

Міністерство освіти і науки України  
Тернопільський національний технічний університет  
імені Івана Пулюя

**Юкало В.Г.**

**БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ  
ПРОТЕЇНІВ І ПЕПТИДІВ МОЛОКА**

*Монографія*

Тернопіль

2021

УДК 577.1

Ю23

Автор:

*Юкало Володимир Глібович*, доктор біол. наук, професор.

Рецензенти:

*О.Й. Цісарик*, доктор с/г наук, професор,

*О.Б. Столяр*, доктор біол. наук, професор,

*І.О. Романчук*, доктор техн. наук, ст. наук. співробітник.

Рекомендовано до друку на засіданні вченої ради

Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя.

Протокол № 9 від 31 жовтня 2019 р.

Ю23

Юкало В. Г. Біологічна активність протеїнів і пептидів молока : монографія /Юкало В. Г. – Тернопіль : Вид-во ТНТУ імені Івана Пулюя, 2021. – 372с.

**ISBN 978-966-305-117-8**

УДК 577.1

Монографія присвячена біологічній дії протеїнів і природних пептидів молока, а також пептидів, які утворюються в результаті протеолізу. У першому розділі запропоновано класифікацію біоактивних сполук молока і місце в ній біоактивних протеїнів і пептидів. У другому розділі розглянуто будову і властивості основних протеїнів-попередників біоактивних пептидів із казеїнового комплексу і сироватки молока, біологічну дію мінорних протеїнів і природних пептидів молока. У третьому розділі монографії узагальнено дані про біоактивні пептиди, які утворюються з протеїнів молока в процесі їх протеолізу ензимами шлунково-кишкового тракту, протеолітичних систем молочнокислих бактерій, молокозсідальних та інших харчових протеолітичних препаратів. Розглянуто шляхи утворення, виділення та застосування біоактивних пептидів з протеїнів молока у харчуванні людини. Книга призначена для студентів і аспірантів спеціальності «Харчові технології», які спеціалізуються в технології молока і молочних продуктів, а також може бути корисною для біохіміків, мікробіологів, біотехнологів, які працюють у даній галузі.

**ISBN 978-966-305-117-8**

© Юкало В. Г. ....2021

© Тернопільський національний технічний університет

імені Івана Пулюя .....2021

**ЗМІСТ**

Перелік умовних скорочень .....	6
Вступ .....	9
<b>РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ КОМПОНЕНТИ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ .....</b>	<b>11</b>
1.1 Визначення і класифікація харчових біологічно активних компонентів .....	11
1.2 Біоактивні компоненти молока .....	13
<b>РОЗДІЛ 2. ПРОТЕЇНИ І ПРИРОДНІ ПЕПТИДИ МОЛОКА КОРОВИ, ЯКИМ ПРИТАМАННА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ</b>	<b>20</b>
2.1 Протеїни казеїнового комплексу молока .....	21
2.1.1 Класифікація і номенклатура казеїнів .....	21
2.1.2 Характеристика казеїнових фракцій .....	22
2.1.2.1 $\alpha_{S1}$ -Казеїни .....	25
2.1.2.2 $\alpha_{S2}$ -Казеїни .....	28
2.1.2.3 $\beta$ -Казеїни .....	31
2.1.2.4 $\kappa$ -Казеїн .....	34
2.1.3 Міцели казеїну .....	39
2.1.4 Біологічні функції казеїнів.....	41
2.2 Протеїни сироватки молока .....	45
2.2.1 Класифікація і номенклатура.....	45
2.2.2 Будова, властивості і біологічні функції протеїнів сироватки молока .....	48
2.2.2.1 $\beta$ -Лактоглобулін .....	49
2.2.2.2 $\alpha$ -Лактальбумін .....	52
2.2.2.3 Альбумін сироватки крові .....	55
2.2.2.4 Імуноглобуліни .....	58
2.2.2.5 Лактоферин .....	63
2.3 Протеїни жирових кульок молока .....	74
2.3.1 Загальна характеристика і номенклатура .....	74

2.3.2	Будова, властивості і біологічна дія протеїнів жирових кульок .....	78
2.4	Ензими молока .....	81
2.4.1	Загальна характеристика ензимів молока .....	81
2.4.2	Важливі природні ензими молока .....	83
2.5	Міnorні біологічно активні протеїни і пептиди молока .....	90
2.5.1	Міnorні протеїни .....	92
2.5.2	Природні біоактивні пептиди і гормони молока .....	100
2.5.3	Протеоміка і пептидоміка молока .....	113
<b>РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ ПЕПТИДИ З ПРОТЕЇНІВ МОЛОКА .....</b>		<b>118</b>
3.1	Характеристика основних груп пептидів казеїнового походження за їхньою біологічною дією .....	119
3.1.1	Казоморфіни й казоксини – агоністи і антагоністи опіодних рецепторів .....	121
3.1.2	Казокініни – пептиди з антигіпертензивною дією ....	128
3.1.3	Імуномодуляторні властивості казеїнових пептидів .	136
3.1.4	Казофосфопептиди .....	139
3.1.5	Антитромботичні пептиди казеїнового походження	146
3.1.6	Інші види біологічної дії казеїнових пептидів .....	150
3.1.7	Особливості розміщення біоактивних пептидів серед протеїнів казеїнового комплексу .....	160
3.2	Біоактивні пептиди з протеїнів сироватки молока .....	169
3.2.1	Лактокініни .....	170
3.2.2	Бактерицидні, фунгіцидні та антивірусні пептиди ...	176
3.2.3	Імуномодуляторні пептиди .....	180
3.2.4	Пептиди з опіодною дією .....	183
3.2.5	Інші види біологічної дії пептидів із протеїнів сироватки молока .....	184



3.2.6 Розміщення амінокислотних послідовностей біоактивних пептидів серед фракцій протеїнів сироватки молока .....	188
3.3 Функціональні продукти та інгредієнти на основі біоактивних пептидів із протеїнів молока .....	193
3.3.1 Загальна оцінка протеїнів молока як попередників біологічно активних пептидів .....	193
3.3.2 Шляхи утворення біоактивних пептидів у молоці та молочних продуктах .....	199
3.3.2.1 Природні ензими молока .....	199
3.3.2.2 Протеолітичні системи молочнокислих бактерій. Протеїнази .....	202
3.3.2.3 Пептидази молочнокислих бактерій .....	206
3.3.2.4 Молокозсідальні протеолітичні препарати ...	213
3.3.2.5 Модельна протеолітична система для виявлення біоактивних пептидів з протеїнів молока .....	216
3.3.2.6 Вторинні біоактивні пептиди в молочних продуктах.....	224
3.3.3 Виділення біоактивних пептидів із протеїнів молока .	229
3.3.3.1 Методи ідентифікації протеїнів-попередників біоактивних пептидів.....	229
3.3.3.2 Виділення основних протеїнів-попередників біоактивних пептидів .....	232
3.3.3.3 Отримання біоактивних фосфопептидів з протеїнів казеїнового комплексу .....	244
3.3.3.4 Промислове виробництво біоактивних пептидів з протеїнів молока .....	254
3.3.4 Продукти з біоактивними пептидами .....	257
Висновки .....	264
Список використаних джерел .....	268
Додатки .....	334

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

ААЗ	амілоїд АЗ
АПЕ	ангіотензин-перетворювальний ензим
іАПЕ	інгібітор ангіотензин-перетворювального ензиму
БАК	біологічно активні компоненти
БАПП	біологічно активні пептиди і протеїни
БАП	біологічно активні пептиди
БАС	біологічно активні сполуки
ВЕРХ (HPLC)	високоєфективна рідинна хроматографія (high performance liquid chromatography)
ГМП	глікомакропептид
ДЕАЕ	діетиламіноетил
ДСН	додecilсульфат натрію
ЕДТА	етилендіамінтетраоцтова кислота
ЕСІ (ESI)	електроспрей-іонізація (electrospray ionization)
ЗФРХВТ	зворотно-фазова рідинна хроматографія під високим тиском
ЛГ	лютеїнізуючий гормон
МАЛДІ (MALDI)	матрично-активована лазерна десорбція/іонізація (matrix assisted laser desorption/ionization)
МЖКМ	мембрана жирових кульок молока
ПАГ	поліакриламідний гель
ППФ (PPF)	протеозо-пептонна фракція (proteose peptone fraction)
ФСГ	фолікулостимулюючий гормон
ЧУП (NPU)	чиста утилізація протеїну (net protein utilization)
ШКТ	шлунково-кишковий тракт
СРІ	інгібітор цистеїнових протеїназ
ДВР	вітамін D-зв'язувальний протеїн
ДРР	дипептидил-пептидза
ФВР	фолат-зв'язувальний протеїн

---

f 9-15	фрагмент первинної структури протеїну
GIP	глюкозозалежний інсулінотропний поліпептид
GLP	глюкагоноподібний поліпептид
NPN	непротеїновий азот
MHC	головний комплекс гістосумісності
MS/MS	тандемна мас-спектрометрія
RfBP	рибофлавін-зв'язувальний протеїн
SHR	спонтанно-гіпертензивний щур
PerA	амінопептидаза А
PerI	пролін-імінопептидаза
PerN	амінопептидаза N
PerP	амінопептидаза P
PerQ	пролідаза
PerT	трипептидаза
PerX	X-проліл-дипептидил-амінопептидаза
PP3	протеозо-пептон 3
PrtP	приклітинна протеїназа
SC	секреторний компонент
VKY	нормотензивний щур лінії Вістар Кіото
$\alpha_{S1}$ -CN	$\alpha_{S1}$ -казеїн
$\alpha_{S2}$ -CN	$\alpha_{S2}$ -казеїн
$\beta$ -CN	$\beta$ -казеїн
$\kappa$ -CN	$\kappa$ -казеїн
$\alpha$ -La	$\alpha$ -лактальбумін
$\beta$ -Lg	$\beta$ -лактоглобулін
$\beta_2$ -MG	$\beta_2$ -мікроглобулін
BSA (SA)	альбумін сироватки крові
Ig	імуноглобулін
Lf	лактоферин

**Варіанти позначення амінокислот**

Ала (A, Ala)	аланін
Арг (R, Arg)	аргінін
Асн (N, Asn)	аспарагін
Асп (D, Asp)	аспарагінова кислота
Вал (V, Val)	валін*
Гіс (H, His)	гістидин
Глі (G, Gly)	гліцин
Глн (Q, Gln)	глутамін
Глу (E, Glu)	глутамінова кислота
Іле (I, Ile)	ізолейцин*
Лей (L, Leu)	лейцин*
Ліз (K, Lys)	лізин*
Мет (M, Met)	метіонін*
Про (P, Pro)	пролін
Сер (S, Ser)	серин
Тир (Y, Tyr)	тирозин
Тре (T, Thr)	треонін*
Три (W, Trp)	триптофан*
Фен (F, Phe)	фенілаланін*
Цис (C, Cys)	цистеїн

Примітка. \* Незамінні (есенціальні) амінокислоти.

*Присвячую своїм дідусям і бабусям (фото на обкладинці), які здогадувалися про біологічну цінність молока, постійно його вживали і прожили довге життя в праці і без насильства над природою.*

## ВСТУП

Ідея написання цієї книги виникла у зв'язку з відсутністю у вітчизняній науковій літературі узагальнення сучасних даних про роль протеїнів молока у формуванні біологічної цінності молока і молочних продуктів. Переважно зустрічаються ґрунтовні роботи, присвячені детальному опису вмісту і значенню вітамінів, мінеральних сполук, поліненасичених жирних кислот та ін. Що стосується протеїнів – то описано окремі функції протеїнів сироватки молока. Для казеїнів в основному відводиться роль постачальника амінокислот (в першу чергу незамінних) та мінеральних компонентів, які входять до його складу. Але тут і виникають перші запитання – чому за класичними критеріями амінокислотний скор казеїнів не ідеальний і для чого потрібно стільки різних фракцій казеїну. Очевидно, природа вирішувала ще якісь важливі завдання, коли створювала шляхом відбору протеїни молока. Однією з відповідей на ці питання може бути відкриття численних біоактивних пептидів серед продуктів протеолізу казеїнів і протеїнів сироватки молока. Виявилось, що у казеїнів більша частина їх амінокислотних послідовностей входить до складу різних біоактивних пептидів, які можуть утворюватися в результаті протеолізу у шлунково-кишковому тракті. Цей феномен заслуговує на детальне вивчення і може мати важливе практичне значення у створенні нових функціональних

продуктів для профілактики різних захворювань. Насамперед це стосується гіпертензії, імунологічних захворювань, нервових розладів, порушень у засвоєнні організмом іонів кальцію, феруму та інших металів, регуляції апетиту, порушень обміну холестеролу, окисно-відновних процесів, канцерогенезу.

Окрім основних протеїнових фракцій, завдяки розвитку сучасних методів протеоміки і пептидоміки у молоці відкрито сотні мінорних пептидів і протеїнів, функції яких в більшості випадків не зрозумілі. Це, звичайно, можуть бути і випадкові компоненти молока. Але якщо це не випадкові сполуки в молоці, то вони можуть володіти важливою біологічною активністю. Очевидно, присутність біологічно активних пептидів з казеїнів і протеїнів сироватки молока, а також біоактивних мінорних пептидів і протеїнів може у значній мірі пояснити відому з древніх часів здатність молока і молочних продуктів позитивно впливати на організм.

Оскільки дослідження біологічно активних пептидів і протеїнів молока інтенсивно проводяться у наш час, то дану книгу можна розглядати як вступ до вивчення цієї цікавої частини біологічних функцій природного харчового продукту – молока, яке надало багато переваг ссавцям в їх успішному еволюційному розвитку. До них можна віднести гарантовану присутність всіх необхідних нутрієнтів при вигодовуванні новонароджених і, відповідно, високий відсоток їх виживання. Крім цього, біологічно активні компоненти молока захищають організм від патогенних мікроорганізмів, а також беруть участь у регуляції розвитку і функціонування різних фізіологічних систем.

Хочу висловити щире подяку к.т.н., доценту Людмилі Сторож за допомогу в підготовці рукопису до друку і моїй дружині Наталії Юкало за розуміння у процесі тривалої роботи над монографією.

## **РОЗДІЛ 1**

### **ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ КОМПОНЕНТИ В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ**

Перед тим, як приступити до розгляду біоактивних протеїнів і пептидів молока необхідно дати чітке визначення, що можна віднести до біологічно активних компонентів. Це поняття в науковій і, особливо, популярній літературі часто трактується дуже довільно. Також важливим є врахування особливостей біоактивних компонентів, які ми споживаємо з харчовими продуктами [16, 203, 551].

#### **1.1 Визначення і класифікація харчових біологічно активних компонентів**

Рациональне харчування здорової людини передбачає забезпечення організму енергією, замінними і незамінними (есенціальними) харчовими речовинами (нутриєнтами), а також біологічно активними компонентами. Нутриєнти (більше 600 необхідних в раціоні) поділяються на макронутриєнти (грами в 100 г продукту) і мікронутриєнтами (мг і нг в 100 г продукту) [136]. У свою чергу вони діляться на незамінні і замінні. Незамінні нутриєнти в більшості літературних джерел відносять до класичних біоактивних компонентів (мікроелементи, окремі макроелементи, вітаміни, амінокислоти і поліненасичені жирні кислоти). Частина авторів вважає, що біологічно активні компоненти не мають харчової цінності і повинні проявляти свою активність у малих кількостях. У роботі Schrezenmeir et al. (2000) дається наступне визначення біоактивних компонентів у харчових продуктах – це компоненти, які впливають на біологічні процеси або структури, що відображається на функціях або стані організму і, відповідно,

здоров'ї [475]. При цьому біоактивні компоненти раціону повинні показувати кількісний ефект (який можна виміряти) на реальному фізіологічному рівні. Також ця біологічна активність повинна позитивно впливати на здоров'я, виключаючи такі шкідливі ефекти, як токсичність, алергенність та мутагенність [349]. За визначенням Park (2009) термін «біоактивні компоненти» стосується сполук, які природно присутні у харчовому продукті або утворюються чи формуються при виробництві харчового продукту і впливають на фізіологічні та біохімічні функції при споживанні його людиною [402].

Враховуючи все сказане, ми будемо притримуватись наступного загального визначення: «Біологічно активні компоненти (БАК) – це сполуки, які в малих кількостях при споживанні з їжею здатні суттєво впливати на біологічні функції організму». Для біологічно активних компонентів харчових продуктів притаманні певні особливості. Так, до них не можуть бути зараховані сполуки, які розщеплюються і втрачають свою активність у процесі травлення. Таким чином відпадає спірне питання, чи відносити до БАК ензими, а також багато інших біополімерів або олігомерів. Вони можуть проявляти біологічну активність в організмі, але не бути стійкими до травних ензимів і розщеплюватися ними до неактивних сполук. З іншого боку, завдяки особливостям приклітинного травлення, яке притаманне новонародженим ссавцям, частина біоактивних полімерів з молока можуть проникати у нативному вигляді в кров'яне русло і проявляти свою дію [17]. Також частина БАК може проявляти свою активність у шлунково-кишковому тракті до розщеплення їх травними ензимами [184].

Залежно від характеру біологічної дії і активності БАК харчових продуктів поділяються на нутрицевтики, парафармацевтики і токсичні



речовини або токсиканти. Нутрицевтики і парафармацевтики – це природні нутрієнти, які позитивно впливають на здоров'я людини у фізіологічних межах функціональної активності органів і систем. Границя між нутрицевтиками і парафармацевтиками не дуже строга. До нутрицевтиків умовно відносять переважно нутрієнти, які, окрім біологічної дії, мають харчову цінність, а також незамінні нутрієнти (вітаміни, незамінні амінокислоти, поліненасичені жирні кислоти, мікроелементи) і харчові волокна. До парафармацевтиків відносять переважно мікронутрієнти з вираженою біологічною активністю, які не мають харчового значення (гормони, регуляторні пептиди, органічні кислоти, біофлавоноїди, пребіотики та ін.) [8].

Окрім раціонального харчування здорової людини, біологічно активним компонентам відводять важливу роль у концепції функціонального харчування, яка виникла у 80-тих роках минулого століття у Японії. Згідно з цією концепцією функціональні продукти – це продукти, які позитивно впливають на здоров'я людини, запобігають виникненню захворювань, передчасному старінню, допомагають адаптуватись до несприятливих умов середовища. Значну частину мікронутрієнтів у функціональних продуктах становлять функціональні інгредієнти (природні або додані), які визначають їх позитивний вплив на здоров'я. Функціональні інгредієнти одночасно є нутрицевтиками або парафармацевтиками [8, 270].

Враховуючи велику кількість різноманітних біологічно активних компонентів, а також їх попередників у молоці, відомий дослідник біоактивних пептидів Ганс Мейзель запропонував вважати молоко природним функціональним продуктом [334].

## **1.2 Біоактивні компоненти молока**

Харчова цінність молока формується завдяки протеїнам, ліпідам, вуглеводам (переважно лактозі) та неорганічним сполукам.

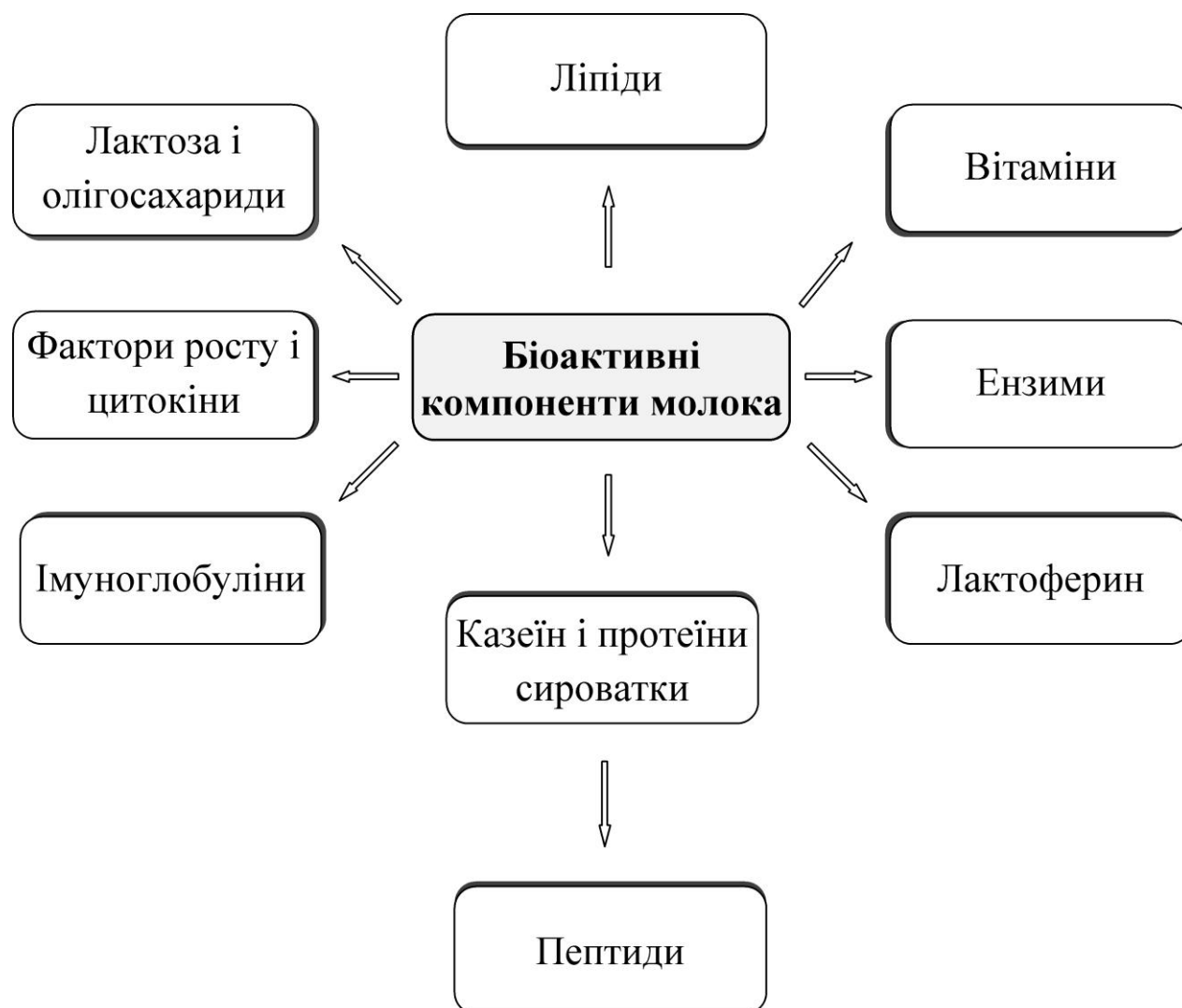
Окрім того, в молоці знайдено багато компонентів, які проявляють біологічну активність або є попередниками біоактивних сполук [184, 402, 552]. За Gobetti et al. (2007) можна виділити чотири напрями біологічної дії компонентів молока:

1. Розвиток, функції і активність шлунково-кишкового тракту.
2. Розвиток новонародженого організму ссавця.
3. Розвиток і функції імунної системи.
4. Дія антибіотиків і пробіотиків на активність мікроорганізмів [200].

Також за мішенями дії БАК молока можна розділити на такі, що впливають на організм новонародженого ссавця або споживача, і БАК молока, які проявляють дію на материнський організм. Так, наприклад, доведено, що у жінок, які годують молоком, знижується ризик захворювання раком грудей. З іншого боку доведено, що діти, які після народження харчувалися молоком матері (до шести місяців), мали менше проблем зі здоров'ям у подальшому житті порівняно з дітьми, які споживали замітники жіночого молока [184].

БАК молока за складом можна розділити залежно від періоду лактації. У перші декілька днів лактації продукується молозиво, яке відрізняється вмістом нутрієнтів і БАК. У молозиві багато імуноглобулінів, а також БАК, які сприяють розвитку імунної системи новонародженого. Через біоактивні сполуки материнський організм здійснює регуляторний вплив на організм новонародженого. Наявність такої збалансованої за харчовою цінністю та біологічною активністю їжі для новонароджених, як молоко, значною мірою призвела до еволюційного успіху ссавців [325].

Існує декілька класифікацій БАК молока. Патрік Фокс у другому виданні своєї фундаментальної праці «Dairy chemistry and biochemistry» [184] наводить наступну схему (рис. 1).



**Рис. 1. Класифікація біологічно активних сполук молока**

Більш детальну, але подібну класифікацію основних біологічно активних компонентів молока пропонує Park (2009) у вигляді таблиці (табл. 1).

У цих схемах і класифікаціях одночасно присутні біоактивні компоненти, їх неактивні попередники, а також біоактивні сполуки, які мають харчову цінність. Деяка невизначеність настає при намаганні віднести сполуки або до чисто біоактивних, або до харчових чи попередників біоактивних сполук. Виходячи із сучасних даних про біологічно активні компоненти молока та принципу біохімічної економії, сформульованого Альбертом Ленінджером [10], нами було запропоновано поняття про додаткові функції природних

**Таблиця 1. Основні біологічно активні компоненти молока та їх функції [402]**

Попередники або компоненти молока	Біоактивні сполуки	Встановлена біологічна дія
1	2	3
$\alpha$ -, $\beta$ -казеїни	Казоморфіни	Опіюїдні агоністи (понижують мобільність кишечника, темп звільнення шлунка, підвищують засвоєння амінокислот і електролітів)
$\alpha$ -, $\beta$ -казеїни	Казокініни	Інгібітори ангіотензин-перетворювального ензиму (АПЕ) (підвищують потік крові до епітелію кишечника)
$\alpha$ -, $\beta$ -казеїни	Фосфопептиди	Зв'язування мінералів (зв'язування Са, підвищення засвоєння мінералів, Са, Р, Zn)
$\alpha$ -, $\beta$ -казеїни	Імунопептиди Казоморфіни Казокініни	Імуномодулятори (інтенсифікація імунної відповіді та підвищення фагоцитарної активності)
$\alpha_{S1}$ -казеїн	Ізрацидин	Антимікробна дія
$\alpha_{S2}$ -казеїн	Казоцидин	Антимікробна дія
$\kappa$ -казеїн	Казоксин	Опіюїдний антагоніст
$\kappa$ -казеїн	Казоплателіни	Антитромботична дія
$\kappa$ -казеїн	Глікомакропептид	Стимулювання росту біфідобактерій у шлунково-кишковому тракті
$\alpha$ -лактальбумін $\beta$ -лактоглобулін	Лакторфіни	Опіюїдні агоністи
Альбумін сироватки	Серорфін	Опіюїдний агоніст
$\alpha$ -лактальбумін $\beta$ -лактоглобулін Альбумін сироватки	Лактокініни	Інгібітори ангіотензин-перетворювального ензиму
Імуноглобуліни	I <sub>g</sub> G, I <sub>g</sub> A	Імуномодуляторна дія (пасивний імунітет)

## Закінчення таблиці 1

1	2	3
Лактоферин	Лактоферин	Імуномодуляторна дія (підвищення активності природних клітин-кілерів, гуморальної імунної відповіді, імунологічного розвитку, пов'язаного з тимоцитами, зниження $\alpha$ -фактору ракового некрозу). Антимікробна дія (пригнічення розвитку Fe-залежних бактерій; протидія приєднанню та інфікуванню вірусами клітин). Сприяння росту біфідобактерій у шлунково-кишковому тракті.
Лактоферин	Лактофероксини	Опіюїдні антагоністи
Олігосахариди	Олігосахариди	Сприяння росту біфідобактерій у шлунково-кишковому тракті
Гліколіпіди Олігосахариди	Гліколіпіди	Антимікробна дія (зниження рівня приєднання бактерій і вірусів до епітеліальних клітин кишечника)
Пролактин	Пролактин	Імуномодуляторна дія (підвищення розвитку лімфоцитів і тимоцитів, а також розвиток імунітету)
Цитокіни	Інтерлейкіни-1,2,6 і 10; $\alpha$ -фактор ракового некрозу; інтерферон- $\gamma$ ; $\alpha$ - і $\beta$ -трансформуючі фактори росту, лейкотрієн B <sub>4</sub> ; простагландин E <sub>2</sub> ,Fn	Імуномодуляторна дія (розвиток лімфоцитів, а також розвиток імунітету)
Фактори росту	IGF-1, TGF- $\alpha$ , EGF, TGF- $\beta$	Розвиток органів і функцій
Паратгормон-Р	PTHrP	Підвищує рівень метаболізму і засвоєння Ca <sup>2+</sup>

нутриєнтів на прикладі протеїнів молока [25]. Суть його зводиться до того, що природні харчові біополімери, окрім основної функції (забезпечення пластичного і енергетичного обміну), можуть виконувати додаткові корисні для організму функції. Переважно такі додаткові функції пов'язані з певною біологічною активністю. У зв'язку з цим пропонується розділити біологічні сполуки молока на три групи:

- нутриєнти, у яких біологічна активність є додатковою функцією;
- БАК, які знаходяться у молоці в активному стані;
- вторинні БАК, які утворюються у процесі травлення молока або при виробництві молочних продуктів.

Представники кожної групи наведені у табл. 2.

**Таблиця 2. Класифікація біологічно активних компонентів молока**

Нутриєнти, у яких біологічна активність є додатковою функцією	БАК, які знаходяться у молоці в активному стані	Вторинні БАК молока, які утворюються у процесі травлення або при виробництві молочних продуктів
1. Основні протеїни молока 2. Ліпіди молока 3. Лактоза 4. Макроелементи	1. Вітаміни 2. Мікроелементи 3. Біоактивні мінорні протеїни 4. Природні біоактивні пептиди 5. Олігосахариди 6. Біоактивні мінорні сполуки різної хімічної природи 7. Гормони	1. Незамінні амінокислоти 2. Поліненасичені жирні кислоти 3. Біологічно активні пептиди з казеїнів та протеїнів сироватки молока

Таким чином, біологічну активність можуть проявляти основні протеїни молока, для яких це є додатковою функцією. Також в молоці є багато мінорних протеїнів і пептидів, які знаходяться у біологічно активному стані. І, на кінець, з протеїнів молока можуть утворюватися біоактивні пептиди під час протеолітичних процесів виробництва молочних продуктів або їх травлення у шлунково-кишковому тракті.

## РОЗДІЛ 2

### ПРОТЕЇНИ І ПРИРОДНІ ПЕПТИДИ МОЛОКА КОРОВИ, ЯКИМ ПРИТАМАННА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

Протеїни є одним з найважливіших компонентів молока [132]. У молоці корови протеїни становлять до 3,5 %. Вони забезпечують потребу організму в амінокислотах для синтезу власних протеїнів, а також є джерелом енергії. Технологічна цінність протеїнів молока пов'язана з їх унікальними функціональними і сенсорними властивостями. Окрім цього, важливою функцією протеїнів і природних пептидів молока є їх біологічна активність (регуляторна і захисна дія).

Властивості протеїнів молока були описані Берцеліусом ще у 1814 році. Термін «казеїн» вперше використав Браконо (H. Brasconnot, 1830 р.), а Малдер (I.G. Mulder, 1838 р.) описав кислотне осадження протеїнів з молока і ввів термін «протеїн». У 1883 році метод кислотного осадження казеїну був вдосконалений шведським вченим Олафом Гамарстеном (O. Hammarstan, 1883 р.) і зараз отриманий таким чином казеїн називають казеїном за Гамарстеном. Після осадження казеїну із знежиреного молока (становить близько 75–80 % протеїнів молока) у ньому залишаються протеїни сироватки молока (~15–20 %), лактоза і багато інших низькомолекулярних компонентів. Із сироватки у 1885 році Себелейн (J. Sebelein) висолюванням з використанням сульфату магнію виділив дві фракції протеїнів: розчинну фракцію альбумінів і нерозчинну – глобулінів. Пізніше (1889 р.) Вішман (A. Wischmann) з альбумінової фракції отримав кристали протеїну додаванням сульфату амонію з одночасним підкисленням середовища. В ті часи була поширена думка, що протеїни сироватки поступають в молоко прямо з крові. Це суттєво загальмувало їх вивчення аж до 30-х років ХХ століття [184, 325].

Окрім казеїнів і протеїнів сироватки у молоці є протеозо-пептонна фракція (ППФ або PPF) і фракція сполук непротеїнового



азоту або просто непротеїновий азот (NPN). Ці дві фракції залишаються у розчині після підкислення молока до ізоелектричної точки казеїнів (рН 4,6) і нагрівання до 95 °С протягом 10 хвилин (при цьому відділяються казеїни і протеїни сироватки). Якщо далі провести осадження у присутності 12 % трихлороцтової кислоти, то в осаді отримаємо протеозо-пептонну фракцію (~2 %), а у розчині непротеїновий азот (~3 %).

На сьогоднішній день протеїни молока є найбільш вивченими серед харчових протеїнів. Встановлено всі основні і більшість мінорних протеїнових компонентів молока. Починаючи з 1956 року протеїнами молока (окрім ензимів) займається комітет з номенклатури, класифікації і методології молочних білків Американської асоціації молочних наук. Останні дані (так звана шоста ревізія) про номенклатуру протеїнів молока опубліковані у 2004 році [167].

Оскільки основні фракції протеїнів молока (казеїни і протеїни сироватки) відносяться до першої групи БАК (табл. 2), а також є попередниками численних представників БАК третьої групи, буде доцільним більш детально розглянути сучасні уявлення про їх будову і властивості.

## **2.1 Протеїни казеїнового комплексу молока**

### **2.1.1 Класифікація і номенклатура казеїнів**

Казеїни згідно з сучасним визначенням – це фосфопротеїни, які осаджуються у сирому знежиреному молоці при підкисленні його до рН 4,6 при 20 °С [167]. При цьому в сироватці залишаються інші протеїни молока, протеозо-пептонна фракція, небілкові азотисті речовини, мінеральні речовини (в т.ч. частина мінеральних речовин, що були зв'язані з казеїном). Назва «казеїн» походить від латинського слова «caseus», що означає сир.

Вперше гетерогенність казеїну фракціонуванням етанолом і HCl показав Ліндестром-Ленг (К. Lingeström-Lang) у 1929 році. Далі методами ультрацентрифугування, фронтального і зонального електрофорезу та хроматографії було встановлено, що до складу казеїнового комплексу входить чотири групи протеїнів, які відрізняються первинною структурою. Це  $\alpha_{S1}$ -казеїни (~37 %),  $\alpha_{S2}$ -казеїни (~10 %),  $\beta$ -казеїни (~35 %) і  $\kappa$ -казеїни (~15 %). Кожна група (окрім  $\beta$ -казеїнів) складається з декількох фракцій, які відрізняються кількістю фосфорильованих залишків серину, або, як у випадку  $\kappa$ -казеїнів, – кількістю олігосахаридних груп. Крім того, до складу казеїнового комплексу входять три великі фрагменти  $\beta$ -казеїну, які теж осаджуються у кислому середовищі. Стара назва їх –  $\gamma$ -казеїни. Вони утворюються внаслідок дії на  $\beta$ -казеїн природної протеази молока – плазміну. Вміст  $\gamma$ -казеїнів становить ~3 %, а при маститах та на пізніших стадіях лактації досягає 10 % від кількості всіх казеїнів [184].

Сучасна класифікація казеїнів подана в табл. 3, а їх розміщення на електрофореграмі, отриманій в анодній системі поліакриламідного гелю (ПАГ) у присутності сечовини, показано на рис. 2 [34]. Назва кожної казеїнової фракції складається з назви групи казеїнів, до якої вона відноситься (продукти одного гена), далі великою латинською буквою позначається генетичний варіант і через дефіс позначається кількість фосфорильованих залишків серину. Наприклад, назва « $\beta$ -CN A<sup>2</sup>-5P» означає, що це фракція з групи  $\beta$ -казеїнів, генетичний варіант A<sup>2</sup>, містить п'ять фосфосеринових залишків.

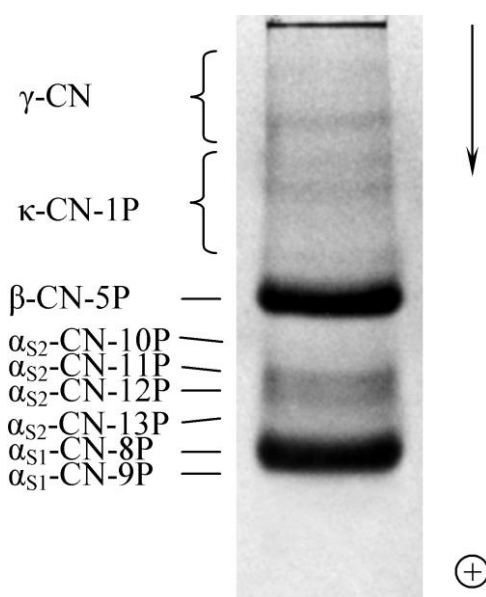
### 2.1.2 Характеристика казеїнових фракцій

Казеїни суттєво відрізняються від протеїнів сироватки молока за походженням, будовою, фізико-хімічними властивостями та біологічними функціями [91]. Казеїн коагулює і осаджується при значеннях рН, близьких до 4,6, а також при дії молокозсідальних протеаз. Казеїн

**Таблиця 3. Номенклатура казеїнів коров'ячого молока [184]**

Протеїни молока	Групи казеїнів	Індивідуальні фракції казеїну	
		Стара назва	Нова назва <sup>1</sup>
Казеїн	$\alpha_{S1}$ -казеїни	$\alpha_{S0}$ -казеїн	$\alpha_{S1}$ -CN В-9P
		$\alpha_{S1}$ -казеїн	$\alpha_{S1}$ -CN В-8P
	$\alpha_{S2}$ -казеїни	$\alpha_{S2}$ -казеїн	$\alpha_{S2}$ -CN А-13P
		$\alpha_{S3}$ -казеїн	$\alpha_{S2}$ -CN А-12P
		$\alpha_{S4}$ -казеїн	$\alpha_{S2}$ -CN А-11P
		$\alpha_{S6}$ -казеїн	$\alpha_{S2}$ -CN А-10P
	$\beta$ -казеїни	$\beta$ -казеїн	$\beta$ -CN А <sup>2</sup> -5P
		$\gamma_1$ -казеїн	$\beta$ -CN А <sup>2</sup> -1P (f29-209)
		$\gamma_2$ -казеїн	$\beta$ -CN А <sup>2</sup> (f106-209)
		$\gamma_3$ -казеїн	$\beta$ -CN А <sup>2</sup> (f108-209)
	$\kappa$ -казеїни	$\kappa$ -казеїн	$\kappa$ -CN А-1P <sup>2</sup>

- Примітки: 1. Вказані найбільш поширені генетичні варіанти казеїнів.  
 2. Група  $\kappa$ -казеїнів включає один основний фосфопротеїн і 9 мінорних фосфоглікопротеїнів.



**Рис. 2. Електрофореграма загального казеїну в анодній системі ПАГ у присутності сечовини [34]**

характеризується високою стійкістю до нагрівання. Він не коагулює при кип'ятінні протягом 24 годин. На відміну від протеїнів сироватки, казеїни є фосфопроїнами. Завдяки наявності фосфорильованих груп казеїн може зв'язувати значну кількість іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та інших двовалентних іонів металів ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ). Для казеїну характерний низький вміст сірковмісних амінокислот, особливо цистеїну. Протеїни казеїнового комплексу синтезуються лише у молочній залозі та існують переважно у вигляді складних великих надмолекулярних структур – міцел, які включають сотні протеїнових субодиниць. Середня молекулярна маса міцел становить близько  $10^9$  Да, а діаметр – 90-100 нм [221, 234, 288, 325].

Загальна характеристика казеїнових фракцій наведена в табл. 4. Дані стосуються найбільш поширених генетичних варіантів.

**Таблиця 4. Властивості казеїнових фракцій молока корів [167]**

Назва показника	Казеїнові фракції			
	$\alpha_{S1}$ -CN B-8P	$\alpha_{S2}$ -CN A-11P	$\beta$ -CN A <sup>2</sup> -5P	$\kappa$ -CN A-1P
Вміст у знежиреному молоці, г/л	12-15	3-4	9-11	2-4
Молекулярна маса, Да	23615	25226	23983	19037
Ізоіонна точка	4,92-5,05	–	5,30	5,77 (5,35)
Ізоелектрична точка	4,44-4,76	–	4,83-5,07	5,45-5,77
$D^{1\%}$ , $\lambda=280$ нм, $L=1$ см	10,05	14,0*	4,6-4,7	10,5
Константа седиментації, $S$ , в одиницях Сведберга ( $10^{-13}$ с)	1,64	–	1,50-1,51	1,4
Середня гідрофобність, ккал/залишок	1170	1111	1335	1205

Примітка. \*В даному випадку  $\lambda=290$  нм.

### 2.1.2.1 $\alpha_{S1}$ -Казеїни

Найбільшу частину серед казеїнів становлять  $\alpha_{S1}$ -казеїни – близько 40 %. Вони включають одну основну фракцію ( $\alpha_{S1}$ -CN В-8Р) і одну мінорну ( $\alpha_{S1}$ -CN В-9Р). Первинна структура найбільш поширеного генетичного варіанту  $\alpha_{S1}$ -казеїну показана на рис. 3.

Починаючи з 1969 року ідентифіковано сім генетичних варіантів  $\alpha_{S1}$ -CN окрім  $\alpha_{S1}$ -CN В-8Р. Зміни у їхній первинній структурі представлені у табл. 5.

1	10	20							
Н – Арг – Про – Ліз – Гіс – Про – Іле – Ліз – Гіс – Глн – Глі – Лей – Про – Глн – Глу – Вал – Лей – Асн – Глу – Асн – Лей –									
21	30	40							
Лей – Арг – Фен – Фен – Вал – Ала – Про – Фен – Про – Глу – Вал – Фен – Глі – Ліз – Глу – Ліз – Вал – Асн – Глу – Лей –									
41	50	60							
Сер – Ліз – Асп – Іле – Глі – Сер – Глу – Сер – Тре – Глу – Асп – Глн – Ала – Мет – Глу – Асп – Іле – Ліз – Глн – Мет –									
<table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Р</td> <td style="padding: 0 10px;">( <math>\alpha_{S1}</math>-CN В-9Р)</td> <td style="padding: 0 10px;">Р</td> <td style="padding: 0 10px;">Р</td> <td style="padding: 0 10px;">Р</td> <td style="padding: 0 10px;">Р</td> <td style="padding: 0 10px;">Р</td> </tr> </table>	Р	( $\alpha_{S1}$ -CN В-9Р)	Р	Р	Р	Р	Р		
Р	( $\alpha_{S1}$ -CN В-9Р)	Р	Р	Р	Р	Р			
61	70	80							
Глу – Ала – Глу – Сер – Іле – Сер – Сер – Сер – Глу – Глу – Іле – Вал – Про – Асн – Сер – Вал – Глу – Глн – Ліз – Гіс –									
<table border="0" style="margin-left: 100px;"> <tr> <td style="padding: 0 10px;">Р</td> <td style="padding: 0 10px;">Р</td> <td style="padding: 0 10px;">Р</td> <td style="padding: 0 10px;">Р</td> <td style="padding: 0 10px;">Р</td> </tr> </table>	Р	Р	Р	Р	Р				
Р	Р	Р	Р	Р					
81	90	100							
Іле – Глн – Ліз – Глу – Асп – Вал – Про – Сер – Глу – Арг – Тир – Лей – Глі – Тир – Лей – Глу – Глн – Лей – Лей – Арг –									
101	110	120							
Лей – Ліз – Ліз – Тир – Ліз – Вал – Про – Глн – Лей – Глу – Іле – Вал – Про – Асн – Сер – Ала – Глу – Глу – Арг – Лей –									
121	130	140							
Гіс – Сер – Мет – Ліз – Глу – Глі – Іле – Гіс – Ала – Глн – Глн – Ліз – Глу – Про – Мет – Іле – Глі – Вал – Асн – Глн –									
141	150	160							
Глу – Лей – Ала – Тир – Фен – Тир – Про – Глу – Лей – Фен – Арг – Глн – Фен – Тир – Глн – Лей – Асп – Ала – Тир – Про –									
161	170	180							
Сер – Глі – Ала – Три – Тир – Тир – Вал – Про – Лей – Глі – Тре – Глн – Тир – Тре – Асп – Ала – Про – Сер – Фен – Сер –									
181	190	199							
Асп – Іле – Про – Асн – Про – Іле – Глі – Сер – Глу – Асн – Сер – Глу – Ліз – Тре – Тре – Мет – Про – Лей – Три – ОН									

**Рис. 3. Первинна структура  $\alpha_{S1}$ -казеїну ( $\alpha_{S1}$ -CN В-8Р)**

**Р – залишок ортофосфатної кислоти [167]**

**Таблиця 5. Відмінності первинної структури генетичних варіантів  $\alpha_{S1}$ -казеїнів [325]**

Генетичний варіант $\alpha_{S1}$ -казеїну	Номер амінокислотного залишку						Види, породи тварин
	14-26	51-58	53	59	66	192	
A	Делеція						Голштинська, червона німецька
B			Ала	Глн	СерР	Глу	Більшість порід корів
C						Глі	Bos indiens, Bos grunniens
D			ТреР				Породи корів у Франції, Італії, Нідерландах
E				Ліз		Глі	Bos grunniens
F					Лей		Чорна і біла німецька порода
G	Зміни не встановлені						Італійська коричнева порода
H		Делеція					

Обидві фракції  $\alpha_{S1}$ -казеїнів генетичного варіанту В складаються з 199 амінокислотних залишків і відрізняються одним фосфорильованим залишком серину у положенні 41. Амінокислотний склад і характеристика властивостей  $\alpha_{S1}$ -CN В-8Р фракції казеїну наведені в табл. 6.

Особливістю амінокислотного складу є мала кількість метіоніну, повна відсутність залишків цистеїну і великий вміст проліну [233]. Залишки проліну рівномірно розміщені вздовж поліпептидного ланцюга і протидіють формуванню  $\alpha$ -спіралі. За розрахунками і експериментальними даними до складу  $\alpha$ -спіралі входить 13-15 % амінокислотних залишків, до  $\beta$ -структури близько 20 %, а решту становлять  $\beta$ -згини і невпорядковані ділянки [298].

**Таблиця 6. Амінокислотний склад і властивості  $\alpha_{S1}$ -CN B-8P [233]**

Амінокислотний склад		Властивості	
Аміно-кислота	Кількість залишків у молекулі $\alpha_{S1}$ -CN B-8P		
Ала	9	Загальна кількість амінокислотних залишків	199
Арг	6	Позитивно заряджені залишки (Ліз/Арг/Гіс)	25
Асн	8	Негативно заряджені залишки (Глу/Асп/СерР)	40
Асп	7	Ароматичні залишки (Тир, Фен, Тре)	20
Вал <sup>1</sup>	11		
Гіс	5	Молекулярна маса	
Глі	9	На базі первинної структури	22 975 Да
Глн	14	Включаючи фосфорилування	23 599 Да
Глу	25		
Іле <sup>1</sup>	11	pI	
Лей <sup>1</sup>	17	На базі первинної структури	4,91
Ліз <sup>1</sup>	14	Включаючи фосфорилування	4,42
Мет <sup>1</sup>	5		
Про	17	Коефіцієнт екстинкції при (280 нм) <sup>2</sup>	25 900 М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>
Сер	16		
Тир	10	Поглинання 1 г/л при (280 нм) <sup>2</sup>	1,127
Тре <sup>1</sup>	5		
Три <sup>1</sup>	2	Аліфатичний індекс	75,43
Фен <sup>1</sup>	8		
Цис	0		

Примітки: 1. Незамінні (есенціальні) амінокислоти.

2. Значення базуються на основі первинної структури і не враховують посттрансляційні модифікації структури.

Цей казеїн характеризується великим рівнем гідрофобності завдяки високому вмісту неполярних бокових груп валіну, лейцину, ізолейцину, фенілаланіну і триптофану. За цим показником можна відзначити ділянки f 20-35 і f 160-175. Гідрофільні ділянки містять аніонні кластери (f 42-55 і f 63-77), які приєднують іони  $\text{Ca}^{2+}$  та інших двовалентних металів.  $\alpha_{\text{S1}}\text{-CN}$  відноситься до  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих казеїнів і осаджується у присутності 4-6 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (і вище) при всіх температурах [184].

Особливості амінокислотного складу і первинної структури  $\alpha_{\text{S1}}$ -казеїнів спричиняють у них виражену тенденцію до утворення агрегатів і надмолекулярних структур. Третинна структура  $\alpha_{\text{S1}}$ -казеїнів остаточно не встановлена.

### 2.1.2.2 $\alpha_{\text{S2}}$ -Казеїни

Наступною важливою групою казеїнів є  $\alpha_{\text{S2}}$ -казеїни (до 10 %). Первинна структура  $\alpha_{\text{S2}}$ -казеїнів показана на рис. 4. Вона є спільною для всіх чотирьох фракцій  $\alpha_{\text{S2}}$ -казеїнів. Між собою вони відрізняються лише кількістю фосфорильованих залишків серину (від 10 до 13). Розміщення залишків серину, які фосфорилуються у  $\alpha_{\text{S2}}$ -казеїнів, встановлені [139]. В останніх дослідженнях було показано, що окрім чотирьох фракцій  $\alpha_{\text{S2}}$ -А-казеїну ( $\alpha_{\text{S2}}\text{-CN A-10P}$ ,  $\alpha_{\text{S2}}\text{-CN A-11P}$ ,  $\alpha_{\text{S2}}\text{-CN A-12P}$ ,  $\alpha_{\text{S2}}\text{-CN A-13P}$ ) в коров'ячому молоці можуть бути також  $\alpha_{\text{S2}}\text{-CN A-9P}$ ,  $\alpha_{\text{S2}}\text{-CN A-14P}$ ,  $\alpha_{\text{S2}}\text{-CN A-15P}$  фракції [160].

