрофобность) +20,84 Ккал\*моль<sup>-1</sup>.

Можно предположить, что пептид обладает антимикробными свойствами, так как большинство АМП относятся к линейным  $\alpha$ -спиральным пептидам (Mishra *et al.*, 2018), аминокислотная последовательность включает менее 50 аминокислот, пептид имеет молекулярную массу менее 10 кДа и положительный заряд (катионный) (Travis *et al.*, 2000).

По данным (Dürr *et al.*, 2006) АМП являются катионными и способны связываться с отрицательно заряженным внешним листком микробной мембраны, приводя к ее разрушению.

Катионные пептиды предоставляют новые возможности в лечении инфекций, вызванных грамотрицательными патогенами, поскольку они часто могут проникать анионные ЛПС внешней мембраны, что приводит к лизису клеток. Аналогичным образом АМП могут действовать как усилители антимикробной активности обычных антибиотиков в отношении грамотрицательных патогенов (Bhattacharjya *et al.*, 2020). Однако некоторые грамотрицательные бактерии обладают врожденной устойчивостью к катионным АМП, связанной с изменениями ЛПС наружной мембраны (Ghimire *et al.*, 2022).

Для пептидов с  $\alpha$ -спиралью характерен механизм действия на основе модели бочкообразных пор (рис. 3), в которой  $\alpha$ -спираль создает вертикальные поры поперек мембраны, а пептиды накапливаются

в бочкообразных агрегатах, демонстрирующих водопроницаемые и трансмембранно ориентированные поры (Mink et al., 2021; Zhang et al., 2021).

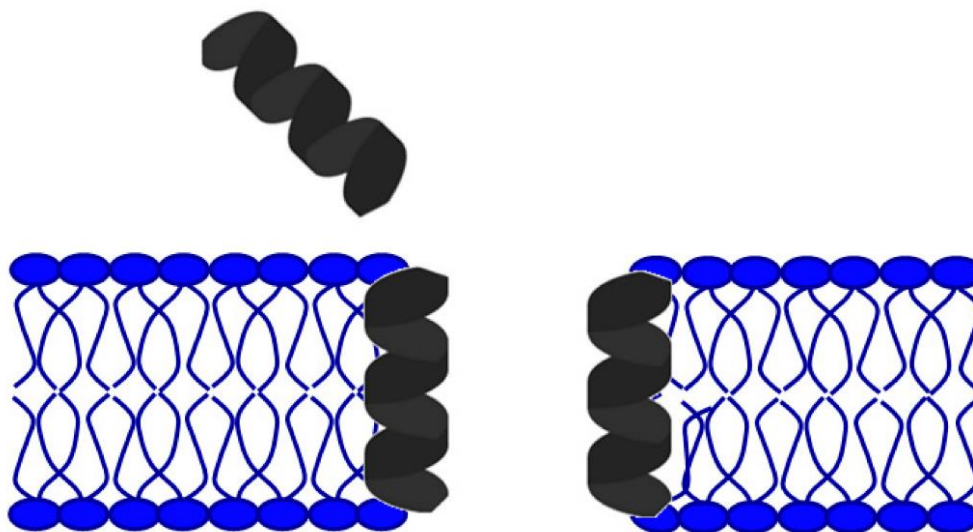


Рис. 3. Модель бочкообразных пор в мембране бактериальных клеток под действием антимикробных пептидов  
 Fig. 3. A model of barrel-shaped pores in the membrane of bacterial cells under the action of antimicrobial peptides

В последние годы поиск пептидных последовательностей с известными биологическими свойствами стал очень популярным, и соответствующие подходы постоянно разрабатываются. Авторами (Yan et al., 2022) представлены передовые вычислительные стратегии и выделены две группы исследовательских подходов: во-первых, открытие новых пептидов из встречающихся в природе последовательностей, во-вторых, разработка искусственных пептидов путем модификации известных или разработки *de novo*. Подход к открытию АМП предсказывает потенциальные пептиды путем виртуального скрининга больших библиотек известных пептидов, в частности, в поисках пептидов, которые структурно наиболее близки по последовательности к известным АМП.

Следует отметить, что помимо положительного заряда и гидрофобности альфа-спиральные пептиды могут иметь различные аминокислотные последовательности, что приводит к усилению цитолитического и антибактериального эффектов (Pino-Angeles et al., 2016).

В табл. 1 представлен аминокислотный состав последовательности пептида.