Для  $\alpha_{\text{S2}}$ -казеїнів характерні декілька генетичних варіантів (табл. 7). Найбільш поширеним є варіант А. Амінокислотний склад і властивості  $\alpha_{\text{S2}}\text{-CN A-11P}$  наведені в табл. 8.

Серед казеїнів  $\alpha_{\text{S2}}$ -казеїн характеризується найвищим вмістом фосфосеринів і є найбільш гідрофільним. Також він містить два залишки цистеїну і може існувати як мономер із внутрішньомолекулярним дисульфідним зв'язком або як димери (близько 15 %) з паралельним і антипаралельним розташуванням поліпептидних





**Таблиця 8. Амінокислотний склад і властивості  $\alpha_{S2}$ -CN A-11P [233]**

Амінокислотний склад		Властивості	
Аміно-кислота	Кількість залишків у молекулі $\alpha_{S2}$ -CN A-11P		
Ала	8	Загальна кількість амінокислотних залишків	207
Арг	6	Позитивно заряджені залишки (Ліз/Арг/Гіс)	33
Асн	14	Негативно заряджені залишки (Глу/Асп/СерР)	39
Асп	4	Ароматичні залишки (Тир, Фен, Тре)	20
Вал <sup>1</sup>	14		
Гіс	3	Молекулярна маса	
Глі	2	На базі первинної структури	24 348 Да
Глн	16	Включаючи фосфорилювання	25 206 Да
Глу	24		
Іле <sup>1</sup>	11	pI	
Лей <sup>1</sup>	13	На базі первинної структури	8,34
Ліз <sup>1</sup>	24	Включаючи фосфорилювання	4,95
Мет <sup>1</sup>	4		
Про	10	Коефіцієнт екстинкції (280 нм) <sup>2</sup>	29 005 М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>
Сер	17		
Тир	12	Поглинання 1 г/л (280 нм) <sup>2</sup>	1,191
Тре <sup>1</sup>	15		
Три <sup>1</sup>	2	Аліфатичний індекс	68,7
Фен <sup>1</sup>	6		
Цис	2		

Примітки: 1. Незамінні (есенціальні) амінокислоти.

2. Значення базуються на основі первинної структури і не враховують посттрансляційні модифікації структури.

ланцюгів [439]. У первинній структурі  $\alpha_{S2}$ -казеїну можна виділити чотири домени: N-кінцевий гідрофільний з аніонними кластерами; центральний гідрофобний; гідрофільний домен з аніонним кластером і C-термінальний гідрофобний позитивно заряджений. Подібність первинної структури двох ділянок  $\alpha_{S2}$ -казеїнів (залишки 42-122 і 124-207) може свідчити про утворення гену  $\alpha_{S2}$ -казеїну в результаті дуплікації [168].  $\alpha_{S2}$ -Казеїн не стійкий до іонів  $Ca^{2+}$  – осаджується при всіх температурах при концентрації  $Ca^{2+}$  2 мМ [325]. Розчинний у пропанолі. Приблизно 46 % амінокислотних залишків формують три ділянки  $\alpha$ -спіралі, а близько 9 % знаходиться у складі  $\beta$ -структури [168]. Третинна структура остаточно не встановлена.

### 2.1.2.3 $\beta$ -Казеїни

$\beta$ -Казеїни є другою за вмістом групою серед казеїнів. Найчастіше зустрічається у різних порід корів генетичний варіант  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>, який включає п'ять фосфосеринових залишків. Його первинна структура показана на рис. 5.

Амінокислотний склад і основні властивості  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>-5P казеїнової фракції наведені в табл. 9. Для  $\beta$ -казеїну також характерна велика кількість генетичних варіантів, які відрізняються первинною структурою. Відмінності в амінокислотній послідовності дванадцяти генетичних варіантів  $\beta$ -казеїну представлені у табл. 10.

У  $\beta$ -казеїну зовсім відсутній цистеїн. Для нього характерна дифільна природа і найвища гідрофобність серед казеїнів [184]. Це пояснюється тим, що основна частина позитивних зарядів і всі фосфосеринові залишки знаходяться у N-термінальній ділянці молекули (залишки 1-45). В середній частині молекули (залишки 46-135) знаходиться мала кількість заряджених залишків, а C-кінцева ділянка включає велику кількість неполярних амінокислотних залишків і, відповідно, їй притаманна висока гідрофобність [139]. В N-термінальній частині також розміщені усі  $\alpha$ -спіральні ділянки

1	10	20
Н – Арг – Глу – Лей – Глу – Глу – Лей – Асн – Вал – Про – Глі – Глу – Іле – Вал – Глу – Сер – Лей – Сер – Сер – Сер – Глу		
		Р            Р            Р            Р
21	30	40
Глу – Сер – Іле – Тре – Арг – Іле – Асн – Ліз – Ліз – Іле – Глу – Ліз – Фен – Глн – Сер – Глу – Глу – Глн – Глн – Глн –		
		Р
41	50	60
Тре – Глу – Асп – Глу – Лей – Глн – Асп – Ліз – Іле – Гіс – Про – Фен – Ала – Глн – Тре – Глн – Сер – Лей – Вал – Тир –		
61	70	80
Про – Фен – Про – Глі – Про – Іле – Про – Асн – Сер – Лей – Про – Глн – Асн – Іле – Про – Про – Лей – Тре – Глн – Тре –		
81	90	100
Про – Вал – Вал – Вал – Про – Про – Фен – Лей – Глн – Про – Глу – Вал – Мет – Глі – Вал – Сер – Ліз – Вал – Ліз – Глу –		
101	110	120
Ала – Мет – Ала – Про – Ліз – Гіс – Ліз – Глу – Мет – Про – Фен – Про – Ліз – Тир – Про – Вал – Глу – Про – Фен – Тре –		
121	130	140
Глу – Сер – Глн – Сер – Лей – Тре – Лей – Тре – Асп – Вал – Глу – Асн – Лей – Гіс – Лей – Про – Лей – Про – Лей – Лей –		
141	150	160
Глн – Сер – Три – Мет – Гіс – Глн – Про – Гіс – Глн – Про – Лей – Про – Про – Тре – Вал – Мет – Фен – Про – Про – Глн –		
161	170	180
Сер – Вал – Лей – Сер – Лей – Сер – Глн – Сер – Ліз – Вал – Лей – Про – Вал – Про – Глн – Ліз – Ала – Вал – Про – Тир –		
181	190	200
Про – Глн – Арг – Асп – Мет – Про – Іле – Глн – Ала – Фен – Лей – Лей – Тир – Глн – Глу – Про – Вал – Лей – Глі – Про –		
201	207	
Вал – Арг – Глі – Про – Фен – Про – Іле – Іле – Вал – ОН		

### Рис. 5. Первинна структура $\beta$ -казеїну ( $\beta$ -CN A<sup>2</sup>-5P)

**Р – залишок ортофосфатної кислоти [71]**

завдяки присутності лише одного залишку проліну. В інших ділянках молекули  $\beta$ -казеїну відносно рівномірно розміщена велика кількість проліну (34 залишки). Тому 70 % поліпептидного ланцюга знаходиться у вигляді неупорядкованих ділянок. Лише близько 10 % залишків амінокислот входять до  $\alpha$ -спіралей [434].  $\beta$ -Казеїни характеризуються здатністю утворювати агрегати за участі гідрофобних взаємодій. При низьких температурах (+4 °C), на відміну від інших казеїнів, молекули  $\beta$ -казеїну можуть виходити зі складу міцел в розчин і знаходитись у молекулярно-дисперсному стані [165, 385]. При температурі близько 20 °C  $\beta$ -казеїн починає утворювати

**Таблиця 9. Амінокислотний склад і властивості  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>-5P [233]**

Амінокислотний склад		Властивості	
Амінокислота	Кількість залишків у молекулі $\beta$ -CN A <sup>2</sup> -5P		
Ала	5	Загальна кількість амінокислотних залишків	209
Арг	4	Позитивно заряджені залишки (Ліз/Арг/Гіс)	20
Асн	5	Негативно заряджені залишки (Глу/Асп/СерР)	28
Асп	4	Ароматичні залишки (Тир, Фен, Тре)	14
Вал <sup>1</sup>	19		
Гіс	5	Молекулярна маса	
Глі	5	На базі первинної структури	23 583 Да
Глн	20	Включаючи фосфорилювання	23 973 Да
Глу	19		
Іле <sup>1</sup>	10	pI	
Лей <sup>1</sup>	22	На базі первинної структури	5,13
Ліз <sup>1</sup>	11	Включаючи фосфорилювання	4,65
Мет <sup>1</sup>	6		
Про	35	Коефіцієнт екстинкції при 280 нм <sup>2</sup>	11 460 М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>
Сер	16		
Тир	4	Поглинання 1 г/л при 280 нм <sup>2</sup>	0,486
Тре <sup>1</sup>	9		
Три <sup>1</sup>	1	Аліфатичний індекс	88,5
Фен <sup>1</sup>	9		
Цис	0		

Примітки: 1. Незамінні (есенціальні) амінокислоти.

2. Значення базуються на основі первинної структури і не враховують посттрансляційні модифікації структури.

**Таблиця 10. Відмінності первинної структури генетичних варіантів  $\beta$ -казеїнів [325]**

Гене- тичний варіант $\beta$ -казеїну	Номер амінокислотного залишку													
	18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	122	137/ 138	152	?
A1						Гіс								
A2	СерР	Арг	СерР	Глу	Глу	Про	Глн	Лей	Мет	Гіс	Сер	Лей/ Про	Про	Глн
A3										Глн				
B						Гіс					Арг			
C1			Сер		Ліз	Гіс								
D	Ліз													
E				Ліз										
F						Гіс							Лей	
G						Гіс						Лей		
H1		Цис						Іле						
H2							Глу		Лей					Глу
I									Лей					

агрегати [184]. При низьких температурах (1 °С)  $\beta$ -казеїн не осаджується навіть при концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  0,4 М. Із підвищенням температури його стійкість знижується. Так, при температурі 18 °С і вище  $\beta$ -казеїн осаджується у присутності 4 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  [163].

#### 2.1.2.4 $\kappa$ -Казеїн

Четвертою важливою групою протеїнів казеїнового комплексу є  $\kappa$ -казеїни (до 15 %). Первинна структура найбільш поширеного варіанту  $\kappa$ -CN A-1P показана на рис. 6. Амінокислотний склад і основні властивості  $\kappa$ -CN A-1P наведені в табл. 11. Для  $\kappa$ -казеїну встановлено, окрім А, ще десять генетичних варіантів. Їх структури представлені в табл. 12.

1	10	20
Н – Глу – Глу – Глн – Асн – Глн – Глу – Глн – Про – Іле – Арг – Цис – Глу – Ліз – Асп – Глу – Арг – Фен – Фен – Сер – Асп –		
21	30	40
Ліз – Іле – Ала – Ліз – Тир – Іле – Про – Іле – Глн – Тир – Вал – Лей – Сер – Арг – Тир – Про – Сер – Тир – Глі – Лей –		
41	50	60
Асн – Тир – Тир – Глн – Глн – Ліз – Про – Вал – Ала – Лей – Іле – Асн – Асн – Глн – Фен – Лей – Про – Тир – Про – Тир –		
61	70	80
Тир – Ала – Ліз – Про – Ала – Ала – Вал – Арг – Сер – Про – Ала – Глн – Іле – Лей – Глн – Три – Глн – Вал – Лей – Сер –		
81	90	100
Асн – Тре – Вал – Про – Ала – Ліз – Сер – Цис – Глн – Ала – Глн – Про – Тре – Тре – Мет – Ала – Арг – Гіс – Про – Гіс –		
	<i>Хімозин</i>	
101	110	120
Про – Гіс – Лей – Сер – Фен – Мет – Ала – Іле – Про – Про – Ліз – Ліз – Асн – Глн – Асп – Ліз – Тре – Глу – Іле – Про –		
	↓	
121	130	140
Тре – Іле – Асн – Тре – Іле – Ала – Сер – Глі – Глу – Про – Тре – Сер – Тре – Про – Тре – Тре – Тре – Глу – Ала – Вал – Глу –		
141	150	160
Сер – Тре – Вал – Ала – Тре – Лей – Глу – Асп – Сер – Про – Глу – Вал – Іле – Глу – Сер – Про – Про – Глу – Іле – Асн –		
	Р	
161	169	
Тре – Вал – Глн – Вал – Тре – Сер – Тре – Ала – Вал – ОН		

**Рис. 6. Первинна структура к-CN A-1P  
Р – залишок ортофосфатної кислоти [167]**

к-Казеїн відрізняється від інших протеїнів казеїнового комплексу своєю будовою і унікальними властивостями. На відміну від інших казеїнів, к-казеїн є глікофосфопропротеїном. Численні мінорні фракції к-казеїну, які одночасно присутні у молоці (рис. 2), утворені за рахунок відмінностей у кількості олігосахаридних груп, а також наявності або відсутності залишків фосфосерину. Олігосахаридні групи складаються з N-ацетилнейрамінової кислоти (сіалова кислота), галактози і N-ацетилгалактозаміну. Вони існують у вигляді моно- (0,8 %), ди- (6,3 %), три- (18,4 %) або тетрасахаридів (56,0 %) і приєднуються до залишків треоніну виключно у C-термінальній ділянці молекули к-казеїну (f 106-169) в процесі посттрансляційного глікозилування [464]. Необхідно відзначити, що у близько 40 %

молекул  $\kappa$ -казеїну олігосахаридні групи повністю відсутні, тобто вони є фосфопротеїнами. Решту молекул  $\kappa$ -казеїну можуть містити

**Таблиця 11. Амінокислотний склад і властивості  $\kappa$ -CN A-1P [233]**

Амінокислотний склад		Властивості	
Амінокислота	Кількість залишків у молекулі $\kappa$ -CN A-1P		
Ала	14	Загальна кількість амінокислотних залишків	169
Арг	5	Позитивно заряджені залишки (Ліз/Арг/Гіс)	17
Асн	8	Негативно заряджені залишки (Глу/Асп/СерР)	28
Асп	4	Ароматичні залишки (Тир, Фен, Тре)	14
Вал <sup>1</sup>	11		
Гіс	3	Молекулярна маса	
Глі	2	На базі первинної структури	18 974 Да
Глн	14	Включаючи фосфорилування	19 052 Да
Глу	12		
Іле <sup>1</sup>	12	pI	
Лей <sup>1</sup>	8	На базі первинної структури	5,93
Ліз <sup>1</sup>	9	Включаючи фосфорилування	5,60
Мет <sup>1</sup>	2		
Про	20	Коефіцієнт екстинкції при 280 нм <sup>2</sup>	19 035 М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>
Сер	13		
Тир	9	Поглинання 1 г/л при 280 нм <sup>2</sup>	1,003
Тре <sup>1</sup>	15		
Три <sup>1</sup>	1	Аліфатичний індекс	73,3
Фен <sup>1</sup>	4		
Цис	2		

Примітки: 1. Незамінні (есенціальні) амінокислоти.

2. Значення базуються на основі первинної структури і не враховують посттрансляційні модифікації структури.



**Таблиця 12. Відмінності первинної структури генетичних варіантів κ-казеїнів [325]**

Генетичний варіант κ-казеїну	Номер амінокислотного залишку						
	10	97	104	135	136	148	155
А	Арг	Арг	Сер	Тре	Тре	Асп	Сер
В					Іле	Ала	
С		Гіс					
Е							Глі
F <sup>1</sup>						Вал	
F <sup>2</sup>	Гіс				Іле	Ала	
G <sup>1</sup>		Цис			Іле	Ала	
G <sup>2</sup>						Ала	
Н					Іле		
І			Ала				
J					Іле	Ала	Арг

від однієї до шести олігосахаридних груп. Встановлено, що приєднання олігосахаридних груп відбувається при взаємодії із залишками треоніну у положеннях 121, 131, 133, 142, 145 і 165 [342]. За допомогою двовимірного електрофорезу знайдено 16 фракцій κ-казеїну, які відрізняються за сайтами глікозилювання. Так, у моноглікоформ κ-казеїну олігосахаридна група приєднана виключно до треоніну в положенні 131, у диглікоформ – тільки до треонінів у положеннях 131 і 142, у триглікоформ – до треонінів у положеннях 131, 133 і 142, а у чотириглікоформ – до треонінів у положеннях 131, 133, 142 і 145 [223, 224, 225]. Олігосахаридні групи суттєво підвищують гідрофільність С-термінальної ділянки κ-казеїну. В тому

числі завдяки олігосахаридним групам глікомакропептид (f 106-109), який утворюється за дії молокозсідальної протеази хімозину на к-казеїн, добре розчинний у водних розчинах, а також у присутності 12%-ї трихлороцтової кислоти [91, 184].

В певній мірі мікрогетерогенність к-казеїну може бути пов'язана з процесами його посттрансляційного фосфорилування. Найчастіше зустрічається моно- або дифосфорильована форма к-казеїну. Встановлено, що у першому випадку фосфорилування відбувається тільки по залишку серину у положенні 149. Друга ортофосфатна група приєднується до серину 121 [510]. На відміну від інших казеїнів, у к-казеїну третя фосфатна група приєднується до залишку треоніну (в положенні 145), а не до серину [225]. Фосфорилування, так як і глікозилування, підвищує гідрофільність С-термінальної ділянки к-казеїну.

Важливою особливістю амінокислотного складу к-казеїну є наявність двох залишків цистеїну. При цьому близько 10 % к-казеїну існує з внутрішньомолекулярними дисульфідними зв'язками у вигляді мономерів. Для решти молекул к-казеїну характерні три види міжмолекулярних дисульфідних зв'язків (Цис<sub>11</sub>-Цис<sub>11</sub>, Цис<sub>11</sub>-Цис<sub>88</sub>, Цис<sub>88</sub>-Цис<sub>88</sub>). При цьому можуть утворюватися надмолекулярні структури, які включають від трьох до восьми і більше субодиниць к-казеїну [164].

Вторинна структура к-казеїну складається з  $\alpha$ -спіралі (10-20 %),  $\beta$ -структури (20-30 %) і згинів (15-25 %). При цьому із зростанням температури в межах від 10 до 70 °С відсоток  $\alpha$ -спіралі збільшується і, відповідно, зменшується відсоток  $\beta$ -структури і згинів [166].

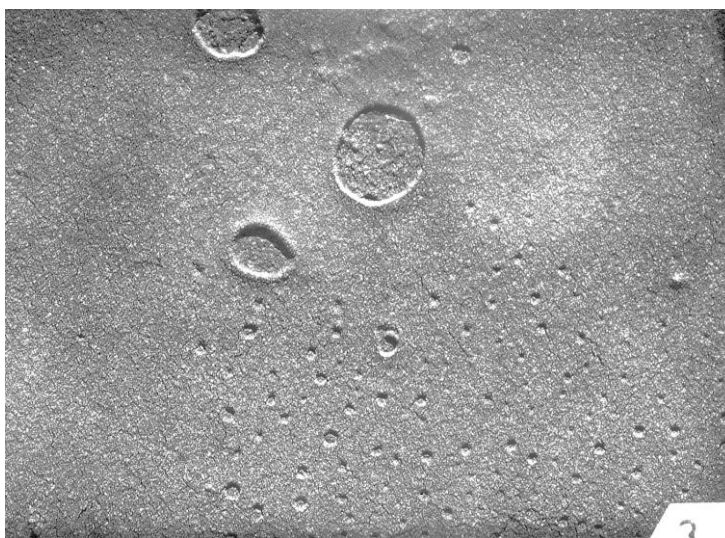
На відміну від інших казеїнів, к-казеїн є стійким до іонів кальцію. Він є кальцій-нечутливим казеїном. Більше того, в його присутності стійкість до дії іонів кальцію проявляють інші казеїнові фракції. Така властивість к-казеїну є дуже важливою для утворення і функціонування казеїнових міцел у молоці.

### 2.1.3 Міцели казеїну

Казеїни синтезуються на рибосомах гранульованого ендоплазматичного ретикулуму клітин молочної залози. Далі частково асоціюються і поступають у комплекс Гольджі. У везикулах комплексу Гольджі відбувається формування казеїнових міцел, фосфорилування і, можливо, глікозилування. Сформовані міцели транспортуються до апікальної мембрани клітини і шляхом екзоцитозу виділяються в порожнину альвеол молочної залози [539].

У молоці майже 95 % казеїнів перебувають у складі великих надмолекулярних структур – міцел (рис. 7). Висушені міцели складаються з 94 % протеїну та близько 6 % колоїдних фосфатів і цитратів кальцію, магнію та інших двовалентних іонів металів [91]. Деякі властивості казеїнових міцел показані у табл. 13.

Кальцій міститься у міцелах у двох формах: органічний кальцій (приєднаний до фосфатних і карбоксильних груп казеїну) і неорганічний кальцій (входить до складу колоїдного фосфату і цитрату кальцію). Найбільш обґрунтованою структурою колоїдного кальцію фосфату є 6-кальційфосфат [184].



**Рис. 7. Електронна мікрофотографія казеїнових міцел коров'ячого молока (31000×1,5) [34]**

Великі розміри міцел призводять до світлорозсіювання. Це в свою чергу зумовлює білий колір молока. Білий колір зникає при додаванні дезагрегуючих агентів (додецилсульфат натрію, сечовина, ЕДТА, цитрат, оксалат, етанол та ін.), які призводять до розпаду міцел.

**Таблиця 13. Властивості казеїнових міцел молока [184]**

№ п/п	Показник (середні значення)	Значення
1	Діаметр міцели	120 нм (діапазон 50-500 нм)
2	Площа поверхні міцели	$8 \cdot 10^{-10}$ см <sup>2</sup>
3	Об'єм	$2 \cdot 10^{-15}$ см <sup>3</sup>
4	Маса	$2,2 \cdot 10^{-13}$ г
5	Вміст води	63 %
6	Молекулярна маса гідратованої міцели	$1,3 \cdot 10^9$ Да
7	Молекулярна маса дегідратованої міцели	$5 \cdot 10^8$ Да
8	Кількість поліпептидних ланцюгів	$10^4$
9	Кількість міцел в 1мл молока	$10^{14}$ - $10^{16}$
10	Відстань між міцелами у молоці	240 нм

Казеїнові міцели характеризуються високою стабільністю до нагрівання (витримують нагрівання до 140 °С протягом 15 хвилин), а також у присутності іонів кальцію (до 0,2 М). Дестабілізація казеїнових міцел може відбуватись при зниженні рН, дії органічних розчинників (етанол, метанол, ацетон), детергентів, протеолізі молокозсідальними ензимами, заморожуванні. При низьких температурах частина  $\beta$ -казеїну (до 20 %) може виходити зі складу міцел у розчин [234, 473].

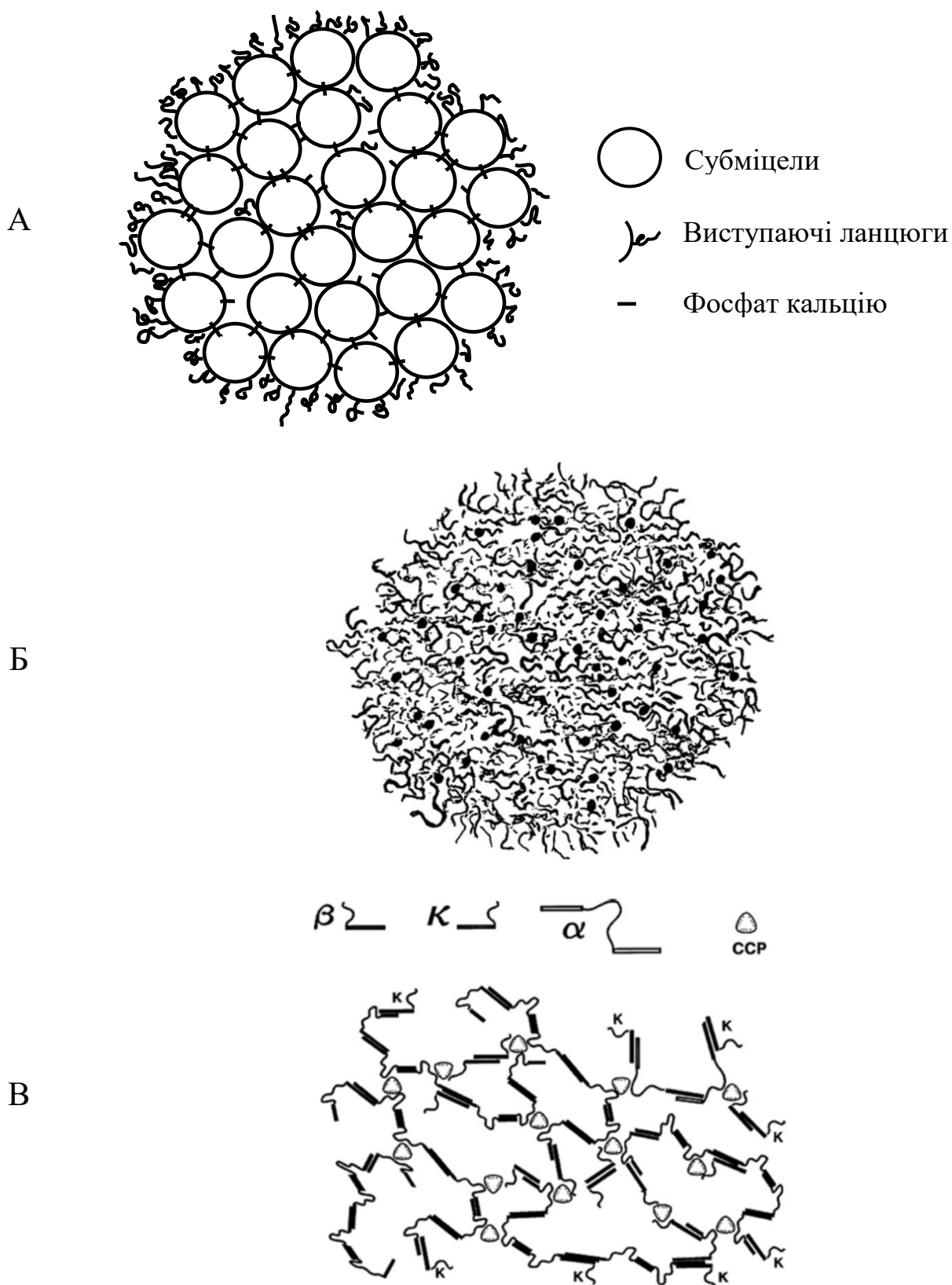
Будова казеїнових міцел складна. Не зважаючи на майже 60-ти річну історію їх вивчення (перша модель запропонована D.F. Waugh у 1958 р.) остаточно не встановлена [91, 140, 183, 324, 547]. Найбільш популярною є субміцелярна модель. Основне твердження цієї

моделі – всі казеїнові міцели складаються з приблизно однакових субміцел величиною 10-15 нм. Субміцели на поверхні містять κ-казеїн (С-кінцеву гідрофільну ділянку) та окремі гідрофільні ділянки α<sub>s</sub>- і β-казеїнів. Протеоліз κ-казеїну призводить до дестабілізації і коагуляції міцел. Така модель добре узгоджується і пояснює більшість відомих властивостей казеїнових міцел (роль κ-казеїну у стабілізації міцел, вихід β-казеїну з міцел при низьких температурах, закономірності протеолізу казеїну, характер зміни в'язкості казеїнових розчинів та ін.) [545].

Були також запропоновані моделі не пов'язані з субміцелярною будовою міцел. Хольт (С. Holt, 1994 р.) запропонував нанокластерну модель. Згідно з цією моделлю нанокластери кальційфосфату оточені казеїнами. Такі нанокластерні структури формують казеїнову міцелу. Ріст міцели завершується при взаємодії з κ-казеїном, який розташовується на її поверхні [226, 229, 230]. Хорн (D.S. Horne, 2014 р.) представив модель подвійних зв'язків [231]. Тут структура казеїнових міцел визначається балансом гідрофобних взаємодій і перехресних зв'язків між гідрофільними ділянками за участі колоїдного фосфату кальцію. Схематичні моделі казеїнових міцел показані на рис. 8.

#### 2.1.4 Біологічні функції казеїнів

Основною функцією казеїнів молока є забезпечення організму ссавців амінокислотами для пластичного обміну. Казеїни характеризуються високим ступенем збалансованості амінокислотного складу порівняно з, так званим, «ідеальним» харчовим протеїном. Деякий дефіцит сірковмісних амінокислот, очевидно, компенсується в процесі молочного живлення протеїнами сироватки молока [184, 229]. Функція забезпечення організму амінокислотами тісно пов'язана з міцелярною структурою казеїну, яка дозволяє:



**Рис. 8. Моделі казеїнових міцел:**

**А – субміцелярна модель [545]; Б – модель за Хольтом [226];**

**В – модель подвійних зв’язків [231]**

1. Здійснювати секрецію концентрованих розчинів протеїнів молочною залозою.

2. Високу доступність казеїнів до дії травних протеаз у нативному і денатурованому стані.

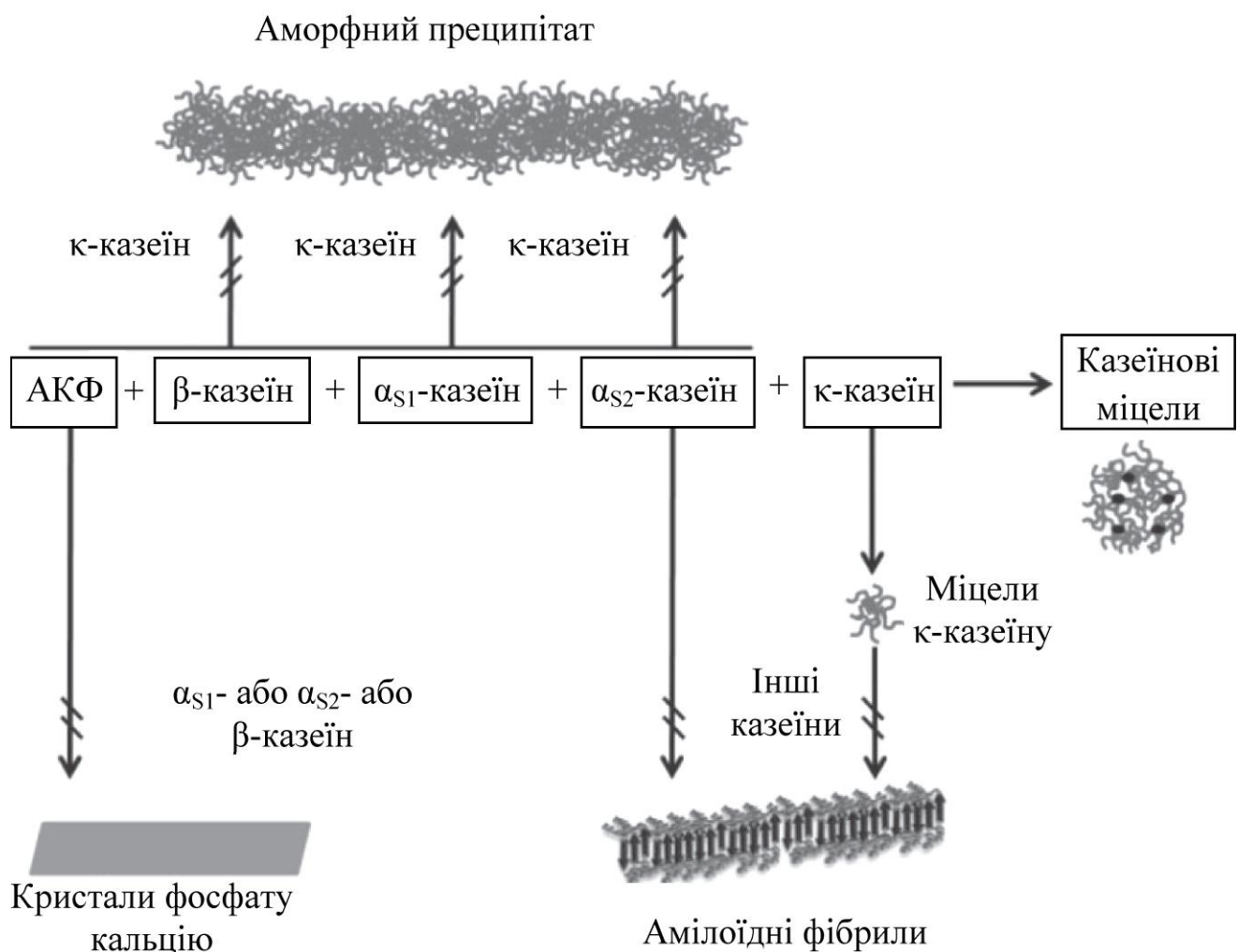
3. Коагулювати казеїн і затримувати в шлунку для кращого перетравлення за дії спеціального молокозсідального ензиму – хімозину [1].

Окрім амінокислотного живлення, казеїни відіграють важливу роль у забезпеченні організму мінеральними сполуками [226]. Казеїни є фосфопропротеїнами. Це дозволяє їм зв'язувати велику кількість іонів кальцію та інших необхідних металів ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ), при цьому казеїнові міцели не коагулюють. Також фосфосеринові групи казеїнів сприяють утворенню пористої структури в казеїнових міцелах і забезпечують їх доступність до дії протеаз шлунково-кишкового тракту. Доведено, що іони металів, які зв'язані з казеїнами, характеризуються підвищеною біодоступністю [94].

У молочній залозі казеїни проявляють біологічну активність, подібну до шаперонів [166, 518, 519]. Шаперони – це протеїни, які належать до родини протеїнів теплового шоку (Heat Stress Proteins – HSP). Вони контролюють правильність збірки (фолдинг) великих молекул протеїнів [10]. Казеїни у молочній залозі формують міцели, взаємодіючи між собою, і тим самим протидіють утворенню токсичних амілоїдних фібрил [234]. Формування міцел також протидіє кальцифікації тканин молочної залози. Особливості структури і взаємодії між окремими поліпептидними ланцюгами казеїнів визначають їх біологічну активність як шаперонів. Хольт (2013 р.) пояснює таку біологічну дію казеїнів виходячи зі своєї моделі казеїнових міцел (рис. 9) [229].

Серед казеїнів дві фракції ( $\alpha_{S2}$ - і  $\kappa$ -казеїни) можуть утворювати токсичні амілоїдні фібрили при фізіологічних значеннях температури і рН. Проте вони не утворюються у молочній залозі завдяки

альтернативному шляху формування міцел, де  $\alpha_{S1}$ - і  $\beta$ -казеїни діють як шаперони [153, 520]. Розміщення у міцелах нанокластерів аморфного фосфату кальцію є результатом сумісної дії кальцій-зв'язувальних  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ - і  $\beta$ -казеїнів. Ці казеїни запобігають утворенню кристалів кальцію фосфату, але можуть утворювати преципітати, в результаті взаємодії з фосфатом кальцію. В цьому процесі функцію шаперону виконує  $\kappa$ -казеїн, який протидіє утворенню преципітатів кальцій-зв'язувальних казеїнів.



**Рис. 9. Біологічна дія казеїнів як шаперонів при формуванні казеїнових міцел у молочній залозі за Хольтом (2013 р.)**



З проблемою амілоїдозу і кальцифікації Хольт пов'язує виникнення різних казеїнових фракцій в процесі еволюції ссавців. Очевидно, що сумісна секреція древніх  $\beta$ - і  $\kappa$ -казеїнів дозволяла формувати стабільні аморфні агрегати – попередники сучасних казеїнових міцел. Подальша диверсифікація  $\beta$ -казеїну з утворенням інших кальцій-зв'язувальних фракцій ( $\alpha_{S1}$ - і  $\alpha_{S2}$ - казеїни) дозволила синтез молока з вищою концентрацією протеїнів і фосфату кальцію без амілоїдозу і кальцифікації в молочній залозі [229].

В останні десятиріччя було відкрито регуляторну функцію казеїнів, яка реалізується через біоактивні продукти їх протеолізу. Це означає, що казеїни є попередниками вторинних біоактивних сполук молока. Показано, що біоактивні казеїнові пептиди можуть впливати на різні системи організму (травну, серцево-судинну, нервову, імунну) [24, 184, 359]. На сьогодні уже відомо сотні біоактивних казеїнових пептидів. Їх біологічне значення і можливі шляхи використання у функціональному і профілактичному харчуванні інтенсивно вивчаються. Відкриття біоактивних казеїнових пептидів вимагає переосмислення поняття біологічної цінності харчових протеїнів. Детально біоактивні пептиди казеїнового походження будуть розглянуті у третьому розділі.

## 2.2 Протеїни сироватки молока

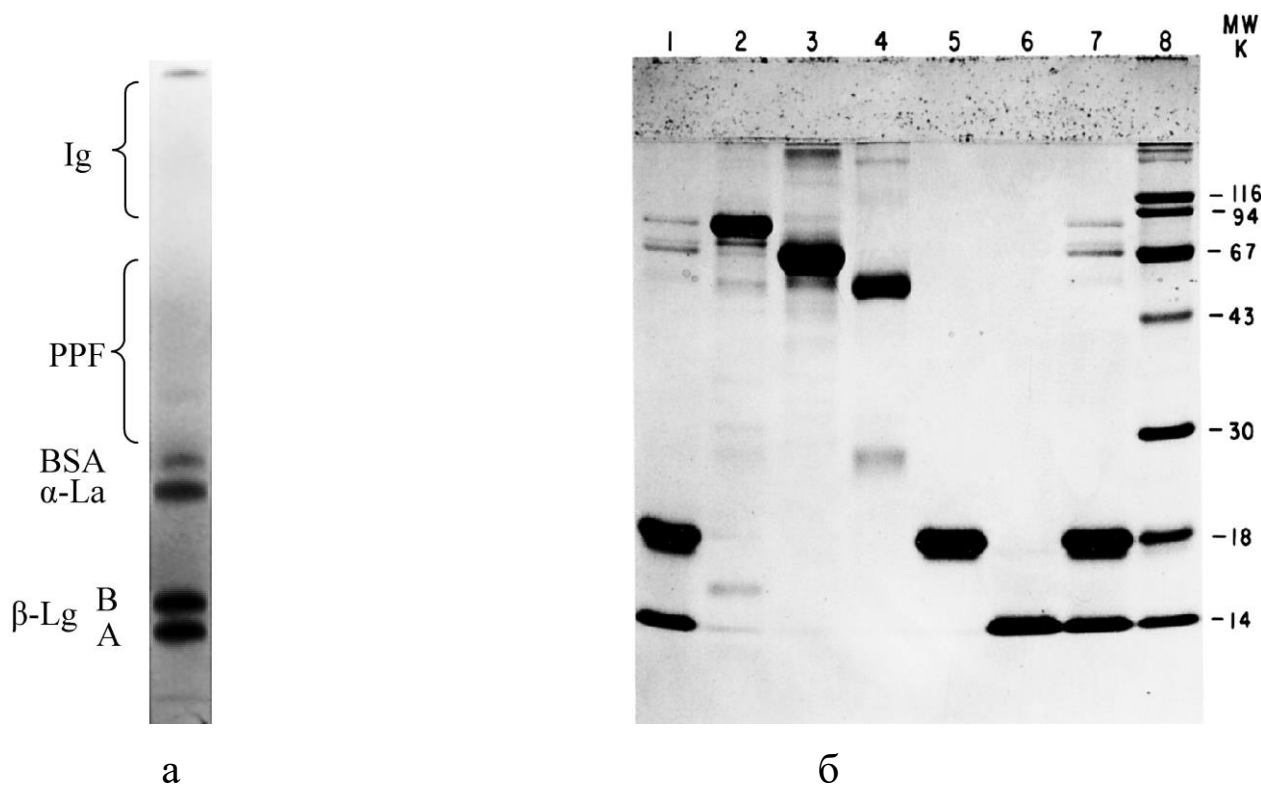
### 2.2.1 Класифікація і номенклатура

До протеїнів сироватки молока відноситься група протеїнів (близько 20 % від загального протеїну молока), яка залишається у молочній сироватці після осадження казеїнів при значенні рН 4,6 і температурі 20 °С [167]. У сироватці молока, окрім протеїнів, є багато низькомолекулярних сполук: лактоза, солі, пептиди, вітаміни та ін. Тому для отримання очищеного препарату протеїнів сироватки необхідно провести діаліз сироватки молока.

Ще в 1890 році шляхом диференційного осадження солями ( $MgSO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ) було встановлено, що протеїни сироватки є гетерогенні і складаються з декількох фракцій. У тридцятих роках минулого сторіччя були виділені окремі очищені фракції цих протеїнів і отримані їх кристали [388]. У наш час для виділення гомогенних протеїнів сироватки в лабораторних умовах найчастіше використовують іонообмінну хроматографію на DEAE – целюлозі [184, 237].

Головними фракціями протеїнів сироватки молока є:  $\beta$ -лактоглобулін ( $\beta$ -Lg, ~50% від усіх протеїнів сироватки),  $\alpha$ -лактальбумін ( $\alpha$ -La, ~20%), альбумін сироватки крові (BSA, ~10%), імуноглобуліни (Ig, ~14%). Також у кількостях менше 1% від усіх протеїнів сироватки присутні лактоферин (Lf) і секреторний компонент (SC) [144, 167]. Для ідентифікації протеїнів сироватки молока і їх генетичних варіантів використовують різні електрофоретичні системи (диск-електрофорез із додецилсульфатом натрію, нативний диск-електрофорез) [34, 78, 479, 580]. На рис. 10 показано результат аналізу протеїнів сироватки молока за використання двох електрофоретичних систем.

Протеїни та інші азотовмісні сполуки сироватки молока поділяються на три групи: протеїни сироватки чутливі до нагрівання ( $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La, BSA, лактоферин, Ig та ін.); протеозо-пептонна фракція (ППФ) і непротеїнові азотовмісні сполуки (амінокислоти, сечовина, креатин, креатинін та ін.) [388]. Після нагрівання сироватки молока до 90-100 °С протягом 20-30 хвилин і відділення денатурованих термочутливих протеїнів першої групи у розчині залишаються ППФ і непротеїнові азотовмісні сполуки. Далі для осадження ППФ додають ТХО до концентрації 12 %. У розчині при цьому залишаються непротеїнові азотовмісні сполуки. ППФ містить близько 10 % азоту, що входить до складу протеїнів, пептидів та інших азотовмісних сполук [184]. За своїм походженням частина компонентів ППФ



**Рис. 10. Електрофореграми протеїнів сироватки молока:**

**а) нативний диск-електрофорез в ПАГ [34];**

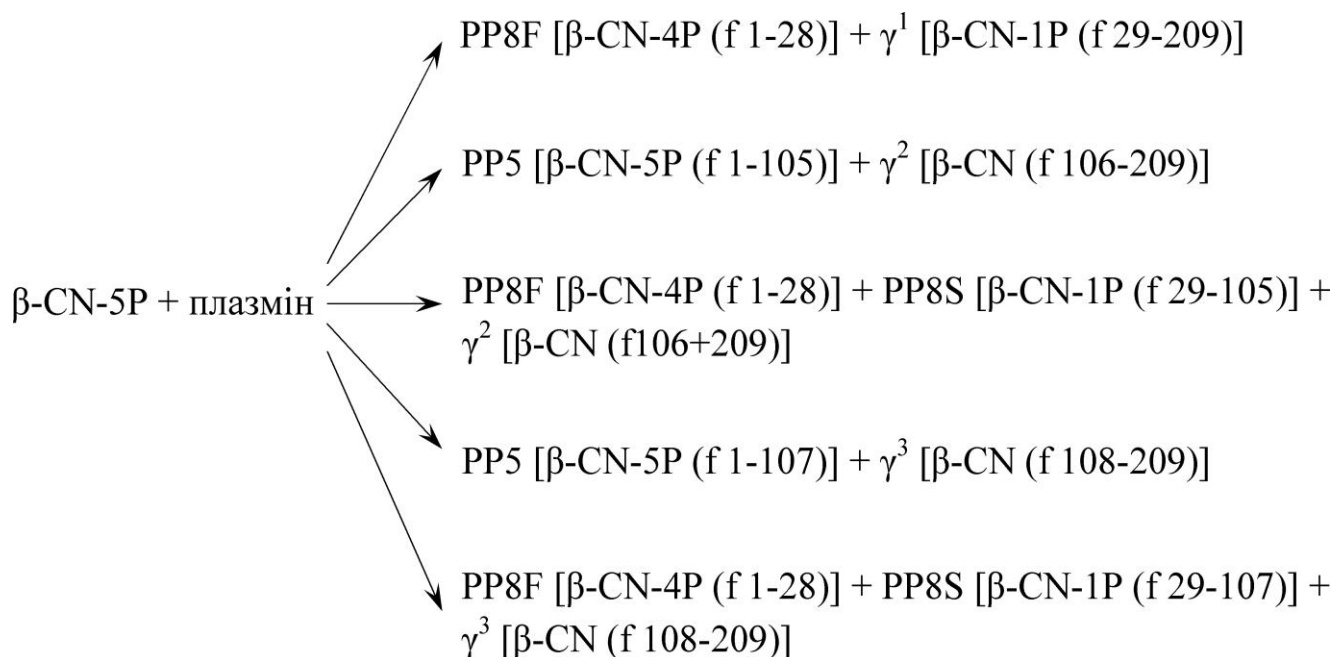
**б) диск-електрофорез в присутності ДСН: 1 – діалізована сироватка (рН 4,6);**

**2 – лактоферин; 3 – BSA; 4 – Ig G; 5 –  $\beta$ -Lg; 6 –  $\alpha$ -La;**

**7 – діалізована сироватка (рН 4,6); 8 – стандартні очищені протеїни [78]**

утворюється під час протеолізу казеїнових фракцій ( $\alpha_{S1}$ -CN,  $\alpha_{S2}$ -CN,  $\beta$ -CN) природною протеазою молока – плазміном. На сьогодні продукти протеолізу  $\beta$ -казеїну ідентифіковані. Вони утворюються одночасно із  $\gamma$ -казеїнами та названі за електрофоретичною рухливістю: PP5, PP8 повільний (PP8S), PP8 швидкий (PP8F). PP8F і PP8S існують у двох варіантах. Шляхи утворення цих пептидів показано на рис. 11.

Окрім продуктів протеолізу казеїнів у сироватці молока присутня велика кількість інших пептидів, а також мінорних фракцій протеїнів. У багатьох випадках їхня будова, властивості і функції не встановлені [54, 134, 353].



**Рис. 11. Схема утворення компонентів протеозо-пептонної фракції внаслідок дії плазміну на  $\beta$ -казеїн**

### 2.2.2 Будова, властивості і біологічні функції протеїнів сироватки молока

Протеїни сироватки молока суттєво відрізняються від казеїнів. Для них характерна більша різноманітність. Всі вони відносяться до глобулярних протеїнів, не осаджуються у своїх ізоелектричних точках і в присутності іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , не утворюють складних надмолекулярних структур, не стійкі до нагрівання [91]. В основних фракціях протеїнів сироватки молока міститься велика кількість сірковмісних амінокислот, мало проліну і відсутні олігосахаридні та ортофосфатні групи [184]. На відміну від казеїнів з основних протеїнів сироватки лише  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg і Lf синтезуються в клітинах молочної залози. Інші протеїни потрапляють у молоко із крові [18, 19].

Властивості основних протеїнів сироватки (без імуноглобулінів) наведені в табл. 14.

**Таблиця 14. Властивості протеїнів сироватки молока [167]**

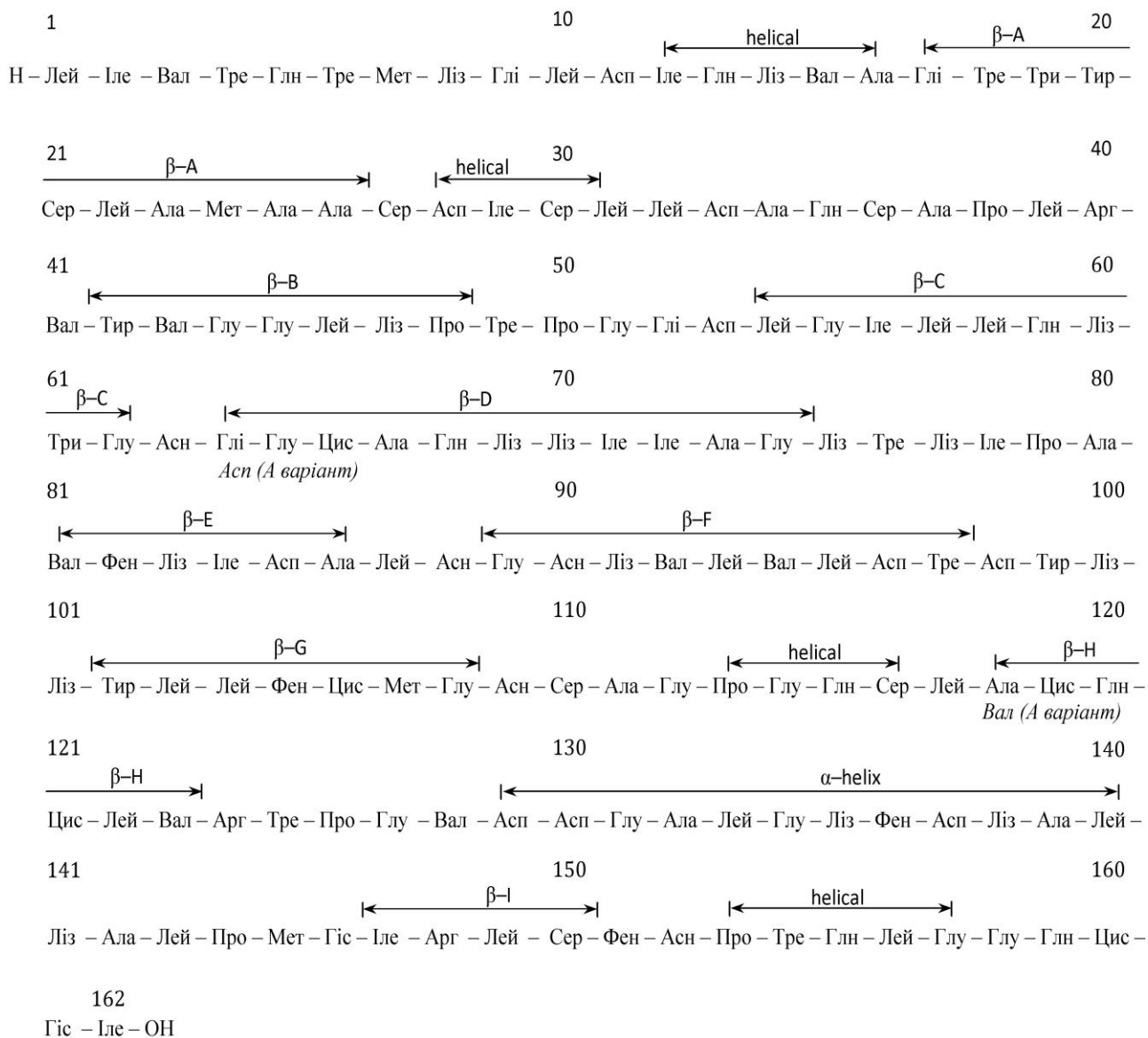
Назва показника	Фракції протеїнів сироватки молока				
	$\beta$ -лактоглобулін ( $\beta$ -Lg)	$\alpha$ - лакталь- бумін ( $\alpha$ -La)	Альбумін сироватки крові (SA або BSA)	Лакто- ферин (Lf)	
Вміст у знежиреному молоці, г/л	2-4		0,6-1,7	0,4	0,02-0,1
Генетичний варіант	А	В	В	А	
Молекулярна маса, Да	18 363	18 277	14 178	66 399	76 110
Ізоіонна точка	5,35	5,41		5,13	8,95
Ізоелектрична точка	5,13	5,13	4,2-4,5	4,7-4,9	8,81
$D_{\%}^1$ $\lambda = 280$ нм $l = 1$ см	9,6	10,0 9,6	20,1-20,9	6,3-6,9	9,91
Константа седиментації, S, в одиницях Свєрдберга ( $10^{-13}$ сек)	2,7		1,98 1,87 1,92	4,0 5,01	
Середня гідрофобність, ккал/залишок	1211	1217	1210	1120	1053

### 2.2.2.1 $\beta$ -Лактоглобулін

$\beta$ -Лактоглобулін найбільш поширений протеїн сироватки молока. Існує у тринадцяти генетичних варіантах, з яких найчастіше зустрічаються А і В у молоці різних порід корів. Варіант В складається зі 162 амінокислот: Асп<sub>10</sub>, Асн<sub>5</sub>, Тре<sub>8</sub>, Сер<sub>7</sub>, Глу<sub>16</sub>, Глн<sub>9</sub>, Про<sub>8</sub>, Глі<sub>4</sub>, Ала<sub>15</sub>, Цис<sub>5</sub>, Вал<sub>9</sub>, Мет<sub>4</sub>, Іле<sub>10</sub>, Лей<sub>22</sub>, Тир<sub>4</sub>, Фен<sub>4</sub>, Ліз<sub>15</sub>, Гіс<sub>2</sub>, Три<sub>2</sub> і Арг<sub>3</sub> [167]. Два дисульфідні зв'язки між цистеїнами утворюють Цис<sub>66</sub> + Цис<sub>160</sub> і Цис<sub>106</sub> + Цис<sub>119</sub>. Вільна тіолова група Цис<sub>121</sub> може взаємодіяти з цистеїнами к-казеїну, що відображається на

стійкості до нагрівання і здатності до ензимної коагуляції казеїнових міцел [144].

Первинна структура  $\beta$ -лактоглобуліну (генетичні варіанти А і В) показана на рис. 12.

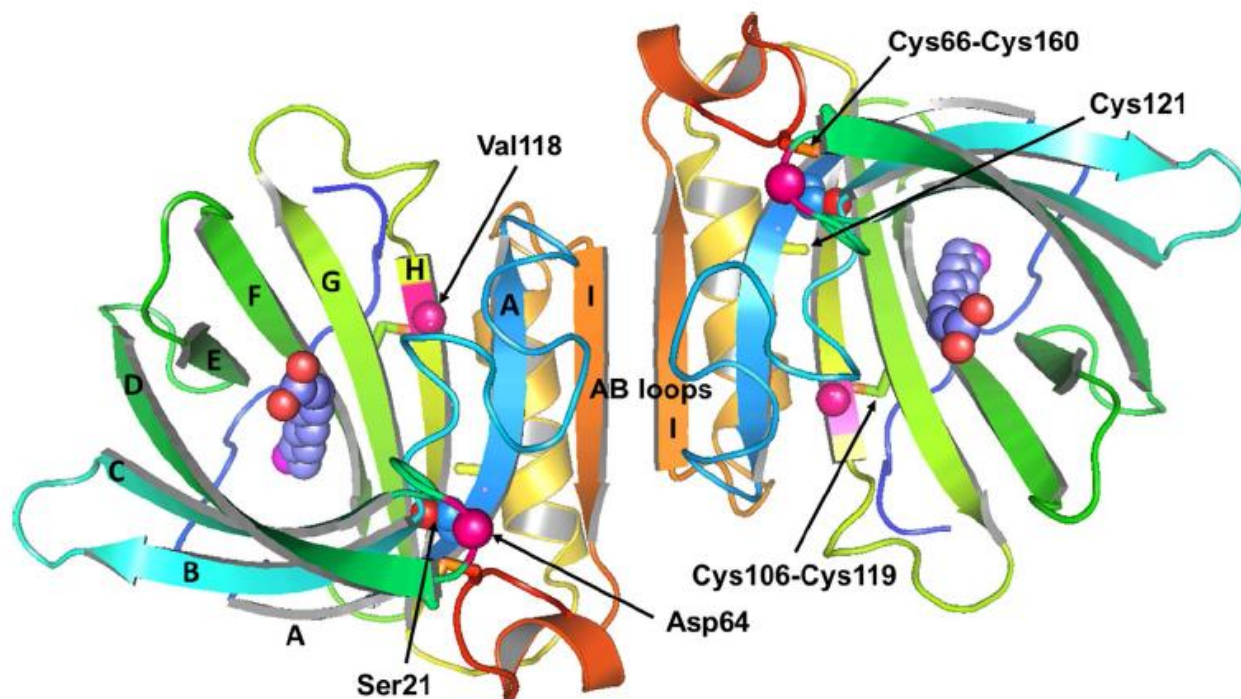


**Рис. 12. Первинна структура  $\beta$ -лактоглобуліну В.**  
 Заміни амінокислотних залишків у генетичному варіанті А  
 подані під основною послідовністю [167]

$\beta$ -Лактоглобулін належить до типових глобулярних протеїнів. Це був один із перших протеїнів, з розчинів яких отримані кристали і пізніше методом рентгеноструктурного аналізу встановлена просторова структура. Вторинна структура  $\beta$ -Lg представлена переважно ділянками  $\beta$ -структури (~45 %), а також  $\alpha$ -спіралі (~8 %). Молекула  $\beta$ -Lg компактно укладена у глобулу діаметром ~3,6 нм (рис. 13) [154].

Залежно від рН  $\beta$ -Lg в розчині існує як мономер ( $3,5 < \text{pH} < 7,5$ ), октамер (рН 3,5-5,5) або димер (рН 5,5-7,5). Димери формуються лише з однакових генетичних варіантів – або 2А або 2В. В утворенні третинної і четвертинної структури важливу роль відіграють вільні сульфгідрильні групи, а також гідрофобні взаємодії [337, 471].

За амінокислотним складом  $\beta$ -Lg можна віднести до цінних харчових протеїнів. Проте наявність інших важливих біологічних функцій вказує його стійкість до травних протеаз, зокрема, пепсину. Остаточні біологічні функції  $\beta$ -Lg не встановлені [206, 386]. Очевидно, біологічна дія  $\beta$ -Lg полягає у переносі вітаміну А (ретинолу) до тонкого кишечника, де він передається на ретинолзв'язувальний протеїн. Така функція  $\beta$ -Lg може бути важливою, оскільки відомо, що ретинол є модулятором диференціації клітин [388]. Структурно ця функція забезпечується наявністю у молекулі  $\beta$ -Lg гідрофобної порожнини. Окрім вітаміну А він може зв'язувати вітамін D, жирні кислоти та інші гідрофобні молекули. Саме завдяки зв'язуванню жирних кислот  $\beta$ -Lg підвищує ліпазну активність. Також в останні роки серед продуктів протеолізу  $\beta$ -Lg виявлено багато біоактивних пептидів [25, 359, 536]. У молоці людини  $\beta$ -Lg відсутній. Очевидно, тому він є одним з найбільш алергенних протеїнів коров'ячого молока для немовлят [155].



**Рис. 13. Структура димеру  $\beta$ -Lg A молока корови [154]**

#### 2.2.2.2 $\alpha$ -Лактальбумін

Другим важливим протеїном сироватки молока є  $\alpha$ -лактальбумін. У коров'ячому молоці найчастіше зустрічається один генетичний варіант  $\alpha$ -альбуміну – В.  $\alpha$ -La В складається з 123 амінокислот: Ала<sub>3</sub>, Арг<sub>1</sub>, Асн<sub>8</sub>, Асп<sub>13</sub>, Цис<sub>8</sub>, Глн<sub>6</sub>, Глу<sub>7</sub>, Глі<sub>6</sub>, Гіс<sub>3</sub>, Іле<sub>8</sub>, Лей<sub>13</sub>, Ліз<sub>12</sub>, Мет<sub>1</sub>, Фен<sub>4</sub>, Про<sub>2</sub>, Сер<sub>7</sub>, Тре<sub>7</sub>, Три<sub>4</sub>, Тир<sub>4</sub>, Вал<sub>6</sub> [167].

Характерним для амінокислотного складу є вісім залишків цистеїну і велика кількість незамінних амінокислот (63,2 %) [144]. Також наявність чотирьох залишків триптофану спричиняє високий рівень поглинання розчинів  $\alpha$ -La при 280 нм ( $D_{1\text{ см}}^{1\%} \sim 20$ ) [325]. Послідовність амінокислот  $\alpha$ -La В корови на 72 % збігається з аналогічним протеїном молока людини. Вважають, що ця фракція є цінною для виробництва замінників жіночого молока, оскільки в молоці людини  $\alpha$ -La є основним протеїном сироватки [249].

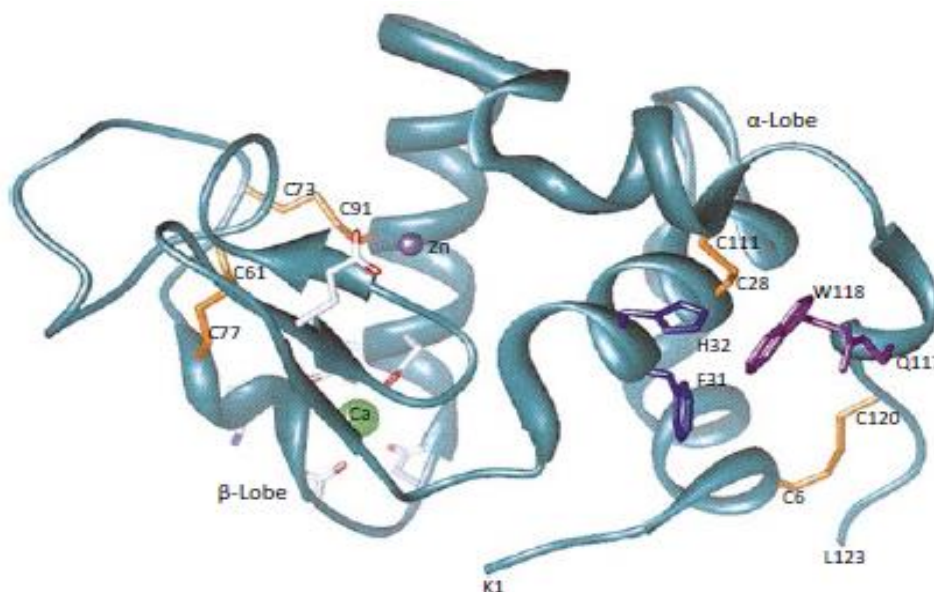


Первинна структура  $\alpha$ -La В представлена на рис. 14. Важливою особливістю первинної структури є її подібність до послідовності амінокислот у лізоцимів. Зокрема, 54 амінокислотні залишки ідентичні до амінокислотних залишків лізоциму курячого яйця, а у 23 положеннях відбулася заміна на подібну за властивостями амінокислоту [101]. Також важливу роль відіграють кластери залишків аспарагінової кислоти, які утворюють структуру для зв'язування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  (Асп<sub>82</sub>, Асп<sub>84</sub>, Асп<sub>87</sub> і Асп<sub>88</sub>). Ця структура інваріантна у різних  $\alpha$ -La і лізоцимів [154].

1	10	20
Н – Глу – Глн – Лей – Тре – Ліз – Цис – Глу – Вал – Фен – Арг – Глу – Лей – Ліз – Асп – Лей – Ліз – Глі – Тир – Глі – Глі – Глу (А варіант)		
21	30	40
Вал – Сер – Лей – Про – Глу – Три – Вал – Цис – Тре – Тре – Фен – Гіс – Тре – Сер – Глі – Тир – Асп – Тре – Глн – Ала –		
41	50	60
Іле – Вал – Глн – Асн – Асн – Асп – Сер – Тре – Глу – Тир – Глі – Лей – Фен – Глн – Іле – Асн – Асн – Ліз – Іле – Три –		
61	70	80
Цис – Ліз – Асп – Асп – Глн – Асн – Про – Гіс – Сер – Сер – Асн – Іле – Цис – Асн – Іле – Сер – Цис – Асп – Ліз – Фен –		
81	90	100
Лей – Асп – Асп – Асп – Лей – Тре – Асп – Асп – Іле – Мет – Цис – Вал – Ліз – Ліз – Іле – Лей – Асп – Ліз – Вал – Глі –		
101	110	120
Іле – Асн – Тир – Три – Лей – Ала – Гіс – Ліз – Ала – Лей – Цис – Сер – Глу – Ліз – Лей – Асп – Глн – Три – Лей – Цис –		
121		
Глу – Ліз – Лей – ОН		

**Рис. 14. Первинна структура  $\alpha$ -лактальбуміну В [167]**

$\alpha$ -La є типовим глобулярним протеїном ( $2,3 \times 2,6 \times 4,0$  нм). У молекулі  $\alpha$ -La 26 % амінокислотних залишків представлені у вигляді  $\alpha$ -спіралі, а 14 % – у вигляді  $\beta$ -структури [100]. Третинна структура  $\alpha$ -La (рис. 15) подібна до третинної структури лізоциму.



**Рис. 15. Просторова структура  $\alpha$ -La людини у комплексі з іонами  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Zn}^{2+}$  [101]**

Біологічні функції  $\alpha$ -La:

1. Участь у синтезі лактози [100].

$\alpha$ -La взаємодіє з  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферазою у ємностях комплексу Гольджі епітеліальних клітин молочної залози. При цьому формується лактозо-синтетазний комплекс, у якому роль  $\alpha$ -La полягає у зміні субстратної специфічності  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферази. В результаті відбувається синтез лактози з глюкози і уридиндифосфат-галактози (УДФ-галактози). За відсутності  $\beta$ -La цей ензим бере участь у синтезі глікопротеїнів і гліколіпідів. Регуляторна дія  $\alpha$ -La у синтезі лактози була підтверджена на мишах, у яких були відсутні функціональні гени  $\alpha$ -La. В результаті молоко таких мишей не містило лактози і мало аномально високу в'язкість.

2. Перенос іонів  $\text{Ca}^{2+}$  [91].

$\alpha$ -La відноситься до металопротеїнів. Його молекула може зв'язувати два іони  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Zn}^{2+}$  з допомогою кластерів залишків аспарагінової кислоти. У комплексі з  $\text{Ca}^{2+}$  (моль/моль)  $\alpha$ -La відновлюється після теплової денатурації. При значеннях  $\text{pH} < 5,0$

залишки аспарагінової кислоти протонуються і  $\alpha$ -La втрачає здатність зв'язувати  $\text{Ca}^{2+}$  та легко денатурує при нагріванні. Ця властивість використовується при виділенні  $\alpha$ -La з сироватки молока

### 3. Апоптоз ракових клітин [118].

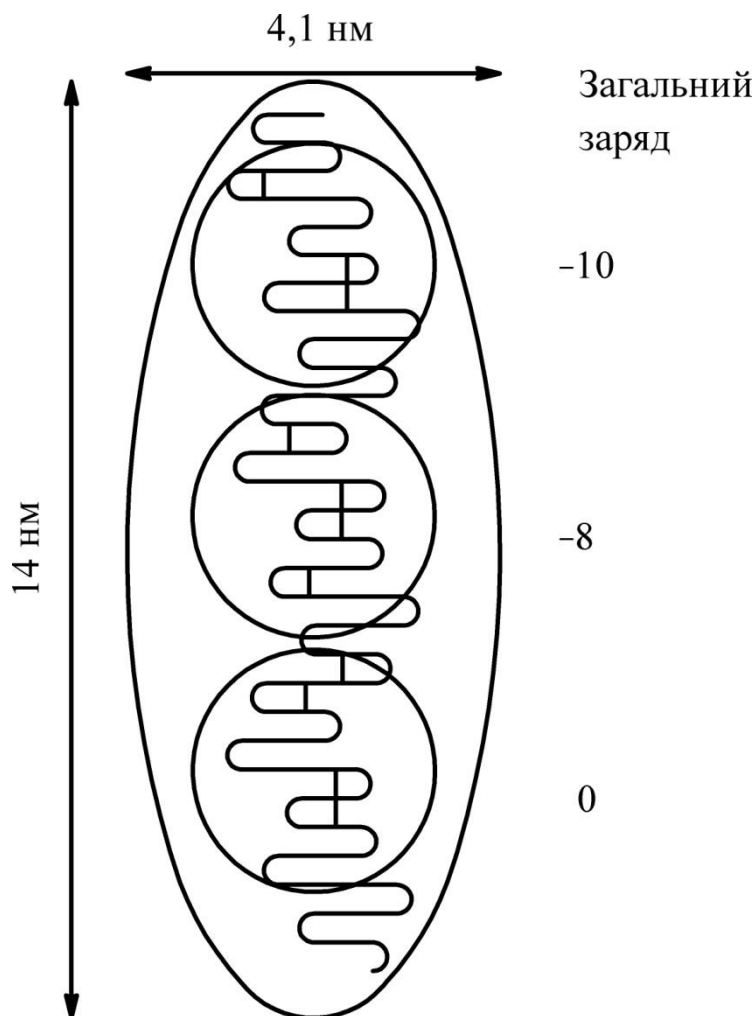
$\alpha$ -La людини і корови утворюють комплекси з олеїною кислотою. Такі комплекси, утворені за певних контрольованих умов, здатні проникати в ракові клітини і активувати апоптоз цих клітин. Апоптоз – це запрограмована смерть клітин, що супроводжується активацією спеціальних протеолітичних ензимів нелізосомного походження – каспаз [22, 593]. Каспази здатні розщеплювати внутрішньоклітинні протеїни. Апоптоз може супроводжуватися фрагментацією клітини або конденсацією її органел, що призводить до самознищення клітини. Комплекси  $\alpha$ -La людини і корови з олеїною кислотою називаються, відповідно, HAMLET (Human  $\alpha$ -La Made Lethal to Tumor cells) і BAMLET (Bovine  $\alpha$ -La Made Lethal to Tumor cells). Ці комплекси (аро- $\alpha$ -La) є цитотоксичними для різних ліній ракових клітин і є перспективними функціональними інгредієнтами [102].

4.  $\alpha$ -La є попередником різних видів біологічно активних пептидів [25, 359, 536].

### 2.2.2.3 Альбумін сироватки крові

Альбумін сироватки крові – BSA (blood serum albumin; bovine serum albumin) або просто SA (serum albumin) у великій кількості присутній у крові, а також знайдений в інших тканинах організму. Невелика кількість BSA також потрапляє з крові у молоко (0,1-0,4 г/л) [184]. BSA молока корови складається з 583 амінокислотних залишків: Ала<sub>47</sub>, Агр<sub>23</sub>, Асн<sub>14</sub>, Асп<sub>40</sub>, Цис<sub>35</sub>, Глн<sub>20</sub>, Глу<sub>59</sub>, Глі<sub>16</sub>, Гіс<sub>17</sub>, Іле<sub>14</sub>, Лей<sub>61</sub>, Ліз<sub>59</sub>, Мет<sub>4</sub>, Фен<sub>27</sub>, Про<sub>28</sub>, Сер<sub>28</sub>, Тре<sub>33</sub>, Три<sub>2</sub>, Тир<sub>20</sub>, Вал<sub>36</sub>. Молекулярна маса становить 66 399 Да [167]. Молекула стабілізується 17-ма дисульфідними зв'язками, має еліпсоїдну форму і

умовно ділиться на три домени (рис. 16). Кожен домен складається з багатьох малих петель, які фіксуються дисульфідними зв'язками. Як важливий протеїн крові BSA досить детально вивчений. На рис. 17 показана первинна структура BSA.



**Рис. 16. Модель молекули BSA [184]**

Для альбуміну сироватки крові встановлені наступні функції:

1. Регуляція осмотичного тиску крові.
2. Транспорт води з тканин.
3. Підтримування постійного значення рН (буферна функція).
4. Транспорт гормонів, жирних кислот та інших молекул.
5. Зв'язування іонів  $\text{Ca}^{2+}$ .

У молоко BSA потрапляє з крові та не має великого значення через малу кількість. Окрім того, не зовсім зрозуміло, які з його біологічних функцій є специфічними для молока і молочного живлення. Можливо, зв'язуючи іони металів і жирні кислоти, він протидіє стимулюванню ними активності ліпази [388]. Також БСА є попередником деяких біоактивних пептидів [25].

1	10	20
Н – Асп – Тре – Гіс – Ліз – Сер – Глу – Іле – Ала – Гіс – Арг – Фен – Ліз – Асп – Лей – Глі – Глу – Глу – Гіс – Фен – Ліз –		
21	30	40
Глі – Лей – Вал – Лей – Іле – Ала – Фен – Сер – Глн – Тир – Лей – Глн – Глн – Цис – Про – Фен – Асп – Глу – Гіс – Вал –		
41	50	60
Ліз – Лей – Вал – Асп – Глу – Лей – Тре – Глу – Фен – Ала – Ліз – Тре – Цис – Вал – Ала – Асп – Глу – Сер – Гіс – Ала –		
61	70	80
Глі – Цис – Глу – Ліз – Сер – Лей – Гіс – Тре – Лей – Фен – Глі – Асп – Глу – Лей – Цис – Ліз – Вал – Ала – Сер – Лей –		
81	90	100
Арг – Глу – Тре – Тир – Глі – Асп – Мет – Ала – Асп – Цис – Цис – Глу – Ліз – Глн – Глу – Про – Глу – Арг – Асп – Глу –		
101	110	120
Цис – Фен – Лей – Сер – Гіс – Ліз – Асп – Асп – Сер – Про – Асп – Лей – Про – Ліз – Лей – Ліз – Про – Асп – Про – Асп –		
121	130	140
Тре – Лей – Цис – Асп – Глу – Фен – Ліз – Ала – Асп – Глу – Ліз – Ліз – Фен – Три – Глі – Ліз – Тир – Лей – Тир – Глу –		
141	150	160
Іле – Ала – Арг – Арг – Гіс – Про – Тир – Фен – Тир – Ала – Про – Глу – Лей – Лей – Тир – Тир – Ала – Асп – Ліз – Тир –		
161	170	180
Асп – Глі – Вал – Фен – Глн – Глу – Цис – Цис – Глн – Ала – Глу – Асп – Ліз – Глі – Ала – Цис – Лей – Лей – Про – Ліз –		
181	190	200
Іле – Глу – Тре – Мет – Арг – Глу – Ліз – Вал – Лей – Ала – Сер – Сер – Ала – Арг – Глн – Арг – Лей – Арг – Цис – Ала –		
201	210	220
Сер – Іле – Глн – Ліз – Фен – Глі – Глу – Арг – Ала – Лей – Ліз – Ала – Три – Сер – Вал – Ала – Арг – Лей – Сер – Глн –		
221	230	240
Ліз – Фен – Про – Ліз – Ала – Глу – Фен – Вал – Глу – Вал – Тре – Ліз – Лей – Вал – Тре – Асп – Лей – Тре – Ліз – Вал –		
241	250	260
Гіс – Ліз – Глу – Цис – Цис – Гіс – Глі – Асп – Лей – Лей – Глу – Цис – Ала – Асп – Асп – Арг – Ала – Асп – Лей – Ала –		
261	270	280
Ліз – Тир – Іле – Цис – Асп – Асп – Глн – Асп – Тре – Іле – Сер – Сер – Ліз – Лей – Ліз – Глу – Цис – Цис – Асп – Ліз –		
281	290	300
Про – Лей – Лей – Глу – Ліз – Сер – Гіс – Цис – Іле – Ала – Глу – Вал – Глу – Ліз – Асп – Ала – Іле – Про – Глу – Асп –		
301	310	320
Лей – Про – Про – Лей – Тре – Ала – Асп – Фен – Ала – Глу – Асп – Ліз – Асп – Вал – Цис – Ліз – Асп – Тир – Глн – Глу –		
321	330	340
Ала – Ліз – Асп – Ала – Фен – Лей – Глі – Сер – Фен – Лей – Тир – Глу – Тир – Сер – Арг – Арг – Гіс – Про – Глу – Тир –		
341	350	360
Ала – Вал – Сер – Вал – Лей – Лей – Арг – Лей – Ала – Ліз – Глу – Тир – Глу – Ала – Тре – Лей – Глу – Глу – Цис – Цис –		

**Рис. 17. Первинна структура альбуміну сироватки крові [167]**  
(продовження на наступній сторінці)

361	370	380
Ала – Ліз – Асп – Асп – Про – Гіс – Ала – Цис – Тир – Сер – Тре – Вал – Фен – Асп – Ліз – Лей – Ліз – Гіс – Лей – Вал –		
381	390	400
Асп – Глу – Про – Глн – Асн – Лей – Іле – Ліз – Глн – Асн – Цис – Асп – Глн – Фен – Глу – Ліз – Лей – Глі – Глу – Тир –		
401	410	420
Глі – Фен – Глн – Асн – Ала – Лей – Іле – Вал – Арг – Тир – Тре – Арг – Ліз – Вал – Про – Глн – Вал – Сер – Тре – Про		
421	430	440
Тре – Лей – Вал – Глу – Вал – Сер – Арг – Сер – Лей – Глі – Ліз – Вал – Глі – Тре – Арг – Цис – Цис – Тре – Ліз – Про –		
441	450	460
Глу – Сер – Глу – Арг – Мет – Про – Цис – Тре – Глу – Асп – Тир – Лей – Сер – Лей – Іле – Лей – Асн – Арг – Лей – Цис –		
461	470	480
Вал – Лей – Гіс – Глу – Ліз – Тре – Про – Вал – Сер – Глу – Ліз – Вал – Тре – Ліз – Цис – Цис – Тре – Глу – Сер – Лей –		
481	490	500
Вал – Асн – Арг – Арг – Про – Цис – Фен – Сер – Ала – Лей – Тре – Про – Асп – Глу – Тре – Тир – Вал – Про – Ліз – Ала –		
501	510	520
Фен – Асп – Глу – Ліз – Лей – Фен – Тре – Фен – Гіс – Ала – Асп – Іле – Цис – Тре – Лей – Про – Асп – Тре – Глу – Ліз –		
521	530	540
Глн – Іле – Ліз – Ліз – Глн – Тре – Ала – Лей – Вал – Глу – Лей – Лей – Ліз – Гіс – Ліз – Про – Ліз – Ала – Тре – Глу		
541	550	560
Глу – Глн – Лей – Ліз – Тре – Вал – Мет – Глу – Асн – Фен – Вал – Ала – Фен – Вал – Асп – Ліз – Цис – Цис – Ала – Ала		
561	570	580
Асп – Асп – Ліз – Глу – Ала – Цис – Фен – Ала – Вал – Глу – Глі – Про – Ліз – Лей – Вал – Вал – Сер – Тре – Глн – Тре –		
581	583	
Ала – Лей – Ала – ОН		

**Рис. 17. Первинна структура альбуміну сироватки крові [167] (закінчення)**

### 2.2.2.4 Імуноглобуліни

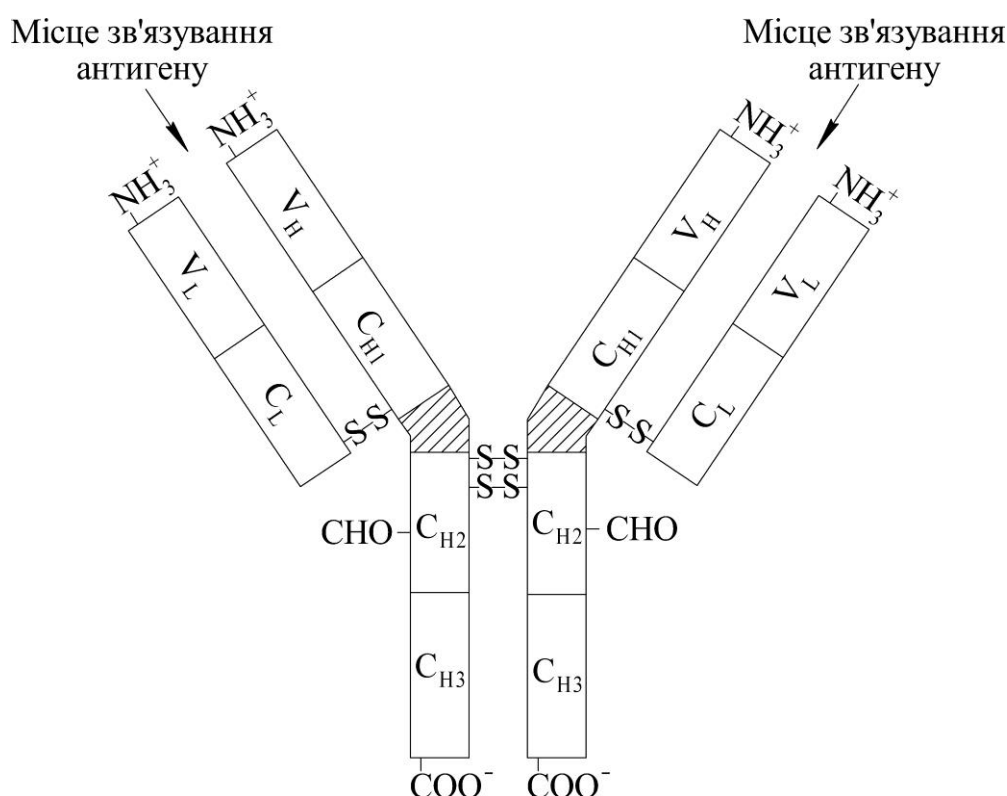
Імуноглобуліни або антитіла – це глікопротеїни, які є основною частиною гуморального імунітету і здатні до специфічного зв’язування з антигенами. Вони синтезуються спеціальними клітинами – В-лімфоцитами, які дозрівають у кістковому мозку. Далі більшість імуноглобулінів потрапляє у кров або лімфу, а частина їх залишається на поверхні В-лімфоцитів і виконує роль рецепторів для антигенів [23]. До антигенів відносяться різні чужорідні агенти, від яких захищається організм (бактерії, мікроскопічні гриби, віруси, великі молекули). Чужорідність молекул визначається їх подібністю до аналогічних молекул в організмі, який продукує антитіла. На свої молекули організм антитіла в нормальних умовах не виробляє.

Відомо, що низькомолекулярні сполуки (до 1000 Да) також не індукують імунну відповідь, тобто є неімуногенними. Малоімуногенні молекули з масою від 1000 до 6000 Да. Високою імуногенністю характеризуються молекули з масою понад 6000 Да. За хімічною природою найбільш імуногенними є чужорідні протеїни. Вуглеводи, ліпіди і нуклеїнові кислоти є імуногенними, як правило, у комплексі з протеїнами [10, 105].

Імунна відповідь здійснюється в результаті контакту чужорідного антигену з В-лімфоцитом. Рецепторний імуноглобулін на поверхні В-лімфоциту розпізнає антиген. В результаті клітина В-лімфоциту активізується, ділиться і утворює клон плазматичних клітин. Плазматичні клітини є кінцевим результатом диференціації В-лімфоцитів і здатні продукувати велику кількість відповідних імуноглобулінів. Імуноглобуліни зв'язують чужорідний антиген і знешкоджують його. Важливо відзначити, що кожен В-лімфоцит має на поверхні імуноглобуліни, які специфічно розпізнають лише один антиген [23].

Молекули імуноглобуліну мають складну четвертинну структуру. Вони складаються з двох легких поліпептидних ланцюгів (L або light) і двох важких (H або heavy), які з'єднані між собою дисульфідними зв'язками. Легкі ланцюги бувають двох типів –  $\kappa$  і  $\lambda$  (діапазон молекулярних мас від 22500 до 27300 Да), а важкі ланцюги – п'яти типів –  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  (діапазон молекулярних мас від 55000 до 76000 Да). Схематично молекулу імуноглобуліну можна представити, як показано на рис.18. Кожен важкий ланцюг складається з константної ділянки (3 домени –  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ) і варіабельної (1 домен –  $V_H$ ). Легкий ланцюг буває двох типів ( $\lambda$  і  $\kappa$ ), які відрізняються первинною структурою і включають по одній константній (1 домен –  $C_L$ ) і варіабельній ділянці ( $V_L$ ). Варіабельні ділянки важких і легких ланцюгів об'єднуються і формують два антиген-зв'язувальні сайти [307].

Сучасні дослідження показали, що константні і варіабельні домени важких і легких ланцюгів молекули імуноглобуліну на рівні ДНК кодуються багатьма сегментами і є мультигенними. Комбінація цих сегментів і генів в процесі біосинтезу може дати до  $10^{12}$  різних молекул імуноглобулінів, які будуть відрізнятися за своєю специфічністю до антигенів.



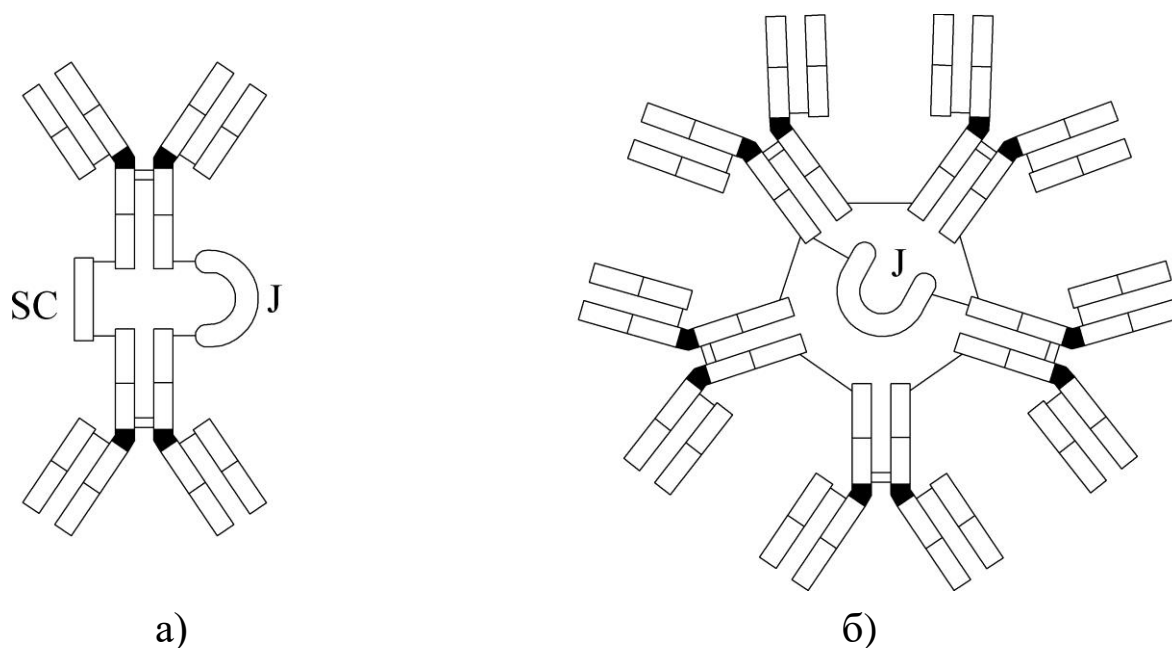
**Рис. 18. Будова молекули імуноглобуліну Ig G:**

**H – важкий ланцюг; L – легкий ланцюг; V – варіабельні ділянки важких ( $V_H$ ) і легких ( $V_L$ ) ланцюгів; C – константні ділянки важких ( $C_H$ ) і легких ( $C_L$ ) ланцюгів; CHO – вуглеводна група; шарнірна ділянка заштрихована (адаптовано за Fox et al., 2015)**

Імуноглобуліни за типом важкого ланцюга поділяють на п'ять класів: Ig A, Ig G, Ig M, Ig D, Ig E. У молоці корів знайдено імуноглобуліни Ig G, Ig A і Ig M. Найбільш поширеним у молоці корів є Ig G. Саме він характеризується типовою будовою молекули з



чотирьох поліпептидних ланцюгів (рис. 19). Секреторний варіант імуноглобуліну Ig A, який знайдений у молоці, складається з двох таких структур, які об'єднані секреторним компонентом (SC) і об'єднуючим компонентом (J) – рис. 19 а. Імуноглобуліни класу Ig M складаються з п'яти чотириланцюгових одиниць, скріплених дисульфідними зв'язками і об'єднуючим компонентом J – (рис. 19 б).



**Рис. 19. Модель будови секреторного варіанту імуноглобуліну Ig A (а) та імуноглобуліну Ig M (б)**

У коров'ячому молоці імуноглобуліни становлять від 0,6 до 1 г на літр. У молозиві їх кількість може досягати 100 г на літр і більше. Корови відносяться до групи ссавців (як і інші жуйні), у яких імуноглобуліни потрапляють у кров телят після їх народження. При народженні у телят відсутні імуноглобуліни і вони дуже чутливі до інфекцій. Тому основною функцією імуноглобулінів молока та молозива є формування пасивного імунітету у новонароджених телят. Відомо, що у телят стінка кишечника здатна пропускати великі молекули протеїнів до трьох днів після народження. Тому протягом

декількох годин після початку годування молозивом імуноглобуліни, де вони становлять до 80 % усіх протеїнів, проникають у кров без втрати структури і активності та проявляють захисні властивості, а саме, протидіють розвитку бактерій, зв'язують і знищують їх, нейтралізують віруси і токсини. Через три дні стінка кишечника телят стає непроникною для великих молекул, тому імуноглобуліни молока вже не можуть потрапляти у кров. Очевидно, що свою біологічну дію вони проявляють у шлунково-кишковому тракті телят. Свої імуноглобуліни у телят починають синтезуватись через два тижні [184]. У зв'язку з цим цікавим є припущення, що синтез слабкої протеїнази хімозину на період молочного годування новонароджених, тобто перед синтезом пепсину, пов'язаний з необхідністю не допустити протеоліз та інактивацію імуноглобулінів молозива [91]. Також функцію захисту імуноглобулінів у ШКТ може виконувати  $\alpha 2$ -макроглобулін молозива, який проявляє інгібіторну дію щодо протеїназ.

У людей формування пасивного імунітету відбувається ще до народження (*in utero*). Вважається, що імуноглобуліни з людського молозива і молока у новонароджених немовлят мало або зовсім не проникають через стінку кишечника у кров. Другою відмінністю є те, що основними імуноглобулінами у молозиві і молоці людини є імуноглобуліни типу Ig A (у коров'ячому – типу Ig G). Проте, не зважаючи на такі відмінності, у багатьох дослідженнях, починаючи від робіт Кемпбела і Петерсона (1959 рік), підтверджено позитивний вплив імуноглобулінів коров'ячого молозива або молока на організм людей різного віку [111]. В першу чергу це стосується протидії кишковим інфекціям [67].

Для підвищення захисних властивостей молока і молозива, а також вироблення імуноглобулінів певної специфічності була запропонована технологія імунного молока [184, 264]. При цьому корови імунізували вакцинами з ослаблених патогенних мікроорганізмів.

мів або виготовленими на їх основі антигенами. В результаті в молоці імунізованих корів підвищується рівень специфічних до цих мікроорганізмів імуноглобулінів. Дослідження показали, що таке імунне молоко, а також препарати імуноглобулінів з нього можуть бути ефективними проти різних патогенних мікроорганізмів і вірусів. Виробництво імунного молока і препаратів імуноглобулінів є перспективним для створення профілактичних і лікувальних продуктів для харчування людини [277, 480]. На даний час промислово виробляється сухе молоко, яке отримують від імунізованих корів.

### 2.2.2.5 Лактоферин

Лактоферин (Lf) вперше описаний ще у 1939 році і є дуже важливим протеїном молока, для якого встановлено багато видів позитивного впливу на організм людини і інших ссавців [497]. Його можна віднести до парафармацевтиків. Лактоферин є основним представником серед залізовв'язувальних протеїнів молока. Окрім лактоферину у молоці у малій кількості також знаходиться інший залізовв'язувальний протеїн – трансферин, який потрапляє у молоко із сироватки крові. Лактоферин синтезується у молочній залозі і кількість його у коров'ячому молоці становить 0,02-0,2 г/л, а у молозиві – 2-5 г/л. Необхідно відзначити, що в молоці і молозиві людини його концентрація значно вища і становить близько 1 г/л та 7 г/л відповідно. Встановлено, що концентрація лактоферину підвищена (до 1,2 г/л) у молоці маститних корів. Окрім молока лактоферин також знайдений у малих кількостях у складі сльози, слини та виділеннях слизових оболонок [48, 261].

Склад і будова лактоферину досить детально вивчені. За даними шостої редакції номенклатури протеїнів коров'ячого молока лактоферин є одноланцюговим глікопротеїном і складається з 689 (Lf людини – з 691) амінокислотних залишків (Асп<sub>36</sub>, Асн<sub>29</sub>, Тре<sub>36</sub>, Сер<sub>45</sub>, Глу<sub>40</sub>, Глн<sub>29</sub>, Про<sub>30</sub>, Глі<sub>49</sub>, Ала<sub>67</sub>, Цис<sub>34</sub>, Вал<sub>46</sub>, Мет<sub>4</sub>, Іле<sub>16</sub>, Лей<sub>66</sub>, Тир<sub>21</sub>,

Фен<sub>27</sub>, Ліз<sub>54</sub>, Гіс<sub>10</sub>, Три<sub>13</sub>, Арг<sub>37</sub>). На основі амінокислотного складу встановлена точна молекулярна маса – 76 110 Да [167]. Амінокислотний склад лактоферину свідчить про позитивний заряд його молекули при нейтральних значеннях рН, а також високе значення ізоелектричної точки (рІ 8,81). Завдяки таким особливостям молекули лактоферину характеризуються вираженою тенденцією до асоціації з негативно зарядженими біомолекулами, а саме гепарином, лізоцимом, протеїнами казеїнового комплексу. Первинна структура лактоферину молока корови показана на рис. 20. Первинна структура лактоферину молока людини приблизно на 70 % є ідентичною до коров'ячого [144].

1	10	20
Н – Ала – Про – Арг – Ліз – Асн – Вал – Арг – Три – Цис – Тре – Іле – Сер – Глн – Про – Глу – Три – Фен – Ліз – Цис – Арг –		
21	30	40
Арг – Три – Глн – Три – Арг – Мет – Ліз – Ліз – Лей – Глі – Ала – Про – Сер – Іле – Тре – Цис – Вал – Арг – Арг – Ала –		
41	50	60
Фен – Ала – Лей – Глу – Цис – Іле – Арг – Ала – Іле – Ала – Глу – Ліз – Ліз – Ала – Асп – Ала – Вал – Тре – Лей – Асп –		
61	70	80
Глі – Глі – Мет – Вал – Фен – Глу – Ала – Глі – Арг – Асп – Про – Тир – Ліз – Лей – Арг – Про – Вал – Ала – Ала – Глу –		
81	90	100
Іле – Тир – Глі – Тре – Ліз – Глу – Сер – Про – Глн – Тре – Гіс – Тир – Тир – Ала – Вал – Ала – Вал – Вал – Ліз – Ліз –		
101	110	120
Глі – Сер – Асн – Фен – Глн – Лей – Асп – Глн – Лей – Глн – Глі – Арг – Ліз – Сер – Цис – Гіс – Тре – Глі – Лей – Глі –		
121	130	140
Арг – Сер – Ала – Глі – Три – Іле – Іле – Про – Мет – Глі – Іле – Лей – Арг – Про – Тир – Лей – Сер – Три – Тре – Глу –		
141	150	160
Сер – Лей – Глу – Про – Лей – Глн – Глі – Ала – Вал – Ала – Ліз – Фен – Фен – Сер – Ала – Сер – Цис – Вал – Про – Цис –		
161	170	180
Іле – Асп – Арг – Глн – Ала – Тир – Про – Асн – Лей – Цис – Глн – Лей – Цис – Ліз – Глі – Глу – Глі – Глу – Асн – Глн –		
181	190	200
Цис – Ала – Цис – Сер – Сер – Арг – Глу – Про – Тир – Фен – Глі – Тир – Сер – Глі – Ала – Фен – Ліз – Цис – Лей – Глн –		
201	210	220
Асп – Глі – Ала – Глі – Асп – Вал – Ала – Фен – Вал – Ліз – Глу – Тре – Тре – Вал – Фен – Глу – Асн – Лей – Про – Глу –		
221	230	240
Ліз – Ала – Асп – Арг – Асп – Глн – Тир – Глу – Лей – Лей – Цис – Лей – Асн – Асн – Сер – Арг – Ала – Про – Вал – Асп –		
241	250	260
Ала – Фен – Ліз – Глу – Цис – Гіс – Лей – Ала – Глн – Вал – Про – Сер – Гіс – Ала – Вал – Вал – Ала – Арг – Сер – Вал –		

**Рис. 20. Первинна структура лактоферину коров'ячого молока.  
Файл 1BLF із бази даних по структурі протеїнів (PDB)  
(продовження на наступній сторінці)**

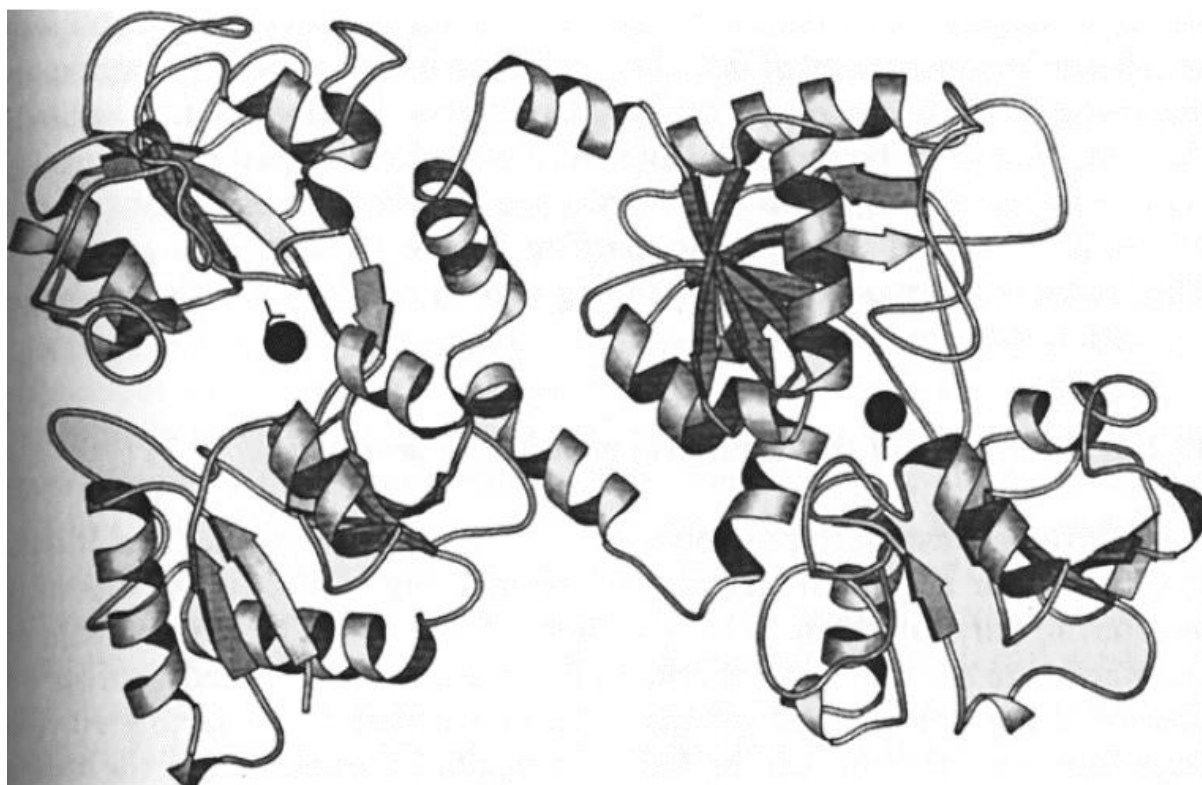
261	270	280
Асп – Глі – Ліз – Глу – Асп – Лей – Іле – Три – Ліз – Лей – Лей – Сер – Ліз – Ала – Глн – Глу – Ліз – Фен – Глі – Ліз –		
281	290	300
Асн – Ліз – Сер – Арг – Сер – Фен – Глн – Лей – Фен – Глі – Сер – Про – Про – Глі – Глн – Арг – Асп – Лей – Лей – Фен –		
301	310	320
Ліз – Асп – Сер – Ала – Лей – Глі – Фен – Лей – Арг – Іле – Про – Сер – Ліз – Вал – Асп – Сер – Ала – Лей – Тир – Лей –		
321	330	340
Глі – Сер – Арг – Тир – Лей – Тре – Тре – Лей – Ліз – Асн – Лей – Арг – Глу – Тре – Ала – Глу – Глу – Вал – Ліз – Ала –		
341	350	360
Арг – Тир – Тре – Арг – Вал – Вал – Три – Цис – Ала – Вал – Глі – Про – Глу – Глу – Глн – Ліз – Ліз – Цис – Глн – Глн –		
361	370	380
Три – Сер – Глн – Глн – Сер – Глі – Глн – Асн – Вал – Тре – Цис – Ала – Тре – Ала – Сер – Тре – Тре – Асп – Асп – Цис –		
381	390	400
Іле – Вал – Лей – Вал – Лей – Ліз – Глі – Глу – Ала – Асп – Ала – Лей – Асн – Лей – Асп – Глі – Глі – Тир – Іле – Тир –		
401	410	420
Тре – Ала – Глі – Ліз – Цис – Глі – Лей – Вал – Про – Вал – Лей – Ала – Глу – Асн – Арг – Ліз – Сер – Сер – Ліз – Гіс –		
421	430	440
Сер – Сер – Лей – Асп – Цис – Вал – Лей – Арг – Про – Тре – Глу – Глі – Тир – Лей – Ала – Вал – Ала – Вал – Вал – Ліз –		
441	450	460
Ліз – Ала – Асн – Глу – Глі – Лей – Тре – Три – Асн – Сер – Лей – Ліз – Асп – Ліз – Ліз – Сер – Цис – Гіс – Тре – Ала –		
461	470	480
Вал – Асп – Арг – Тре – Ала – Глі – Три – Асн – Іле – Про – Мет – Глі – Лей – Іле – Вал – Асн – Глн – Тре – Глі – Сер –		
481	490	500
Цис – Ала – Фен – Асп – Глу – Фен – Фен – Сер – Глн – Сер – Цис – Ала – Про – Глі – Ала – Асп – Про – Ліз – Сер – Арг –		
501	510	520
Лей – Цис – Ала – Лей – Цис – Ала – Глі – Асп – Асп – Глн – Глі – Лей – Асп – Ліз – Цис – Вал – Про – Асн – Сер – Ліз –		
521	530	540
Глу – Ліз – Тир – Тир – Глі – Тир – Тре – Глі – Ала – Фен – Арг – Цис – Лей – Ала – Глу – Асп – Вал – Глі – Асп – Вал –		
541	550	560
Ала – Фен – Вал – Ліз – Асн – Асп – Тре – Вал – Три – Глу – Асн – Тре – Асн – Глі – Глу – Сер – Тре – Ала – Асп – Три –		
561	570	580
Ала – Ліз – Асн – Лей – Асн – Арг – Глу – Асп – Фен – Арг – Лей – Лей – Цис – Лей – Асп – Глі – Тре – Арг – Ліз – Про –		
581	590	600
Вал – Тре – Глу – Ала – Глн – Сер – Цис – Гіс – Лей – Ала – Вал – Ала – Про – Асн – Гіс – Ала – Вал – Вал – Сер – Арг –		
601	610	620
Сер – Асп – Арг – Ала – Ала – Гіс – Вал – Ліз – Глн – Вал – Лей – Лей – Гіс – Глн – Глн – Ала – Лей – Фен – Глі – Ліз –		
621	630	640
Асн – Глі – Ліз – Асн – Цис – Про – Асп – Ліз – Фен – Цис – Лей – Фен – Ліз – Сер – Глу – Тре – Ліз – Асн – Лей – Лей –		
641	650	660
Фен – Асн – Асп – Асн – Тре – Глу – Цис – Лей – Ала – Ліз – Лей – Глі – Глі – Арг – Про – Тре – Тир – Глу – Глу – Тир –		
661	670	680
Лей – Глі – Тре – Глу – Тир – Вал – Тре – Ала – Іле – Ала – Асн – Лей – Ліз – Ліз – Цис – Сер – Тре – Сер – Про – Лей –		
681	689	
Лей – Глу – Ала – Цис – Ала – Фен – Лей – Тре – Арг – ОН		

**Рис. 20. Первинна структура лактоферину коров'ячого молока.  
Файл 1BLF із бази даних по структурі протеїнів (PDB)  
(закінчення)**

У складі молекули лактоферину знайдено декілька сайтів, які можуть зв'язувати олігосахаридні групи (Asn<sub>233</sub>, Asn<sub>281</sub>, Asn<sub>368</sub>, Asn<sub>476</sub> і Asn<sub>545</sub>). Залежно від місця зв'язування олігосахаридних груп лактоферин існує у вигляді двох глікозильованих форм – А і В. Обидві форми глікозильовані по залишках Asn<sub>233</sub>, Asn<sub>368</sub>, Asn<sub>476</sub> і Asn<sub>545</sub>, а лактоферин А також по залишку Asn<sub>281</sub>. В молоці варіант А становить близько 15 %, а в молозиві близько 30 % [48, 535]. Склад олігосахаридних груп може варіювати залежно від періоду лактації. Всього було ідентифіковано 59 олігосахаридних структур [393]. Найчастіше до них входить манноза і сіалова кислота. Загалом вуглеводи становлять близько 11,2 % маси лактоферину. Для лактоферину характерна велика кількість залишків цистеїну, які задіяні в утворенні внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків для стабілізації просторової структури молекули.