Таблица 1. Аминокислотный состав последовательности пептида  
 Table 1. Amino acid composition of the peptide sequence

Наименование показателя аминокислотного состава последовательности пептида	Аминокислотный состав
Гидрофобная аминокислота	I: 0 V: 0 L: 1 F: 0 C: 0 M: 0 A: 2 W: 0
Количество G и P	G: 0 P: 0
Отрицательно заряженная аминокислота	E: 0 D: 0
Положительно заряженная аминокислота	K: 2 R: 3 H: 0
Другая аминокислота	T: 0 S: 1 Y: 0 Q: 0 N: 2

Анализ аминокислотной последовательности позволяет утверждать, что в пептиде содержатся 2 гидрофобные аминокислоты, которые обеспечивают ему высокий уровень гидрофобности и обуславливают антимикробную активность.

Исследуемый нами пептид имеет аминокислотную последовательность KL, что свидетельствует о возможных противомикробных свойствах, так как вышеуказанная последовательность повторяется 5 раз в известном и испытанном антимикробном пептиде, состоящем из 18 аминокислот LKLLKLLKLLKLLKLL, разработанным и полученным синтетическим путем (Blondelle et al., 1992). Также подтверждением наличия антимикробной активности исследуемого пептида является то, что последовательность KL присутствует еще в одном известном пептиде Ac-LKLLKLLKLLKLLKLL-NH<sub>2</sub>, обладающем бактерицидным действием в отношении *E. coli* и *P. aeruginosa* (Yan et al., 2022), и в антимикробных пептидах G-A и G-G в отношении MCF7, A549, *E. coli* и *C. aureus* (Liu et al., 2022; Dean et al., 2020; Tucs, 2020).

Проведены исследования антимикробной и противогрибковой активности пептида (табл. 2).

Таблица 2. Антимикробная и противогрибковая активность пептида  
Table 2. Antimicrobial and antifungal activity of the peptide

Наименование образца	Диаметр зоны лизиса, мм		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Пептид	18	17	12
Контроль	0	0	0
Антибиотик "Канамидин"	22	24	Не исследовали
Противогрибковый препарат "Флуконазол"	Не исследовали	Не исследовали	26

В результате исследований *in vitro* установлено, что выделенный пептид обладает антимикробной активностью в отношении *E. coli* ATCC 25922 и *B. subtilis* и противомикробным действием к *C. albicans*. Так, зона лизиса бактерий под действием пептида составила 18 и 17 мм, но в то же время она ниже на 18,2 и 29,2 % по сравнению с действием антибиотика "Канамидин". Под действием пептида происходит гибель *C. albicans* (зона лизиса 12 мм), что меньше на 53,8 % по сравнению с действием противогрибкового препарата "Флуконазол".

Следовательно, предложенная нами на основании физических свойств пептида и аминокислотной последовательности гипотеза о его противомикробном действии подтверждена в эксперименте *in vitro*.

### Заключение

За последние несколько десятилетий возрос научный интерес к биоактивным пептидам пищевого происхождения в качестве альтернативы фармакологическим методам лечения заболеваний бактериальной этиологии, которые представляют серьезную проблему для здоровья человека во всем мире, так как антибиотикорезистентность возрастает. АМП можно рассматривать как потенциальные противомикробные средства, поскольку они обладают другим механизмом действия в сравнении с антибиотиками. В модели "бочкообразные поры" АМП образуют пучок, который вставляется в мембрану для образования гидрофильной поры, при этом гидрофобные остатки взаимодействуют с липидами, а полярные остатки обращены к каналу поры. Выделенный нами из пепсинового гидролизата молозива коров катионный альфа-спиральный пептид обладает антимикробными и противогрибковыми свойствами, менее выраженными по сравнению с общепринятыми препаратами. Возможно, антимикробную активность полученного пептида можно усилить за счет химических модификаций, в частности, дополнительного введения аминокислотных последовательностей с противобактериальными свойствами. Такой АМП пептид можно получить путем использования методов *in silico*, что позволит после проведения исследований цитотоксичности/токсичности и противомикробной активности *in vitro* и *in vivo* использовать его как профилактическое антибактериальное средство в составе пищевой продукции.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Библиографический список

- Агаркова Е. Ю., Семипятный В. К. Разработка программы системного анализа и выбора оптимальных ферментных препаратов для высвобождения биоактивных пептидов // Пищевая промышленность. 2023. № 2. С. 6–10. DOI: <https://doi.org/10.52653/ppi.2023.2.2.001>. EDN: RCWLJH.
- Жамсаранова С. Д., Лебедева С. Н., Болхонов Б. А., Соколов Д. В. Ферментативная конверсия пищевого белка и оценка антиоксидантной активности пептидов // Вестник ВСГУТУ. 2021. № 4(83). С. 5–14. DOI: [https://doi.org/10.53980/24131997\\_2021\\_4\\_5](https://doi.org/10.53980/24131997_2021_4_5). EDN: TNSCKR.
- Соколов Д. В., Болхонов Б. А., Жамсаранова С. Д., Лебедева С. Н. [и др.]. Ферментативный гидролиз соевого белка // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 1. С. 86–96. DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2418>. EDN: DHXSAX.
- Тихонов С. Л. Исследование противовирусной активности ферментативных гидролизатов белков с обоснованием возможности их использования в составе специализированной пищевой продукции // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. 2023. Т. 11, № 2. С. 103–111. DOI: <https://doi.org/10.14529/food230212>. EDN: FNEJIN.
- Bhattacharjya S., Straus S. K. Design, engineering and discovery of novel  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -boomerang antimicrobial peptides against drug resistant bacteria // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21, Iss. 16. Article number: 5773. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21165773>.
- Blondelle S. E., Houghten R. A. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities // Biochemistry. 1992. Vol. 31, Iss. 50. P. 12688–12694. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi00165a020>.

- Chernukha I. M., Mashentseva N. G., Afanasev D. A., Vostrikova N. L. Biologically active peptides of meat and meat product proteins: A review. Part 2. Functionality of meat bioactive peptides // Theory and practice of meat processing. 2020. Vol. 5, Iss. 2. P. 12–19. DOI: <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2020-5-2-12-19>.
- Dean S. N., Walper S. A. Variational autoencoder for generation of antimicrobial peptides // ACS Omega. 2020. Vol. 5, Iss. 33. P. 20746–20754. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00442>.
- Dürr U. H. N., Sudheendra U. S., Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. 2006. Vol. 1758, Iss. 9. P. 1408–1425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.030>.
- Flom J. D., Sicherer S. H. Epidemiology of cow's milk allergy // Nutrients. 2019. Vol. 11, Iss. 5. Article number: 1051. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11051051>.
- Gaglione R., Pizzo E., Notomista E., de la Fuente-Nunez C. [et al.]. Host defence cryptides from human apolipoproteins: Applications in medicinal chemistry // Current Topics in Medicinal Chemistry. 2020. Vol. 20, Iss. 14. P. 1324–1337. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568026620666200427091454>.
- Ghimire J., Guha S., Nelson B. J., Morici L. A. [et al.]. The remarkable innate resistance of burkholderia bacteria to cationic antimicrobial peptides: Insights into the mechanism of AMP resistance // The Journal of Membrane Biology. 2022. Vol. 255, Iss. 4–5. P. 503–511. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00232-022-00232-2>.
- Hattori M., Miyakawa S., Ohama Y., Kawamura H. [et al.]. Reduced immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004. Vol. 52, Iss. 14. P. 4546–4553. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0353887>.
- Lee E. Y., Wong G. C. L., Ferguson A. L. Machine learning-enabled discovery and design of membrane-active peptides // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2018. Vol. 26, Iss. 10. P. 2708–2718. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.012>.
- Liu S., Lin Y., Liu J., Chen X. [et al.]. Targeted modification and structure-activity study of GL-29, an analogue of the antimicrobial peptide Palustrin-2ISb // Antibiotics. 2022. Vol. 11, Iss. 8. Article number: 1048. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081048>.
- Magana M., Pushpanathan M., Santos A. L., Leanse L. [et al.]. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance // The Lancet Infectious Diseases. 2020. Vol. 20, Iss. 9. P. e216–e230. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30327-3).
- Mehta K., Sharma P., Mujawar S., Vyas A. Role of antimicrobial peptides in treatment and prevention of mycobacterium tuberculosis: A review // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2022. Vol. 28, Iss. 5. Article number: 132. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10989-022-10435-9>.
- Mink C., Strandberg E., Wadhvani P., Melo M. N. [et al.]. Overlapping properties of the short membrane-active peptide BP100 with (i) polycationic TAT and (ii)  $\alpha$ -helical magainin family peptides // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2021. Vol. 11. Article number: 609542. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.609542>.
- Mishra A. K., Choi J., Moon E., Baek K.-H. Tryptophan-rich and proline-rich antimicrobial peptides // Molecules. 2018. Vol. 23, Iss. 4. Article number: 815. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23040815>.
- Moretta A., Scieuzo C., Petrone A. M., Salvia R. [et al.]. Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2021. Vol. 11. Article number: 668632. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.668632>.
- Peng S.-Y., You R.-I., Lai M.-J., Lin N.-T. [et al.]. Highly potent antimicrobial modified peptides derived from the Acinetobacter baumannii phage endolysin LysAB2 // Scientific Reports. 2017. Vol. 7. Article number: 11477. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11832-7>.
- Picariello G., Iacomino G., Mamone G., Ferranti P. [et al.]. Transport across Caco-2 monolayers of peptides arising from *in vitro* digestion of bovine milk proteins // Food Chemistry. 2013. Vol. 139, Iss. 1–4. P. 203–212. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.063>.
- Pino-Angeles A., Leveritt III J. M., Lazaridis T. Pore structure and synergy in antimicrobial peptides of the magainin family // PLOS Computational Biology. 2016. Vol. 12, Iss. 1. Article number: e1004570. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004570>.
- Porto W. F., Irazazabal L., Alves E. S. F., Ribeiro S. M. In silico optimization of a guava antimicrobial peptide enables combinatorial exploration for peptide design // Nature Communications. 2018. Vol. 9, Iss. 1. Article number: 1490. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03746-3>.
- Silva T., Gomes M. S. Immuno-stimulatory peptides as a potential adjunct therapy against intra-macrophagic pathogens // Molecules. 2017. Vol. 22, Iss. 8. Article number: 1297. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22081297>.
- Stelwagen K., Carpenter E., Haigh B., Hodgkinson A. [et al.]. Immune components of bovine colostrum and milk // Journal of Animal Science. 2009. Vol. 87, suppl\_13. P. 3–9. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1377>.
- Travis S. M., Anderson N. N., Forsyth W. R., Espiritu C. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides // Infection and Immunity. 2000. Vol. 68, Iss. 5. P. 2748–2755. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.68.5.2748-2755.2000>.