Муром із співробітниками (1997 р.) були опубліковані результати дослідження просторової структури лактоферину [351]. Показано, що молекула лактоферину складається з двох окремих великих глобулярних структур, названих N і C (рис. 21). N-структура формується з амінокислотних залишків від 1-го до 333-го, а C-структура включає залишки від 345-го до 676-го. Між собою ці структури поєднані спіралевидною послідовністю амінокислотних залишків 334-344. У свою чергу кожна N- і C-структура складається з двох доменів. Таким чином до складу молекули лактоферину входить чотири домени: домен N1 (залишки 1-90 і 251-333), домен N2 (залишки 91-250), домен C1 (залишки 345-431 і 593-676) та домен C2 (залишки 432-592).

Близько до N-термінальної частини молекули лактоферину розміщена ділянка з позитивно зарядженими амінокислотними залишками. Завдяки їй лактоферин може зв'язувати різні сполуки кислотої природи, у тому числі гепарин, а також молекули, що розміщуються на клітинних поверхнях [586].



**Рис. 21. Просторова будова лактоферину коров'ячого молока [325]**

Молекула лактоферину може зв'язувати два іони  $\text{Fe}^{3+}$ . Група Мура з'ясувала, що одна ділянка, яка зв'язує іони  $\text{Fe}^{3+}$ , розміщена в порожнині між доменами N1 і N2, а друга – між доменами C1 і C2 [351]. З іонами феруму в N структурі лактоферину безпосередньо взаємодіють залишки Асп<sub>60</sub>, Тир<sub>92</sub>, Тир<sub>192</sub> і Гіс<sub>253</sub>, а в С структурі – залишки Асп<sub>395</sub>, Тир<sub>433</sub>, Тир<sub>526</sub> і Гіс<sub>595</sub>. Молекули лактоферину можуть бути повністю насичені іонами феруму. При цьому максимальний вміст феруму досягає 1,4 мг/л. Така форма називається хололактоферином і має жовтувато-рожевий колір. Коефіцієнт поглинання розчину хололактоферину  $D_{1\%}^{465}$  становить 0,58. За повної відсутності у його складі  $\text{Fe}^{3+}$  лактоферин називають аполактоферином і він безбарвний. У природному стані, залежно від складу середовища, лактоферин частково насичений іонами феруму (від 15 до 40 %). Аніони гідрокарбонату або карбонату підвищують здатність лактоферину зв'язувати іони феруму [144]. Комплекси лактоферину з

іонами феруму стабільні при нейтральних і кислих значеннях рН (до рН 3,5). Це підтверджує в першу чергу його здатність поглинати іони  $\text{Fe}^{3+}$  з середовища, а не переносити їх. Трансферин, який є переносником  $\text{Fe}^{3+}$ , звільняє ці іони уже при значеннях рН 5,5. Очевидно, така властивість лактоферину тісно пов'язана з його біологічною активністю. Тут доречно буде згадати описані Гансом Шлегелем шляхи транспорту іонів феруму у мікроорганізмів [9]. Зокрема в аеробних умовах за нейтральних значень рН, коли в середовищі утворюються малорозчинні гідроксиди  $\text{Fe}^{3+}$ , мікроорганізми виділяють спеціальні сполуки – сидерофори. Сидерофори бактерій за своєю хімічною природою відносяться до фенольних сполук, а у мікроскопічних грибів – до циклічних пептидів. Сидерофори в умовах дефіциту іонів феруму виділяються в середовище для зв'язування і утворення розчинного комплексу з  $\text{Fe}^{3+}$  та доставки його в клітину мікроорганізму. У клітині відбувається відновлення  $\text{Fe}^{3+}$  до  $\text{Fe}^{2+}$  і звільнення його зі складу комплексу з молекулою сидерофору. Спорідненість сидерофорів до  $\text{Fe}^{2+}$  значно нижча, ніж до  $\text{Fe}^{3+}$ . Очевидно, що конкуренція за іони феруму може бути в основі захисту організму від шкідливих бактерій і мікроскопічних грибів.

Важливою властивістю лактоферину є його стійкість до травних протеаз. Причому більш стійким до протеолізу є лактоферин, насичений іонами феруму (хололактоферин), а також А варіант лактоферину. Це пов'язано з тим, що глікозилування залишку  $\text{Asn}_{281}$  унеможливує розщеплення трипсином пептидного зв'язку, утвореного карбоксильною групою  $\text{Lis}_{282}$  [535].

До факторів, які впливають на структуру, властивості і біологічну активність лактоферину відносяться температура, склад і рН середовища. Встановлено, що прогрівання молока до  $65\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 30 хвилин не викликає змін в лактоферині, а прогрівання до  $85\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 30 хвилин спричиняє втрату його активності. Також



лактоферин денатурує і зменшує бактерицидну дію після оброблення ультрависокими температурами. Більш стійким до впливу високих температур лактоферин є в кислому середовищі, а також коли він насичений іонами феруму (хололактоферин) [48].

Лактоферин є стійким до зміни рН у діапазоні значень від 2 до 7,4 і не втрачає своєї активності, а при рН 4 зберігає здатність зв'язувати іони феруму, проявляти бактерицидну дію та антигенні властивості навіть при нагріванні до 90 °С протягом 5 хвилин [48, 406].

В багатьох дослідженнях *in vivo* і *in vitro* показано, що лактоферин проявляє бактерицидну дію проти різних видів бактерій. Це стосуються як Грам-негативних, так і Грам-позитивних видів. Важливо, що сюди відносяться збудники різних захворювань, зокрема харчових інфекцій, токсикоінфекцій та токсикозів (*Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Helicobacter pylori* та інші). В той же час в деяких дослідженнях *in vitro* встановлено, що лактоферин не затримує розвиток біфідобактерій [244, 282].

Бактерицидна дія лактоферину реалізується за декількома механізмами [367]. Перш за все було встановлено, що утворення стійких комплексів лактоферину з іонами феруму в молоці призводить до його недоступності для живлення клітин бактерій. Оскільки  $Fe^{3+}$  є незамінним компонентом для бактерій, це пригнічує їх розвиток і розмноження. Концентрація лактоферину в молоці і молозиві достатня для зв'язування наявних там іонів феруму. При взаємодії з Грам-негативними бактеріями лактоферин може приєднуватись до ліпополісахариду зовнішньої клітинної мембрани. Наслідком цього є збільшення проникності мембрани, зміна мембранного потенціалу, що призводить до загибелі клітини. Ще один механізм бактерицидної дії лактоферину стосується Грам-негативних і Грам-позитивних бактерій. Встановлено, що в результаті приєднання лактоферину до олігосахаридів зовнішньої мембрани внутрішній муреїновий шар

клітинної стінки бактерій стає доступним для дії ферменту лізоциму. Лізоцим розщеплює глікозидні зв'язки муреїнового каркасу, а саме зв'язок між N-ацетилмурамовою кислотою і N-ацетилглюкозаміном, що призводить до руйнування клітинної стінки. В даному випадку бактерицидна активність зумовлена синергічною взаємодією лактоферину і лізоциму. З бактерицидною дією лактоферину може бути пов'язана його ензимна активність. Так, ще у 2000 році було встановлено, що він є слабкою рибонуклеазою [564]. Тут необхідно відзначити, що пізніше в окремих препаратах лактоферину за допомогою двовимірного електрофорезу було виявлено рибонуклеазу [144]. Також N-термінальна глобулярна структура лактоферину проявляє активність, подібну до серинових протеаз. Це дозволяє йому розщеплювати пептидні зв'язки у молекулах протеїнів. Очевидно, що лактоферин може гідролізувати протеїни, які необхідні бактеріям для утворення комплексу з клітинними мембранами у процесі проникнення в клітину.

Окрім бактерицидної, лактоферин проявляє також антивірусну активність. Причому як проти ДНК-ових, так і РНК-ових вірусів. Встановлено антивірусну дію відносно вірусу герпесу, гепатиту С, пневмонії мишей, імунодефіциту людини та ін. [48, 534]. Одним із основних механізмів антивірусної дії лактоферину є його зв'язування з мембраною тваринних клітин, що протидіє взаємодії вірусів з мембраною і не допускає інфікування клітини. У випадку з вірусом імунодефіциту людини (HIV-1) лактоферин також проявляє інгібіторну дію по відношенню до ензиму зворотної транскриптази, яка є необхідна для його відтворення.

Доведено в багатьох дослідженнях, що лактоферин відіграє важливу роль у модуляції імунної системи, зокрема у процесах, пов'язаних з проходженням запалення в організмі тварин і людини. Лактоферин впливає на імунну систему шляхом стимуляції проліферації лімфоцитів, активації іншого виду лейкоцитів –

моноцитів, підвищення активності макрофагів, а також індукції цитокінів – молекул, які секретуються лейкоцитами та забезпечують міжклітинні взаємодії за імунної відповіді [50].

Важливою властивістю лактоферину є його здатність зв'язувати ліпополісахариди. При цьому формується комплекс «ліпополісахарид – лактоферин». Такий комплекс може індукувати медіатори запалення, які продукуються макрофагами. Крім цього, зв'язуючи ліпополісахариди, лактоферин протидіє їх приєднанню до CD-14-рецепторів моноцитів. Споживання лактоферину індукує секрецію інтерлейкіну – IL-8 епітеліальними клітинами, що призводить до посилення цитотоксичної лімфоцитарної активності. Цитотоксичність лімфоцитів може бути пов'язана з виділенням гідролітичних ферментів або метаболітів кисню [282].

Для лактоферину встановлений ще один важливий вид біологічної активності – його антиканцерогенна дія по відношенню до ракових клітин, які розвиваються. Дослідження на тваринах показали, що споживання лактоферину сповільнює розвиток раку легень, стравоходу, печінки, сечового міхура та інших органів [348, 525]. В основі антиканцерогенної дії лактоферину, зокрема, є його здатність зв'язувати іони феруму. Відомо, що іони феруму викликають оксидативні мутації в молекулі ДНК і сприяють розвитку оксидант-індукованої карциноми. Високу активність лактоферин проявляє як інгібітор канцерогенезу кишечника у щурів. Одним з пояснень антиканцерогенної дії лактоферину може бути його здатність викликати апоптоз ракових клітин [279].

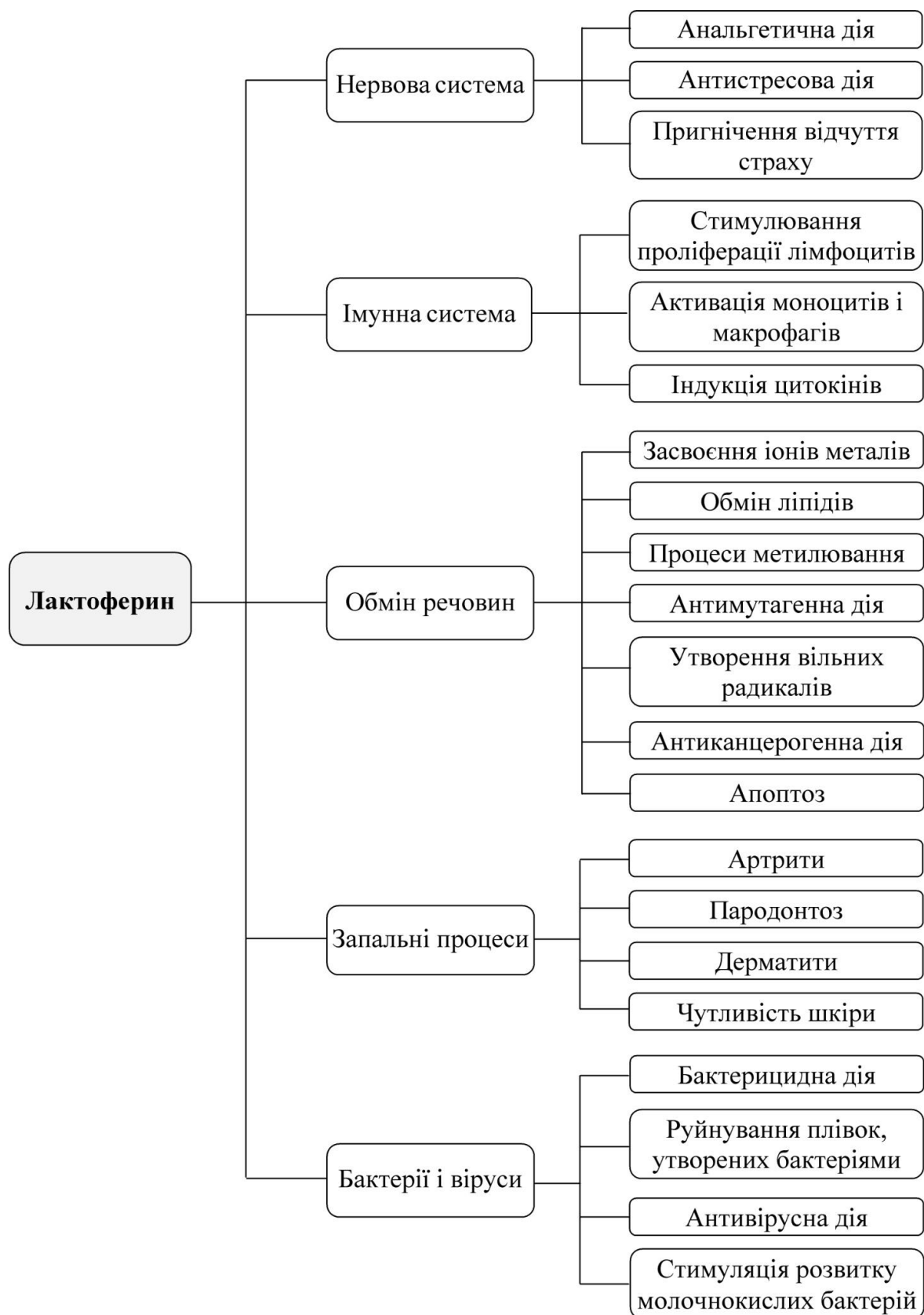
В останні роки для лактоферину був відкритий анти-адипогенний ефект. Виявилось, що лактоферин є супресором диференціації адипоцитів і може контролювати ліпідний обмін. У Японії були проведені дослідження на добровольцях, яким давали таблетки з лактоферином коров'ячого молока (300 мг/день) протягом восьми тижнів. За результатами комп'ютерної томографії було

показано, що у групі чоловіків і жінок, яка отримували лактоферин у порівнянні з контрольною групою, яка отримувала плацебо, розміри ділянок вісцерального і підшкірного жиру значно зменшились. Також суттєво зменшилась вага тіла. Цікаво, що анти-адипогенну активність проявляють фрагменти лактоферину після обробки трипсином, а після обробки пепсином така активність втрачається [280, 283].

Таким чином лактоферин є цінною біологічно-активною природною сполукою. Інтенсивне вивчення властивостей і біологічної дії лактоферину показало мультифункціональність цього протеїну. На схемі (рис. 22) відображено перспективні напрямки досліджень його біологічної активності. У багатьох випадках встановлено вплив лактоферину на різні фізіологічні функції і процеси в організмі, але не завжди з'ясований механізм його дії.

Лактоферин виділяють у промислових масштабах із знежиреного молока та різних видів сироватки. При цьому на першому етапі проводиться екстрагування лактоферину із лактоферинвмісної сировини. Далі відбувається концентрування і очищення від низькомолекулярних солей і лактози. Після цього за допомогою іонообмінної хроматографії в об'ємі на катіонообмінниках відділяють лактоферин від лактопероксидази та інших протеїнів, які мають подібні властивості. В результаті отримують препарат лактоферину зі ступінню очищення 90-95 %. [413]. Відоме одностадійне виділення лактоферину з використанням катіонообмінника і ступеневого градієнту іонної сили. Також налагоджено виробництво рекомбінантного лактоферину людини.

Для ідентифікації лактоферину в молоці під час його виділення із сироватки застосовують вискоєфективну рідинну хроматографію при високому тиску (ВЕРХ) на катіонообмінниках або частіше імунний метод ELISA з використанням поліклональних або моноклональних



**Рис. 22. Види біологічної дії лактоферину**

антитіл [144, 146]. При електрофоретичній ідентифікації лактоферину в присутності ДСН може відбуватися накладання смуг лактоферину і лактопероксидази через близькість їх молекулярних мас.

Використовується лактоферин у харчових продуктах, перш за все у продуктах дитячого харчування і харчових добавках, а також у фармацевтичних препаратах і косметичних засобах. Перспективним напрямком застосування лактоферину є харчові добавки для людей похилого віку, при відхиленнях імунної системи, для відновлення після гастроінтестинальних інфекцій, для підтримання імунної системи в умовах токсичного середовища, для профілактики розладів шлунково-кишкового тракту [144]. Лактоферин є цінною сировиною для отримання біологічно активних пептидів з різними видами біологічної дії [48].

## **2.3 Протеїни жирових кульок молока**

### **2.3.1 Загальна характеристика і номенклатура**

За визначенням комітету з номенклатури і методології протеїнів молока до протеїнів мембран жирових кульок відносять комплекс протеїнів та ензимів (включаючи ліпопротеїни, лужну фосфатазу і ксантиноксидазу), які адсорбовані на поверхні жирових кульок. Ці протеїни можуть бути ізольовані в результаті промивання і збивання вершків з коров'ячого молока.

Протеїни мембран жирових кульок походять з апікальної мембрани або цитоплазми секреторних клітин молочної залози. Таких протеїнів може бути багато [53]. Це ускладнює їх класифікацію. Важко відрізнити протеїни, які постійно є у складі жирових кульок, і протеїни, які туди потрапили випадково із секреторних клітин або абсорбувалися з молока у процесі виділення. У зв'язку з цим комітетом з номенклатури і методології запропоновано використовувати певні умови при виділенні протеїнів

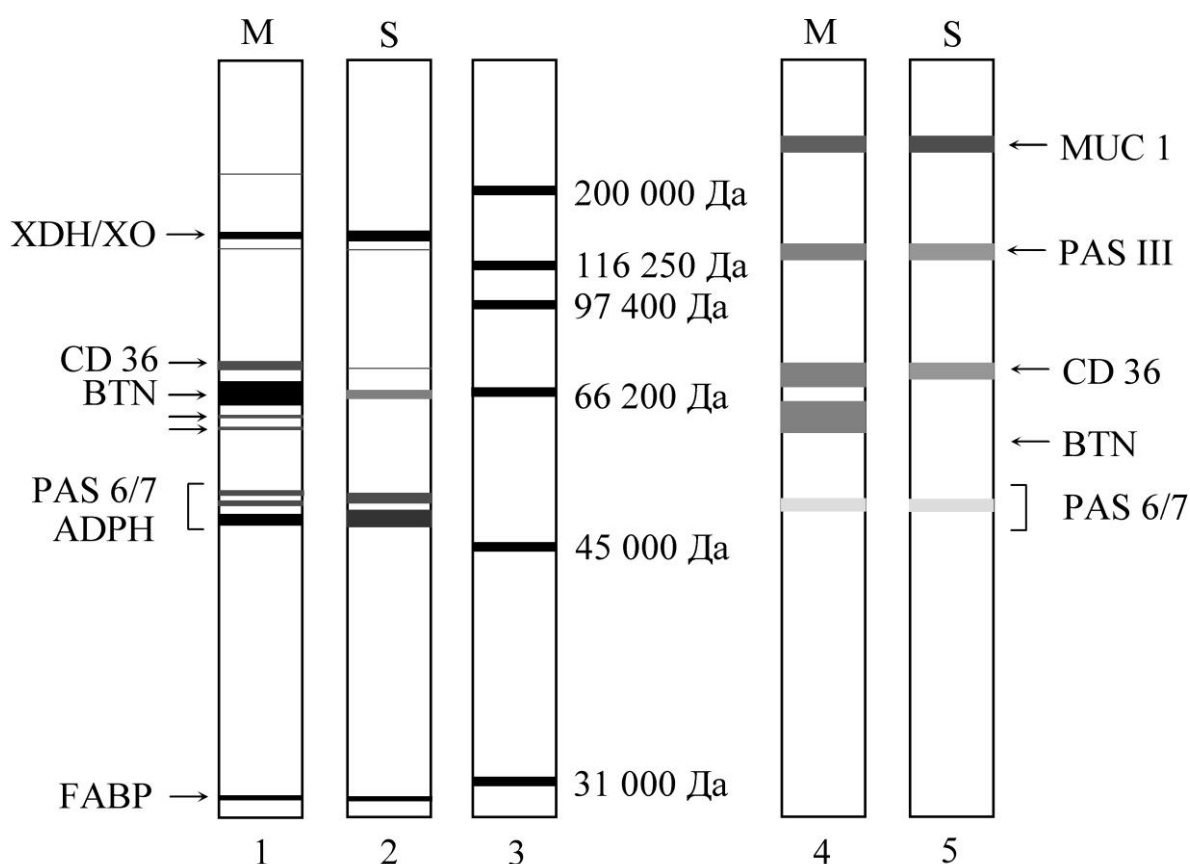
жирових кульок, їх фракціонуванні та ідентифікації. Велика кількість різних мінорних фракцій привела до плутанини з їх ідентифікацією і назвами. Пропонується остаточні назви цих протеїнів присвоювати після їх виділення, встановлення первинної структури і функцій. Тимчасово використовується класифікація, яка базується на рухливості під час електрофорезу в ПАГ у присутності ДСН. Оскільки багато протеїнів жирових кульок є глікопротеїнами, то використовують забарвлення протеїнових фракцій кумасі голубим або періодатом з реагентом Шиффа [167].

Основними стадіями виділення протеїнів жирових кульок є наступні:

1. Виділення жирових кульок з незбираного молока центрифугуванням.
2. Декількаразове промивання жирових кульок фізіологічним буферним розчином.
3. Звільнення мембран з поверхні жирових кульок фізичними (збивання) або хімічними (екстракція) способами.
4. Виділення звільнених мембран ультрацентрифугуванням (90 000-100 000 g протягом 60 хвилин).

В результаті центрифугування отримують супернатант і фазу мембран жирових кульок. До 20 % протеїнів знаходиться у розчинній фазі (супернатанті), решта – у фазі мембран. Основні фракції протеїнів жирових кульок вдається виявити незалежно від застосованого методу. Проте суттєві відмінності проявляються на рівні численних мінорних протеїнів. Тому в майбутньому, очевидно, буде встановлена єдина строга методика виділення мембран жирових кульок з метою дослідження їх протеїнів [167].

Вміст протеїнів власне мембран і супернатанту далі характеризують електрофорезом в ПАГ у присутності ДСН, а також двовимірним електрофорезом. Схема електрофореграм протеїнів жирових кульок, отриманих електрофорезом в ПАГ за присутності ДСН, показана на рис. 23.



**Рис. 23. Схема розділення протеїнів жирних кульок у 8 % ПАГ з ДСН [316]**

Доріжки 1-3 забарвлені кумасі, а 4 і 5 – періодатом з реактивом Шиффа.

На доріжках 1 і 4 – протеїни мембран жирних кульок після ультрацентрифугування (М), а на доріжках 2 і 5 – протеїни супернатанту (S).

На доріжці 3 показані маркерні протеїни: міозин скелетних м'язів кролика (200 000 Да);  $\beta$ -галактозидаза *E. Coli* (116 250 Да); фосфорилаза  $\beta$  з м'язів кролика (97 400 Да); альбумін сироватки крові (66 200 Да); овальбумін курячого яйця (45 000 Да); карбоангідраза бика (31 000 Да). Окремою стрілкою (доріжка 1) показані продукти обмеженого протеолізу бутирофіліну (BTN)

В результаті електрофоретичного аналізу було встановлено, що мембрани жирних кульок містять унікальні протеїни, які відсутні у знежиреному молоці. Використання чутливого методу забарвлення сріблом дозволило виявити близько 60 протеїнових фракцій на електрофореграмах. Природа цих фракцій ще не встановлена



остаточно. Це можуть бути генетичні варіанти протеїнів, продукти обмеженого протеолізу ( $\gamma$ -казеїни) і т.д. На сьогодні найбільш детально вивчено декілька основних протеїнів мембран жирових кульок: муцин 1 (MUC1), ксантин-оксидоредуктаза (XDH/XO), періодат Шиф III (PAS III), кластер диференціації (CD 36), бутирофілін (BTN), адипофілін (ADPH), періодат Шиф 6/7 (PAS 6/7), жирнокислотозв'язувальний протеїн (FABP) [316].

Розміщення протеїнів з врахуванням сучасних уявлень про будову мембран жирових кульок молока схематично представлено на рис. 24.

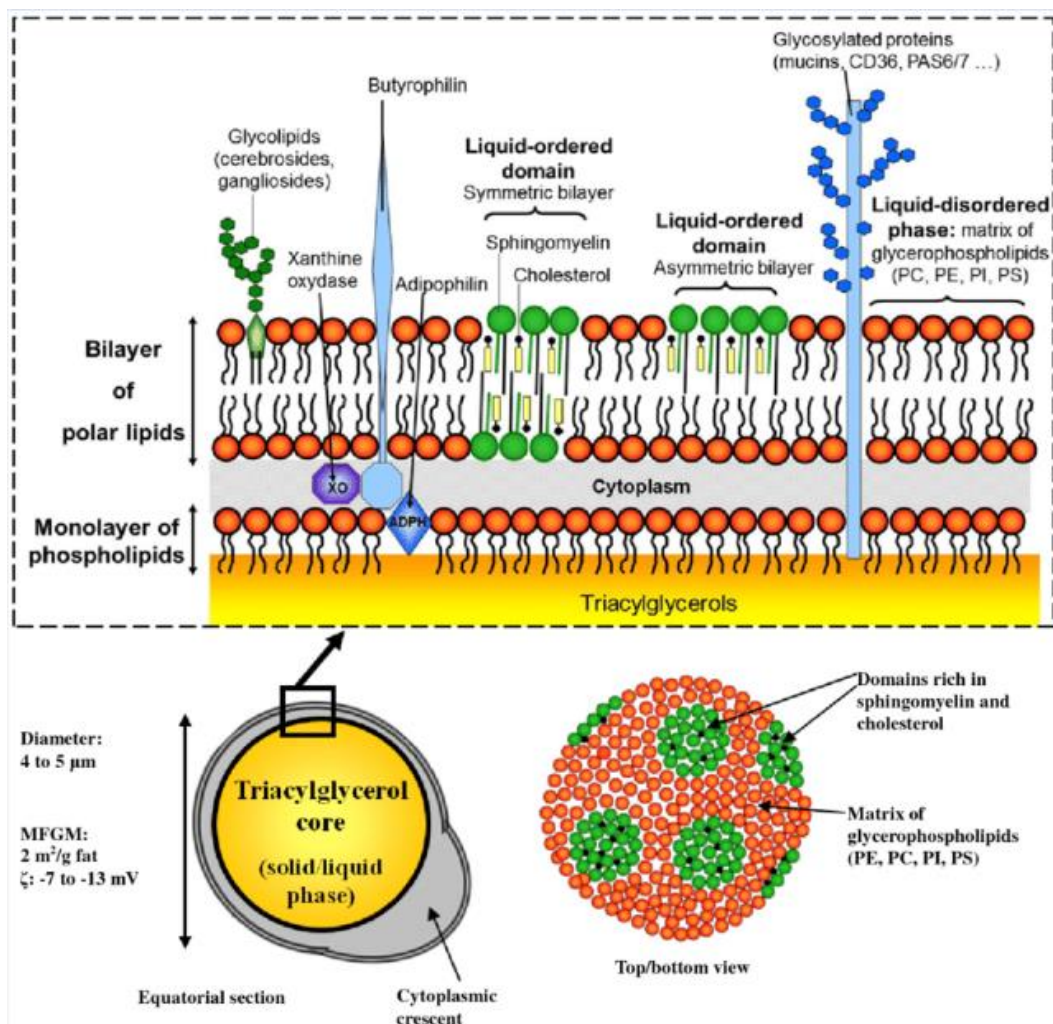
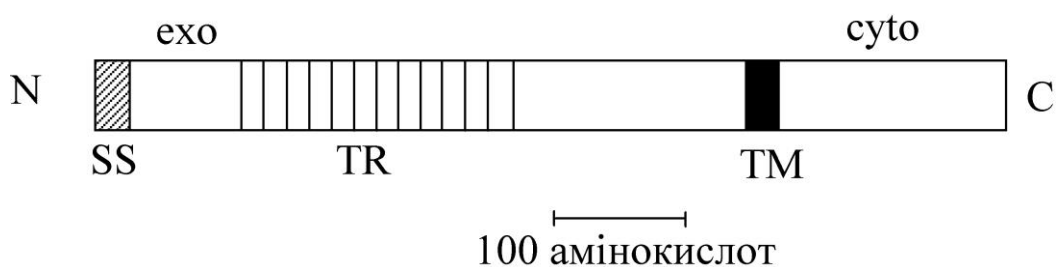


Рис. 24. Модель будови мембрани жирових кульок молока [136, 285, 441]

### 2.3.2 Будова, властивості і біологічна дія протеїнів жирових кульок

Муцин 1 відноситься до сильно глікозильованих високомолекулярних глікопротеїнів, які добре забарвлюються періодатом з реактивом Шиффа. Схематично будова молекули муцину 1 представлена на рис. 25.



**Рис. 25. Доменна структура муцину 1 [316]:**

SS – сигнальна послідовність; TR – тандемні послідовності (20 амінокислотних залишків у тандемі), що повторюються в екзоплазматичному домені (ехо);

ТМ – трансмембранна якірна послідовність;

cyto – короткий цитоплазматичний «хвіст»

Вміст муцину 1 в коров'ячому молоці становить до 40 мг/л. Залежно від кількості тандемних послідовностей (25-35) молекулярна маса індивідуальних молекул може становити від 15 600 до 193 000 Да. Муцин 1 відноситься до мембрано-зв'язаних протеїнів у свіжому молоці. Пізніше частина його переходить у розчин без якірної послідовності. Біологічні функції цього глікопротеїну остаточно не встановлені. До складу мембран жирових кульок муцин 1 потрапляє з апікальної мембрани секреторних клітин у процесі формування і звільнення жирових кульок. Муцин 1 входить до складу філаментів апікальних мембран і його виступаюча ділянка захищає їх поверхню від фізичних пошкоджень та патогенних

мікроорганізмів. Захисну роль він може відігравати при молочному живленні новонароджених, зв'язуючи патогенні мікроорганізми [414].

Наступним важливим протеїном МЖКМ (20 % від всіх протеїнів МЖКМ) є ксантин-оксидоредуктаза (XDH/XO). Молекулярна маса цього протеїну становить близько 155 000 Да за даними електрофорезу з ДСН. Вони відносяться до периферійних протеїнів МЖКМ. Аналіз первинної структури на основі клонованої кДНК показав, що ксантин-оксидоредуктаза складається з 1332 амінокислотних залишків і має точну молекулярну масу 146 600 Да. Ізоелектрична точка її – 7,7. До складу ксантин-оксидоредуктази як кофактор входять іони феруму, молібдену і ФАД. Вона може окиснювати ліпиди через утворення супероксид-радикалів ( $O_2^-$ ). Можливо, ксантин-оксидоредуктаза відіграє певну структуру роль у формуванні МЖКМ у взаємодії з цитоплазматичним доменом бутирофіліну (BTN). Також вона може мати значення у молоці як антибактеріальний фактор, забезпечуючи лактопероксидазу пероксидом водню [313].

Глікопротеїн PAS III мало охарактеризований. Молекулярна маса його знаходиться в межах 95 000-100 000 Да за даними електрофоретичного аналізу (ПАГ з ДСН). PAS III розміщений на апікальній поверхні секреторних клітин в період лактації і може виконувати роль маркера секреторного епітелію [316].

Протеїн CD 36 відноситься до інтегральних протеїнів МЖКМ з молекулярною масою 76 000-78 000 Да за результатами електрофоретичного аналізу в присутності ДСН. Відноситься до глікопротеїнів (включає близько 24 % вуглеводів) і появляється лише з допомогою періодату і реактиву Шиффа. CD 36 становить 5 % від усіх протеїнів МЖКМ. Цей глікопротеїн виконує різні функції у кровоносній системі (рецептор тромбоспондіну, активація і агрегація тромбоцитів, гальмування ангиогенезу, рецептор для зв'язування апоптичних клітин). Функції CD 36 у секреторних клітинах і МЖКМ не зовсім

зрозумілі. Можливо, він забезпечує транспорт тромбоспондіну через секреторні клітини (як рецептор тромбоспондіну). Також CD 36 може брати участь у транспорті вищих жирних кислот [316].

Бутирофілін (BTN) – найбільша фракція серед протеїнів МЖКМ (від 20 до 43 % від всіх протеїнів МЖКМ). Молекулярна маса цього протеїну становить 60 000-67 000 Да. Бутирофілін відноситься до інтегральних гідрофобних глікопротеїнів у складі мембран. Важливу роль у стабілізації його структури в мембрані відіграють дисульфідні зв'язки. Встановлена первинна структура бутирофіліну. Показано, що він складається з 526 амінокислотних залишків і його молекулярна маса без вуглеводів 56 460 Да. Бутирофілін міцно зв'язує фосфоліпиди і жирні кислоти і, очевидно, відіграє певну роль в утворенні структури МЖКМ [315].

Адипофілін (ADPH) за молекулярною масою дуже близький до глікопротеїну PAS 6/7. Їхні молекулярні маси близькі до 52 000 Да. Розділити адипофілін і PAS 6/7 вдається лише з допомогою двовимірного електрофорезу. Адипофілін є головною нерозчинною фракцією, яка залишається після екстракції МЖКМ солями і неіонними детергентами. Його можна солюбілізувати 10 %-м розчином ДСН при нагріванні. У клітинах адипофілін, можливо, бере участь у переносі вищих жирних кислот. Враховуючи його здатність взаємодіяти з бутирофіліном і ксантин-оксидоредуктазою, пропонується важлива роль адипофіліну в формуванні МЖКМ. Необхідно також відзначити, що адипофілін містить у своєму складі ковалентно зв'язані жирні кислоти (56 молекул на 1 молекулу протеїну). Це міристинова, пальмітинова, стеаринова і олеїнова кислоти [217].

Периферійний глікопротеїн PAS 6/7 на електрофореграмі представлений двома фракціями. Встановлено, що відмінності між фракціями проявляються на етапі посттрансляційної модифікації молекул протеїну. Асоційовані з PAS 6/7 глікани можуть зв'язувати ротавіруси і захищати травний тракт новонароджених від інфекцій.

Також обговорюється питання ацилтрансферазної активності у PAS 6/7. Встановлено, що PAS 6/7 коров'ячого молока складається з 427 амінокислотних залишків і молекулярна маса до процесингу становить 47 500 Да. Після відщеплення сигнальної послідовності (18 амінокислотних залишків) утворюється протеїн з молекулярною масою 45 600 Да та ізоелектричною точкою – 7,0 [316].

Протеїн FABP ідентифікується на електрофореграмі як найменший протеїн (близько 13 000 Да). Двовимірним електрофорезом показано, що у молоці FABP одночасно представлений двома основними і одним мінорним варіантами. У молочній залозі FABP може виконувати функцію внутрішньоклітинного транспорту жирних кислот, контролю обміну ліпідів, формування жирових кульок у цитоплазмі [316].

## **2.4 Ензими молока**

### **2.4.1 Загальна характеристика ензимів молока**

Молоко містить багато різних ензимів. Основна їх частина (близько 70) потрапляють у молоко з клітин молочних залоз під час синтезу молока. Також у молоці присутні ензими, які виділяються мікроорганізмами. У процесі виробництва молочних продуктів у молоко можуть додавати різні препарати ензимів (наприклад, молокозсідальні).

Природні ензими потрапляють у молоко з крові, з цитоплазми і апікальної мембрани секреторних клітин, яка включається до складу жирових кульок молока. Очевидно, частина таких ензимів є випадковими компонентами молока, оскільки вони не проявляють своєї активності через відсутність відповідного субстрату. Але деякі природні ензими мають важливе значення у технології молочних продуктів. Вони можуть впливати на якість молока, свідчити про наявність маститної інфекції або ефективність термічної обробки

молока. Необхідно відзначити, що у більшості випадків природні ензими молока негативно впливають на органолептичні властивості і харчову цінність молока. Також окремі природні ензими можуть проявляти біологічну дію на організм. В першу чергу це стосується захисту від мікроорганізмів і токсинів. Характеристика наважливіших природних ензимів молока наведена у табл. 15.

**Таблиця 15. Важливі природні ензими молока [184]**

Ензим	Реакція	Значення
Ліпаза	Тригліцероли + H <sub>2</sub> O → жирні кислоти + моно- і дигліцероли + гліцерол	Погіршення смаку молока; формування смаку у голубому сирі
Плазмін	Гідроліз пептидних зв'язків, зокрема у β-казеїні	Зменшення стабільності при зберіганні продуктів після УВТ обробки; дозрівання сиру
Каталаза	2H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → O <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	Показник захворювання на мастит; прооксидант
Лізоцим	Гідроліз мукополісахаридів	Бактерицидний агент
Ксантин оксидаза	Альдегід + H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub> → кислота +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Прооксидант; дозрівання сирів
Сульфгідрил оксидаза	2 R-SH + O <sub>2</sub> → R-S-S-R+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Покращення смаку
Супероксид дисмутаза	2O <sub>2</sub> <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup> → H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + O <sub>2</sub>	Антиоксидант
Лактопероксидаза	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + AH <sub>2</sub> → 2H <sub>2</sub> O + A	Показник пастеризації; бактерицидний агент; показник захворювання на мастит; прооксидант
Лужна фосфомоноестераза	Гідроліз естерів фосфатної кислоти	Показник пастеризації
Кисла фосфомоноестераза	Гідроліз естерів фосфатної кислоти	Зменшення теплової стабільності молока; дозрівання сиру

## 2.4.2 Важливі природні ензими молока

Плазмін (К.Ф. 3.4.21.7) або фібринолізин потрапляє у молоко з крові у складі плазмінової системи, яка складається з плазміну ( $M = 81\ 000$  Да), плазміногену ( $M = 88\ 092$  Да), активаторів плазміногену та інгібіторів активаторів плазміногену і плазміну. У крові функцією плазміну є розрідження кров'яних згустків. Плазмін відноситься до серинових протеїназ, які гальмуються інгібітором трипсину і розщеплюють пептидні зв'язки, утворені  $\alpha$ -карбокисьльними групами лізину і аргініну [7]. Він екстрагується з казеїнового згустку при значеннях рН 3,5. Оптимальні умови для плазміну –  $\sim 35^\circ\text{C}$  і рН 7,5; витримує прогрівання до  $72^\circ\text{C}$  протягом 15 секунд, інактивується при  $80^\circ\text{C}$  протягом 10 хвилин. За дії на  $\beta$ -казеїн утворюються  $\gamma$ -казеїни і компоненти протеозо-пептонної фракції (PP5, PP8 повільний і PP8 швидкий). Протеїни сироватки ( $\beta$ -Lg і  $\alpha$ -La), а також  $\kappa$ -казеїн не розщеплюються плазміном [238].

Враховуючи стійкість плазміну до високих температур, він має значення для гелеутворення у молоці після ультрависокої температурної обробки, а також приймає участь у протеолізі в сирах з високою температурою другого нагрівання. У таких сирах проходить інактивація протеаз молокозідальних препаратів. Також дія плазміну може спричиняти зменшення виходу твердих сирів і казеїну за рахунок втрат компонентів протеозо-пептонної фракції. Як протеолітичний ензим плазмін приймає участь в утворенні вторинних біологічно активних сполук (БАС) у молоці і молочних продуктах з протеїнів-попередників [24, 25].

Ліпопротеїніліпаза (К.Ф. 3.1.1.34). Цей ензим був відкритий ще на початку минулого століття і має велике значення у технології молочних продуктів. Дія ліпази полягає у гідролізі естерних зв'язків емульгованих ацилгліцеролів молока. Назва цього ензиму пов'язана з тим, що він активується ліпопротеїном плазми (аполіпопротеїн С II). Компонент протеозо-пептонної фракції PP8 є інгібітором ліпопро-

теїнліпази. Від співвідношення у молоці аполіпопротеїну С II і РР8 залежить активність ліпопротеїнліпази. Ліпопротеїнліпаза складається з двох однакових мономерів, кожен з яких містить 450 амінокислотних залишків. Загальна молекулярна маса димеру становить близько 90 000 Да. Оптимальними умовами для цього ензиму є рН 9,0 і температура 37 °С [389]. Ліпопротеїнліпаза у молоці зв'язана з міцелами казеїну і тому не проявляє своєї дії по відношенню до ацилгліцеролів, які знаходяться у складі жирових кульок і захищені мембраною. При руйнуванні мембрани жирових кульок відбувається гідроліз доступних ацилгліцеролів і молоко швидко гіркне. У зв'язку з суттєвим впливом на органолептичні властивості ліпопротеїнліпаза з точки зору технології є найважливішим ензимом молока. Інші естерази і ліпази присутні у малих кількостях і не мають великого значення.

Лужна фосфатаза або лужна фосфомоноестераза (К.Ф. 3.1.3.1). Ензим поширений у природі. Його виявили у різних тканинах і органах ссавців, а також у молоці. Дослідження властивостей лужної фосфатази показали, що її температурна інактивація відбувається за вищих значень температур, ніж відмирання *Mycobacterium tuberculosis*. Це дало підстави використовувати визначення активності лужної фосфатази, як тест на ефективність пастеризації молока. При цьому як субстрати беруть фенілфосфат, р-нітрофенілфосфат, фенофталеїнфосфат [182]. Лужна фосфатаза молока ідентична до відповідного ензиму молочної залози. Вона є мономером з молекулярною масою близько 85 000 Да. У молоці більша частина цього ензиму знаходиться у мембранах жирових кульок. Оптимальні умови для лужної фосфатази – температура 37°С, а рН залежно від субстрату: 6,8 (казеїн) або 10,5 (р-нітрофенілфосфат). Також до складу ензиму входять чотири іони  $Zn^{2+}$ , які є важливими для його активності. Встановлено, що іони  $Mg^{2+}$  активують лужну фосфатазу. Відповідно металзв'язувальні агенти можуть її інактивувати.



Важливою властивістю лужної фосфатази є її здатність до зворотної інактивації після короткочасної дії високої температури (130–140 °С, 3–5 секунд). Причому, після пастеризації, яка відбувається за нижчих температур, реактивація не відбувається. Ці особливості необхідно враховувати при визначенні її активності [478]. Реакція дефосфорилювання казеїну за участі лужної фосфатази у молоці не має великого значення, оскільки не відбувається в оптимальних умовах. Це ж стосується дефосфорилювання фосфопептидів, які утворюються під час визрівання сирів.

Кисла фосфатаза або кисла фосфомоноестераза (К.Ф. 3.1.3.2). Відноситься до глікопротеїнів. Суттєво відрізняється за своїми властивостями і значно меншою кількістю у молоці від лужної фосфатази. Переважно знаходиться у плазмі молока і лише близько 20 % у складі мембран жирових кульок. Причому, необхідно відзначити, що кислі фосфатази плазми молока і МЖКМ – це різні ензими. Також зростання активності кислої фосфатази у маститному молоці відбувається за рахунок двох ензимів лейкоцитарного походження.

Кисла фосфатаза плазми молока має молекулярну масу близько 42 000 Да. Вона характеризується ізоелектричною точкою  $pI = 7,9$ , тобто є основним протеїном і може бути виділена із знежиреного молока іонообмінною хроматографією на катіонообмінниках одночасно з лактоферином [555]. Оптимальним значенням рН для неї є 4,0 [144]. Кисла фосфатаза стійка до нагрівання. Повна інактивація настає через 10 хвилин при температурі 88 °С. Активність кислої фосфатази гальмують іони фтору, іони важких металів, а також ортофосфати і поліфосфати. Кисла фосфатаза відноситься до фосфопротеїнфосфатаз і може відщеплювати залишки ортофосфатної кислоти від казеїнів. Технологічне значення кислої фосфатази полягає у дефосфорилюванні казеїнів і фосфопептидів, що робить їх більш доступними до дії протеаз [184]. Окрім того, дефосфори-

лювання може впливати на біологічну активність казеїнових фосфопептидів.