- Tucs A., Tran D. P., Yumoto A., Ito Y. [et al.]. Generating ampicillin-level antimicrobial peptides with activity-aware generative adversarial networks // *ACS Omega*. 2020. Vol. 5, Iss. 36. P. 22847–22851. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02088>.
- Yan J., Cai J., Zhang B., Wang Y. [et al.]. Recent progress in the discovery and design of antimicrobial peptides using traditional machine learning and deep learning // *Antibiotics*. 2022. Vol. 11, Iss. 10. Article number: 1451. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101451>.
- Yang M., Tan M., Wu J., Chen Z. [et al.]. Prevalence, characteristics, and outcome of cow's milk protein allergy in Chinese infants: A population-based survey // *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2019. Vol. 43, Iss. 6. P. 803–808. DOI: <https://doi.org/10.1002/jpen.1472>.
- Zhang S., Ma M., Shao Z., Zhang J. [et al.]. Structure and formation mechanism of antimicrobial peptides temporin B- and L-induced tubular membrane protrusion // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, Iss. 20. Article number: 11015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22011015>.

## References

- Agarkova, E. Yu., Semipyatny, V. K. 2023. Development of the program for system analysis and selection of optimal enzyme preparations for the release of bioactive peptides. *Food Industry*, 2, pp. 6–10. DOI: <https://doi.org/10.52653/ppi.2023.2.2.001>. EDN: RCWLJH. (In Russ.)
- Zhamsaranova, S. D., Lebedeva, S. N., Bolkhonov, B. A., Sokolov, D. V. 2021. Enzymatic conversion of food protein and evaluation of antioxidant activity of peptides. *ESSUTM Bulletin*, 4(83), pp. 5–14. DOI: [https://doi.org/10.53980/24131997\\_2021\\_4\\_5](https://doi.org/10.53980/24131997_2021_4_5). EDN: TNSCKR. (In Russ.)
- Sokolov, D. V., Bolkhonov, B. A., Zhamsaranova, S. D., Lebedeva, S. N. 2023. Enzymatic hydrolysis of soy protein. *Food Processing: Techniques and Technology*, 53(1), pp. 86–96. DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2418>. EDN: DHXSAX. (In Russ.)
- Tikhonov, S. L. 2023. Investigation of antiviral activity of enzymatic hydrolysates of proteins with justification of the possibility of their use as part of specialized food products. *Bulletin of the South Ural State University. Series: Food and Biotechnology*, 11(2), pp. 103–111. DOI: <https://doi.org/10.14529/food230212>. EDN: FNEJIN. (In Russ.)
- Bhattacharjya, S., Straus, S. K. 2020. Design, engineering and discovery of novel  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -boomerang antimicrobial peptides against drug resistant bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16). Article number: 5773. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21165773>.
- Blondelle, S. E., Houghten, R. A. 1992. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochemistry*, 31(50), pp. 12688–12694. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi00165a020>.
- Chernukha, I. M., Mashentseva, N. G., Afanasev, D. A., Vostrikova, N. L. 2020. Biologically active peptides of meat and meat product proteins: A review. Part 2. Functionality of meat bioactive peptides. *Theory and Practice of Meat Processing*, 5(2), pp. 12–19. DOI: <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2020-5-2-12-19>.
- Dean, S. N., Walper, S. A. 2020. Variational autoencoder for generation of antimicrobial peptides. *ACS Omega*, 5(33), pp. 20746–20754. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00442>.
- Dürr, U. H. N., Sudheendra, U. S., Ramamoorthy, A. 2006. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1758(9), pp. 1408–1425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2006.03.030>.
- Flom, J. D., Sicherer, S. H. 2019. Epidemiology of cow's milk allergy. *Nutrients*, 11(5). Article number: 1051. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11051051>.
- Gaglione, R., Pizzo, E., Notomista, E., de la Fuente-Nunez, C. et al. 2020. Host defence cryptides from human apolipoproteins: Applications in medicinal chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20(14), pp. 1324–1337. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568026620666200427091454>.
- Ghimire, J., Guha, S., Nelson, B. J., Morici, L. A. et al. 2022. The remarkable innate resistance of burkholderia bacteria to cationic antimicrobial peptides: Insights into the mechanism of AMP resistance. *The Journal of Membrane Biology*, 255(4–5), pp. 503–511. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00232-022-00232-2>.
- Hattori, M., Miyakawa, S., Ohama, Y., Kawamura, H. et al. 2004. Reduced immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), pp. 4546–4553. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0353887>.
- Lee, E. Y., Wong, G. C. L., Ferguson, A. L. 2018. Machine learning-enabled discovery and design of membrane-active peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(10), pp. 2708–2718. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.012>.
- Liu, S., Lin, Y., Liu, J., Chen, X. et al. 2022. Targeted modification and structure-activity study of GL-29, an analogue of the antimicrobial peptide Palustrin-2ISb. *Antibiotics*, 11(8). Article number: 1048. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081048>.
- Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A. L., Leanse, L. et al. 2020. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(9), pp. e216–e230. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30327-3).



- Mehta, K., Sharma, P., Mujawar, S., Vyas, A. 2022. Role of antimicrobial peptides in treatment and prevention of mycobacterium tuberculosis: A review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28(5). Article number: 132. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10989-022-10435-9>.
- Mink, C., Strandberg, E., Wadhvani, P., Melo, M. N. et al. 2021. Overlapping properties of the short membrane-active peptide BP100 with (i) polycationic TAT and (ii)  $\alpha$ -helical magainin family peptides. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. Article number: 609542. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.609542>.
- Mishra, A. K., Choi, J., Moon, E., Baek, K.-H. 2018. Tryptophan-rich and proline-rich antimicrobial peptides. *Molecules*, 23(4). Article number: 815. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23040815>.
- Moretta, A., Scieuzo, C., Petrone, A. M., Salvia, R. et al. 2021. Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. Article number: 668632. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.668632>.
- Peng, S.-Y., You, R.-I., Lai, M.-J., Lin, N.-T. et al. 2017. Highly potent antimicrobial modified peptides derived from the *Acinetobacter baumannii* phage endolysin LysAB2. *Scientific Reports*, 7. Article number: 11477. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11832-7>.
- Picariello, G., Iacomino, G., Mamone, G., Ferranti, P. et al. 2013. Transport across Caco-2 monolayers of peptides arising from *in vitro* digestion of bovine milk proteins. *Food Chemistry*, 139(1–4), pp. 203–212. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.063>.
- Pino-Angeles, A., Leveritt, III J. M., Lazaridis, T. 2016. Pore structure and synergy in antimicrobial peptides of the magainin family. *PLOS Computational Biology*, 12(1). Article number: e1004570. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004570>.
- Porto, W. F., Irazazabal, L., Alves, E. S. F., Ribeiro, S. M. 2018. In silico optimization of a guava antimicrobial peptide enables combinatorial exploration for peptide design. *Nature Communications*, 9(1). Article number: 1490. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03746-3>.
- Silva, T., Gomes, M. S. 2017. Immuno-stimulatory peptides as a potential adjunct therapy against intramacrophagic pathogens. *Molecules*, 22(8). Article number: 1297. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22081297>.
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A. et al. 2009. Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science*, 87(suppl\_13), pp. 3–9. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1377>.
- Travis, S. M., Anderson, N. N., Forsyth, W. R., Espiritu, C. 2000. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infection and Immunity*, 68(5), pp. 2748–2755. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.68.5.2748-2755.2000>.
- Tucs, A., Tran, D. P., Yumoto, A., Ito, Y. et al. 2020. Generating ampicillin-level antimicrobial peptides with activity-aware generative adversarial networks. *ACS Omega*, 5(36), pp. 22847–22851. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02088>.
- Yan, J., Cai, J., Zhang, B., Wang, Y. et al. 2022. Recent progress in the discovery and design of antimicrobial peptides using traditional machine learning and deep learning. *Antibiotics*, 11(10). Article number: 1451. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101451>.
- Yang, M., Tan, M., Wu, J., Chen, Z. et al. 2019. Prevalence, characteristics, and outcome of cow's milk protein allergy in Chinese infants: A population-based survey. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 43(6), pp. 803–808. DOI: <https://doi.org/10.1002/jpen.1472>.
- Zhang, S., Ma, M., Shao, Z., Zhang, J. et al. 2021. Structure and formation mechanism of antimicrobial peptides temporin B- and L-induced tubular membrane protrusion. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20). Article number: 11015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222011015>.