Лізоцим (К.Ф. 3.1.2.17). Лізоцим був відкритий А. Флемінгом у різних рідинах організму, як антибактеріальний агент. Пізніше його також виявили у плазмі молока. Лізоцим молока корови відносно невеликий протеїн, який складається із 154 амінокислотних залишків і має молекулярну масу  $\sim 18\,000$  Да. Він суттєво відрізняється за первинною структурою від лізоциму молока людини (130 амінокислотних залишків,  $M = 15\,000$  Да), а також лізоциму курячого яйця [162]. Разом з тим, лізоцим молока корови дуже близький за своєю будовою до  $\alpha$ -лактальбуміну. Лізоцим молока корови є основним протеїном з  $pI \sim 9,5$ . Тому для його виділення використовують катіонообмінники [144].

Лізоцим гідролізує  $\beta$  (1-4)-зв'язки між N-ацетилмурамовою кислотою і N-ацетилглюкозаміном мукополісахаридів (пептидогліканів) клітинної стінки бактерій. Грам-позитивні бактерії більш чутливі до дії лізоциму, оскільки мають у складі клітинної стінки до 90 % пептидогліканів (у Грам-негативних їх близько 10 %). Також у Грам-негативних бактерій пептидоглікани захищені зовнішнім шаром ліпополісахаридів. При одночасній дії на Грам-негативні бактерії лізоциму і лактоферину останній змінює зовнішній ліпополісахаридний шар клітинної стінки бактерій і робить доступними пептидоглікани для розщеплення лізоцимом [476]. Оптимальне значення рН для лізоциму коров'ячого молока становить 6,35. Лізоцим стійкий до дії високих температур і витримує нагрівання до  $75\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 15 хвилин або до  $80\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 15 секунд.

Основна фізіологічна роль лізоциму – захист організму новонароджених, а також молочної залози від патогенних бактерій. У зв'язку з цим, враховуючи, що кількість лізоциму у молоці людини значно вища (100 мг/л), ніж у молоці корови (3 мг/л), були спроби додавати лізоцим курячого яйця у дитячі молочні продукти [162].

Лізоцим курячого яйця виробляється у промислових масштабах і є доступним. Проте це не покращило їх захисні властивості у зв'язку з втратою лізоцимом курячого яйця активності у шлунково-кишковому тракці людини. Також в окремих людей він може викликати алергію. Одним із шляхів вирішення цього питання може бути експресія рекомбінантного лізоциму людини в молоці трансгенних корів [560]. При цьому вже вдалося досягнути концентрації лізоциму людини у коров'ячому молоці – 26 мг/л.

Каталаза або  $H_2O_2$ : оксидоредуктаза (К.Ф. 1.11.1.16). Цей ензим широко розповсюджений у природі. У молоці більша його частина знаходиться у плазмі молока і менше 30 % – у мембранах жирових кульок. Каталаза з коров'ячого молока є гемовмісним протеїном з молекулярною масою близько 200 000 Да. Вона не стійка до нагрівання і повністю інактивується при температурі 70 °С протягом однієї години. До інгібіторів каталази відносяться наступні іони:  $Hg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $CN^-$  і  $NO_3^-$ . Каталаза використовується як індикатор ефективності пастеризації, а також присутності гнильної мікрофлори або молока від хворих тварин [549].

Лактопероксидаза (К.Ф. 1.11.1.7). Лактопероксидаза є другим (після ксантин-оксидоредуктази) за кількістю ензимом у молоці (~ 30 мг/л), що синтезується клітинами молочної залози. Лактопероксидаза це гемовмісний глікопротеїн. Включає до свого складу протопорфірин IX з іоном  $Fe^{2+}$ . Протопорфірин приєднаний ковалентно до залишків Глу<sub>375</sub> і Асп<sub>275</sub>. Лактопероксидаза складається з 612 амінокислотних залишків ( $M = 78\ 030$  Да). Існує всього десять ізоформ ензиму. Два варіанти, А і В, відрізняються рівнем амідування залишків глутамінової і аспарагінової кислот. Також свій вклад у гетерогенність лактопероксидази вносить розміщення чотирьох або п'яти олігосахаридних груп. Окрім іону феруму, молекула лактопероксидази містить один іон кальцію, який необхідний для стабілізації її структури. Присутність іону феруму обумовлює зелене

забарвлення протеїну і наявність максимуму поглинання при 412 нм ( $D_{412} : D_{280}$  становить  $\sim 0,9$ ). У молоці (рН  $\sim 6,7$ ) лактопероксидаза витримує температуру пастеризації (72 °С, 15 с), але інактивується при нагріванні до 78 °С (15 с). Враховуючи це, запропоновано рівень активності лактопероксидази використовувати для тестування ефективності температурної обробки молока. Лактопероксидаза є основним протеїном з рІ близько 9,6. Подібно до лактоферину, її можна виділяти препаративною хроматографією на катіонообмінниках. При цьому вона звільняється з катіонообмінника при вищих значеннях іонної сили у порівнянні з лактоферином [144].

Ферментативна активність лактопероксидази пов'язана зі здатністю окиснювати різні субстрати (ароматичні кислоти, ненасичені жирні кислоти, феноли та ін.). Для вимірювання її активності використовують хромогенний субстрат 2,2'-азино-біс-(3-етилбензотіазолін-6-сульфонову кислоту). Активність визначають за збільшенням поглинання при  $\lambda = 436$  нм (рН 5,5; 25 °С) [144].

Значення лактопероксидази насамперед полягає в тому, що вона входить до лактопероксидазної системи молока. Ця система складається з лактопероксидази, тіоціанату і пероксиду водню. За дії ензиму тіоціанат перетворюється у гіпотіоціанат, який є сильним окиснювачем, що згубно впливає на мікрофлору молока.



Лактопероксидазна система у 50-100 разів ефективніша за бактерицидною дією, ніж сам пероксид водню. Така система може бути використана для холодної пастеризації за відсутності холодильників або теплових пастеризаторів [75, 389]. Лактопероксидаза виробляється промислово і її комерційні препарати використовуються як антибактеріальні препарати в харчових продуктах, косметичних засобах, зубній пасті та ін. [138].

Ксантин-оксидоредуктаза (К.Ф. 1.1.3.22; 1.1.1.204). За кількістю цього ензиму найбільше серед усіх ензимів молока (~120 мг/л). Частково його характеристики наведені у розділі «Протеїни жирових кульок молока». Ксантин-оксидоредуктаза може знаходитись у двох формах – ксантиноксидази (К.Ф. 1.1.3.22) і ксантиндегідрогенази (К.Ф. 1.1.1.204). Ці форми можуть зворотно переходити одна в одну за дії сульфгідрильних реагентів. Також ксантиндегідрогеназа може незворотно переходити у ксантиноксидазу за рахунок обмеженого протеолізу. Ксантин-оксидоредуктаза каталізує окиснення азотистих основ гіпоксантину і ксантину до сечової кислоти, а також альдегідів до карбонових кислот з одночасним відновленням  $O_2$  до  $H_2O_2$ . За певних умов ензим каталізує дегідрування ксантину. Активність ксантин-оксидоредуктази зростає в результаті гомогенізації молока, витримування при 4 °С, а також нагріванні до 70 °С (5 хвилин). Причиною підвищення активності у цих випадках є перехід ензиму у водну фазу молока з мембран жирових кульок. У складі мембран жирових кульок ензим є більш стабільним до теплової інактивації [389].

Визначення активності ксантин-оксидоредуктази використовують для моніторингу теплової обробки молока при 80-90 °С. Ензим сприяє перетворенню триплетного кисню ( $^3O_2$ ) у синглетний ( $^1O_2$ ), який є прооксидантом у процесах окиснення ліпідів молока. Утворення  $H_2O_2$  за дії ксантин-оксидоредуктази є важливим для функціонування лактопероксидазної системи молока [75].

При потраплянні у кишківник людини ксантин-оксидоредуктаза проявляє сильну бактерицидну дію, продукуючи пероксинітрил ( $ONOO^-$ ) [73]. Велике значення, не пов'язане з її ензимною дією, ксантин-оксидоредуктаза має в утворенні жирових кульок у клітинах молочної залози. Для покриття крапель ліпідів перед їх проходженням через апікальну мембрану використовуються протеїни

ацидофілін, а також бутирофілін і димерна ксантиноксидаза, які поєднуються між собою дисульфідними зв'язками.

Супероксиддисмутаза (К.Ф. 1.15.1.1). Функція цього ензиму полягає у захисті тканин організму від окиснювальної дії супероксид радикалів ( $O_2^-$ ) в анаеробних системах. Супероксиддисмутаза молока повністю відповідає за характеристиками і будовою аналогічному ензиму з еритроцитів крові. Супероксиддисмутаза складається з двох ідентичних субодиниць ( $2 \times 16\,000$  Да), поєднаних дисульфідними зв'язками. Ензим містить важливі для його активності іони  $Cu^{2+}$  і менш важливі іони  $Zn^{2+}$ . Супероксиддисмутаза знаходиться у молоці у малих кількостях. Рівень її активності прямо пов'язаний з активністю ксантиноксидази. Можливо, вона потрапляє у молоко для нейтралізації прооксидантної дії ксантиноксидази. Розглядається питання додавання цього ензиму у молочні продукти для захисту ліпідів від окиснення [389].

## 2.5 Мінорні біологічно активні протеїни і пептиди молока

У молоці корів знайдено велику кількість різних природних протеїнів і пептидів у дуже малих концентраціях (мг і мкг на літр). Їх прийнято називати мінорними. Якщо у молоко вони потрапляють не випадково, то є велика ймовірність, що вони відносяться до біологічно активних сполук. У таких малих кількостях вони не можуть мати великого значення для пластичного і енергетичного обміну. На сьогодні відсутня чітка класифікація мінорних протеїнів і пептидів молока. Це переважно пов'язано з їх багатфункціональністю або відсутністю повних даних про їх властивості, біологічну дію і функції у молоці. Частина мінорних протеїнів була вже розглянута у підрозділах, що стосуються протеїнів жирових кульок (2.3) і ензимів молока (2.4). Характеристика окремих біоактивних мінорних протеїнів коров'ячого молока показана у табл. 16.

**Таблиця 16. Мінорні біологічно активні протеїни молока [184]**

Протеїн	Молекулярна маса, Да	Концентрація у коров'ячому молоці, мг/л	Джерело походження
$\beta_2$ -Мікроглобулін ( $\beta_2$ -Mikroglobulin)	11 636	9,5	Моноцити
Остеопонтин (Osteopontin)	60 000	3-10	Молочна залоза
Протеозо-пептон 3 (Proteose Peptone 3)	28 000	300	Молочна залоза
Фолат-зв'язувальний протеїн (Folat-binding Protein, FBP)	30 000	6-10	
Вітамін D-зв'язувальний протеїн (Vitamin D-binding Protein)	52 000	16	Кров
Вітамін B <sub>12</sub> -зв'язувальний протеїн (Vitamin B <sub>12</sub> -binding Protein)	43 000	0,1-0,2	
Ангіогенін 1 (Angiogenin 1)	14 577	4-8	Молочна залоза
Ангіогенін 2 (Angiogenin 2)	14 522		
Кініноген (Kininogen)	68 000/17 000		Кров
Трансферин сироватки (Serotransferrin)	77 000		Кров
$\alpha_1$ -Кислий глікопротеїн ( $\alpha_1$ -Acid glycoprotein)	40 000	<20	Кров
Церулоплазмін (Ceruloplasmin)	132 000		Молочна залоза
Просапосин (prosaposin)	66 000	6,0	Молочна залоза
Ензими (~60)	Різна	Сліди	Кров, молочна залоза

З використанням сучасних методів протеоміки, зокрема двовимірного електрофорезу в ПАГ у комбінації з мас-спектрометрією, виявлено близько 900 різних мінорних протеїнів у молоці. Їх походження, будова, властивості та функції інтенсивно вивчаються [550]. Частина з них ідентифікована і досліджена. Природні мінорні протеїни впливають на формування і функціонування судинної системи (ангіогеніни), імунної системи (ангіогеніни,  $\beta_2$ -мікроглобулін, остеопонтин, протеозо-пептон 3, лактопероксидаза, лізоцим, трансформуючі фактори росту  $\beta_1$  і  $\beta_2$ ), епітелію шлунково-кишкового тракту (інсуліноподібні фактори росту (IGF<sub>1</sub> та IGF<sub>2</sub>), епідермальні фактори росту (EGF), трансформуючий фактор росту (TGF $\alpha$ )). Мінорні вітамін-зв'язувальні протеїни приймають участь в обміні і засвоєнні вітамінів. Окрема група мінорних протеїнів молока впливає на молочну залозу і функції материнського організму (лептин, релаксин, зворотний інгібітор лактації) [184].

### 2.5.1. Мінорні протеїни

Протеозо-пептон 3 (PP3). Це термостабільний фосфогліко-протеїн протеозо-пептонної фракції молока неказеїнового походження. Він синтезується у молочній залозі і складається з 135 амінокислотних залишків (M ~ 28 000 Да). За дії плазміну він розщеплюється з утворенням двох великих фрагментів (~ 11 000 і ~ 18 000 Да), які теж присутні у молоці. У складі молекули PP3 знайдено п'ять фосфорильованих залишків серину (Сер<sub>29</sub>, Сер<sub>34</sub>, Сер<sub>38</sub>, Сер<sub>40</sub>, Сер<sub>46</sub>) і два глікозильовані залишки треоніну (Тре<sub>16</sub> і Тре<sub>86</sub>) та глікозильований залишок аспарагіну (Асп<sub>77</sub>) [195]. Окрім молочної сироватки, PP3 виявлений також у складі мембран жирових кульок. Біологічні функції PP3 остаточно не встановлені. Завдяки біфільній природі він, очевидно, може запобігати контакту між

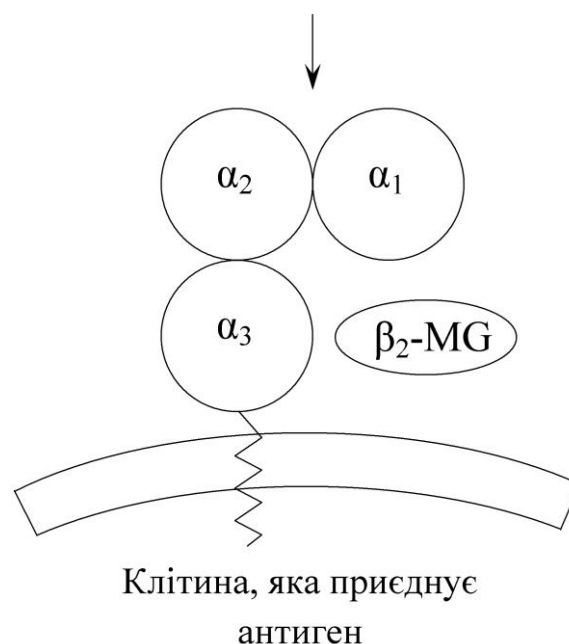


ліпазами і молекулами ліпідів. Інша біологічна дія РРЗ може бути пов'язана зі стимуляцією росту біфідобактерій, а також зі здатністю зв'язувати іони кальцію [181]. Пептид лактофорицин, який утворюється з РРЗ (f 113-135), проявляє бактерицидну дію щодо Грам-позитивних бактерій [110].

$\beta_2$ -Мікроглобулін ( $\beta_2$ -MG). Виявлений у молоці, молозиві та інших рідинах організму. Цей поліпептид складається з 98 амінокислотних залишків ( $M = 11\ 636$  Да).  $\beta_2$ -MG за первинною структурою є гомологом константної ділянки імуноглобулінів (п. 2.2.2.4), а також він входить до складу головного комплексу гістосумісності I класу (Main histocompatibility complex – МНС). Цей комплекс знаходиться на поверхні антигенпрезентувальних клітин і є необхідним для розпізнавання антигену рецептором Т-лейкоцитів. МНС I класу присутній на поверхні всіх ядерних клітин. Його будова показана на рис. 26. Комплекс складається з тридоменного протеїну ( $\sim 45\ 000$  Да) і  $\beta_2$ -MG. У коров'ячому молоці поява  $\beta_2$ -MG асоціюється з підвищеною експресією імуноглобулінів (Ig G) після народження теляти. Утворюється  $\beta_2$ -MG в результаті протеолізу соматичних клітин молока у молочній залозі. Біологічна дія  $\beta_2$ -MG у молоці не зовсім зрозуміла [181]. Можливо, вона пов'язана з регуляцією Fc рецепторів клітин молочної залози. Fc рецептори – це мембранні рецептори, які зв'язують комплекси антиген-антитіло в Fc-частині молекули імуноглобуліну. Назва рецептору походить від Fc-ділянки імуноглобуліну, яка утворюється при протеолізі папаїном шарнірної ділянки між  $C_{H1}$  і  $C_{H2}$  доменами ланцюга молекули імуноглобуліну (п. 2.2.2.4). Також  $\beta_2$ -MG може бути задіяний у процесах апоптозу ракових клітин з МНС I класу [561]. Функції  $\beta_2$ -MG потребують подальшого вивчення.

Вітамін-зв'язувальні протеїни. У молоці присутня група протеїнів, які здатні зв'язувати певні вітаміни. Вважають, що їх біологічна активність направлена на забезпечення засвоєння

організмом вітамінів. Такі протеїни можуть доставляти вітаміни в інтактному вигляді до відповідних рецепторів на поверхні стінки кишечника. При відсутності вітамін-зв'язувальних протеїнів ефективність засвоєння вітамінів спожитого молока суттєво зменшується. Незахищені молекули вітамінів також можуть бути використані мікроорганізмами кишечника. Цим можна пояснити бактерицидну дію вітамін-зв'язувальних протеїнів. У коров'ячому молоці знайдено щонайменше чотири вітамін-зв'язувальні протеїни – для вітаміну D, вітаміну B<sub>12</sub>, фолієвої кислоти і рибофлавіну. Також функцію зв'язування і переносу вітаміну А виконує протеїн сироватки молока  $\beta$ -Lg [184, 550].



**Рис. 26. Головний комплекс гістосумісності (МНС) I класу  
антигенпрезентувальних клітин**

Стрілкою показано місце приєднання  
антигену і рецептора Т-лейкоцитів

Вітамін D-зв'язувальний протеїн (DBP) у великих кількостях виявлений у молозиві, сироватці крові та у менших кількостях в молоці. Це глікопротеїн, що складається з 458 амінокислотних

залишків. Молекулярна маса його близько 52 000 Да. Синтезується DBP клітинами печінки. Молекула DBP може зв'язувати одну молекулу вітаміну D. Встановлено, що за зв'язування вітаміну відповідає домен, який включає до свого складу послідовність амінокислот 35-49. Інший домен DBP (амінокислотні залишки 350-403) здатний зв'язувати протеїн м'язового волокна G-актин і запобігати його полімеризації. G-актин – це глобулярна форма актину м'язових волокон, яка утворюється у безсолевому середовищі. У присутності солей (KCl) і АТФ G-актин здатний полімеризуватися з утворенням довгих молекул – так званий F-актин. Така властивість DBP може бути пов'язана з протизапальною та імуномодуляторною дією. В сучасних дослідженнях DBP також розглядають як генетичний фактор захворювань підшлункової залози, простати і раку крові [297].

У коров'ячому молоці вітамін B<sub>12</sub> переносить протеїновий комплекс (M ~ 280 000 Да) і кобаламін-зв'язувальний протеїн (M ~ 43 000 Да). У молоці людини три протеїни відповідають за транспорт і засвоєння вітаміну B<sub>12</sub>. Це внутрішньошлунковий фактор (GIF), транскобаламін (ТС) і гаптокорин. GIF зв'язує і доставляє молекулу вітаміну до кишківника і передає на ТС. Гаптокорин формує комплекс з молекулою вітаміну B<sub>12</sub> і забезпечує його абсорбцію клітинами кишківника. Зв'язуючи вітамін B<sub>12</sub>, гаптокорин робить його недоступним для бактерій і проявляє таким чином антибактеріальну дію [169, 281].

Фолат-зв'язувальний протеїн (FBR) знайдений у молоці корів і людини. Його концентрація у молозиві приблизно у п'ять разів вища, ніж у молоці. Це мономерний глікопротеїн, що складається з 222 амінокислотних залишків. Його молекулярна маса може становити від 25 720 до 30 000 Да залежно від вмісту олігосахаридних груп. Біологічна дія FBR полягає у зв'язуванні, транспортуванні і забезпеченні абсорбції фолієвої кислоти у кишківнику. При цьому FBR теж проявляє антибактеріальну дію [383, 384].

Рибофлавін-зв'язувальний протеїн (RfBP). Це фосфоглікопротеїн з молекулярною масою  $\sim 37\,000$  Да. Є дві гіпотези щодо потрапляння цього протеїну у молоко. Спершу вважали, що RfBP потрапляє у молоко з крові. Проте пізніше було встановлено, що його концентрація у молоці вища, ніж у сироватці крові. Тому була висунута друга гіпотеза, згідно з якою RfBP транспортується у молоко з молочної залози, де він синтезується у відповідь на дію естрогенів. Про важливість біологічної функції цього протеїну свідчить консервативність його первинної структури. Виявилося, що амінокислотна послідовність RfBP більш як на 30 % збігається з аналогічним протеїном у курчат – FBP [550].

Амілоїд АЗ (AA3). Цей протеїн синтезується у молочної залозі. Найвища його концентрація у молозиві. Через декілька днів після пологів вміст AA3 знижується. Біологічна функція цього протеїну полягає у протидії приєднанню патогенних бактерій до ентероцитів кишківника. У грудних дітей AA3 також запобігає розвитку некротизуючого ентероколіту [184].

Інгібітор цистеїнових протеїназ (CPI). CPI виявлений у коров'ячому молоці. Інша назва його, яка зустрічається у науковій літературі, цистатін С. Молекулярна маса CPI становить близько 12 000 Да. Інгібітор цистеїнових протеаз проявляє бактерицидну дію. Іншою біологічною активністю CPI є протидія розрідженню кісткової тканини, яке спричиняється великими багатоядерними клітинами – остеокластами. Ензими, які секретують ці клітини, можуть викликати протеоліз протеїнів кісткового матриксу [317].

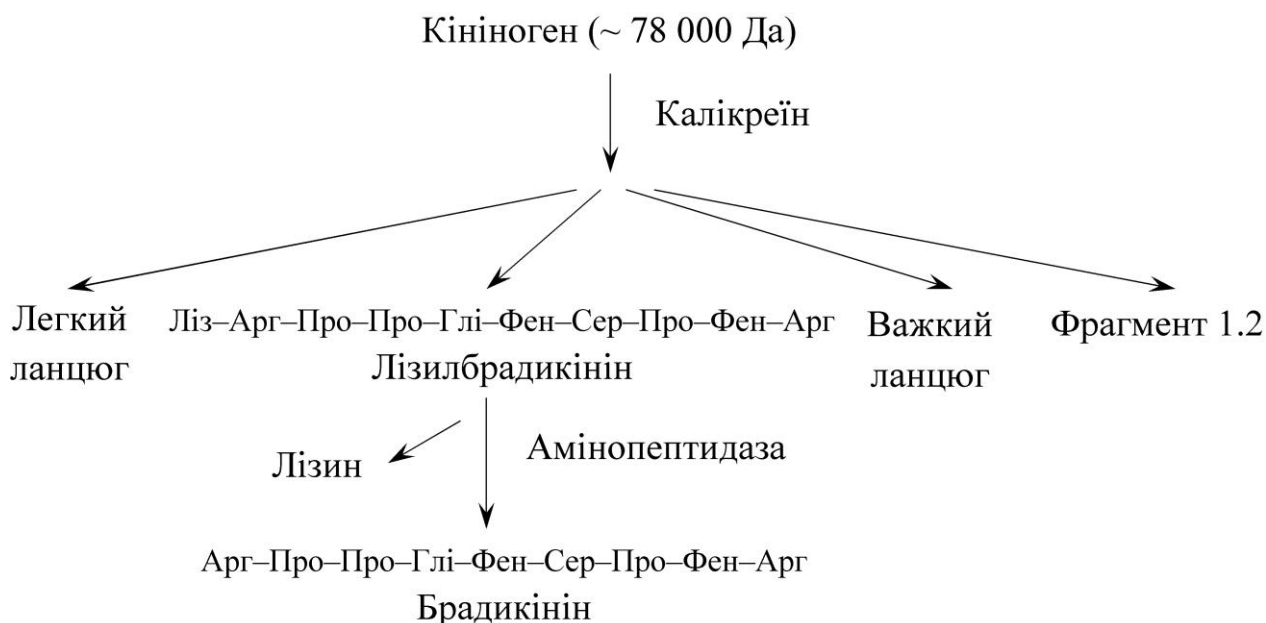
Остеопонтин (OPN). Остеопонтин перш за все було виявлено у мінералізованому матриксі костей великої рогатої худоби, а також в інших тканинах і рідинах, в т.ч. у молоці. Знайдений остеопонтин і в молоці людини. OPN відноситься до кислих фосфоглікопротеїнів. Він складається з 262 амінокислотних залишків ( $M \sim 29\,283$  Да). Характерною особливістю його амінокислотного складу є відносно

велика кількість залишків серину і треоніну, які можуть приєднувати ортофосфатні і олігосахаридні групи. Всього у молекулі OPN розміщено 27 фосфосеринових і одна фосфотреонінова група. У первинній структурі OPN знайдено два гепарин-зв'язувальні сайти, один домен для зв'язування пептиду Арг-Глі-Асп і численні кальцій-зв'язувальні сайти [123]. Для остеопонтину притаманний широкий спектр біологічних активностей, які проявляються в різних тканинах організму. Сюди можна віднести участь у процесах розвитку і мінералізації кісток, утворення і розвитку кровоносних судин (ангіогенез), загоєння ран, утворення метастазів ракових пухлин, апоптозу (програмоване руйнування клітин). Також OPN може стимулювати утворення одного з видів Т-лейкоцитів, а саме Т-хелперів I-го і II-го класів. Яка з його біологічних функцій має значення у молоці – остаточно не встановлено. Найбільш імовірно, це може бути кальцій-зв'язувальна і бактерицидна дія. Цікавими у зв'язку з цим є дані щодо сприяння OPN прояву багатьох біологічних активностей лактоферином. Виявлені ділянки електростатичної комплементарності остеопонтину і лактоферину, які забезпечують їх взаємодію [142, 181]. Також на сьогодні встановлено, що остеопонтин впливає на процеси інволюції молочних залоз і синтез протеїнів казеїнового комплексу молока [483]. Враховуючи важливе значення остеопонтину для розвитку фізіологічних систем новонароджених, було запропоновано додавати його в продукти для дитячого харчування [245]. На теперішній час остеопонтин виробляється промислово із сироватки молока за допомогою аніонообмінної хроматографії та використовується в дитячих продуктах [123].

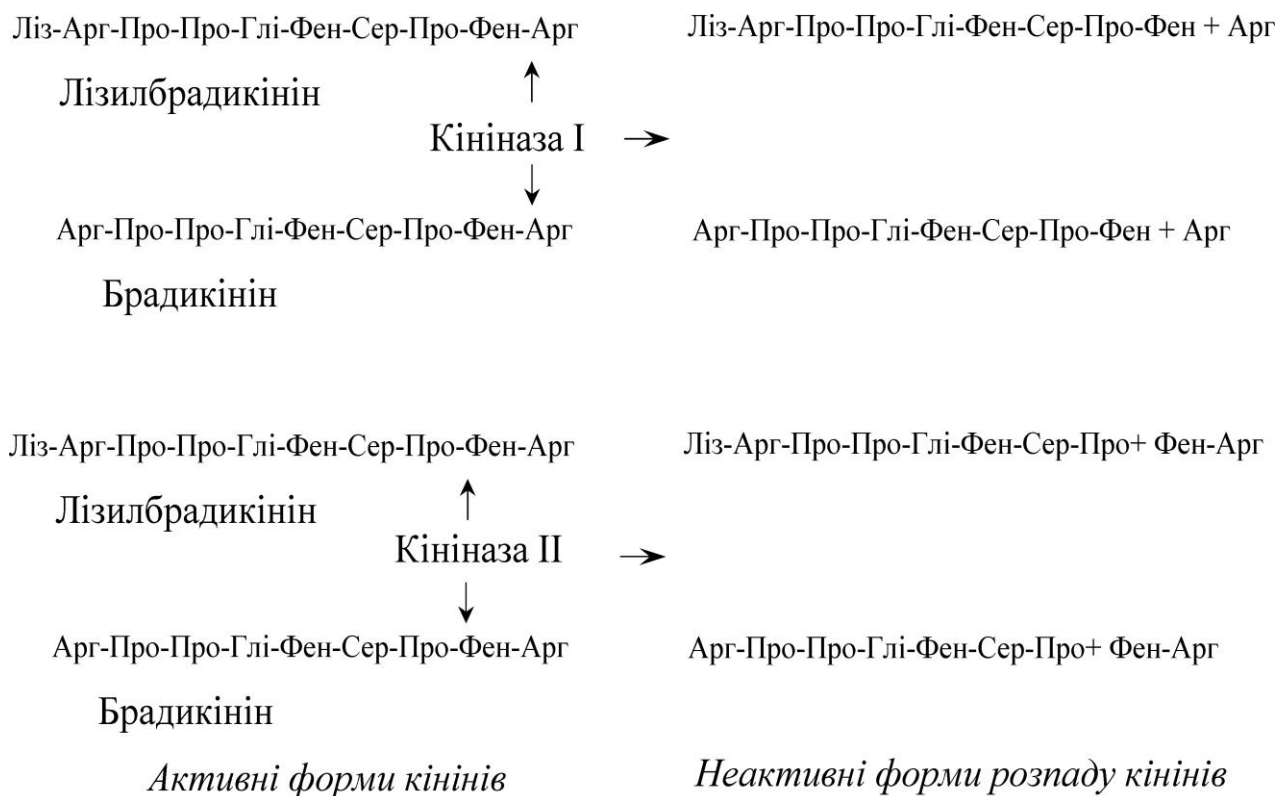
Ангіогеніни (ANG). Назва цих протеїнів походить від слова «ангіогенез». Ангіогенез – це процес утворення нових кровоносних судин брунькуванням від існуючих судин для нормального кровопостачання тканин, які ростуть. Ангіогенез частково відповідає

за утворення кровоносних судин під час ембріонального розвитку (інша частина судин утворюється з ангіобластів), а також є основним способом утворення судин у дорослих організмів. Ангіогенез є важливим процесом при загоєнні ран, утворенні доброякісних і злоякісних пухлин [2]. Відомо багато сполук, які стимулюють або гальмують ангіогенез. Одними з таких регуляторів є ангіогеніни молока. Еволюційно ангіогеніни споріднені з РНКазою підшлункової залози. У процесі еволюції ці протеїни отримали нові функції, а саме захисту організму і здатності впливати на ангіогенез [498]. Необхідно відзначити, що РНКазна активність ангіогенінів також є важливою для регуляції ангіогенезу. У молоці і сироватці крові корів знайдено два види ангіогенінів: ангіогенін 1 (ANG-1) з молекулярною масою ~15 000 Да і ангіогенін 2 (ANG-2) з молекулярною масою близько 17 000 Да. Вони подібні за своєю первинною структурою – близько 57 % амінокислотних послідовностей ANG-1 і ANG-2 збігаються [550]. Крім цього, ANG-2 є глікопротеїном (має один олігосахаридний залишок), що знижує його РНКазну активність. Гомологічний до ANG-1 і ANG-2 ангіогенінів коров'ячого молока протеїн знайдений у молоці людини. У ангіогенінів, окрім стимуляції ангіогенезу, виявлені інші види біологічної активності. Це регуляція активності ензиму NO-синтази в ендотеліальних клітинах пупцевої вени ембріона людини, інгібіторна дія на процеси розрідження кісткової тканини остеокластами, індукція синтезу цитокінів лейкоцитами. Вважають, що основними функціями ангіогенінів молока є захисна дія щодо клітин молочної залози, а також клітин кишківника новонароджених [356, 482, 524].

Кініногени. Це протеїни, які є попередниками судинорозширювальних гормонів – кінінів. Утворення кінінів в організмі відбувається в результаті послідовної дії на кініноген двох протеаз – калікреїну (протеїназа плазми крові) і амінопептидази:



Дія обох кінінів – брадикініну і лізилбрадикініну полягає у розслабленні гладких м'язів судин, що призводить до зниження тиску крові, а також збільшує проникність капілярів [2]. Інактивація кінінів відбувається внаслідок дії двох ензимів – кінінази I (карбокси-пептидази) і кінінази II (дипептидил-карбокси-пептидази).



Інша назва кінінази II – ангіотензин-перетворювальний ензим (АПЕ), оскільки він може відщеплювати дипептид у ангіотензину I. У молоці корів знайдено два види кініногенів з молекулярною масою > 68 000 Да і 17 000 Да, які відрізняються від кініногенів плазми крові. Кініноген (68 000 Да) складається з 626 амінокислотних залишків і синтезується у печінці, а кініноген (17 000 Да) може синтезуватися у різних тканинах. У молоці також виявлені всі чотири продукти протеолізу кініногенів – лізилбрадикінін, легкий і важкий ланцюги та фрагмент 1.2, які потрапляють туди з молочної залози. Їх роль у молоці остаточно не встановлена. Відомо, що фрагмент 1.2 здатний стимулювати проліферацію остеобластів і формування кісткової тканини [558, 559].

Міnorні глікопротеїни молока. У коров'ячому молоці ідентифіковано декілька глікопротеїнів з певною біологічною активністю. До них можна віднести просапосин (PSAP), глікопротеїн M-1 і оросамукоїд ( $\alpha_1$ -кислий глікопротеїн). Просапосин (M~66 000 Да) є попередником чотирьох різних сапосинів – фрагментів, що включають близько 80 амінокислотних залишків кожен. У молоці корови, людини та інших ссавців виявлено лише просапосин. Є дані, що просапосин впливає на розвиток і функціонування нервової системи. Просапосин молока людини є важливим для функціонування кишківника новонароджених. M-1 глікопротеїн (M~10 000 Да) стимулює розвиток біфідобактерій. Оросамукоїд (M~40 000 Да) був виявлений лише у молозиві. Його біологічна дія пов'язана з модуляцією імунної системи [91, 184].

### **2.5.2 Природні біоактивні пептиди і гормони молока**

Регуляція фізіологічних функцій організму і його пристосування до умов середовища здійснюється за допомогою нервової системи, а також складної розгалуженої системи різних сигнальних сполук. Раніше така система називалася ендокринною, а сигнальні сполуки –



гормонами. В міру розвитку біохімії і молекулярної біології (кінець ХХ і початок ХХІ століття) було відкрито багато інших сигнальних молекул різного походження і різних механізмів передачі сигналів. На сьогодні існує декілька варіантів класифікації сигнальних сполук в організмі: за місцем їх утворення; за їх хімічною будовою; за механізмом передачі сигналу і функціями або процесами, які вони регулюють в організмі [2].

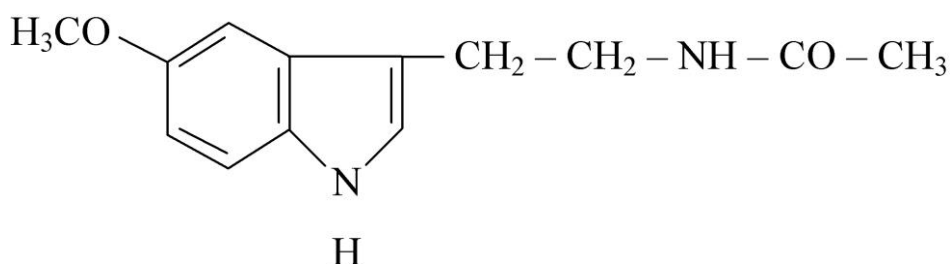
За хімічною будовою сигнальні молекули поділяють на сполуки протеїнового (поліпептиди, пептиди і похідні амінокислот) та ліпідного (похідні холестеролу і фосфоліпідів) походження. За місцем утворення розрізняють істинні або класичні гормони, які синтезуються і виділяються у кров'яне русло ендокринними залозами (кора наднирників, щитовидна і паращитовидна залози, гіпоталамус, гіпофіз, епіфіз, ендокринні клітини підшлункової залози, статеві залози). Для класичних гормонів характерний ендокринний або дистальний спосіб передачі сигналів, коли цільові клітини або тканини знаходяться віддалено від місця синтезу гормону. Окрім цього, в організмі виявлена велика кількість сполук, які можуть передавати сигнали паракринно (між сусідніми клітинами тканин або органу), аутокринно (сигнальна сполука діє на клітину, де вона синтезована) та інтракринно (сигнальна сполука діє у клітині, де вона синтезована). Їх часто відносять до тканинних гормонів. Детальна класифікація таких сполук досить складна і остаточно не розроблена. З біологічної точки зору також важливим є розподіл сигнальних сполук за їх фізіологічною дією та її інтенсивністю. На сьогодні вже встановлені деталі регуляторної дії для багатьох сигнальних молекул. Виявилось, що така звичайна і зрозуміла фізико-хімічна властивість як гідрофобність сигнальної молекули має суттєве значення для того, за якими механізмами буде реалізовуватися сигнал у клітині. Відомо, що такі механізми включають три стадії: сприйняття сигнальної сполуки клітиною-мішенню; перетворення сигналу в доступну для клітини форму; відповідь клітини на отриманий сигнал. Сприйняття хімічного сигналу відбувається за участю спеціального протеїну-

рецептора. На кожен сигнальний молекулу є свій рецептор. Всі гідрофільні сигнальні молекули (поліпептиди, пептиди і катехоламіни) сприймаються рецепторами, які знаходяться на поверхні клітинної мембрани. Це пов'язане з тим, що гідрофільні сигнальні сполуки не здатні проникати через клітинну мембрану. Гідрофобні сигнальні сполуки (стероїдні і тиреоїдні гормони) можуть проникати всередину клітин-мішеней. Їхні рецептори знаходяться у клітині. Загалом, відповідь на гідрофільні сигнальні молекули настає швидше (секунди або хвилини), ніж на гідрофобні (хвилини або години) [10, 14].

У молоці і молозиві виявлено багато різних сигнальних сполук протеїнової природи [184, 396, 426, 550]. Переважно вони відносяться до пептидів і поліпептидів. Частина гормонів і біоактивних пептидів потрапляє у молоко з крові, а частина синтезується у молочній залозі. Як правило, у молозиві їх концентрація вища, ніж у молоці. Необхідно відзначити, що у багатьох випадках не встановлено остаточно, чим зумовлена присутність цих біоактивних молекул у молоці. Проте, якщо їх концентрація у молоці вища, ніж у крові, то є велика ймовірність, що вони виконують важливі функції і потрапили у молоко не випадково. До таких природних біоактивних пептидів і гормонів протеїнової природи коров'ячого молока можна віднести: соматостатин, гонадотропін-рилізінг-гормон, паратгормон-подібний пептид, пролактин, інсулін, інсуліноподібні фактори росту. На сьогодні доведено, що ці біоактивні сполуки відіграють важливу роль у розвитку і формуванні різних фізіологічних систем новонародженого організму. Насамперед це стосується шлунково-кишкового тракту, імунної та ендокринної систем [184].

Загальний список і коротка характеристика найважливіших природних біоактивних пептидів і гормонів молока наведені у табл. 17. Для систематизації даних про гормони молока у таблиці всі сигнальні молекули розділені на дві частини: гормони, які виробляються ендокринними залозами і гормони, що виробляються

спеціалізованими клітинами у складі інших тканин. В першій групі гормони, у свою чергу, поділені за місцем синтезу (ендокринна залоза). Другу групу умовно ділимо на гастроінтестинальні гормони, фактори росту, цитокіни, адипокіни і нейропептиди. До факторів росту відносяться поліпептиди, які відіграють важливу роль у диференціації і розвитку різних клітин, впливаючи на них безпосередньо через мембранні рецептори. Багато різних факторів росту знайдено у молоці (див. табл. 17). Найважливішими з них є інсуліноподібний фактор росту I, який виявлено у коров'ячому молоці та молоці людини [426]. До цитокінів відносяться поліпептиди, ще секретуються лейкоцитами та іншими клітинами, які опосередковують міжклітинні взаємодії за імунної відповіді [23]. Цитокіни є важливими при формуванні імунної відповіді на інфекцію, травму, запалення, злоякісну трансформацію клітин. Цитокіни умовно поділяють на інтерлейкіни, фактори некрозу пухлин, колонієстимулювальні фактори. Для повноти картини в таблицю включені також класичні гормони непротеїнової природи – це гормони кори наднирників і статевих залоз. З класичних гормонів, що знайдені у молоці, заслуговує на увагу гормон епіфізу – мелатонін. За будовою він відноситься до біогенних амінів:



Встановлено, що мелатонін позитивно впливає на емоційний стан і сон. Найвища його концентрація в коров'ячому молоці досягається опівночі. Це було використано на практиці для отримання молока з високим вмістом мелатоніну [489, 532].

**Таблиця 17. Гормони коров'ячого і жіночого молока**

Гормон	Наявність у			Біологічна дія
	МОЛОЗИВІ КОРІВ	МОЛОЦІ КОРІВ	ЖІНОЧОМУ МОЛОЦІ	
1	2	3	4	5
<b>Гормони коркової частини наднирникових залоз</b>				
Кортизол		+		Головний глюкокортикоїд. Впливає на обмін глюкози (стимулює глюконеогенез). Також діє на обмін протеїнів, ліпідів, функції імунної системи
Кортикостерон		+		Менш активний, ніж кортизол, глюкокортикоїд. Не має протизапальної дії.
Альдостерон		+		Головний мінералокортикоїд. Впливає на водно-сольовий баланс (стимулює реабсорбцію $\text{Na}^+$ і $\text{Cl}^-$ у каналцях нефронів нирок).
<b>Стероїдні гормони статевих залоз</b>				
Естрадіол		+	+	Найактивніший жіночий статевий гормон (естроген). Впливає на репродуктивну функцію і формування вторинних статевих ознак.
Естрон		+	+	Жіночий статевий гормон (естроген). Діє подібно до естрадіолу, але менш активний. Утворюється при окисненні естрадіолу.
Естріол		+	+	Жіночий статевий гормон (естроген). Продукт біотрансформації естроноу. Малоактивний.
Прогестерон		+	+	Жіночий статевий гормон (прогестаген). Регулює процеси прийняття і розвитку заплідненої яйцеклітини у матці. Спричиняє розвиток молочних залоз.

Продовження таблиці 17

1	2	3	4	5
Тестостерон		+		Чоловічий статевий гормон. Впливає на сперматогенез і формування вторинних статевих ознак. Проявляє анаболічну дію.
Гормони щитоподібної залози				
Тироксин (3,5,3',5'- тетрайодтиронін)		+	+	Головний гормон щитоподібної залози. Підвищує рівень обміну речовин у клітинах.
Трийодтиронін (3,5,3'- трийодтиронін)		+	+	Утворюється в результаті дейодування тироксину в периферійних тканинах. У декілька разів активніший, ніж тироксин.
Гормони паращитоподібної залози				
Паратгормон (паратиреоїдний гормон)		+	+	Поліпептид (84 амінокислотні залишки). Підвищує концентрацію $Ca^{2+}$ і знижує концентрацію фосфатів у крові.
Паратгормон- подібний пептид Parathyreoid hormone related peptide (PTHrP)		+		Підвищує концентрацію $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ і фосфатів у крові. Можливо, також синтезується у молочній залозі.
Кальцитонін			+	Поліпептид (32 амінокислотні залишки). Знижує концентрацію $Ca^{2+}$ і неорганічних фосфатів у плазмі крові.
Гормони гіпоталамуса				
Соматостатин		+	+	Циклічні тетрадекапептиди. Гальмують звільнення гормону росту та деяких інших гормонів.
Гонадоліберин (гонадотропін- рилізинг-гормон) Gonadotropin- releasing hormone (GnRH)	+	+	+	Стимулює синтез і звільнення гонадотропних гормонів передньої долі гіпофізу – фолікулостимулюючого (ФСГ) і лютеїнізуючого гормону (ЛГ)

Продовження таблиці 17

1	2	3	4	5
Тироліберин (тиротропін- рилізінг-гормон) Tyrotropin-releasing hormone (TRH)	+	+	+	Стимулює синтез і звільнення тирео- тропного гормону гіпофізу (ТТГ)
Гонадоліберин- асоційований пептид Gonadotropin- releasing hormone- associated peptide (GAP)		+		Гальмує синтез і секрецію гормону гіпофіза – пролактину
Соматоліберин (Соматотропін- рилізінг-гормон) Growth hormone- releasing factor (GRF)			+	Стимулює синтез і звільнення гормону росту в гіпофізі
Гормони передньої частини гіпофіза				
Гормон росту або соматотропін Growth hormone (GH) Somatotropin (ST)	+	+	+	Регуляція росту організму у постнатальний період.
Пролактин (маотропін, лютеотропний гормон) Prolactin	+	+	+	Бере участь в ініціації та стимуляції лактації.
Тиреотропний гормон (тиротропін) Thyroid-stimulating hormone (TSH)			+	Стимуляція синтезу тиреоїдних гормонів. Підтримка структури і активності щитоподібної залози.

## Продовження таблиці 17

1	2	3	4	5
Гормон епіфізу				
Мелатонін Melatonin		+	+	Регуляція добових (циркадних) коливань життєвих функцій організму (сон, температура, поведінка)
Гормон підшлункової залози				
Інсулін Insulin		+	+	Регуляція обміну вуглеводів. Стимуляція росту і проліферації клітин.
Гормони шлунково-кишкового тракту				
Гастрин Gastrin		+	+	Стимулює секреторну активність клітин слизової оболонки шлунка (звільнення соляної кислоти і пепсину).
Бомбезин (гастрин-рилізинг-пептид) Bombesin (gastrin-releasing peptide, GRP)		+	+	Стимулює синтез гастрину G-клітинами шлунка і клітинами слизової оболонки дванадцятипалої кишки
Нейротензин Neurotensin		+	+	Гальмує моторику шлунка і кишківника. Збільшує кровопостачання до клубової кишки.
Шлунковий інгібувальний пептид (ШІП) Gastric inhibitory polypeptide (GIP)			+	Гальмує секреторну функцію і моторику шлунка. Стимулює секрецію інсуліну.
Вазоактивний інтестинальний поліпептид Vasoactive intestinal peptide (VIP)			+	Стимулює секрецію електролітів і води в кишківнику, розслабляє гладкі м'язи кишківника, розширює периферійні судини, гальмує секрецію соляної кислоти в шлунку.
Пептид YY Peptide YY (PYY) Peptide tyrosine tyrosine			+	Гальмує секрецію соляної кислоти в шлунку, яка стимульована гастрином

## Продовження таблиці 17

1	2	3	4	5
Фактори росту				
Інсуліноподібний фактор росту I (ІФР-I) Insulin-like growth factor I (IGF-I)	++	+	+	Комплекс пептидів. Синтезується стромальними клітинами молочної залози. Впливає на проліферацію різних клітин, засвоєння глюкози і синтез глікогену.
Інсуліноподібний фактор росту II (ІФР-II) Insulin-like growth factor II (IGF-II)	++	+		Комплекс пептидів. Синтезується епітеліальними клітинами молочної залози. Впливає на проліферацію різних клітин.
Релаксин Relaxin		+	+	Поліпептид (~ 6000 Да). За властивостями подібний до інсуліну. Впливає на розвиток і функціонування молочних залоз, а також на перебіг пологів.
Трансформувальний фактор росту $\alpha$ (ТФР- $\alpha$ ) Transforming growth factor $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )	++	+	+	Регулює розвиток епітеліальних клітин шлунково-кишкового тракту.
Трансформувальний фактор росту $\beta$ (ТФР- $\beta$ ) Transforming growth factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )	+	+	+	Гальмує розвиток секреторних епітеліальних клітин, пов'язаних з інволюцією молочних залоз. Стимулює імунну відповідь при інфекціях.
Фактор росту епідерміса (ФРЕ) Epidermal growth factor (EGF)	+	+	++	Направляє диференціацію і проліферацію епітеліальних клітин шлунково-кишкового тракту. Впливає на розвиток зубів.
Фактор росту фібробластів (ФРФ) Fibroblast growth factor (FGF)	++	+		Регулює розвиток епітеліальних, ендотеліальних клітин, фібробластів. Сприяє синтезу колагену. Бере участь в ангіогенезі і заживленні ран.



## Продовження таблиці 17

1	2	3	4	5
Фактор росту тромбоцитів (ФРТ) Platelet-derived growth factor (PDGF)	++	+		Бере участь в ембріональному розвитку. Регулює розвиток різних типів клітин.
ІФР-зв'язувальні протеїни IGF-binding proteins (IGFBPs)	+	+		Група з шести гомологічних протеїнів, здатних зв'язуватися з IGF I і II та гальмувати або рідше стимулювати їх активність.
Активатор плазміногену (АП) Tissue plasminogen activator (tPA)		+		Каталізує перетворення плазміногену в плазмін. Можливо впливає на трофіку молочної залози. У молоці асоційований з міцелами казеїну.
Бетацелюлін Betacellulin (BTC)		+	+	Входить до складу пептидів фактора росту епідерміса. Відіграє основну роль у розвитку шлунково-кишкового тракту немовлят.
Інгібітор росту з молочної залози (ІРЗМЗ) Mammary-derived growth inhibitor (MDGI)		+		Гальмує розвиток тканин молочної залози. Виділений з молочної залози і мембран жирових кульок молока. Перспективний для лікування раку грудей.
Цитокіни				
Інтерлейкін-1 (ІЛ-1) Interleukin-1 (IL-1)	++	+		Імуномодуляторна дія. Впливає на Т і В-лімфоцити, макрофаги. Зумовлює появу лихоманки, гострої стадії імунної відповіді. Існує у вигляді ІЛ-1 $\alpha$ (17,5 кДа) і ІЛ-1 $\beta$ (17,3 кДа)
Інтерлейкін-6 (ІЛ-6) Interleukin-6 (IL-6)	++	+	+	Імуномодуляторна дія. Впливає на функції Т і В-лімфоцитів, на гемопоез. Індукує гостру стадію імунної відповіді. Поліпептид (26 кДа).

## Продовження таблиці 17

1	2	3	4	5
Фактор некрозу пухлин $\alpha$ (ФНП- $\alpha$ ) Tumor necrosis factor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	++	+	+	Регулює розвиток різних типів клітин. Є медіатором запальних та імунних реакцій. Цитотоксичний для різних типів трансформованих клітин. Поліпептид (52 кДа).
Інтерферон гама Interferon $\gamma$ (INF- $\gamma$ )	++	+		Активує розвиток Т і В-лімфоцитів, макрофагів, натуральних клітин-кілерів. Впливає на експресію головного комплексу гістосумісності. Поліпептид (17,1 кДа).
Колонієстимулювальний фактор 1 Macrophage colony-stimulating factor 1 (CSF-1)			+	Зв'язується з рецепторами гемопоетичних стовбурових клітин, що спричиняє їх проліферацію і диференціацію в лейкоцити. Захист від мікроорганізмів.
Адипокіни				
Лептин Leptin	++	+	+	Синтезується у жировій тканині адипоцитами (167 амінокислотних залишків). Регулює енергетичний обмін, апетит, розвиток і апоптоз клітин молочних залоз.
Грелін Ghrelin			+	Поліпептид (28 амінокислотних залишків). Бере участь у засвоєнні їжі, утворенні жирової тканини, довготерміновому регулюванні ваги тіла.
Резистин Resistin			+	Бере участь у регуляції енергетичного обміну, утворенні жирової тканини. Є сигналом, що обмежує її утворення.
Адипонектин Adiponectin			+	Найбільш поширений адипоцит у молоці. Низький рівень адипонектину в крові корелює з ожирінням і діабетом другого типу.

## Закінчення таблиці 17

1	2	3	4	5
Обестатин Obestatin			+	Поліпептид (23 амінокислотні залишки). Знижує рівень засвоєння їжі і вагу тіла завдяки впливу на моторику шлунку і кишківника.
Нейропептиди				
Галанін Galanin			+	Нейропептид (29 амінокислотних залишків). Стимулює ріст і відновлення сенсорних нервів периферійної нервової системи кишківника.
Дельта сон-індукуючий пептид Delta sleep-inducing peptide (DSIP).			+	Нейропептид (9 амінокислотних залишків). Викликає тип сну, який супроводжується зростанням дельта-ритмів на електроенцефалограмі.

Адипокіни синтезуються в клітинах жирової тканини – адипоцитах. За визначенням Патріка Фокса, оскільки адипокіни безпосередньо не впливають на імунну систему, як цитокіни (імуномодуляторні агенти), їх правильніше називати гормонами жирової тканини [184]. Дія адипокінів пов'язана з процесами засвоєння їжі, енергетичним обміном, гомеостазом глюкози та ін. Саме адипокінам відводять важливу роль у захисній функції грудного молока [280, 283].

Лептин, як єдиний з адипокінів, що входить до складу як до коров'ячого молока, так і до складу молока людини, заслуговує на особливу увагу. У перекладі з грецької лептин означає тонкий або слабкий. Лептин – це протеїн (167 амінокислотних залишків), який синтезується жировими клітинами і циркулює у крові. Функція лептину була встановлена на мишах, у яких був пошкоджений ген, що відповідає за його синтез. Такі миші не могли насититися їжею і мали надлишкову вагу. Подібна картина спостерігалася у тварин з

дефектним геном, який відповідає за синтез лептинових рецепторів. Лептинові рецептори розміщені у головному мозку та інших тканинах організму. Рецептори головного мозку опосередковують вплив лептину на апетит. У людей з пошкодженим геном лептину теж спостерігається ожиріння. Очевидно, що лептини та їх рецептори є ланками одного механізму, який регулює кількість споживання їжі. Такий механізм підтверджує ліпостатичну гіпотезу регуляції споживанні їжі. Суть цієї гіпотези зводиться до утворення гуморальних факторів жировою тканиною, які сигналізують про рівень накопичення жирів у центральну нервову систему. За іншими гіпотезами такими факторами можуть бути поліпептиди шлунково-кишкового тракту (кишково-пептидна гіпотеза), рівень глюкози (глюкостатична гіпотеза) і значення температури тіла (термостатична гіпотеза) [2].

У корів, окрім жирових клітин, лептин також синтезується епітеліальними клітинами молочної залози. Концентрація його у молозиві значно вища, ніж у молоці, а у молоці вища, ніж у плазмі крові [404]. Отже, лептин може відігравати певну роль в обміні речовин у новонародженого [550]. Також важливим є те, що рецептори лептину знайдені у молочній залозі. Це може свідчити про його паракринну або автокринну дію [173, 174, 175]. Регуляторну функцію лептину підтверджує його здатність гальмувати проліферацію клітин епітелію молочної залози у клітинній культурі або підвищувати рівень проліферації цих клітин при сумісній дії з пролактином (гормоном, який стимулює лактацію). Цікавим у зв'язку з цим є факт, що заміна амінокислоти Арг на Цис у 25-му положенні первинної структури лептину призводить до збільшення кількості утвореного молочною залозою молока у гомозиготних за таким геном лептину корів у період лактації [106].

Враховуючи отримані дані про роль лептину в регуляції апетиту і забезпеченні нормального набору ваги новонародженим, важливо контролювати його рівень у замінниках жіночого молока [305, 345, 513].

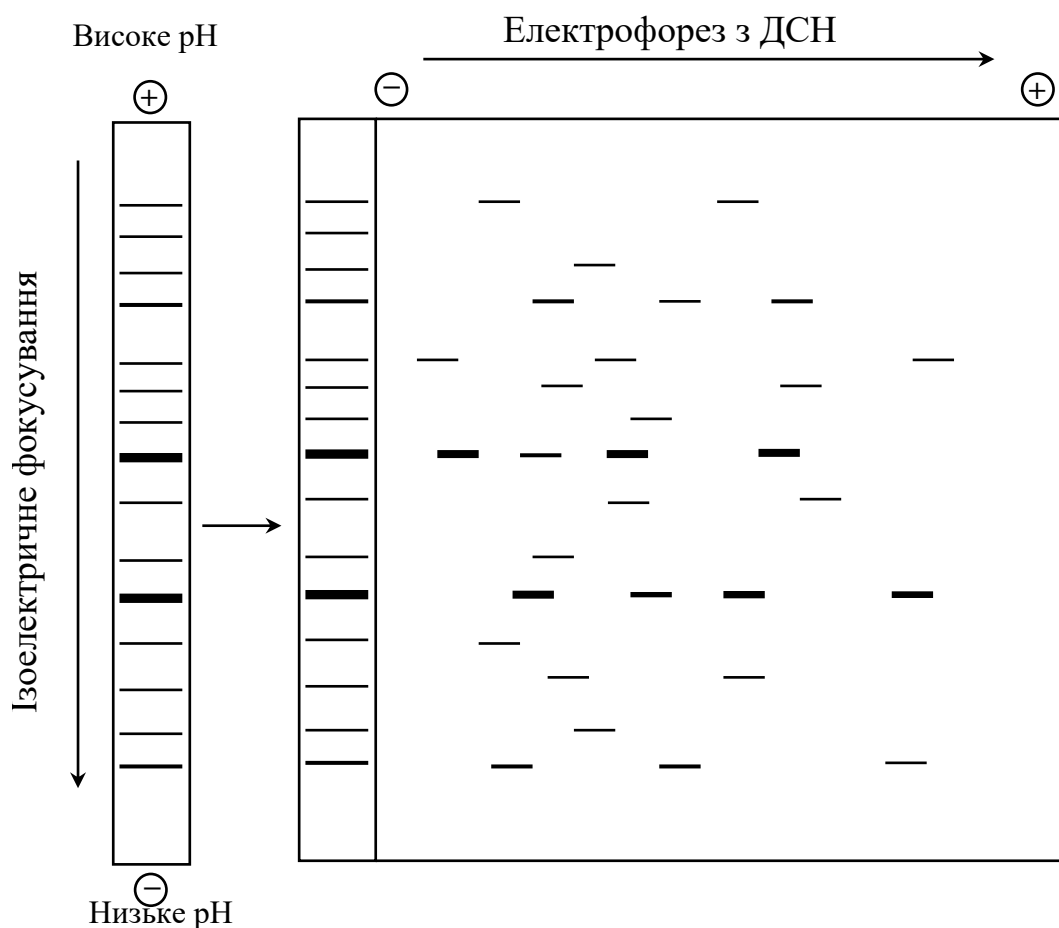
### 2.5.3 Протеоміка і пептидоміка молока

По мірі нагромадження даних в сучасній біології, зокрема біохімії і молекулярній біології, стало зрозуміло, що класичні методи не спроможні забезпечити ідентифікацію і характеристику протеїнів, які знаходяться у клітинах і тканинах у малих кількостях. Такі протеїни часто виконують важливі біологічні функції. Для отримання повної картини функціонування клітини або тканини організму необхідні дані про будову і властивості всіх протеїнів, що входять до їхнього складу. Це питання вирішує один із сучасних напрямків молекулярної біології – протеоміка. Протеоміка – це повний аналіз складу, будови і властивостей всіх протеїнів біологічного об'єкта, а протеом – це повний набір його протеїнів [527].

Протеоміку прийнято поділяти на експресійну протеоміку, протеоміку взаємодій і структурну протеоміку. Експресійна протеоміка займається кількісною ідентифікацією всіх протеїнів певного біологічного об'єкта (органели, клітини, тканини організму). Протеоміка взаємодій досліджує протеїн-протеїнові взаємодії і взаємодії протеїнів з іншими біомолекулами і надмолекулярними структурами. Структурна протеоміка вивчає просторову структуру молекул протеїнів, зокрема, встановлює нові структури для різних родин протеїнів [10, 54].

Для проведення досліджень з експресійної протеоміки було розроблено ряд нових методичних підходів, які характеризуються високою чутливістю і роздільною здатністю. До них відноситься двовимірний електрофорез в поліакриламідному гелі, високо-ефективна рідинна хроматографія, мас-спектрометрія. При двовимірному електрофорезі протеїни спочатку розділяють у стовпчику ПАГ в одному напрямку за зарядом за допомогою ізоелектричного фокусування у градієнті рН до досягнення ділянки ПАГ зі значенням рН, що дорівнює їх ізоелектричним точкам. Після цього стовпчик ПАГ приєднують до пластинки ПАГ і проводять

електрофорез у присутності ДСН перпендикулярно до напрямку ізоелектричного фокусування (рис. 27). Двовимірним електрофорезом можна виявити до 2000 різних протеїнів [320].



**Рис. 27. Схема проведення двовимірного електрофорезу протеїнів біологічного об'єкта**

Другим важливим методом у протеоміці є високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) [92]. Переваги ВЕРХ у тому, що цей метод піддається автоматизації і поєднанню з мас-спектрометричним аналізом для ідентифікації фракцій протеїнів. Справа у тому, що класичні методи ідентифікації протеїнів (аналіз первинної структури за Едманом, імунологічні методи), виділених з ПАГ або хроматографічних фракцій, довготривалі і не можуть бути використані для аналізу великої кількості протеїнів. На початку 90-х років був

розроблений варіант мас-спектрометрії для аналізу великих молекул поліпептидів і протеїнів. При цьому використовувалася м'яка іонізація молекул, що не призводила до фрагментації молекул, а саме матрично-активована лазерна десорбція/іонізація (МАЛДІ або англ. MALDI) або електроспрей-іонізація (ЕСІ або англ. ESI). У 1993 році були розроблені алгоритми для пошуку первинних структур у базах даних для мас-спектрометричних досліджень. При цьому проводиться порівняння молекулярних мас реальних трипсинових пептидів невідомого протеїну (виділеного після двовимірного електрофорезу або ВЕРХ) з віртуальними трипсиновими пептидами протеїнів, які є у базі даних. За збігом первинної структури декількох пептидів можна говорити про ідентифікацію досліджуваного протеїну. При виникненні розбіжностей (за рахунок поліморфізму або післятрансляційних модифікацій) використовують тандемну мас-спектрометрію (MS/MS) для фрагментації пептидів і обчислення маси фрагментованих іонів [147, 206].

Для проведення MALDI мас-спектрометрії трипсинові пептиди невідомого протеїну розміщують у матриці, яка поглинає енергію лазерних імпульсів. Енергія короткочасних лазерних імпульсів звільняється у вигляді тепла і спричиняє випаровування та емісію іонізованих пептидів. Далі іонізовані пептиди певний час рухаються у трубці, відбиваються від рефлектора і потрапляють на детектор тривалості пролітання (TOF – від англ. *time of flight*). Тривалість пролітання іонізованих пептидів строго пов'язана з відношенням маси іонізованих пептидів до їх заряду. Це дозволяє точно визначити молекулярну масу пептидів та ідентифікувати первинну структуру (рис. 28).

Молоко почали досліджувати методами протеоміки на початку 90-х років минулого століття. До цього часу основні фракції протеїнів молока (95 % від усіх протеїнів) були досить детально досліджені та ідентифіковані методами одновимірного електрофорезу і рідинної хроматографії. Це такі макрокомпоненти протеому молока, як казеїни (вміст у молоці ~25 г/л або 78 %), основні протеїни сироватки молока



**Рис. 28. Принцип MALDI-TOF мас-спектрометричного аналізу пептидів**

(разом 5,4 г/л або 17 %, в т.ч.  $\beta$ -Lg – 2,7 г/л або 8 %,  $\alpha$ -La – 1,2 г/л або 3,8 % і BSA – 0,25 г/л або 0,8 %). Решту 5 % протеїнів представлені сотнями різноманітних мінорних протеїнів, які є в складі сироватки молока або мембран жирових кульок. Саме ці мінорні протеїни після 2000 року були основними об'єктами протеомних досліджень [451]. Методичні підходи протеоміки також були використані для вивчення молочних продуктів і лактобактерій, які використовуються при їх виробництві [358, 440]. У результаті, станом на 2016 рік у коров'ячому молоці ідентифіковано понад 900 різних протеїнів (у молоці людини – понад 1000). Зокрема, протеом мембран жирових кульок налічує близько 300, а сироватки молока – близько 400 протеїнів [507].

По аналогії з протеомікою, для вивчення пептидного складу біологічного об'єкту або харчового продукту виник напрям досліджень пептидоміка. Пептидом – це вся сукупність пептидів у біологічному об'єкті або харчовому продукті. Пептиди в харчових продуктах (зокрема в молочних) мають велике значення у формуванні показників якості, органолептичних властивостей, біологічної активності. Також дані про пептидний склад можуть вказувати на автентичність продукту, його походження,



характеризувати технологічний процес його виготовлення, можливу алергенну дію і т.д. [135, 137, 152, 457]. В останні десятиліття важливим застосуванням для пептидоміки є вивчення біоактивних пептидів, які утворюються з протеїнів молока в результаті природних протеолітичних процесів (дія протеаз молока, травлення в шлунково-кишковому тракті) та протеолізу за участю ензимів молокозсідальних препаратів, мікрофлори заквасок, що використовуються при виробництві молочних продуктів. На сьогодні виявлено понад 300 таких пептидів, яким притаманні різні види біологічної дії на фізіологічні системи організму [193].

Повне вивчення протеому і пептидому молока є передумовою для створення технологій, які забезпечать збереження корисних властивостей і біологічної дії протеїнів і пептидів у молочних продуктах.

### РОЗДІЛ 3

## БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ ПЕПТИДИ З ПРОТЕЇНІВ МОЛОКА

В останні десятиліття встановлено, що молоко, окрім природних регуляторних пептидів, є джерелом численних біоактивних пептидів, які утворюються з протеїнів молока під час його перетравлювання в шлунково-кишковому тракті або в результаті технологічних процесів його переробки [184]. До біоактивних пептидів із харчових протеїнів за визначенням Г. Мейзеля належать пептиди, які утворюються в результаті протеолітичних процесів у харчових продуктах та під час їхнього перетравлювання в шлунково-кишковому тракті і проявляють регуляторну дію на фізіологічні системи людини [211]. Першим таким біоактивним пептидом із протеїнів молока виявився добре відомий глікомакропептид, який утворюється в результаті розщеплення к-казеїну молокозсідальними ензимами. Було встановлено, що глікомакропептид гальмує секрецію шлункового соку і впливає на моторику шлунку [13]. Далі в результаті дії на казеїн ензимів ШКТ були отримані опіодні пептиди, які впливають на нервову систему [97], а також антигіпертензивні, антитромботичні, імуномодуляторні та інші види біологічно активних пептидів (БАП) [120, 176, 177, 310, 490]. Трохи пізніше з'явилися публікації про БАП із протеїнів сироватки молока [292, 293]. На сьогодні вже виявлено сотні ділянок первинної структури в протеїнах казеїнового комплексу та сироватки молока, з яких у процесах протеолізу утворюються БАП з десятками різних видів біологічної дії на організм [149, 150, 151]. Причому, ці пептиди нерідко характеризуються двома й більше видами біологічної дії. Окремі БАП у меншій кількості також були виявлені в результаті протеолізу інших харчових протеїнів рослинного і тваринного походження [219, 309]. Проте БАП із молочних протеїнів викликають особливий інтерес. Це пов'язано з їхнім значенням у регуляції розвитку й оптимальному забезпеченні

нутрієнтами організму ссавця в постнатальний період. Очевидно, що така кількість БАП, які утворюються з протеїнів молока, не є випадковою і дає певні переваги у виживанні. У зв'язку з цим важливими є питання механізмів прояву біологічної дії БАП на організм, відмінності між БАП із протеїнів молока корови та людини і, звичайно, як це явище раціонально використати під час виробництва функціональних інгредієнтів і молочних продуктів. На сьогодні ще багато запитань залишається без відповіді.

### **3.1 Характеристика основних груп пептидів казеїнового походження за їхньою біологічною дією**

Годування молодих особин молоком є однією зі складових частин еволюційного успіху ссавців. У науковій літературі описано багато досліджень, у яких різними методами підтверджується відповідність складу молока, зокрема протеїнів молока, потребам у харчових речовинах різних видів ссавців включаючи людину [4, 20]. Біологічна цінність харчових протеїнів за класичним визначенням є комплексною характеристикою, яка визначається двома показниками: амінокислотним складом і здатністю перетравлюватися протеолітичними ензимами шлунково-кишкового тракту. Перший показник визначається при порівнюванні амінокислотного складу досліджуваного протеїну з так званим «ідеальним» харчовим протеїном. «Ідеальний» харчовий протеїн – це гіпотетичний еталонний зразок протеїну, амінокислотний склад якого повністю відповідає потребам людини. За таким критерієм казеїн належить до протеїнів із високою біологічною цінністю. Також казеїн легко розщеплюється травними протеазами. Причому, нативний казеїн розщеплюється краще, ніж денатурований [20]. Іншим показником цінності протеїну є чиста утилізація протеїну (ЧУП) або Net protein utilization (NPU). Він показує відношення кількості азоту, який

затримується в організмі після споживання протеїну, до загальної кількості азоту в спожитому протеїні. Показник чистої утилізації протеїну виявився меншим для казеїну в порівнянні з яечним альбуміном і протеїнами сироватки молока [4]. Якщо не сумніватися в мудрості природи, то це може бути пов'язано з виконанням казеїнами або продуктами їхнього протеолізу якихось додаткових важливих функцій.

Ще в кінці сімдесятих років минулого століття було встановлено, що окремі фрагменти первинної структури протеїнів казеїнового комплексу молока, які звільняються у вигляді пептидів у процесі травлення, можуть проявляти біологічну активність в організмі тварин у період молочного живлення. Такий висновок було зроблено в результаті дослідження властивостей глікомакропептиду, що утворюється з к-казеїну на початкових стадіях дії травних протеїназ шлунку (хімозину й пепсину) на казеїнові міцели [13]. Виявилось, що глікомакропептид (ГМП) є сильним інгібітором шлункової секреції та моторики. Можливо ця дія ГМП пов'язана з необхідністю збереження біологічно активних протеїнів (лактоферину, лізоциму, імуноглобулінів та ін.) і пептидів молока від протеолітичної інактивації травними протеазами.

Уперше біологічно активні пептиди з протеїнів казеїнового комплексу, дія яких не була безпосередньо пов'язана з процесами травлення, було виділено в 1979 р. у Мюнхені групою Віктора Брантла (Інститут Макса-Планка) [97]. Шляхом екстрагування сумішшю хлороформу й метанолу та використанням різних видів рідинної хроматографії та гель-фільтрації йому вдалося виділити із ферментативного гідролізату загального казеїну декілька пептидних препаратів, які були стійкі до дії пронази та проявляли опіодну активність. У подальшому ці пептиди отримали назву казоморфінів [98, 99].

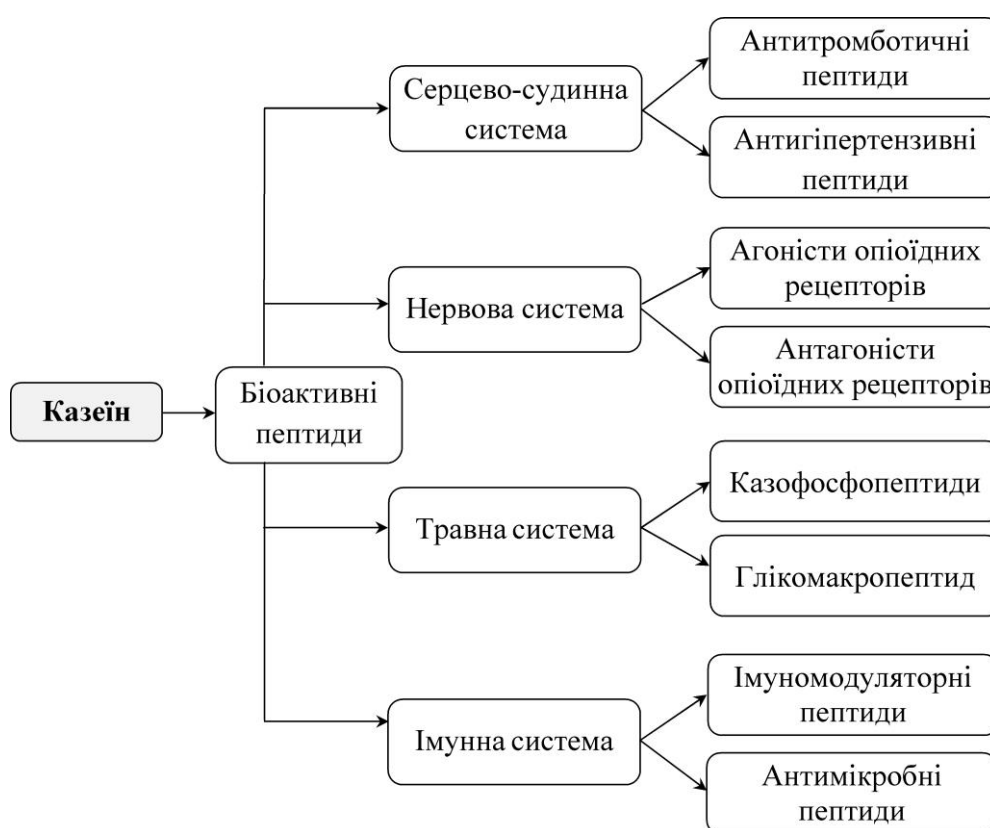
За останні десятиліття було проведено багато досліджень ферментативних гідролізатів казеїнів, отриманих *in vitro*, гастроінтестинальних гідролізатів, отриманих *in vivo*, а також синтетичних пептидів, які відповідали первинній структурі казеїнів. У результаті було виявлено десятки біологічно активних пептидів, які можуть утворюватися при розщепленні різних фракцій протеїнів казеїнового комплексу [328, 329]. Список біологічно активних пептидів казеїнового походження постійно поновлюється [150, 184, 380, 402, 553]. Було відкрито пептиди, яким притаманні два і навіть три різні види біологічної дії [333, 334]. На основі аналізу літературних даних нами складений список біоактивних пептидів із різних казеїнових фракцій (Додаток А). У таблицях показані назва пептиду, первинна структура, шляхи отримання, біологічна дія та літературне джерело. Аналіз систематизованих даних показує, що основними групами біоактивних пептидів за біологічною дією є: казоморфіни та казоксини (агоністи та антагоністи опіатних рецепторів), казокініни (пептиди з антигіпертензивною дією), імуномодуляторні і антимікробні пептиди, казофосфопептиди (мінералзв'язувальна дія) і казоплателіни (антитромботичні пептиди) (рис. 29).

### **3.1.1 Казоморфіни й казоксини – агоністи й антагоністи опіоїдних рецепторів**

Опіоїдні рецептори розміщуються в головному мозку, шлунково-кишковому тракті, а також в різних органах. Ідентифіковано  $\mu$ -,  $\kappa$ - і  $\delta$ -опіоїдні рецептори, які відрізняються за фармакологічними властивостями, розміщенням в організмі, спорідненістю до різних опіоїдних лігандів. До таких лігандів, які зв'язуються з опіоїдними рецепторами, відносяться опіоїдні пептиди. Активування  $\mu$ -рецепторів опіоїдними пептидами зумовлює підвищення провідності іонів  $K^+$  шляхом гіперполяризації

аферентних нейронів, а активування  $\kappa$ - і  $\delta$ -рецепторів зумовлює закривання  $\text{Ca}^{2+}$  каналів [2]. Основні фізіологічні ефекти при стимулюванні опіюїдних рецепторів наведені в табл. 18.

Опіюїдні пептиди, а саме казоморфіни – перші біологічно активні пептиди, які були виділені з ферментативних гідролізатів казеїну [97]. Віктор Брантл зі співробітниками встановили, що фрагменту  $\beta$ -казеїну  $\beta$ -CN (f 60-70) притаманна опіюїдна морфіноподібна активність. Він отримав назву  $\beta$ -казоморфін. Пізніше було встановлено, що  $\beta$ -казоморфіни і їхні синтетичні аналоги є агоністами  $\mu$ - і  $\kappa$ -опіюїдних рецепторів, вони викликають анальгезію при внутрішньошлунковому введенні щурам [98]. Крім того, ці пептиди, подібно до морфію, викликають сонливість, пригнічення



**Рис. 29. Основні групи біоактивних пептидів, які утворюються в результаті протеолізу протеїнів казеїнового комплексу**

**Таблиця 18. Фізіологічні ефекти, що виникають при стимулюванні рецепторів опіоїдних пептидів [2]**

Рецептор	Фізіологічний ефект
μ-рецептор	Знеболювання Пригнічення дихання Закреп Ейфорія Заспокоєння Збільшення секреції гормону росту і пролактину Мейоз
κ-рецептор	Знеболювання Діурез Заспокоєння Мейоз Тривога
δ-рецептор	Знеболювання

дихання, гіпотензію, брадикардію. Анальгетична дія β-казоморфіну досягає піку через 10 хвилин після введення пептиду і зникає повністю через 30 хвилин внаслідок відщеплення *N*-термінального залишку тирозину. Амідний аналог β-казоморфіну – β-казоморфін-4-амід (морфіцептин) проявляє сильнішу дію на центральну нервову систему, ніж морфін [116]. β-Казоморфіни виявлені в аналогічних ділянках первинної структури β-казеїнів людини і вівці [474, 565]. Вважають, що материнське молоко, яке містить β-казоморфіни, забезпечує нормалізацію сну в немовлят і заспокоює їх. У результаті протеолізу пепсином були виявлені також опіоїдні пептиди з α<sub>S1</sub>-казеїну. Вони отримали назву екзорфінів [24].

Ліганди опіоїдних рецепторів казеїнового походження належать до екзогенних атипівих опіоїдних пептидів. Вони відрізняються за структурою від типових ендогенних лігандів (динорфіни, енкефаліни, ендорфіни), хоча мають спільні риси в будові. Спільною структурною особливістю ендогенних і екзогенних опіоїдних пептидів є наявність тирозинового залишку в N-термінальному положенні молекули (крім екзорфінів) і додаткового ароматичного залишку (Фен або Тир) у третьому або четвертому положенні, що важливо для формування сайту зв'язування з опіоїдними рецепторами [474]. Негативний заряд, локалізований навколо фенольної гідроксильної групи тирозину, є необхідним для проявлення опіоїдної активності. Відсутність тирозинового залишку призводить до втрати біологічної активності опіоїдів [116]. Крім того, дуже важливим для активності опіоїдних пептидів є також залишок проліну, який впливає на просторову орієнтацію тирозину і фенілаланіну в пептидному ланцюзі. Крім опіоїдної активності казоморфіни можуть впливати на різні ланки обміну речовин (ліпідний обмін, секреція гормонів, інтестинальний транспорт амінокислот) [96, 331].

Казоморфіни розглядаються як екзогенні ліганди опіоїдних рецепторів [514], проте було показано, що в окремих випадках вони можуть діяти як ендогенні регулятори. Казоморфіни можуть звільнятися молочною залозою у жінок під час вагітності, переноситися через кров і зв'язуватися з опіоїдними рецепторами і в такий спосіб брати участь в ендокринній регуляції вагітності, стимулюючи звільнення пролактину [70, 254].

З трипсинових і пепсинових гідролізатів коров'ячого к-казеїну були виділені два пептиди з вираженою антагоністичною активністю до  $\mu$ - і меншою мірою до  $\kappa$ -опіоїдних рецепторів [565]. Такі пептиди отримали назву казоксинів. Механізм їхньої дії подібний до дії налоксону. Характеристика ідентифікованих опіоїдних пептидів казеїнового походження наведена в табл. 19.



**Таблиця 19. Опіодні пептиди казеїнового походження [380, 514]**

Назва пептиду <sup>1</sup>	Фрагмент казеїну <sup>1</sup>	Амінокислотна послідовність	Вид активності	Специфічність до рецепторів (μ, δ, κ)	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>2</sup>
α <sub>S1</sub> -CN екзорфін	α <sub>S1</sub> -казеїн (90-95)	RYLGYL	агоніст		12
α <sub>S1</sub> -CN екзорфін (1-7)	α <sub>S1</sub> -казеїн (90-96)	RYLGYLE	агоніст	μ / δ << κ	1,2
α <sub>S1</sub> -CN екзорфін (2-7)	α <sub>S1</sub> -казеїн (91-96)	YLGYLE (синтетичний)	агоніст	μ / δ	45
Казоксин D <sup>3</sup>	κ <sub>(л)</sub> -казеїн (158-164)	YVPFPPF	антагоніст	μ / δ	
α <sub>S1(л)</sub> -казоморфін (1-5) <sup>3</sup>	κ <sub>(л)</sub> -казеїн (158-162)	YVPFP	агоніст/ антагоніст	μ / δ <<< κ	
α <sub>S1(л)</sub> -казоморфін (1-5)-NH <sub>2</sub> <sup>3</sup>	κ <sub>(л)</sub> -казеїн (158-162)	YVPFP-NH <sub>2</sub>	агоніст/ антагоніст	μ << δ / κ	
β-казоморфін-7	β-казеїн A <sup>2</sup> (60-66)	YPFPGPI	агоніст	μ > δ >> κ	14
β-казоморфін-4	β-казеїн (60-63)	YFPF (синтетичний)	агоніст		2,7
Морфіцептин	β-казеїн A <sup>2</sup> (60-63)	YFPF-NH <sub>2</sub>	агоніст	μ >> δ >> κ	3
β-казоморфін-5	β-казеїн (60-64)	YPFPG	агоніст		1,1
β-казоморфін-6	β-казеїн (60-65)	YFPFGR (синтетичний)	агоніст		3,2
β-казоморфін (1-8)	β-казеїн (60-67)	YFPFGPIP	агоніст	μ >> δ, κ	
β-казоморфін-11	β-казеїн (60-70)	YFPFGPIPNSL	агоніст		10
Неоказоморфін	β-казеїн (114-119)	YVPEPF	агоніст	μ	
β <sub>л</sub> -казоморфін (1-5)	β <sub>л</sub> -казеїн (51-55)	YPFVE	агоніст	μ / δ >> κ	
β <sub>л</sub> -казорфін	β <sub>л</sub> -казеїн (41-44)	YPSF-NH <sub>2</sub>	агоніст	μ	
Валмуцептин	β <sub>л</sub> -казеїн (51-54)	YPFV-NH <sub>2</sub>	агоніст	μ > δ	
Казоксин А	κ-казеїн (35-41)	YPSYGLN	антагоніст	μ	
Казоксин А	κ-казеїн (35-42)	YPSYGLNY	антагоніст	μ	400
Казоксин С	κ-казеїн (25-34)	YIPIQYVLSR	антагоніст	μ	50
Казоксин-5	κ-казеїн (34-38)	RYPSY-OCH <sub>3</sub>	антагоніст	μ > κ	
Казоксин-6	κ-казеїн (33-38)	SRYPSY-OCH <sub>3</sub>	антагоніст	μ > κ	
Казоксин В	κ-казеїн (58-61)	YPTY	антагоніст		100

Примітки: 1. л – Казеїни людини.

2. Концентрація пептиду, який гальмує з'ясування [<sup>3</sup>H]-ліганду на 50 %.

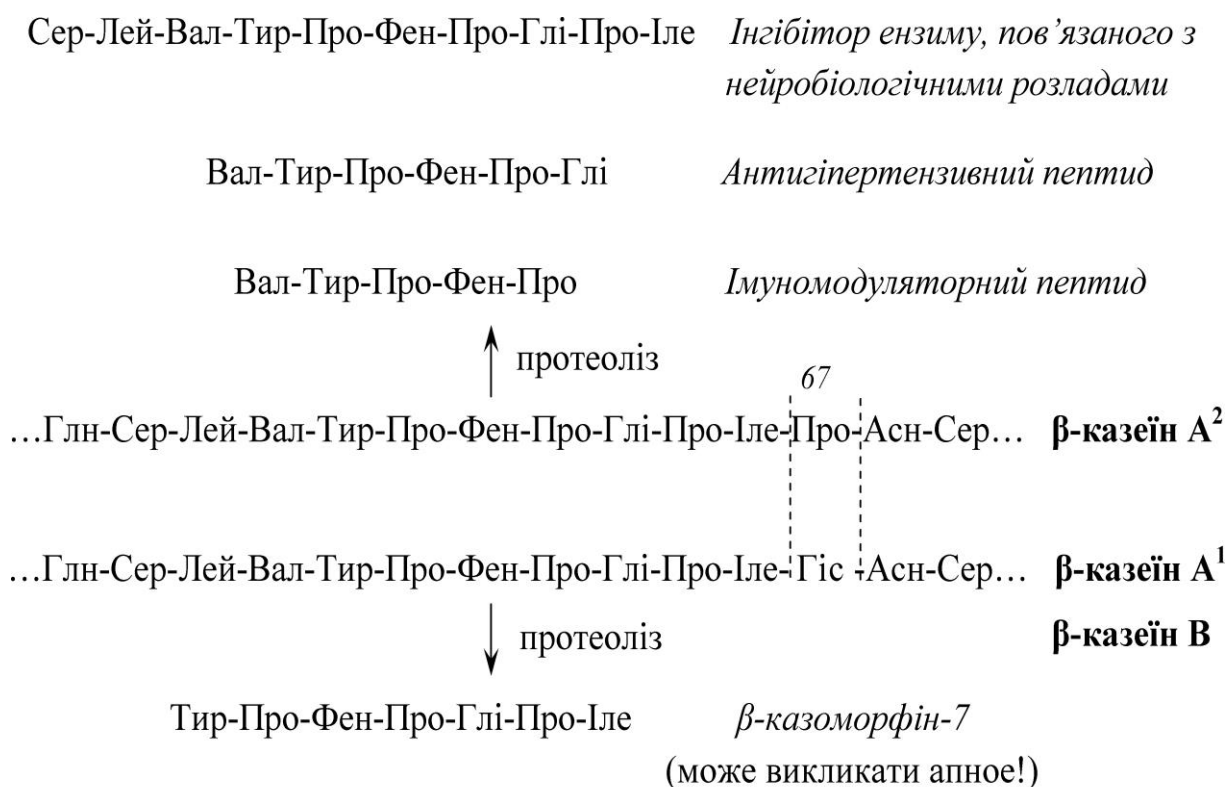
3. Фрагмент, отриманий з κ-казеїну. В таблиці збережена стара назва α<sub>S1(л)</sub>-казеїн, як в літературному джерелі.

Важливе питання, пов'язане з дією цих пептидів, стосується їхньої стійкості і здатності зв'язуватися відповідними опіоїдними рецепторами. Так, було показано, що  $\beta$ -казоморфін стійкий до дії трипсину, хімотрипсину й карбоксипептидаз А і Б [24, 514]. Проте він може розщеплюватися карбоксипептидазою V з утворенням фрагменту Тир-Про-Фен, який ще зберігає активність. Повна втрата активності  $\beta$ -казоморфіну настає при дії пептидилдипептидази IV (КФ 3.4.14.1). Цей ензим виявлений в багатьох тканинах тварин і людини. Не дивлячись на чутливість до травних пептидаз кишківника,  $\beta$ -казоморфіни, очевидно, можуть проникати в кров'яне русло й досягати своїх рецепторів у нервовій системі у вигляді своїх попередників – проказоморфінів, які стійкі до дії пептидаз. Проказоморфіни утворюються з казеїнів у результаті дії шлункових і панкреатичних протеїназ. Після досягнення рецептора захисна амінокислотна послідовність проказоморфінів відщеплюється внаслідок обмеженого протеолізу й утворюється активний пептид [328].

У дослідженнях *in vitro* з використанням моношару клітин Сасо-2 доведено можливість проходження через них окремих опіоїдних пептидів ( $\beta$ -казоморфін-5,  $\beta$ -казоморфін-7, казоксин-6) в апікально-базолатеральному та базолатерально-апикальному напрямках [488]. Це підтверджує здатність проникнення цих пептидів із кишківника в кров'яне русло. У дослідженнях *in vivo* з використанням тварин або на людях-добровольцях підтверджено утворення опіоїдних пептидів у кишківнику після споживання ними  $\beta$ -казеїну або молока. Зокрема, у людей після випивання одного літра молока у вмісті кишківника було ідентифіковано в значній кількості  $\beta$ -казоморфін-7 і в менших кількостях  $\beta$ -казоморфін-4 та  $\beta$ -казоморфін-6 [24].

Важливий вплив на утворення біоактивних пептидів може мати генетичний варіант казеїну-попередника. Так, під час протеолізу  $\beta$ -CN A<sup>1</sup> і  $\beta$ -CN B варіантів  $\beta$ -казеїну утворюється  $\beta$ -казоморфін-7, який

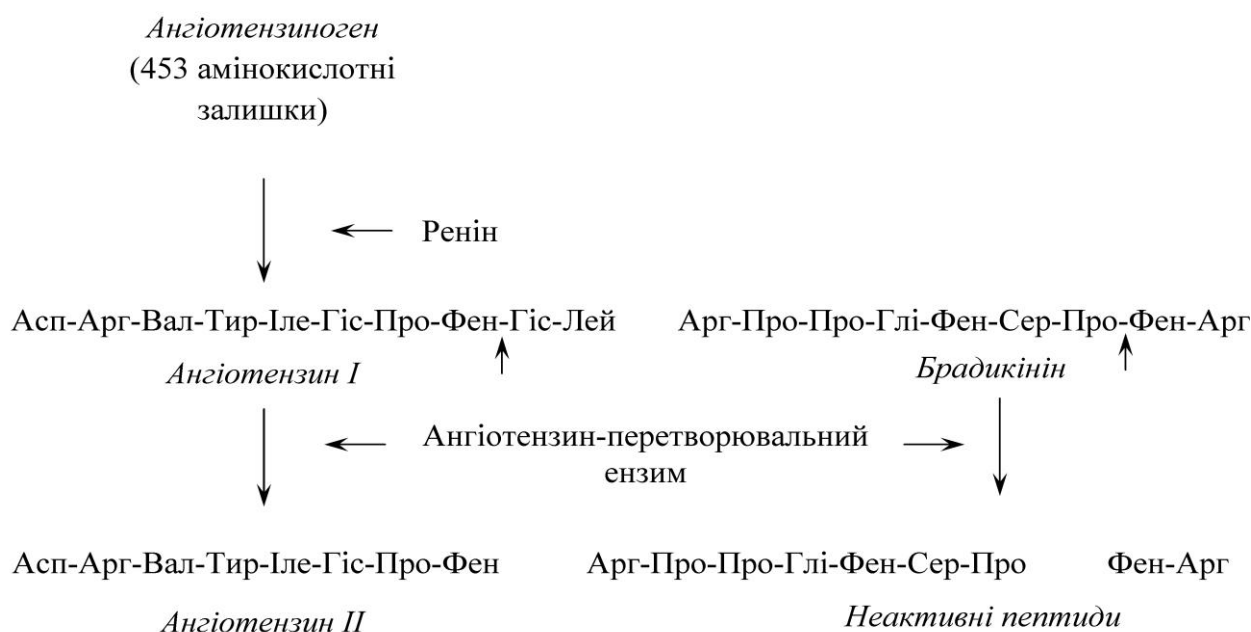
за даними окремих авторів може впливати на дихальний центр у довгастому мозку і викликати раптову зупинку дихання (апноє) у немовлят після вживання коров'ячого молока, яке містить ці малопоширені генетичні варіанти [546]. Відомо, що в  $A^1$  і  $B$  генетичних варіантів у 67-му положенні замість амінокислотного залишку проліну (генетичний варіант  $A^2$ ) розміщений залишок гістидину [167]. У процесі протеолізу  $\beta$ -CN  $A^2$  варіанту такий казоморфін не утворюється. На рис. 30 показано, які біоактивні пептиди можуть утворюватися з різних генетичних варіантів  $\beta$ -казеїну.



**Рис. 30.** Біоактивні пептиди з  $\beta$ -казеїну  $A^1$ ,  $A^2$  і B  
Заміна однієї амінокислоти (Про на Гіс) призводить до зміни специфічності протеолізу  $\beta$ -казеїну. Адаптовано з [184]

### 3.1.2 Казокініни – пептиди з антигіпертензивною дією

Серед біологічно активних пептидів казеїнового походження важливе місце займають пептиди, здатні гальмувати дію ангіотензин-перетворювального ензиму (АПЕ) [553]. Цей ензим є компонентом ренін-ангіотензин-альдостеронової системи організму і відіграє важливу роль у регуляції кров'яного тиску та водно-електролітичного гомеостазу [2]. Біологічна дія АПЕ, зокрема, полягає в перетворенні декапептиду ангіотензину I в октапептид ангіотензин II, який є сильним вазоконстриктором. Також АПЕ відщеплює С-термінальний дипептид у брадикініну, що призводить до втрати його вазодилаторних властивостей [2, 284] (рис. 31).



**Рис. 31. Дія ангіотензин-перетворювального ензиму на ангіотензин і брадикінін**

Надмірна активність АПЕ спричиняє артеріальну гіпертензію, яка є основним фактором ризику в розвитку багатьох серцево-судинних захворювань. Серед інших засобів для лікування і профілактики гіпертензії важлива роль відводиться інгібіторам АПЕ [6]. Дію

інгібіторів АПЕ *in vitro* прийнято характеризувати показником  $IC_{50}$ , який відповідає значенню концентрації інгібітора, необхідної для гальмування 50% активності АПЕ. *In vivo* інгібітори АПЕ (іАПЕ) тестують на щурах зі спонтанною гіпертензією (SHR), яких використовують для моделювання гіпертензії в людини. Нормотензивні щури лінії Вістар Кіото (VKY) при цьому служать контролем, оскільки пептидні інгібітори з протеїнів молока не впливають на їхній артеріальний тиск [284].

Залежність між структурою та активністю досліджувалася на багатьох пептидних інгібіторах АПЕ [334, 447]. В результаті було з'ясовано деякі загальні закономірності їхньої взаємодії з АПЕ [284]. Найчастіше іАПЕ – це невеликі пептиди, що містять від 2 до 12 амінокислотних залишків. Взаємодія пептидних інгібіторів з АПЕ суттєво залежить від трьох С-кінцевих амінокислотних залишків у складі пептиду. Наявність там залишків проліну або інших гідрофобних амінокислот посилює їхню інгібіторну дію. Важливу роль можуть також відігравати позитивно заряджені групи лізину й аргініну, розміщені в С-кінцевій ділянці іАПЕ. Конфігурація N-кінцевих залишків у іАПЕ мало впливає на інгібіторну дію пептидів [429]. Враховуючи отримані результати, Гобетті і співавтори [198] стверджують, що для повного гальмування АПЕ необхідна суміш інгібіторних пептидів різної будови для взаємодії з каталітичними сайтами АПЕ. Очевидно, що в даному випадку гальмування відбувається за змішаним типом.

З казеїнів інгібітори АПЕ вперше були виділені в 1982 році Маруямою і співавторами [310]. Вони виділили їх із трипсинового гідролізату загального казеїну коров'ячого молока. Пізніше було виділено цілий ряд пептидів, інгібіторів АПЕ, з продуктів ферментативного гідролізу різних фракцій протеїнів казеїнового комплексу. У багатьох випадках ці пептиди були одержані шляхом хімічного синтезу. Ганс Мейзель у 1993 році запропонував казеїнові

пептиди з АПЕ-інгібіторною дією називати казокінінами у зв'язку з подібністю їх дії до брадикініну. У табл. 20 наведена коротка характеристика відомих казокінінів [380].

**Таблиця 20. Пептиди – інгібітори ангіотензин-перетворювального ензиму з протеїнів казеїнового комплексу молока корови (адаптовано з McSweeney, 2016)**

Фракція казеїну молока корови	Фрагмент протеїну	Первинна структура пептиду	IC <sub>50</sub> (μM)
1	2	3	4
α <sub>S1</sub> -CN	f 25-27	Вал-Ала-Про	2
	f 23-27	Фен-Фен-Вал-Ала-Про	6
	f 24-27	Фен-Вал-Ала-Про	10
	f 90-91	Арг-Тир <sup>1</sup>	10,5
	f 1-9	Арг-Про-Ліз-Гіс-Про-Іле-Ліз-Гіс-Глн	13,4
	f 194-199	Тре-Тре-Мет-Про-Лей-Три	16
	f 104-109	Тир-Ліз-Вал-Про-Глн-Лей	22
	f 197-199	Про-Лей-Три	36
	f 198-199	Лей-Три	50
	f 142-147	Лей-Ала-Тир-Фен-Тир-Про	65
	f 23-34	Фен-Фен-Вал-Ала-Про-Фен-Про-Глу-Вал-Фен-Глі-Ліз	77
	f 157-164	Асп-Ала-Тир-Про-Сер-Глі-Ала-Три	98
	f 91-92, f 94-95	Тир-Лей <sup>2</sup>	122
	f 28-34	Фен-Про-Глу-Вал-Фен-Глі-Ліз	140
	f 32-34	Фен-Глі-Ліз	160
	f 27-30	Про-Фен-Про-Глу	>1000
f 143-147	Ала-Тир-Фен-Тир-Про	>1000	
f 143-148	Ала-Тир-Фен-Тир-Про-Глу	106 <sup>3</sup>	
α <sub>S2</sub> -CN	f 174-179	Фен-Ала-Лей-Про-Глн-Тир	4,3
	f 174-181	Фен-Ала-Лей-Про-Глн-Тир-Лей-Ліз	4,3

Продовження таблиці 20

1	2	3	4
	f 92-98	Фен-Про-Глн-Тир-Лей-Глн-Тир	14
	f 182-184	Тре-Вал-Тир	15
	f 204-207	Вал-Арг-Тир-Лей	24,1
	f 25-32	Асн-Мет-Ала-Іле-Асн-Про-Сер-Ліз	60
	f 81-89	Ала-Лей-Асн-Глу-Іле-Асн-Глн-Фен-Тир	219
	f 81-91	Ала-Лей-Асн-Глу- Іле-Асн-Глн-Фен-Тир-Глн-Ліз	264
	f 190-197	Мет-Ліз-Про-Три-Іле-Глн-Про-Ліз	300
	f 198-202	Тре-Ліз-Вал-Іле-Про	400
	f 189-192	Ала-Мет-Ліз-Про-Три	580
	f 189-197	Ала-Мет-Ліз-Про-Три-Іле-Глн-Про-Ліз	600
β-CN	f 74-76	Іле-Про-Про <sup>4</sup>	5
	f 169-174	Ліз-Вал-Лей-Про-Вал-Про	5
	f 84-86	Вал-Про-Про	9
	f 177-183	Ала-Вал-Про-Тир-Про-Глн-Арг	15
	f 49-61	Іле-Гіс-Про-Фен-Ала-Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	19
	f 52-61	Фен-Ала-Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	25
	f 50-61	Гіс-Про-Фен-Ала-Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	26
	f 48-61	Ліз-Іле-Гіс-Про-Фен-Ала-Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	39
	f 57-61	Сер-Лей-Вал-Тир-Про	40
	f 56-61	Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	41
	f 59-61	Вал-Тир-Про	44
	f 55-61	Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	64
	f 54-61	Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	73
	f 53-61	Ала-Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	76
	f 177-181	Ала-Вал-Про-Тир-Про	80
	f 58-61	Лей-Вал-Тир-Про	170
	f 183-190	Арг-Асп-Мет-Про-Іле-Глн-Ала-Фен	209
	f 179-181	Про-Тир-Про <sup>5</sup>	220

## Закінчення таблиці 20

1	2	3	4
	f 59-64	Вал-Тир-Про-Фен-Про-Глі	221
	f 177-183	Ала-Вал-Про-Тир-Про-Глн-Арг	274
	f 193-198	Тир-Глн-Глу-Про-Вал-Лей	280
	f 59-61	Вал-Тир-Про	299
	f 193-202	Тир-Глн-Глу-Про-Вал-Лей-Глі-Про-Вал-Арг	300
	f 62-63, f 111-112, f 157-158, f 205-206	Фен-Про <sup>6</sup>	315
	f 177-179	Ала-Вал-Про	340
	f 108-113	Глу-Мет-Про-Фен-Про-Ліз	423
	f 140-143	Лей-Глн-Сер-Три	500
	f 60-66	Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про-Іле	500
	f 80-90	Тре-Про-Вал-Вал-Вал-Про-Про-Фен-Лей- Глн-Про	749
	f 191-197	Лей-Лей-Тир-Глн-Глу-Про-Вал	>1000
	f 133-138	Лей-Гіс-Лей-Про-Лей-Про	7 <sup>3</sup>
	f 58-76	Лей-Вал-Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про-Іле- Про-Асн-Сер-Лей-Про-Глн-Асн-Іле-Про-Про	19 <sup>3</sup>
κ-CN	f 25-34	Тир-Іле-Про-Іле-Глн-Тир-Вал-Лей-Сер-Арг	100
	f 58-59	Тир-Про <sup>7</sup>	720

- Примітки:
- Така структура також знайдена у  $\alpha_{S2}$ -CN (f 170-171 і f 205-206),  $\kappa$ -CN (f 34-35) і в BSA (f 409-410).
  - Така структура також знайдена у  $\alpha_{S2}$ -CN (f 95-96, f 98-99, f 179-180 і f 206-207) BSA (f 30-31, f 137-138 і f 451-452) і в  $\beta$ -Lg (f 102-103).
  - Значення IC<sub>50</sub> подано у мг/л.
  - Така структура також знайдена у  $\kappa$ -CN (f 108-110).
  - Така структура також знайдена у  $\kappa$ -CN (f 57-59).
  - Така структура також знайдена у  $\alpha_{S1}$ -CN (f 28-29),  $\alpha_{S2}$ -CN (f 92-93) і в BSA (f 222-223).
  - Така структура також знайдена у  $\alpha_{S1}$ -CN (f 146-147 і f 159-160) та в  $\beta$ -CN (f 114-115).