#### Сведения об авторах

**Мерзлякова Наталия Вадимовна** – ул. Карла Либкнехта, 42, г. Екатеринбург, Россия, 620075;  
Уральский государственный аграрный университет, аспирант;  
e-mail: merzlyakova@xk3.ru

**Natalya V. Merzlyakova** – 42 Karl Liebknecht Str., Yekaterinburg, Russia, 620075;  
Ural State Agrarian University, PhD Student; e-mail: merzlyakova@xk3.ru

**Тихонов Сергей Леонидович** – ул. Карла Либкнехта, 42, г. Екатеринбург, Россия, 620075;  
Уральский государственный аграрный университет, д-р техн. наук, профессор;  
e-mail: tihonov75@bk.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

**Sergey L. Tikhonov** – 42 Karl Liebknecht Str., Yekaterinburg, Russia, 620075;  
Ural State Agrarian University, Dr Sci. (Engineering), Professor;  
e-mail: tihonov75@bk.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

**Тихонова Наталья Валерьевна** – ул. Карла Либкнехта, 42, г. Екатеринбург, Россия, 620075;  
Уральский государственный аграрный университет, д-р техн. наук, профессор;  
e-mail: [tihonov75@bk.ru](mailto:tihonov75@bk.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>

**Natalya V. Tikhonova** – 42 Karl Liebknecht Str., Yekaterinburg, Russia, 620075;  
Ural State Agrarian University, Dr Sci. (Engineering), Professor;  
e-mail: [tihonov75@bk.ru](mailto:tihonov75@bk.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>

**Пестова Инга Геннадьевна** – б-р Гагарина, 57, г. Пермь, Россия, 614070;  
Пермский институт (филиал) Российского экономического университета им. Г. В. Плеханова, доцент;  
e-mail: [inga-pestova@rambler.ru](mailto:inga-pestova@rambler.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0559-965X>

**Inga G. Pestova** – 57 Gagarin Boulevard, Perm, Russia, 614070;  
Perm Institute (Branch) of Plekhanov Russian University of Economics, Associate Professor;  
e-mail: [inga-pestova@rambler.ru](mailto:inga-pestova@rambler.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0559-965X>

**Кулагова Екатерина Петровна** – ул. Козлова, 29, г. Минск, Республика Беларусь, 220037;  
Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию,  
канд. техн. наук, науч. сотрудник; e-mail: [tateka@tut.by](mailto:tateka@tut.by), ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-3559-771X>

**Elena P. Kulagova** – 29 Kozlova Str., Minsk, Republic of Belarus, 220037; Scientific and Practical Center  
of the National Academy of Sciences of Belarus for Food, Cand. Sci. (Engineering), Researcher;  
e-mail: [tateka@tut.by](mailto:tateka@tut.by), ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-3559-771X>