Антигіпертензивні властивості пептидів, утворених з білків казеїнового комплексу молока, залежать від здатності цих пептидів досягати тканин-мішеней, долаючи при цьому природні бар'єри, представлені ендотеліальними пептидазами, можливістю проникати в кров'яне русло, а також циркуляторними протеолітичними ензимами, які є в плазмі крові. У зв'язку з цим резистентність до розщеплення пептидазами є необхідною передумовою при пероральному чи внутрішньовенному використанні препаратів пептидів чи білкових гідролізатів з АПЕ-інгібіторною активністю. Наприклад, фрагменти 23-27 і 104-109  $\alpha_{S1}$ -казеїну гальмували активність АПЕ *in vitro*, проте антигіпертензивний ефект *in vivo* був відсутній [129].

Особливої уваги заслуговують фізіологічні ефекти, продемонстровані казокінінами *in vivo*. Насамперед було показано антигіпертензивну дію казокінінів при їх внутрішньовенному введенні спонтанно-гіпертензивним (SHR) щурам [312, 556]. Пероральне введення SHR-щурам трипсинового гідролізату загального казеїну спричиняло антигіпертензивний ефект. Були показані дозозалежні антигіпертензивні ефекти казокінінів після їхнього перорального введення. У табл. 21 узагальнені дані про дію казокінінів у спонтанно-гіпертензивних щурів.

Фізіологічні ефекти казокінінів, введенних перорально, дають підстави вважати, що такі пептиди здатні в активній формі абсорбуватися в кишечнику. Це підтверджується даними про те, що ди- і трипептиди більш легко всмоктуються в кишечнику, ніж амінокислоти чи більші олігопептиди. Пептиди, які містять пролін, є стійкіші до деградації травними ферментами, а пептиди, які мають Про-Про послідовність у С-термінальній ділянці молекули, резистентні до деградації пролін-специфічними пептидазами – пролідазами. У зв'язку з цим казокініни можуть бути стійкими до дії травних ферментів, можуть проникати в організм і проявляти антигіпертензивний ефект. Часткове розщеплення пептидів може призводити до підвищення АПФ-інгібіторної дії [24].

**Таблиця 21. Антигіпертензивна дія казеїнових пептидів у спонтанно-гіпертензивних щурів (адаптовано з McSweeney, 2016)**

Фракція казеїну молока корови	Спосіб отримання пептиду	Первинна структура пептиду (фрагмент)	Доза, мг/кг	Зміна систолічного тиску, мм рт.ст.
1	2	3	4	5
$\alpha_{S1}$ -CN	Трипсин (гідролізат)	Фен-Фен-Вал-Ала-Про-Фен-Про-Глу-Вал-Фен-Глі-Ліз (f 23-34)	100	-34,0
	<i>L. helveticus</i> CPN4 (ферментація)	Тир-Про (f 146-147)	2	-32,1
	Пепсин (гідролізат)	Арг-Тир-Лей-Глі-Тир (f 90-94)	5	-25,0
	Пепсин (гідролізат)	Ала-Тир-Фен-Тир-Про-Глу-Лей (f 143-149)	5	-20,0
	Трипсин (гідролізат)	Тре-Тре-Мет-Про-Лей-Три (f 194-199)	100	-13,6
	Протеїназа з <i>L. helveticus</i> CP790	Тир-Ліз-Вал-Про-Глн-Лей (f 104-109)	2	-12,5
	Сир	Арг-Про-Ліз-Гіс-Про-Іле-Ліз-Гіс-Глн (f 1-9)	6,1-7,5	-9,3
$\alpha_{S2}$ -CN	Пепсин (гідролізат)	Про-Тир-Вал-Арг-Тир-Лей (f 202-207)	3	-23,4
	Пепсин (гідролізат)	Тир-Глн-Ліз-Фен-Про-Глн-Тир (f 89-95)	5	-15,0
	Протеїназа з <i>L. helveticus</i> CP 790	Тре-Ліз-Вал-Іле-Про (f 198-202)		-9,0
	Протеїназа з <i>L. helveticus</i> CP 790	Ала-Мет-Ліз-Про-Три (f 189-192)	2	-5,0
	Протеїназа з <i>L. helveticus</i> CP 790	Ала-Мет-Ліз-Про-Три-Іле-Глн-Про-Ліз (f 189-197)	2	-3,0
$\beta$ -CN	Протеїназа з <i>L. helveticus</i> CP 790	Ліз-Вал-Лей-Про-Вал-Про (f 169-174)	1	-32,2
	Протеїназа з <i>L. helveticus</i> CP 790	Ліз-Вал-Лей-Про-Вал-Про-Глн (f 169-175)	2	-31,5
	<i>L. helveticus</i> and <i>S. cerevisiae</i>	Іле-Про-Про (f 74-76)	1	-28,3
	Протеїназа К	Фен-Про (f 62-63, f 111-112, f 157-158, f 205-206)	8	-27,0
	<i>E. faecalis</i> (ферментація)	Лей-Гіс-Лей-Про-Лей-Про (f 133-138)	3	-25,0

## Закінчення таблиці 21

1	2	3	4	5
	<i>E. faecalis</i> (ферментація)	Гіс-Лей-Про-Лей-Про (f 134-138)	7	-23,5
	Протеїназа К (гідролізат)	Вал-Тир-Про-Фен-Про-Глі (f 59-64)	8	-22,0
	Протеїназа К (гідролізат)	Вал-Тир-Про (f 59-61)	8	-21,0
	Ензимно модифікований сир	Мет-Ала-Про (f 102-104)	3	-17,0
	<i>E. faecalis</i> (ферментація)	Вал-Лей-Глі-Про-Вал-Арг-Глі- Про-Фен-Про (f 197-206)	10	-16,2
	<i>E. faecalis</i> (ферментація)	Вал-Арг-Глі-Про-Фен-Про-Іле- Іле-Вал (f 201-209)	10	-16,1
	<i>E. faecalis</i> (ферментація)	Лей-Вал-Тир-Про-Фен-Про-Глі- Про-Іле-Про-Асн-Сер-Лей-Про- Глн-Асн-Іле-Про-Про (f 58-76)	6	-14,9
	Трипсин (гідролізат)	Ала-Вал-Про-Тир-Про-Глн-Арг (f 177-183)	100	-10,0
	Протеїназа К (гідролізат)	Тре-Про-Вал-Вал-Вал-Про-Про- Фен-Лей-Глн-Про (f 80-90)	8	-8,0
	<i>E. faecalis</i> (ферментація)	Лей-Гіс-Лей-Про-Лей-Про-Лей (f 133-139)	10	-7,7
	Сир	Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про-Іле- Про-Асн (f 60-68)	6,1- 7,5	-7,0
	Протеїназа з <i>L. helveticus</i> CP 790	Лей-Глн-Сер-Три (f 140-143)	2	-2,0
к-CN	Пепсин, хімотрипсин і трипсин (гідролізат)	Іле-Ала-Ліз (f 22-24)	4	-20,7
	Флаверзим і <i>S. thermophilus</i> і <i>L. Bulgaricus</i>	Тир-Про-Тир-Тир (f 58-61)	3,4	-15,9
	Пепсин, хімотрипсин і трипсин (гідролізат)	Гіс-Про-Гіс-Про-Гіс-Лей-Сер- Фен (f 98-105)	10	-15,7

Антигіпертензивну дію виявлено в добровольців, які споживали трипсиновий гідролізат загального казеїну по 10 г двічі на добу протягом чотирьох тижнів. Також на добровольцях було досягнуто зменшення систолічного тиску крові на 14 мм рт.ст. і діастолічного на 7 мм рт.ст. при використанні пептидів Іле-Про-Про та Вал-Про-Про [260]. З цими пептидами в інших дослідженнях із різними групами людей теж було відзначено достовірне зниження кров'яного тиску [125, 430, 435].

### 3.1.3 Імуномодуляторні властивості казеїнових пептидів

До імуномодуляторних пептидів належать пептиди, які можуть посилювати імунну функцію організму шляхом стимуляції або супресії імунної системи [55]. Тому імуномодуляторні властивості пептидів казеїнового походження викликають значний теоретичний і практичний інтерес. Такі пептиди були виділені з різних фракцій казеїну [188, 516, 529]. Окремі імуномодуляторні пептиди з казеїнів показані в табл. 22 [194]. Було встановлено, що панкреатинний і трипсиновий гідролізати  $\alpha_{S1}$ -казеїну значно гальмують проліферацію лімфоцитів селезінки мишей і псерових бляшок кролів, тоді як пептидні препарати, отримані за допомогою пепсину й хімотрипсину, не мали ефектів при їхньому введенні *in vitro* в культуру клітин, поділ яких стимулювався мітогенами [395]. Пізніше було виявлено, що пептиди, отримані в процесі протеолізу  $\alpha_{S1}$ -казеїну пепсином і трипсином, суттєво пригнічували проліферацію периферійних мононуклеоцитів крові людини *in vitro*, індуковану мітогеном [250]. На відміну від цього, обробка  $\alpha_{S1}$ -казеїну лише трипсином спричиняла вивільнення С-кінцевого пептиду Тре-Тре-Мет-Про-Лей-Три (f 194-199), який посилював продукцію антитіл і активував фагоцитоз *in vitro* [395].

При дії хімозину на  $\alpha_{S1}$ -казеїн утворюється імуностимулюючий пептид, що має назву ізрацидин, який відповідає N-кінцевій амінокислотній послідовності 1-23  $\alpha_{S1}$ -казеїну. Цей пептид підвищує резистентність мишей до інфекції, викликаной *Staphylococcus aureus*.

**Таблиця 22. Імуномодуляторна дія казеїнових пептидів [194]**

Пептид і його амінокислотна послідовність, яка відповідає фрагменту протеїну-попередника	Спосіб протеолізу протеїну-попередника	Імунний ефект
<i>α<sub>1</sub></i> -казеїн Суміш пептидів	Панкреатин Трипсин Пепсин/хімотрипсин Пепсин/трипсин	↓проліферації лімфоцитів ↓проліферації лімфоцитів Немає ефекту <i>in vitro</i> з мітоген-стимульованими лімфоцитами ↓проліферації людських периферичних кров'яних мононуклеарних клітин
<i>α<sub>1</sub></i> -казеїн TTMPLW (f 194-199) RYLGYLE (f 90-96) RYLGYL (f 90-95) FFVAPFPEVFGK (f 23-34)	Трипсин	↑продукції антитіл, ↑фагоцитозу ↓інфекції, викликані <i>Klebsiella pneumoniae</i> ↑проліферації лімфоцитів, ↑активності природних кілерів, ↑міграції нейтрофілів ↑проліферації лімфоцитів, ↑активності природних кілерів, ↑міграції нейтрофілів Інгібітор АПЕ, ↑фагоцитозу, ↑резистентність до інфекції <i>Klebsiella pneumoniae</i> ↓проліферації лімфоцитів ↓проліферації лімфоцитів
<i>β</i> -казеїн Суміш пептидів	Панкреатин Трипсин Пепсин/хімотрипсин Пепсин/трипсин	Немає ефекту <i>in vitro</i> з мітоген-стимульованими лімфоцитами ↓проліферації лімфоцитів
<i>β</i> -казеїн YQEPVLGPRGPRPPIV (f 193-209) PGIPN (f 63-68) LLY (f 191-193)	Пепсин/хімозин	↑проліферації лімфоцитів ↑продукції антитіл, ↑фагоцитозу
<i>β</i> -казоморфін /YFPFGIPNSL (f 60-70) <i>β</i> -казоморфін /YFPFGPI (f 60-66) <i>β</i> -казокінін /YQEPVLGPR (f 193-202) AVYYPQR (f 177-183)	Трипсин	↑продукції антитіл, ↑фагоцитозу, ↑антиген-залежної проліферації лімфоцитів ↓проліферації лімфоцитів, ↑резистентність мишей до інфекції <i>K. pneumoniae</i> ↓проліферації лімфоцитів при низьких концентраціях ↑проліферації лімфоцитів при високих концентраціях Інгібітор АПЕ
Глікомакропептид к-казеїну (f 106-169) Фракції глікомакропептиду к-казеїну з різним вмістом N-ацетил-нейрамінової кислоти	Хімозин	↓проліферації лімфоцитів ↓фітогемаглютинін-індукованої проліферації спленоцитів мишей ↓ліпополисахарид-індукованої проліферації спленоцитів мишей
<i>Пара-κ</i> -казеїн FFSDK (f 17-21) YG (f 38-39) Суміш пептидів	Трипсин Пепсин/трипсин Lactobacillus casei+ пепсин/трипсин	↑продукції антитіл, ↑фагоцитозу <i>in vitro</i> ↑проліферації лімфоцитів ↑проліферації лімфоцитів ↓проліферації лімфоцитів

Крім цього, ізрацидин при внутрішньовенному введенні мишам стимулював фагоцитарну відповідь *in vivo* на інфекцію, спричинену *Candida albicans*. Також було показано, що введення ізрацидину у вим'я попереджає розвиток маститів у корів та овець. Фрагментам 90-95 і 90-96  $\alpha_{S1}$ -казеїну притаманні опіатні властивості, а низка опіатних пептидів, зокрема  $\beta$ -ендорфінів, виявляють імуномодуляторні властивості *in vitro* та *in vivo*, зокрема посилюють проліферативну відповідь, підвищують активність природних кілерів та локомоцію нейтрофілів [340].

Залежно від концентрації,  $\beta$ -казоморфін-7 (фрагмент 60-66  $\beta$ -казеїну) і  $\beta$ -казокінін-10 (фрагмент 193-202  $\beta$ -казеїну) можуть проявляти протилежні модуляторні ефекти на проліферацію периферійних лімфоцитів крові людини. Зокрема, обидва пептиди при низьких концентраціях проявляють гальмівний вплив на мітоген-стимульовану проліферацію культури Т-лімфоцитів *in vitro*, проте у високих концентраціях вони, навпаки, посилюють проліферацію клітин цієї культури [250]. Було встановлено, що казеїнові пептиди можуть викликати підвищення конканавалін А-стимульовального синтезу інтерлейкіну-2 в культурі Т-лімфоцитів людини. Водночас ніякого ефекту на синтез цими клітинами інтерлейкіну-10 не виявлено [415].

Для  $\beta$ -казокінінів – пептидів, які гальмують активність ангіотензин-перетворювального ензиму, характерною є властивість стимулювати фагоцитоз, який здійснюють перитонеальні макрофаги мишей, і запобігати розвитку інфекції, викликаной *Klebsiella pneumoniae*, після внутрішньовенного введення їх мишам у дозах не менше 0,5 мг/кг [246, 474]. Крім цього,  $\beta$ -казеїнові пептиди як інгібітори АПЕ вносять вклад у регуляцію активності імунної системи, попереджуючи розщеплення брадикініну [312].

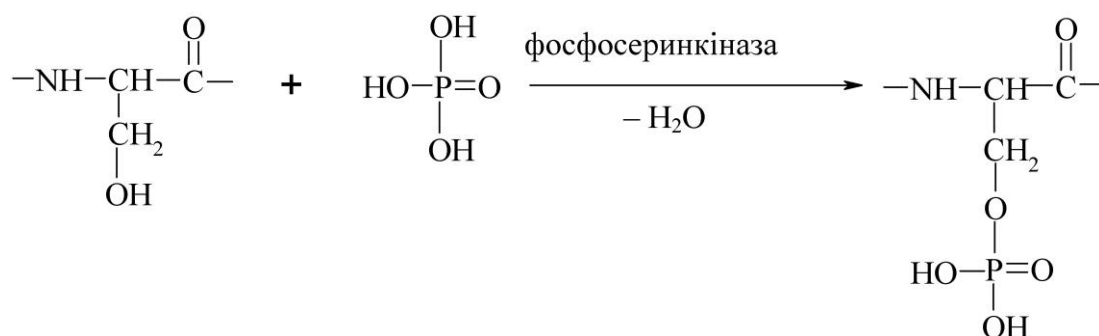
Трипсиновий фрагмент Фен-Фен-Сер-Асп-Ліз (залишок 17-21 к-казеїну) та коров'ячий пара-к-казеїн (1-105 послідовність к-казеїну) володіють властивістю посилювати утворення антитіл та посилювати активність макрофагів людини та миші *in vitro* [504]. Дипептиду Тир-Глі (фрагмент 38-39 к-казеїну) також притаманні імуномодуляторні

властивості та вважається, що він може проходити через інтестинальний бар'єр і діяти на периферійні лімфоцити. Зокрема, показано імуностимулюючий ефект цього дипептиду на проліферацію периферійних лімфоцитів крові людини *in vitro* [250].

Поки що не виявлено певного зв'язку між структурою й біологічною активністю в імуномодуляторних пептидів казеїнового походження [529]. Важливою, очевидно, є присутність залишку аргініну в С- або N-термінальному положенні пептиду [366]. Загалом, на сьогодні не встановлені механізми біологічної дії казеїнових імуномодуляторних пептидів. Потрібні подальші дослідження *in vivo* [326].

### 3.1.4 Казофосфопептиди

Казеїни належать до фосфопротеїнів і можуть бути джерелом фосфопептидів. На основі аналізу первинної структури встановлені ділянки у казеїнових фракціях, які містять фосфосеринові залишки (рис. 32). Утворення таких залишків є результатом післятрансляційного фосфорилювання за участю протеїнкіназ, зокрема фосфосеринкіназ, у клітинах молочної залози під час біосинтезу молока:



Ступінь фосфорилювання нативних фосфопротеїнів і місце приєднання ортофосфатної групи лежать в основі утворення мінорних фракцій  $\alpha_{S1}$ - і  $\alpha_{S2}$ -груп казеїнів.

Місце приєднання ортофосфатної групи фосфосеринкіназою визначається послідовністю амінокислот навколо серинового залишку.





також на можливість фосфорилювання залишків треоніну, хоча сучасні дані вказують на відсутність у первинній структурі казеїнів фосфотреонінових залишків. У будові різних фосфопептидів виявлено багато спільних рис [167]. Більшість із них містять три послідовно розміщені фосфосеринові залишки, за якими розташовані два залишки глутамінової кислоти (-СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-). Така високополярна амінокислотна послідовність є основою металзв'язувального сайту фосфопептидів [177].

З фосфосеринових ділянок казеїнових фракцій може утворюватися велика кількість фосфопептидів, які відрізняються за молекулярними масами й первинною структурою. Будова казеїнових фосфопептидів залежить від специфічності протеолітичних ензимів та умов проходження протеолізу. Приклади ідентифікованих казеїнових фосфопептидів наведені в табл. 23.

**Таблиця 23. Казеїнові фосфопептиди [481, 496]**

Фрагмент	Первинна структура пептиду*	Вид біоактивності
$\alpha_{S1}$ -CN (f 43-58) 2P	Асп-Іле-Глі-СерР-Глу-СерР-Тре-Глу-Асп-Глн-Ала-Мет-Глу-Асп-Іле-Ліз	зв'язування мінералів
$\alpha_{S1}$ -CN (f 59-79) 5P	Глн-Мет-Глу-Ала-Глу-СерР-Іле-СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-Іле-Вал-Про-Асн-СерР-Вал-Глу-Глн-Ліз	зв'язування мінералів, імуномодуляторна
$\alpha_{S2}$ -CN (f 1-32) 4P	Ліз-Асн-Тре-Мет-Глу-Гіс-Вал-СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-Сер-Іле-Іле-СерР-Глн-Глу-Тре-Тир-Ліз-Глн-Глу-Ліз-Асн-Мет-Ала-Іле-Асн-Про-СерР-Ліз	зв'язування мінералів, імуномодуляторна
$\alpha_{S2}$ -CN (f 55-64) 4P	Глі-СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-СерР-Ала-Глу-Вал	зв'язування мінералів
$\beta$ -CN (f 1-25/28) 4P	Арг-Глу-Лей-Глу-Глу-Лей-Асн-Вал-Про-Глі-Глу-Іле-Вал-Глу-СерР-Лей-СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-Сер-Іле-Тре-Арг-Іле-Асн-Ліз	зв'язування мінералів, імуномодуляторна, цитомодуляторна

Примітка. \* СерР – залишок фосфосерину.

Для розуміння біологічної ролі казеїнових фосфопептидів важливо розглянути їх фізичні та хімічні властивості. Найважливішою їх властивістю є взаємодія з іонами металів, зокрема іонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Показано, що фосфопептиди різного походження, отримані внаслідок дії травних протеаз, можуть зв'язувати фосфат кальцію у діапазоні значень рН від 7,0 до 10,5 і запобігати осадженню аморфного фосфату кальцію [89, 158, 253].

На думку авторів [446] фосфосеринові групи маленьких часточок фосфопептидів (розміром до 1 нм) взаємодіють із фосфатом кальцію, стабілізуючи аморфний дикальцію фосфат, що на ранніх стадіях запобігає утворенню кристалів гідроксиапатиту. Кінетика зв'язування фосфосеринових груп залежить від концентрації неорганічного кальцію [253]. При підвищенні концентрації іонів кальцію від 1 до 6 мМ характер реакції змінюється з екзотермічної до ендотермічної. Гальмування осадження фосфату кальцію починається вже при концентраціях казеїнових фосфопептидів 10 мг/л (рН 6,5), а повна стабільність емульсії досягається при 100 мг/л [89]. Механізм запобігання осадженню кальцію в присутності фосфатів у лужному середовищі полягає в утворенні іонами кальцію і фосфатами розчинних нанокластерів у присутності фосфопептидів [227, 228]. Як встановлено в роботах, ці нанокластери включають ядро радіусом 2,4 нм, яке в середньому містить близько 350 гідратованих іонних пар кальцій фосфату. Ядро покрите оболонкою товщиною 1,6 нм, яка містить близько 50 фосфопептидних ланцюгів.

Різні методи були використані для кількісної характеристики взаємодії іонів кальцію з казеїновими фосфопептидами. Було встановлено, що константа зв'язування кальцію може набувати значень від  $10^{-2}$ - $10^{-3} \text{ M}^{-1}$  до  $0,32 \text{ mM}^{-1}$  для нефракціонованої суміші казеїнових фосфопептидів і для очищеного пептиду  $\alpha_{\text{S1-CN}}$  (f 59-79) 5P відповідно. N-термінальному фосфопептиду  $\beta\text{-CN}$  (f 1-25) притаманна здатність зв'язувати 4 молі іонів феруму на 1 моль пептиду [177]. Що стосується

кальцію, то до 40 молів іонів кальцію може зв'язувати один моль казеїнових фосфопептидів. Більш наочно це виглядає у вагових співвідношеннях. Показано, що від 7,4 до 24,0 мг  $\text{Ca}^{2+}$  може утворити розчинну сіль із 1 мг суміші казеїнових фосфопептидів, які отримали в результаті протеолізу казеїну різними протеїназами [24, 322]. Розчини фосфату кальцію концентрацією до 1 М залишаються стабільними в присутності фосфопептидів, виділених з  $\beta$ -казеїну –  $\beta$ -CN (f 1-25) 4P і  $\beta$ -CN (f 1-42) 5P [227]. Іншими авторами [177] встановлено, що 1 моль  $\beta$ -CN (f 1-25) 4P і  $\alpha_{s1}$ -CN (f 61-79) 4P може приєднувати відповідно 24 і 17 молів  $\text{Ca}^{2+}$  при рН 9,0. За даними Baum J. J. et al. (1989) максимальна кількість кальцію зв'язується фосфосериновими залишками в положенні 17, 18, 19 фосфопептиду  $\beta$ -CN (f 1-25) при значеннях рК від 6,57 до 7,10 [81]. Значення констант зв'язування іонів кальцію, яке знаходиться в межах  $10^2 \div 10^3 \text{ M}^{-1}$ , є порівняно невисокими, що важливо для адсорбції іонів кальцію в кишківнику.

Здатність казеїнових фосфопептидів протидіяти осадженню іонів кальцію насамперед залежить від ступеня фосфорилування, а також рН і температури. Так, при повному дефосфорилуванні казеїнові фосфопептиди втрачали здатність зв'язувати двовалентні іони металів навіть при концентраціях пептидів вище 100 мг/л [98]. Слід зазначити, що вклад карбоксильних груп залишків глютамінової й аспарагінової кислот казеїнових фосфопептидів є незначним. З використанням синтетичних фосфопептидів підтверджено важливість кількості фосфосеринових залишків і їх розміщення у фосфопептиді [594]. Також велике значення для взаємодії з іонами металів мають амінокислотні залишки, розташовані навколо функціональної ділянки фосфопептидів. Заміна цих залишків у синтетичних фосфопептидах зменшує їх металзв'язувальну дію.

При низьких значеннях рН відбувається протонування фосфатних груп казеїнових фосфопептидів і зниження активності зв'язування іонів кальцію. Підвищення температури в межах від 20 до 40 °С посилює ендотермічну реакцію взаємодії фосфопептидів з іонами кальцію [253].

Фосфосеринові групи, безумовно, відіграють важливу біологічну функцію на рівні протеїнів казеїнового комплексу. Це стосується структури і функцій казеїнових міцел (підрозділ 2.1). Але чи притаманні їм спеціальні біологічні функції в складі казеїнових фосфопептидів, які утворюються в процесі нормального перетравлювання молока в шлунково-кишковому тракті? В організмі перетворення молочних протеїнів починається у шлунку. При цьому внаслідок дії пепсину розщеплюється близько 20 % пептидних зв'язків. Далі розщеплення продовжується в тонкому кишківнику протеолітичними ензимами підшлункової залози. Травлення завершується мембранними протеазами й пептидазами, розташованими на ворсинках тонкого кишківника, а також ензимами, які виділяються мікрофлорою кишківника [2]. Утворення фосфопептидів із казеїну коров'ячого молока відбувається в шлунку і дванадцятипалій кишці після вживання людиною молока [115]. Фосфатні групи у фосфопептидів можуть відщеплюватися фосфатазами, які розміщені на апікальній мембрані ентероцитів. Частина фосфопептидів утворює стійкі до дії протеолітичних ензимів і фосфатази комплекси з іонами кальцію, цинку, магнію, феруму [95]. Такі стійкі комплекси можуть переміщуватися в кишковому тракті до дистальних ділянок тонкого кишечника. Цей факт може свідчити про важливість їхньої біологічної дії [332].

Уперше на біологічну функцію казеїнових фосфопептидів у своїх роботах вказав Mellander O. (1950). Він дослідив і описав незалежну від вітаміну D кальцифікацію кісток при застосуванні казеїнових фосфопептидів у дітей, які хворіли рахітом [335]. У подальшому в численних роботах було досліджено вплив фосфопептидів на засвоєння організмом кальцію, а також інших макро- (магній, ферум) і мікроелементів (цинк, нікель, кобальт, селен) [58, 59, 87, 262]. Вважається, що високу доступність кальцію, який надходить у травний тракт із казеїнами в складі молока й молочних продуктів, можна пояснити здатністю фосфопептидів доставляти іони кальцію в розчинному вигляді до активних і пасивних транспортних систем кальцію в кишечнику. Механізм дії

фосфопептидів при адсорбції іонів остаточно не встановлений. Пропонується декілька варіантів щодо засвоєння іонів кальцію:

1. Вбудовування фосфопептидів у цитоплазматичну мембрану і формування в ній кальцій-селективних каналів.

2. Перенос іонів кальцію фосфопептидами і транспортування шляхом ендоцитозу.

3. Інші способи постачання іонізованого кальцію в цитозоль.

У ряді робіт було також підтверджено позитивний вплив казеїнових фосфопептидів на засвоєння іонів феруму, магнію, цинку та ін. [94, 188, 253, 326]. Зокрема, у випадку взаємодії іонів феруму з фосфопептидами не утворюються високомолекулярні гідроксиди феруму, які погано адсорбуються в кишківнику [251, 424]. При використанні фосфопептиду  $\beta$ -CN (f 1-25) 4P підвищується абсорбція іонів цинку [94]. Необхідно зазначити, що дані про роль фосфопептидів у адсорбції іонів, зокрема іонів кальцію, отримані *in vivo*, не завжди є позитивними, іноді суперечать одні одним [177, 326]. Це пов'язано з впливом багатьох факторів на цей процес. Насамперед це стосується компонентів дієти, стану організму та ін. [424].

Біологічну дію казеїнових фосфопептидів часто пов'язують із проблемою карієсу зубів. [143, 370, 446, 543]. Це не може бути їх природною біологічною активністю. Під час молочного годування зуби ще можуть бути відсутні, а фосфопептиди не утворюються в ротовій порожнині. Як правило, карієс виникає значно пізніше при демінералізації твердих тканин зубів органічними кислотами різного походження (кислоти їжі або кислоти, продуковані каріогенними бактеріями при ферментації вуглеводів). Проте, в силу своїх фізико-хімічних властивостей фосфопептиди можуть брати участь у відновленні мінерального складу зубів і запобігати розвитку карієсу [107, 207, 278, 353, 402, 511]. Також показано, що казеїнові фосфопептиди гальмують адгезію каріогенних бактерій *Streptococcus mutans* до поверхні зубів і сприяють запасанню біодоступних іонів кальцію [452].

Окрім наведених видів біологічної дії для казеїнових фосфопептидів в окремих роботах встановлено антигіпертензивні властивості, здатність регулювати секрецію шлункового соку, імуномодуляторна дія, антиоксидантна дія, здатність впливати на апоптоз клітин [131, 205, 213, 214, 252]. Звичайно, біологічна дія казеїнових фосфопептидів потребує подальшого детального вивчення, але вже встановлені факти говорять про унікальність властивостей і важливість їх функцій в організмі, що робить їх перспективними інгредієнтами для функціональних продуктів.

### **3.1.5 Антитромботичні пептиди казеїнового походження**

Серед біологічно активних пептидів, які походять із білків казеїнового комплексу молока, є й такі, що впливають на процеси згортання крові. Утворення кров'яного згустку є важливим механізмом захисту від втрат крові, які виникають внаслідок пошкодження судин чи тканин. Як гемокоагуляція, так і згортання молока є важливими фізіологічними коагуляційними процесами. Існує багато подібностей між цими процесами. Фібриноген ( $\gamma$ -ланцюг) людини має схожу первинну структуру з коров'ячим  $\kappa$ -казеїном чи глікомакропептидом, який із нього утворюється. Ще в 1978 році Jolles та співавт. [24] припустили, що  $\gamma$ -ланцюг фібриногену та  $\kappa$ -казеїн виникли від спільного попередника протягом останніх 450 млн років. Існують структурні та функціональні подібності між  $\gamma$ -ланцюгом С-кінцевого додекапептиду (f 400-411), який приймає участь у процесі зв'язування з рецепторами тромбоцитів та різними пептидами з фрагменту 103-116 коров'ячого  $\kappa$ -казеїну, які одержали назву «казоплателіни» (табл. 24).

Процеси розщеплення фібриногену тромбіном і розщеплення  $\kappa$ -казеїну молокозсідальним ензимом хімозином теж мають певну подібність. Як згортання крові, так і згортання молока визначається процесами обмеженого протеолізу: тромбін розщеплює два пептидні зв'язки між залишками аргініну і гліцину, внаслідок чого утворюється фібрин і фібринопептиди, а хімозин розщеплює пептидний зв'язок Фен-

Мет зі звільненням пара-к-казеїну і ГМП. Короткі розчинні пептиди (фібринопептиди й казоглікопептиди) утворюються в обох процесах – згортання крові й згортання молока. Фібринопептиди і казоглікопептиди мають різну амінокислотну послідовність, проте володіють загальним негативним зарядом і жоден із пептидів не містить залишків цистеїну чи триптофану.  $\epsilon$ -Аміногрупи лізину, можливо, залучені в процеси агрегації як фібрину, так і казеїну. Кальцій є однаково важливим у другій фазі згортання молока і в процесі агрегації фібринових мономерів. Простетичні групи, утворені залишками олігосахаридів, не відіграють важливої ролі в процесах згортання, проте вони гальмують активність хімозину чи тромбіну.

**Таблиця 24. Антитромботичні пептиди з  $\gamma$ -ланцюга фібриногену людини і з к-казеїну корови, отримані за дії трипсину**

Фрагмент протеїну	Первинна структура пептиду	Літературне джерело
$\gamma$ -ланцюг фібриногену людини (f 400-411)	Гіс-Гіс-Лей-Глі-Глі-Ала-Ліз-Глн-Ала-Глі-Асп-Вал	Rutherford et al. (2000)
к-казеїн (f 103-111)	Лей-Сер-Фен-Мет-Ала-Іле-Про-Про-Ліз	Fiat et al. (1993)
к-казеїн (f 106-110)	Мет-Ала-Іле-Про-Про	Fiat et al. (1993)
к-казеїн (f 106-112)	Мет-Ала-Іле-Про-Про-Ліз	Schlimme and Meisel (1995)
к-казеїн (f 106-116)	Мет-Ала-Іле-Про-Про-Ліз-Ліз-Асн-Глн-Асп-Ліз	Schlimme and Meisel (1995)
к-казеїн (f 113-116)	Асн-Глн-Асп-Ліз	Schlimme and Meisel (1995)

к-Казеїн гальмує тромбін-індуковану агрегацію і тромбініндуковану секрецію серотоніну *in vitro*, досягаючи 50% гальмування при концент-

рації 10  $\mu\text{M}$  [458]. На відміну від  $\kappa$ -казеїну, пара- $\kappa$ -казеїн не проявляє жодної активності. ГМП (f 106-116) гальмує як тромбін, так і АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів, спричиняючи 50 % гальмування при концентрації 10  $\mu\text{M}$  і 250  $\mu\text{M}$  відповідно. В експериментальній моделі *in vivo* на щурах з використанням направленою лазерного пучка, який викликав пошкодження в ендотелії брижової артерії, було показано, що внутрішньовенне введення ГМП призводило до 65 % гальмування тромбогенезу [458].

Казоплателіни утворюються в результаті протеолізу  $\kappa$ -казеїну трипсином. Ці пептиди можуть гальмувати агрегацію АДФ-активованих тромбоцитів, а також приєднання  $\gamma$ -ланцюгів фібриногену людини до специфічних рецепторів на поверхні тромбоцитів [415]. Причому, пептид  $\kappa$ -казеїну (f 103-111) гальмує агрегацію тромбоцитів, а пептид  $\kappa$ -казеїн (f 106-110) проявляє антитромботичну дію, гальмуючи зв'язування фібриногену тромбоцитами. Встановлено, що пептид  $\kappa$ -CN (f 106-112) і  $\kappa$ -CN (f 113-116) мають значно слабшу дію, ніж повний фрагмент  $\kappa$ -CN (f 106-116) [319]. Для проявлення антитромботичної дії велике значення мають залишки Іле<sub>108</sub>, Ліз<sub>112</sub> і Асп<sub>115</sub> у складі казоплателінів. Так, наявність залишку лізину в казоплателіні  $\kappa$ -CN (f 112-116) посилює його дію у 222 рази порівняно з фрагментом 113-116 [24]. Порівняльні дані щодо антитромботичної дії пептидів, отриманих з  $\kappa$ - і  $\beta$ -казеїнів молока та фібриногену людини, наведені у табл. 25. У плазмі крові п'ятиденних немовлят виявлені антитромботичні пептиди з  $\kappa$ -казеїну людини й корови після споживання ними грудного молока, а також дитячої суміші на основі коров'ячого молока. Це підтверджує здатність казоплателінів проникати в кров'яне русло [115]. Антитромботична дія ГМП і його фрагментів (f 106-116 і f 112-116) підтверджена на морських свинках з артеріальним тромбозом [76].

Окрім казоплателінів, можливо, існує ще один механізм антитромботичної дії казеїнових пептидів. Відомо, що високий рівень оксидативного стресу може спричиняти утворення тромбів [275].



Допускається, що цьому можуть протидіяти численні антиоксидантні пептиди, які утворюються з протеїнів казеїнового комплексу [428].

**Таблиця 25. Антитромботична дія пептидів, отриманих із протеїнів молока корови і вівці та фібриногену людини (адаптовано з Fox, 2015 і McSweeney, 2016)**

Фрагмент протеїну	Первинна структура пептиду	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>1</sup>	Спосіб отримання
κ-казеїн вівці (f 112-116)	Ліз-Асп-Глн-Асп-Ліз	повне гальмування	Гідроліз трипсином
κ-казеїн вівці (f 163-171)	Тре-Ала-Глн-Вал-Тре-Сер-Тре-Глу-Вал	повне гальмування	Гідроліз трипсином
κ-казеїн вівці (f 165-171)	Глн-Вал-Тре-Сер-Тре-Глу-Вал	повне гальмування	Гідроліз трипсином
β-казеїн корови (f 193-209)	Тир-Глн-Глу-Про-Вал-Лей-Глі-Про-Вал-Арг-Глі-Про-Фен-Про-Іле-Іле-Вал	4,6 % <sup>2</sup>	Ферментація <i>L. casei</i>
κ-казеїн корови (f 106-116)	Мет-Ала-Іле-Про-Про-Ліз-Ліз-Асп-Глн-Асп-Ліз	60	Гідроліз трипсином
κ-казеїн корови (f 112-116)	Ліз-Асп-Глн-Асп-Ліз	2	Гідроліз трипсином
κ-казеїн корови (f 113-116)	Асп-Глн-Асп-Ліз	400	Гідроліз трипсином
α-ланцюг фібриногену людини (f 572-575)	Арг-Глі-Асп-Сер	75	
γ-ланцюг фібриногену людини (f 400-411)	Гіс-Гіс-Лей-Глі-Глі-Ала-Ліз-Глн-Ала-Глі-Асп-Вал	150	

Примітки: 1. Концентрація пептиду (μM), яка на 50 % зменшує агрегацію тромбоцитів.

2. Зменшення агрегації (%) на μг/мл пептиду.

### 3.1.6 Інші види біологічної дії казеїнових пептидів

В останні десятиліття описані нові види біологічної дії казеїнових пептидів. До них можна віднести антидіабетичну, антимікробну, антиоксидантну, антиканцерогенну дію, вплив на апетит та деякі інші [326, 379].

Антидіабетична дія продуктів протеолізу казеїну проявляється завдяки їхньому впливу на синтез інсуліну [300]. Цей гормон синтезується  $\beta$ -клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози й діє як анаболік, тобто сприяє запасанню глюкози, жирних кислот і амінокислот. Надлишок інсуліну спричиняє гіпоглікемію, а нестача зумовлює важке захворювання – діабет [2]. Діабет буває двох типів. При діабеті першого типу (інсулінозалежному) нестача інсуліну спричинена автоімунним руйнуванням  $\beta$ -клітин підшлункової залози. Найпоширенішим є діабет другого типу. У цьому випадку розвивається відносна недостатність інсуліну внаслідок дії контрінсулярних факторів (ожиріння, стрес, гормони-антагоністи), а також розвитку інсулінорезистентності клітин інсулін-залежних тканин (м'язова, жирова, клітини печінки). Саме на діабет другого типу позитивно впливають продукти протеолізу казеїнів [192]. Лікування діабету другого типу включає стимуляцію синтезу інсуліну, а також регуляцію активності ензимів, дія яких пов'язана з рівнем глюкози в крові [326].

Стимуляція синтезу інсуліну може відбуватися завдяки підвищенню концентрації в крові специфічних інсулінотропних амінокислот (Лей, Фен, Арг, Тир), а також дипептидів із розгалуженими боковими групами амінокислотних залишків (Іле-Вал, Вал-Лей) [289, 355]. Інший механізм регуляції синтезу інсуліну пов'язаний із дією глюкозозалежного інсулінотропного поліпептиду (GIP) і глюкагоноподібного поліпептиду 1 (GLP-1). Ці поліпептиди стимулюють секрецію інсуліну. У випадку з інсулінотропними амінокислотами й дипептидами – кращі результати досягнуті з гідролізатами протеїнів сироватки молока, які будуть розглянуті в

підрозділі 3.2. Казеїнові пептиди мають відношення до дії інсулінотропних поліпептидів. Регуляція активності цих поліпептидів в організмі відбувається шляхом їх розщеплення протеолітичним ензимом дипептидил-пептидазою IV (DPP-IV) [204]. Серед казеїнових пептидів і, у меншій мірі, серед продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока знайдені інгібітори DPP-IV [267, 372, 375] (табл. 26).

**Таблиця 26. Казеїнові пептиди – інгібітори дипептидил-пептидази IV [530]**

Фрагмент протеїну	Первинна структура пептиду	IC <sub>50</sub> (μM)*
α <sub>S2</sub> -CN (f 117-122)	Вал-Про-Іле-Тре-Про-Тре	130
α <sub>S2</sub> -CN (f 117-123)	Вал-Про-Іле-Тре-Про-Тре-Лей	110
β-CN (f 60-68)	Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про-Іле-Про-Асн	670
β-CN (f 62-68)	Фен-Про-Глі-Про-Іле-Про-Асн	260
β-CN (f 63-69)	Про-Глі-Про-Іле-Про-Асн-Сер	1000
β-CN (f 70-72), α <sub>S1</sub> -CN (f 11-13)	Лей-Про-Глн	82
β-CN (f 70-76)	Лей-Про-Глн-Асн-Іле-Про-Про	160
β-CN (f 70-77)	Лей-Про-Глн-Асн-Іле-Про-Про-Лей	46
β-CN (f 71-77)	Про-Глн-Асн-Іле-Про-Про-Лей	1500
β-CN (f 74-82)	Іле-Про-Про-Лей-Тре-Глн-Тре-Про-Вал	1300
β-CN (f 84-91)	Вал-Про-Про-Фен-Іле-Глн-Про-Глу	2500

Примітка. \* Концентрація (μM), яка забезпечує половину максимальної інгібіторної дії.

Встановлено, що інгібіторами DPP-IV є пептиди, які складаються з 2-8 залишків гідрофобних амінокислот, а також часто містять залишок

проліну [372]. Аналіз кінетики гальмування DPP-IV в подвійних зворотних координатах Лайнуївера-Берка показав, що серед пептидів із протеїнів молока є конкурентні й неконкурентні інгібітори [374, 378]. Автори вважають, що пептиди з протеїнів казеїнового комплексу можуть доповнювати дію синтетичних лікарських препаратів. Підтвердженням цьому є результати, отримані *in vivo* на щурах, у яких казеїновий пептид  $\beta$ -CN (f 70-77), виділений із сиру гауда, викликав суттєве зниження концентрації глюкози в крові [530]. У дослідах на людях споживання гідролізатів казеїну призводило до суттєвого підвищення секреції інсуліну [301]. Додавання інсулінотропної амінокислоти лейцину до казеїнового гідролізату викликало значне збільшення концентрації інсуліну в плазмі крові, проте мало впливало на рівень глюкози [192].

Великий інтерес викликає група казеїнових пептидів, які здатні впливати на розвиток і життєдіяльність мікроорганізмів [86]. Такі пептиди називають антимікробними і їм часто притаманна імуномодуляторна дія [379]. Історія вивчення антимікробних пептидів молока починається з 1930 року, коли був відкритий лактенін [247]. У той час лактенін не міг бути детально охарактеризований. На сьогодні антимікробні пептиди отримані з усіх фракцій казеїну. Приклади казеїнових антимікробних пептидів наведені в табл. 27. Вони, як правило, порівняно короткі, гідрофобні, часто включають амінокислотні залишки з позитивно зарядженими боковими групами [55, 114]. Причому, позитивний заряд і гідрофобність відіграють важливу роль і посилюють антимікробну дію. Механізм дії антимікробних пептидів пов'язаний із їхньою взаємодією з клітинною мембраною мікроорганізмів. У результаті відбувається пошкодження мембран, збільшується їхня проникність для іонів і молекул. Це призводить до загибелі клітин [380].

Антимікробні пептиди почали детально вивчати з 1967 року. Тоді в результаті нагрівання і протеолізу загального казеїну хімозином при нейтральних значеннях рН була отримана фракція пептидів ( $M < 5000$  Да), які проявляли бактерицидну дію щодо *Staphylococcus*

*aureus*, а також до пробіотичних лактобацил [268]. Ці пептиди були названі казецидинами. Пізніше при використанні очищеного  $\alpha_{S1}$ -казеїну як субстрату під дією хімосину було отримано перший антимікробний пептид, для якого встановили первинну структуру. Ним виявився фрагмент 1-23  $\alpha_{S1}$ -казеїну. Він отримав назву ізрацидин. Очевидно, що ізрацидин входив до складу казецидинів. Цей пептид у досліджах *in vivo* на мишах показав високу ефективність проти інфекції *Staphylococcus aureus*, а також при маститах овець і корів.

**Таблиця 27. Антимікробні пептиди казеїнового походження [380]**

Протеїн-попередник	Ензим	Біоактивний пептид	Антимікробна дія
Загальний казеїн	Хімосин	Казецидини $\beta$ -CN (f 193-209) $\beta$ -CN (f 193-207)	<i>Staphylococcus</i> , <i>Sarcina</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>
	Папаїн	Ізрацидин ( $\alpha_{S1}$ -CN (f 1-23))	Антимікробна, антивірусна, антипатогенна адгезія
$\alpha_{S1}$ -CN	Хімосин	Ізрацидин ( $\alpha_{S1}$ -CN (f 1-23))	<i>Candida albicans</i> , Грам (+) і Грам (-) бактерії
$\alpha_{S2}$ -CN	Хімосин	Казоцидин	Інгібітор росту
	Кислота	Казоцидин I ( $\alpha_{S2}$ -CN (f 165-203))	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i>
$\kappa$ -CN	Хімосин	Капацин	Патогени зубів
	Пепсин	$\kappa$ -CN (f 63-117)	Грам (+) і Грам (-) бактерії, дріжджі
	Хімосин	ГМП ( $\kappa$ -CN (f 106-169))	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Escherichia coli</i>
Капацин	Протеоліз	$\kappa$ -CN (f 138-158)	<i>Streptococcus mutans</i>

Наступним активним ідентифікованим антимікробним пептидом був казоцидин I, який отримали при кип'ятінні молока з оцтовою кислотою. Первинна структура казоцидину I відповідає фрагменту  $\alpha_{S2}$ -CN (f 165-203) [595]. Цей пептид проявляв *in vitro* бактерицидну дію по відношенню до *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*. Яскраво виражена біфільна будова цього пептиду, очевидно, має важливе значення при проникненні в бактеріальну мембрану. Пізніше ще два бактерицидні пептиди, які утворюються з тої ж ділянки первинної структури, що й казоцидин I, були отримані за дії на  $\alpha_{S2}$ -казеїн пепсину [442]. Це фрагменти  $\alpha_{S2}$ -CN (f 164-179) і  $\alpha_{S2}$ -CN (f 183-207). Вони показали бактерицидну дію як до Грам (+) так і до Грам (-) бактерій. Зокрема, встановлено їх активність по відношенню до *Listeria monocytogenes* і *Cronobacter sakazakii* [61].

Три нові антибактеріальні пептиди виділені препаративним ізоелектричним фокусуванням комерційних гідролізатів казеїну –  $\alpha_{S2}$ -CN (f 165-188),  $\alpha_{S1}$ -CN (f 6-15),  $\kappa$ -CN (f 136-146). Показано, що мінімальна інгібіторна концентрація пептидів по відношенню до *Escherichia coli* та *Bacillus subtilis* становить від 12,5 до 100 мкг/мл [157]. Антимікробні пептиди можуть утворюватися і з  $\beta$ -казеїну. До них можна віднести пептиди  $\beta$ -CN (f 177-183),  $\beta$ -CN (f 191-193) і  $\beta$ -CN (f 193-209) [127, 380].

Окремо заслуговує на увагу глікомакропептид –  $\kappa$ -CN (f 106-169). Цей великий глікополіпептид, який утворюється в процесі молочного живлення за дії хімозину на  $\kappa$ -казеїн, здатний зв'язувати холерний токсин і ентеротоксин *Escherichia coli* [104]. Крім того, ГМП гальмує адгезію каріогенних стрептококів (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*) у ротовій порожнині. Очевидно, за дії ГМП відбувається заміна стрептококів на менш каріогенні актиноміцети в складі зубних бляшок, що гальмує розвиток карієсу зубів. Важливу роль у протидії розвитку карієсу відіграють казеїнові фосфопептиди. У підрозділі 3.1.4 було розглянуто їх значення для відновлення зубної емалі за рахунок

доставки доступної форми фосфату кальцію. Виявилося, що казеїнові фосфопептиди також протидіють колонізації поверхні зуба каріогенними бактеріями, а також забезпечують інгібіторну дію на ензими цих бактерій [133, 160, 436]. В окремих випадках позитивну антикарієсну дію казофосфопептидів було показано на добровольцях (стабілізація рН, зниження кількості каріогенних бактерій) [83, 113, 445].

Серед казеїнових пептидів знайдені пептиди, здатні впливати на функціонування шлунково-кишкового тракту й апетит [379]. Регуляція кількості споживання їжі відбувається у двох центрах, розміщених у центральній нервовій системі. Це центр насичення (медіальна ділянка гіпоталамуса) і харчовий центр (латеральна ділянка гіпоталамуса). Подразнення харчового центру призводить до підвищення апетиту, а подразнення центру насичення викликає відмову від їжі [2]. Харчовий центр постійно активний, але після споживання їжі його активність гальмується центром насичення. Регулювання апетиту – це складний процес, у якому беруть участь багато чинників. Зокрема, існує чотири гіпотези щодо аферентного впливу на центри гіпоталамусу. Це ліпостатична (гуморальні фактори з жирової тканини, зокрема лептин), кишково-пептидна (кишкові пептидні гормони), глюкостатична й термостатична гіпотези. Згідно з кишково-пептидною гіпотезою споживання їжі призводить до звільнення пептидів, які впливають на гіпоталамус, що знижує рівень мотивації до споживання їжі. До них належать шлунково-кишкові пептидні гормони холецистокінін, соматостатин, GLP-1, пептид Тир-Тир [2, 323, 467]. До регуляції апетиту причетний нейротрансмітер серотонін і його рецептори. Зокрема, миші з нокаутом генів серотонінових рецепторів 5HT<sub>2A</sub> і 5HT<sub>2C</sub> набирають надлишкову вагу. Таким чином, зниження апетиту може бути досягнуто за дії агоністів серотоніну на його рецептори в шлунково-кишковому тракті або центральній нервовій системі [472].

Давно відомо, що протеїни молока, зокрема казеїни, викликають відчуття насичення й можуть знижувати рівень апетиту. Тут, очевидно,

здіяно декілька механізмів. Ще у 70-80-х роках минулого століття була проведена серія робіт у лабораторії Чернікова М.П. щодо ролі ГМП у регуляції виділення шлункового соку [13, 20]. Виявилося, що ГМП є сильним інгібітором шлункової секреції й моторики. Також ефект насичення за участі ГМП може бути пов'язаний із його здатністю стимулювати звільнення холецистокініну [516]. Казеїнові пептиди, отримані протеолізом казеїнату натрію, можуть активувати серотонінові рецептори 5HT<sub>2C</sub> у культурі клітин [376]. Встановлено, що активні пептиди агоністи серотоніну є низькомолекулярними, гідрофобними й містять позитивно заряджені амінокислотні залишки. Подібну дію показав і ГМП. Негідролізовані протеїни казеїнового комплексу не здатні активувати серотонінові рецептори 5HT<sub>2C</sub>. У досліджах *in vivo* ще не доведено роль казеїнових пептидів як агоністів серотоніну. Проте, на щурах показано, що казеїнові гідролізати можуть знижувати рівень засвоєння їжі. Цей ефект пов'язують із дією β-казоморфінів як опіюїдних агоністів. Така активність казоморфінів може проявлятися в затримці шлункової секреції, кишкового транзиту і, відповідно, викликати відчуття насичення [63, 433, 526].

Епідеміологічні дослідження поширення ракових захворювань свідчать на користь споживачів молока й молочних продуктів [336, 380]. Хоча механізми канцерогенезу остаточно не встановлені, можна допустити, що певну роль у протидії виникненню й розвитку раку можуть відігравати природні біоактивні пептиди з протеїнів казеїнового комплексу [333]. В дослідженнях *in vitro* доведено, що казоморфіни з α<sub>S1</sub>-казеїну (f 90-95, f 90-96) і β-казеїну (f 60-64, f 60-66) та синтетичний амідований аналог фрагменту β-казеїну (f 60-63) – морфіцептин (Тир-Про-Фен-Про-NH<sub>2</sub>) гальмують проліферацію клітин лінії T47D раку грудей людини [215]. Гальмуючу дію на розвиток ракових клітин людини лінії Jurkat-T і Сасо-2 показали гідролізати казеїнату кальцію [417]. Також було досліджено вплив кальцій-казофосфопептидів на життєдіяльність трьох ліній ракових клітин людини: Hela (карцинома), U373 (гліобластома) і Jurkat T (лейкемія). Клітини обробляли



фосфопептидами, отриманими із загального казеїну за дії трипсину, хімотрипсину й панкреатину. У результаті було встановлено, що трипсинові й панкреатинові кальцій-казофосфопептиди гальмували розвиток клітин ліній U373 і Hela, але водночас стимулювали розвиток клітин лінії Jurkat T [363]. Казеїновий гідролізат, отриманий у результаті дії ензимів бактерій, показав протилежну дію на розвиток різних ліній ракових клітин [291]. Важливі результати були отримані *in vivo* на мишах із фібросаркомою [273]. Споживання пептидів, отриманих у результаті ферментації молока бактеріями *Lactobacillus helveticus* протягом семи днів призвело до зменшення розмірів пухлини. Проте, точний склад, структуру й походження антиканцерогенних пептидів не було встановлено.

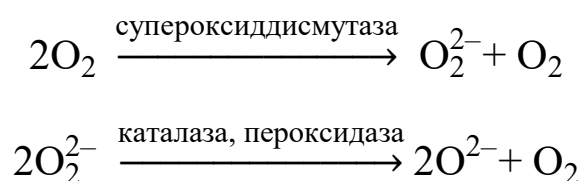
Заслуговує уваги ще одна властивість окремих казеїнових пептидів – це здатність проявляти антиоксидантну дію. Така дія може бути цінним доповненням до природного антиоксидантного захисту організму. Як вважає більшість авторів, антиоксидантні пептиди з протеїнів молока мають перевагу перед синтетичними антиоксидантами завдяки відсутності побічних ефектів [380, 419, 529].

В організмі в процесі тканинного дихання утворюються продукти неповного відновлення кисню. Відомо, що молекула кисню може приймати один, два або чотири електрони. Продукти неповного відновлення містять неспарений електрон, характеризуються високою реакційною здатністю й називаються активними формами кисню [14]. До них, зокрема, належить супероксид аніон:



Активні форми кисню здатні започатковувати ланцюгові процеси окиснення за радикальним механізмом. Надлишкова кількість активних форм кисню (при запальних процесах, при дії ксенобіотиків або іонізуючого випромінювання) призводить до пошкодження біополімерів (ДНК, протеїни), ненасичених ліпідів біомембран і виникнення стану

оксидативного стресу. Захист від надмірного утворення активних форм кисню в організмі здійснює система, яка включає захисні ензими (супероксиддисмутаза, каталаза і глутатіонпероксидаза), а також неензимні антиоксиданти. Захисні ензими послідовно розкладають активні форми кисню до стабільних продуктів:



Неензимні знешкоджувачі радикалів зупиняють розвиток ланцюгових процесів окиснення. До них належать різні природні сполуки (глутатіон, поліненасичені жирні кислоти, вітаміни (А, Е, Р, С) та ін.).

В гідролізатах молочних протеїнів знайдені пептиди з антиоксидантною дією [380, 419, 503]. Окремі такі пептиди, що можуть утворюватися з казеїнів, показані в табл. 28. Як правило, це невеликі пептиди, що включають залишки гідрофобних амінокислот. Антиоксидантні пептиди з протеїнів молока можуть безпосередньо знешкоджувати активні форми кисню або впливати на ензими антиоксидантного захисту [428]. У досліджах *in vitro* встановлено, що пептиди, які безпосередньо знешкоджують активні форми кисню, часто містять ароматичні й сірковмісні амінокислоти. Цистеїн може бути попередником глутатіону, а амінокислоти з фенольною та індольною групами можуть використовуватися як донори гідрогену. Також радикали, що утворюються за участі амінокислот із цими групами є порівняно стабільними [466].

Значення амінокислотної послідовності пептидів в антиоксидантній активності можна прослідкувати на прикладі групи пептидів з  $\alpha_{S1}$ -казеїну, представлених в табл. 28. Поступове скорочення пепсинового пентапептиду  $\alpha_{S1}$ -CN (f 144-149) до трипептиду  $\alpha_{S1}$ -CN (f 147-149) призводить до зниження антиоксидантної активності. Основною структурою, що відповідає за захоплення супероксид радикалу, є Глу-

Лей. На казеїнових гідролізатах було показано, що загалом пептиди з більшою молекулярною масою ( $M > 5000$  Да) мають вищу антиоксидантну активність [372]. Антиоксидантні властивості також характерні для казеїнових фосфопептидів. Вони можуть безпосередньо знешкоджувати активні форми кисню, а також зв'язувати прооксидантні іони редокс-активних металів (ферум, купрум) [252].

**Таблиця 28. Антиоксидантні пептиди казеїнового походження [380]**

Фрагмент казеїну	Первинна структура пептиду	CO EC <sub>50</sub> (μM)*	Літературне джерело
α <sub>S1</sub> -CN (f 144-149)	Тир-Фен-Тир-Про-Глу-Лей	79,2	Suetsuna et al. (2000)
α <sub>S1</sub> -CN (f 145-149)	Фен-Тир-Про-Глу-Лей	127,5	Suetsuna et al. (2000)
α <sub>S1</sub> -CN (f 146-149)	Тир-Про-Глу-Лей	189,3	Suetsuna et al. (2000)
α <sub>S1</sub> -CN (f 147-149)	Про-Глу-Лей	306,0	Suetsuna et al. (2000)
α <sub>S1</sub> -CN (f 148-149)	Глу-Лей	61,1	Suetsuna et al. (2000)
Різні фракції	Сер-Фен	163,54	Nongonierma and FitzGerald (2013)
Різні фракції	Фен-Лей	13,81	Nongonierma and FitzGerald (2013)
Різні фракції	Гіс-Лей	>370	Nongonierma and FitzGerald (2013)
Різні фракції	Сер-Лей	24,92	

Примітка. \* CO EC<sub>50</sub> – половина максимальної ефективної концентрації супероксиду

У досліджах *in vitro* доведено, що ензимні гідролізати казеїну також можуть викликати підвищення активності каталази в клітинах лінії Jurkat (лімфоцити людини) [415]. *In vivo* в досліджах на щурах встановлено, що ферментовані молочні продукти з антиоксидантними властивостями сприяють відновленню м'язової тканини після важких фізичних навантажень. При цьому пептиди цих продуктів діють двома способами – безпосередньо знешкоджують активні форми кисню, а також можуть індукувати експресію антиоксидантних ензимів, зокрема супероксиддисмутази й ката-

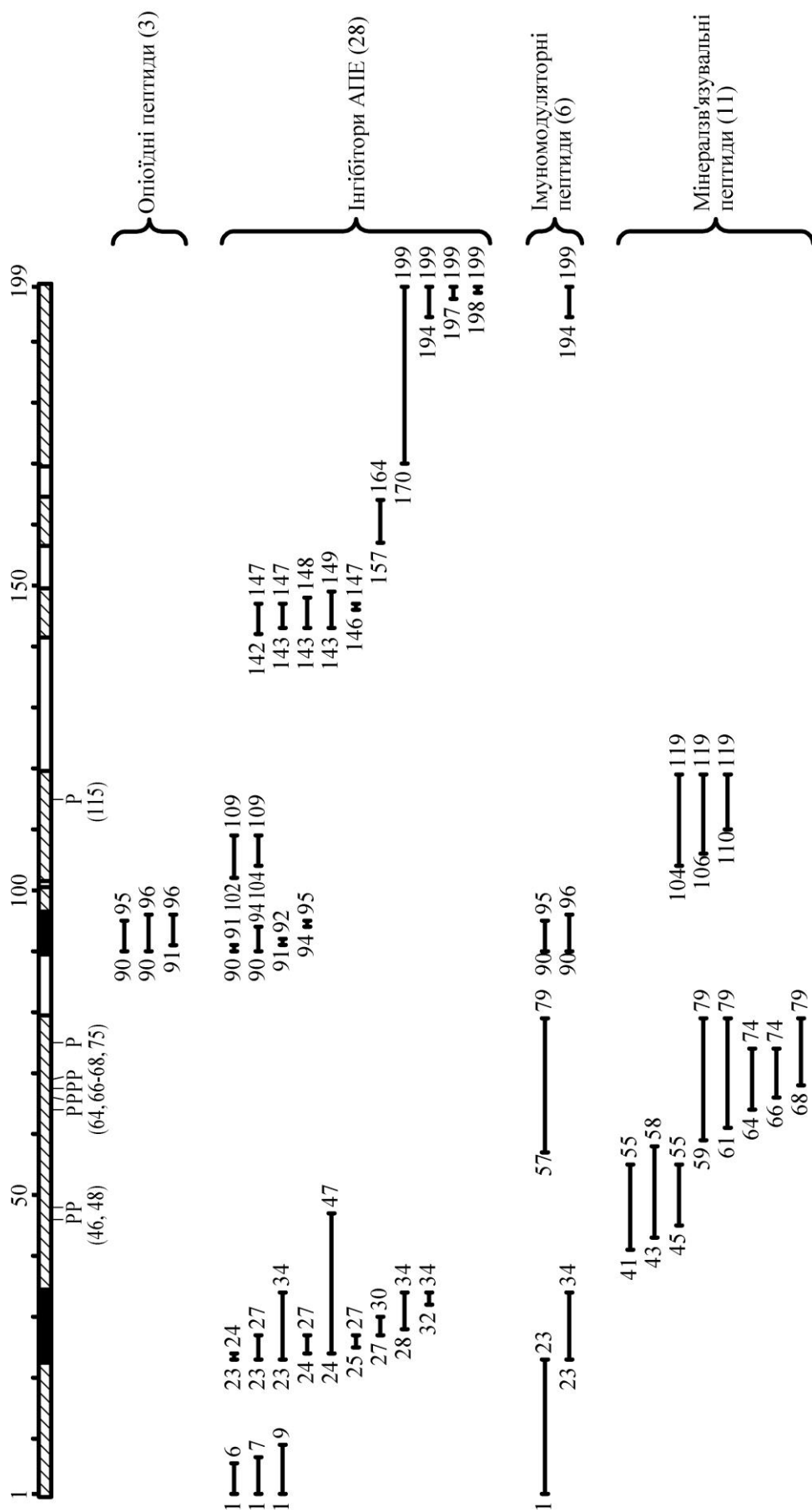
лази [66]. У подібних дослідях на спортсменах при споживанні молока, ферментованого *Lactobacillus helveticus*, спостерігали інтенсифікацію метаболізму глюкози і зменшення болю в м'язах після важких фізичних вправ. Це може бути пов'язано зі зменшенням впливу активних форм кисню на інсулін-залежний шлях постачання глюкози в м'язові клітини [242].

### 3.1.7 Особливості розміщення біоактивних пептидів серед протеїнів казеїнового комплексу

Враховуючи те, що казеїн є складним протеїном і включає чотири основні фракції, які відрізняються за первинною структурою, доцільно розглянути, як розподіляються біоактивні пептиди в кожній фракції, а також як розподіляються пептиди з різними видами активностей між фракціями. Для цього відомі біоактивні пептиди були згруповані за видами біологічної дії й позначені відрізками, які відповідають певним ділянкам первинної структури казеїнових фракцій (рис. 33, 34, 35, 36).

Усі казеїнові фракції суттєво відрізняються за кількістю амінокислотних залишків, які входять до складу БАП, а також характером розподілу цих амінокислотних залишків вздовж поліпептидного ланцюга кожної фракції. Так, у  $\alpha_{S1}$ -CN B-8P фракції із 199 амінокислотних залишків у складі БАП задіяно 154 або 77 % (рис. 33). За розміщенням можна виділити декілька ділянок первинної структури, які містять найбільше послідовностей БАП. Це фрагменти 23-34, 90-96. Такі ділянки окремі автори називають стратегічними зонами. Вони можуть проявляти стійкість до дії протеолітичних ензимів і часто характеризуються консервативною первинною структурою в різних видів ссавців [176].

Для фракції  $\alpha_{S2}$ -CN A-11P характерна менша кількість різних БАП, проте до їхнього складу входить 84,5 % (175 із 207) амінокислотних залишків (рис. 34). Також для цієї фракції характерний високий ступінь асиметричності розміщення БАП у первинній структурі. Переважна більшість БАП знаходиться у С-кінцевій ділянці молекули (залишки 164-207). Крім цього, важливими є ділянки, які містять фосфосеринові залишки і є джерелом біоактивних фосфопептидів.

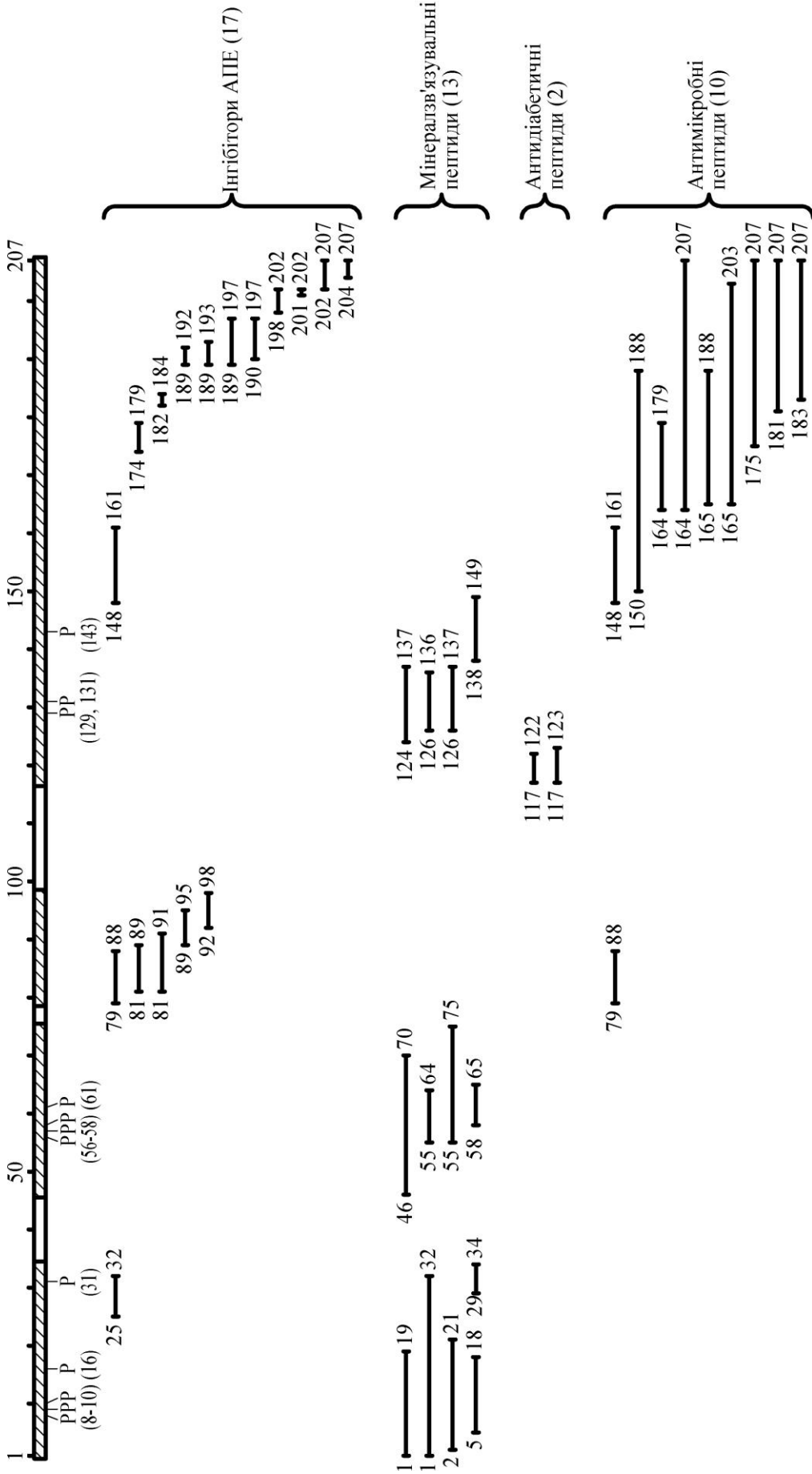


**Рис. 33. Біоактивні пептиди з  $\alpha_{S1}$ -CN В-8Р фракції казеїну молока корови**

Прозорими прямокутниками позначені ділянки первинної структури, які не входять до складу БАП. Темні прямокутники – ділянки первинної структури, які входять до складу багатьох БАП (стратегічні зони). Цифрами позначені порядкові номери амінокислотних залишків казеїнової фракції.

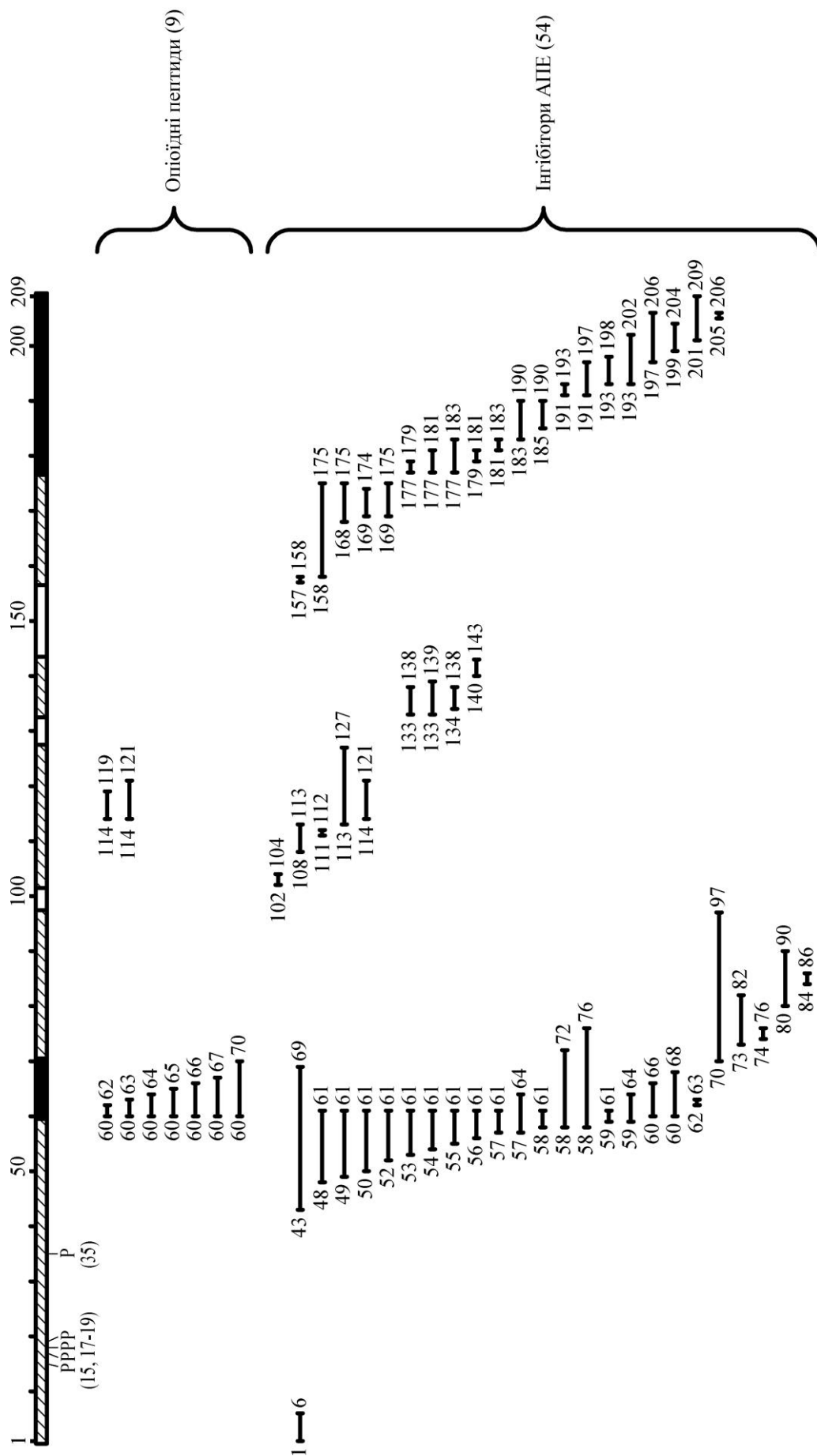
Фосфосеринові залишки позначені як **P** з порядковим номером в дужках





**Рис. 34. Біоактивні пептиди з  $\alpha_{S2}$ -CN A-11P фракції казеїну молока корови**

Прозорими прямокутниками позначені ділянки первинної структури, які не входять до складу БАП. Заштриховані ділянки входять до складу БАП. Цифрами позначені порядкові номери амінокислотних залишків казеїнової фракції. Дванадцять можливих фосфосеринових залишків позначені як P з порядковим номером в дужках



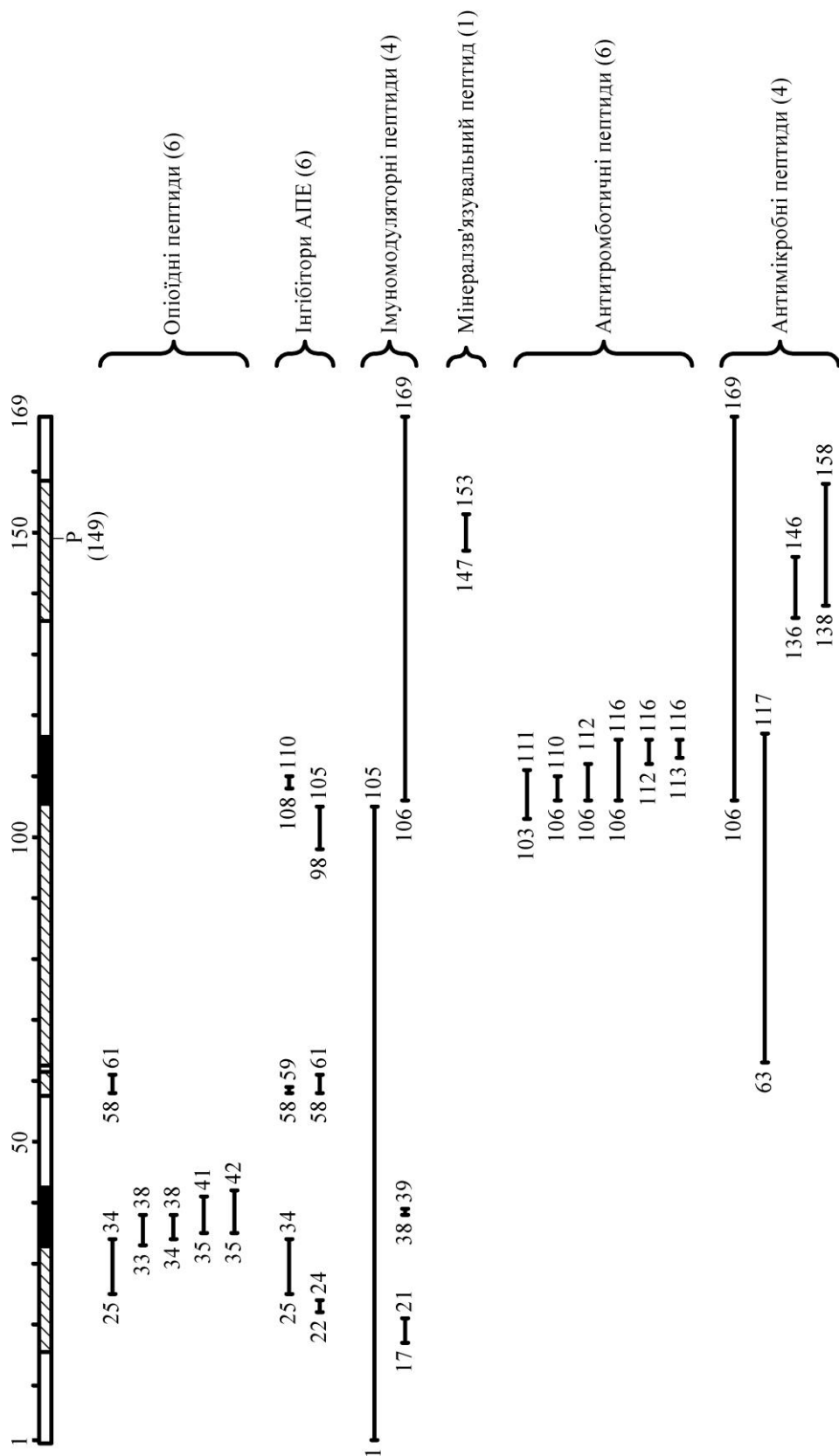
**Рис. 35. Біоактивні пептиди з  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>-5P фракції казеїну молока корови**

Прозорими прямокутниками позначені ділянки первинної структури, які не входять до складу БАП. Заштриховані ділянки входять до складу БАП. Темні прямокутники – ділянки первинної структури, які входять до складу багатьох БАП (стратегічні зони). Цифрами позначені порядкові номери амінокислотних залишків казеїнової фракції.

Фосфосеринові залишки позначені як **P** з порядковим номером в дужках







**Рис. 36. Біоактивні пептиди з к-CN A-1P фракції казеїну молока корови**

Прозорими прямокутниками позначені ділянки первинної структури, які не входять до складу БАП (не враховуючи пара-к-казеїн і ГМП). Заштриховані ділянки входять до складу БАП. Темні прямокутники – ділянки первинної структури, які входять до складу багатьох БАП (стратегічні зони). Цифрами позначені порядкові номери амінокислотних залишків казеїнової фракції. Фосфосериновий залишок позначений як **P** з порядковим номером в дужках

Найбільшу кількість БАП (89 % амінокислотних залишків) знайдено в складі казеїнової фракції  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>-5P (рис. 35). Тут можна виділити дві стратегічні зони: залишки 60-70, 177-209. Ділянка від 83-го до 167-го амінокислотного залишку включає лише поодинокі БАП. Проте дослідження продовжується і, можливо, будуть знайдені нові БАП.

Фракція  $\kappa$ -CN A-1P суттєво відрізняється від інших казеїнів за розміщенням БАП (рис. 36). У ній лише 62 амінокислотні залишки із 169 (37 %) входять до складу БАП (без врахування ГМП і пара- $\kappa$ -казеїну). Можна виділити дві основні зони (залишки 33-42 і 106-116), де розміщено більшість БАП. Мала кількість біоактивних пептидів у складі  $\kappa$ -казеїну, очевидно, може пояснюватися виконанням цією фракцією інших важливих функцій, пов'язаних зі стабілізацією та ензиматичною коагуляцією нативних казеїнових міцел молока [184]. Узагальнені дані щодо розподілу БАП серед казеїнових фракцій за біологічною дією показані в табл. 29.

**Таблиця 29. Розподіл біоактивних пептидів серед казеїнових фракцій за характером біологічної дії**

Вид біологічної дії	Казеїнові фракції			
	$\alpha_{S1}$ -CN B-8P	$\alpha_{S2}$ -CN A-11P	$\beta$ -CN A <sup>2</sup> -5P	$\kappa$ -CN A-1P
Агоністи опіоїдних рецепторів	3	–	8	–
Антагоністи опіоїдних рецепторів	–	–	1	6
Інгібітор АПЕ	28	17	54	6
Імуномодуляторна дія	6	1	9	4
Мінералзв'язувальна дія	11	13	12	1
Антитромботична дія	–	–	1	6
Антидіабетична дія	1	2	9	–
Антимікробна дія	4	10	4	4
Антиканцерогенна дія	2	–	2	–
Антиоксидантна дія	5	–	–	–
Регуляція виділення травних соків	–	–	–	2
Антиконвульсант	1	–	–	–

Видно, що фракції суттєво відрізняються за видами біологічної дії їхніх БАП. Немає ні одного виду біологічної дії, який би був рівномірно представлений у всіх фракціях. Казеїнові фракції характеризуються певною специфікою. Так інгібітори АПЕ й мінералзв'язувальні пептиди найчастіше утворюються з  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ - і  $\beta$ -казеїнів. Пептиди, які впливають на виділення травних соків, а також на процеси згортання крові, притаманні виключно  $\kappa$ -казеїну. Також із цієї фракції утворюються переважно антагоністи опіодних рецепторів. Водночас агоністи опіодних рецепторів утворюються лише з  $\alpha_{S1}$ - і  $\beta$ -казеїнів. Найбільш специфічним попередником пептидів є  $\alpha_{S2}$ -казеїн. З нього можуть утворюватися переважно бактерицидні, мінералзв'язувальні пептиди та інгібітори АПЕ. Звичайно, такий формальний підхід не може враховувати всіх особливостей складного процесу утворення БАП. Так, один із нечисленних інгібіторів АПЕ з  $\kappa$ -казеїну проявив дуже високу активність і став одним з основних функціональних інгредієнтів антигіпертензивного продукту «Calpis» (Японія). Як видно в таблиці 29, з  $\beta$ -казеїну утворюється більше фосфопептидів, ніж з  $\alpha_{S1}$ -казеїну, проте вони в основному утворюються з однієї ділянки первинної структури  $\beta$ -казеїну і, відповідно,  $\alpha_{S1}$ -казеїн є важливішим джерелом фосфопептидів.

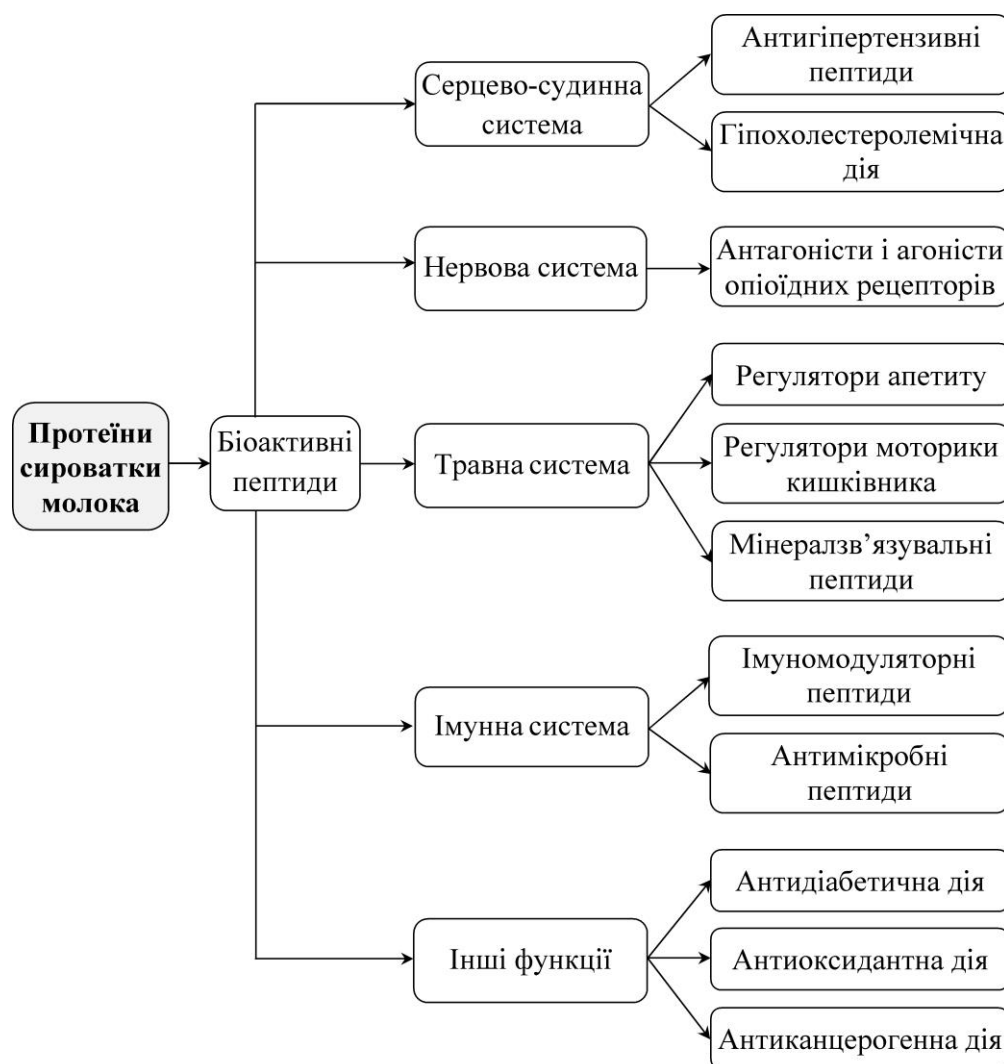
Окрім вказаних у табл. 29 знайдені казеїнові пептиди, які проявляють інші види біологічної дії. До них можна віднести нейропептиди ( $\alpha_{S1}$ - і  $\alpha_{S2}$ -CN), регулятори фосфоінозитольного механізму ( $\alpha_{S1}$ -CN), інгібітори хімозину ( $\alpha_{S1}$ - і  $\kappa$ -CN), кальмодулінзв'язувальні пептиди ( $\alpha_{S1}$ -CN), гемолітичні пептиди ( $\alpha_{S2}$ -CN), антиамнезійні пептиди ( $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ - і  $\beta$ -CN) та ін [151]. Механізм дії цих пептидів ще потребує детально вивчення.

### 3.2 Біоактивні пептиди з протеїнів сироватки молока

Протеїни сироватки молока є повноцінним джерелом амінокислот. Їхній амінокислотний скор близький до скору «ідеального» харчового протеїну. Проте, на відміну від протеїнів казеїнового комплексу, протеїни сироватки молока, окрім трофічної, виконують багато інших важливих біологічних функцій [25, 303]. Так  $\beta$ -лактоглобулін бере участь у транспортуванні жирних кислот і ретинолу, проявляє антиоксидантну дію. Інший важливий протеїн  $\alpha$ -лактальбумін бере участь у синтезі лактози в секреторних клітинах молочної залози, транспортуванні іонів кальцію, проявляє імуномодуляторну та антиканцерогенну дію. Імуноглобуліни сироватки молока беруть участь у формуванні імунного захисту новонародженого ссавця в період молочного живлення. Альбумін сироватки здійснює транспортну функцію. Лактоферин зв'язує іони феруму, а також йому притаманна антимікробна та антиоксидантна дія. Можливо, це й було причиною того, що відкриття біоактивних пептидів, які утворюються в процесі протеолізу протеїнів сироватки молока, відбулося пізніше, ніж у казеїнів [293, 366, 506].

З протеїнів сироватки молока до основних попередників біоактивних пептидів можна віднести  $\beta$ -лактоглобулін,  $\alpha$ -лактальбумін і лактоферин [258]. До потенційних попередників БАП також можна віднести імуноглобуліни. У порівнянні з казеїнами на сьогодні серед продуктів протеолізу протеїнів сироватки було відкрито менше пептидів, яким притаманна певна біологічна активність. Узагальнені дані про відомі біоактивні пептиди з протеїнів сироватки молока корів наведені в таблиці (Додаток Б). Більшість відкритих БАП впливають на серцево-судинну, нервову, травну та імунну системи організму. За видами біологічної дії серед біоактивних пептидів із протеїнів сироватки молока знайдено інгібітори ангіотензин-перетворювального ензиму, пептиди з опіюдною та бактерицидною діями, гіпохолесте-

ролемічні, імуномодуляторні, антиканцерогенні та антидіабетичні пептиди, а також пептиди, що впливають на моторику кишківника (рис. 37).



**Рис. 37. Розподіл біоактивних пептидів, які утворюються в результаті протеолізу протеїнів сироватки молока, за біологічною дією**

### 3.2.1 Лактокініни

Серед біологічно активних пептидів із протеїнів сироватки молока, як і у випадку казеїнів, найчастіше зустрічаються пептиди, здатні гальмувати дію ангіотензин-перетворювального ензиму (АПЕ). Такі пептиди, знайдені серед продуктів протеолізу білків сироватки молока, отримали назву лактокінінів [178]. Біологічна дія лактокінінів, а також загальні закономірності їх будови і взаємодії з АПЕ подібні до

антигіпертензивних пептидів із протеїнів казеїнового комплексу – казокінінів (підрозділ 3.1.2). Коротка характеристика відомих лактокінінів наведена в таблиці (Табл. 30). Можна зазначити, що загалом за результатами досліджень *in vitro* пептидам з протеїнів сироватки молока притаманна слабша інгібіторна дія на АПЕ, ніж пептидам, отриманим із казеїнів.

Для отримання інгібіторів АПЕ було проведено низку досліджень протеолізу протеїнів сироватки молока з використанням ензимів шлунково-кишкового тракту. Під час протеолізу відтворювали умови травлення в організмі (температура, рН, тривалість процесу, концентрація) [421, 538]. Зокрема фінські вчені [421] провели широкомасштабні дослідження продуктів протеолізу окремих фракцій протеїнів сироватки молока  $\alpha$ -лактальбуміну і  $\beta$ -лактоглобуліну ензимними препаратами пепсину, панкреатину, трипсину, хімотрипсину, еластази, карбоксипептидази, взятих окремо або в комбінаціях. Отримані препарати пептидів фракціонували за молекулярною масою шляхом ультрафільтрації на мембранах 30000 MWCO і 1000 MWCO. У результаті, окрім загальних препаратів, було отримано фракції пептидів з молекулярними масами до 30000 Да і фракції із молекулярними масами до 1000 Да. Усі препарати було протестовано на здатність гальмувати АПЕ. Встановлено, що загальні препарати продуктів протеолізу забезпечують гальмування АПЕ на 50 % при концентраціях 0,345-1,733 мг/мл; фракції пептидів до 30000 Да – у діапазоні концентрацій від 0,485 до 1,134 мг/мл, а низькомолекулярні фракції (до 1000 Да) – при концентраціях від 0,109 до 0,837 мг/мл. Індивідуальні пептиди з АПЕ-інгібіторною дією (іАПЕ) виділяли із загальних гідролізатів хроматографією з подальшим визначенням первинної структури. Таким чином, у гідролізатах з  $\alpha$ -лактальбуміну були ідентифіковані іАПЕ, які відповідають фрагментам  $\alpha$ -La – f 50-52, f 99-108, f 104-108, а з гідролізатів  $\beta$ -лактоглобуліну –  $\beta$ -Lg – f 22-25, f 32-40, f 81-83, f 94-100, f 106-111 і f 142-146 [421]. Необхідно зазначити, що індивідуальні пептиди показали значення  $IC_{50}$  від 77 до 1062  $\mu$ M. Більш активний іАПЕ з трипсинового гідролізату  $\beta$ -лактоглобуліну

**Таблиця 30. Пептиди – інгібітори агіотензин-перетворювального ензиму, отримані з протеїнів сироватки молока (адаптовано з McSweeney, 2016)**

Фракція протеїнів сироватки молока	Фрагмент первинної структури протеїну	Первинна структура пептиду	IC <sub>50</sub> (μM)
α-La	f 104-108	Три-Лей-Ала-Гіс-Ліз	77
	f 99-108	Вал-Глі-Іле-Асн-Тир-Три-Лей-Ала-Гіс-Ліз	327
	f 50-52	Тир-Глі-Лей	409
	f 105-110	Лей-Ала-Гіс-Ліз-Ала-Лей	621
	f 50-53	Тир-Глі-Лей-Фен	733,3
	f 50-51	Тир-Глі	1522,6
	f 52-53	Лей-Фен <sup>1</sup>	349
β-Lg	f 142-148	Ала-Лей-Про-Мет-Гіс-Іле-Арг	42,6
	f 102-103	Тир-Лей	122,1
	f 78-80	Іле-Про-Ала	141
	f 102-105	Тир-Лей-Лей-Фен	171,8
	f 142-146	Ала-Лей-Про-Мет-Гіс	521
	f 15-19	Вал-Ала-Глі-Тре-Три	534
	f 9-14	Глі-Лей-Асп-Іле-Глн-Ліз	580
	f 32-40	Лей-Асп-Ала-Глн-Сер-Ала-Про-Лей-Арг	635
	f 148-149	Арг-Лей	2438,9
	f 106-111	Цис-Мет-Глу-Асн-Сер-Ала	788
	f 146-148	Гіс-Іле-Арг	953
	f 94-100	Вал-Лей-Асп-Тре-Асп-Тир-Ліз	946
	f 81-83	Вал-Фен-Ліз	1049
	f 22-25	Лей-Ала-Мет-Ала	1062
	f 146-149	Гіс-Іле-Арг-Лей	1153,2
	f 147-148	Іле-Арг	695,5
	f 15-20	Вал-Ала-Глі-Тре-Три-Тир	1682
	f 10-14	Лей-Асп-Іле-Глн-Ліз	17 <sup>2</sup>
	f 1-5	Лей-Іле-Вал-Тре-Глн	17 <sup>2</sup>
	f 81-82	Вал-Фен	19 <sup>2</sup>
f 7-9	Мет-Ліз-Глі	24 <sup>2</sup>	

Примітки: 1. Така послідовність також знайдена у α<sub>S1</sub>-CN (f 149-150), BSA (f 69-70, f 505-506) і у β-Lg (f 104-105).

2. Значення IC<sub>50</sub> подано в мг/л.



вдалося виділити групі Фітцджеральда і Мейзеля –  $\beta$ -Lg (f 142-148) з  $IC_{50}$  – 42,6  $\mu$ M [25]. Найчастіше для отримання іАПЕ серед ензимів шлунково-кишкового тракту використовують трипсин, який забезпечує високий вихід пептидних іАПЕ з протеїнів сироватки молока. Найнижчу інгібіторну дію показали продукти протеолізу протеїнів сироватки еластазою [421, 538].

Окрім протеаз травного тракту ссавців для отримання іАПЕ використовували протеази мікробіологічного походження. Це дозволило виділити нові види інгібіторних пептидів. Так, за дії протеїнази К, було виділено інгібіторний пептид з  $\beta$ -лактоглобуліну (f 78-80) з низьким значенням  $IC_{50}$ , а також іАПЕ з альбуміну сироватки молока (f 221-222) [49]. Найактивніший іАПЕ був знайдений серед продуктів протеолізу  $\beta$ -Lg комплексним протеолітичним препаратом (Protease N Amano), виділеним з *Bacillus subtilis* [394]. Цей гептапептид відповідає послідовності  $\beta$ -Lg f 36-42 і характеризується дуже низьким значенням  $IC_{50}$  – 8  $\mu$ M. Є дані про утворення лактокінінів внаслідок дії ензимів молочнокислих бактерій [487].

Для проявлення антигіпертензивної дії пептидні іАПЕ повинні бути стійкими до протеаз травного тракту та циркуляторних протеаз, а також здатними проникати через клітини епітелію в кров'яне русло. Вивчення впливу пептидаз в'їчастого епітелію тонкого кишківника та здатності пептидів проникати через ці клітини проводять із використанням модельної системи з клітинами Caco-2 людини. Так, дослідження перспективного іАПЕ  $\beta$ -лактокініну на моношарі клітин Caco-2 показали, що цей пептид може транспортуватися через клітини епітелію, але при цьому значна кількість  $\beta$ -лактокініну розщеплюється амінопептидазами [537]. Щодо механізму транспорту лактокінінів, то пропонується проходження їх через міжклітинні з'єднання [469]. Відомо, що перенос ди- і трипептидів з допомогою переносника пептидів Per T1 проходить дуже ефективно, і навіть, більш ефективно, ніж перенос вільних амінокислот [401]. Проте при цьому пептиди, зокрема лактокініни, можуть швидко розщеплюватися [469].

Характеристики лактокінінів, отримані *in vitro*, не завжди однозначні. Так, за даними групи Фітцджеральда і Мейзеля [25],  $\beta$ -лактокінін є резистентним до дії хімотрипсину та пепсину. Інші автори в досліджах *in vitro* показали малу стійкість цього іАПЕ до дії гастроінтестинальних та циркуляторних протеаз [453, 544]. Важливим є факт, що фрагмент  $\beta$ -лактокініну  $\beta$ -лактозин В ( $\beta$ -Lg, f 142-145), який має значення  $IC_{50}$  – 928  $\mu$ M, проявляє набагато вищу антигіпертензивну дію у SHR, ніж  $\beta$ -лактокінін ( $\beta$ -Lg, f 142-148), зі значенням  $IC_{50}$  – 42,6  $\mu$ M [361]. Тому остаточну відповідь щодо ролі пептидних іАПЕ в регуляції тиску крові можуть дати лише дослідження *in vivo*. Такі роботи були проведені з використанням гідролізатів протеїнів сироватки молока та індивідуальних пептидів [179, 293, 366, 382, 506, 557]. Результати дії окремих лактокінінів на систолічний тиск у SHR-щурів показані в табл. 31.

**Таблиця 31. Антигіпертензивна дія пептидів із протеїнів сироватки молока в спонтанно-гіпертензивних щурів (адаптовано з McSweeney, 2016)**

Фракція протеїнів сироватки молока	Спосіб отримання	Фрагмент	Первинна структура	Доза, мг/кг	Зміна систолічного тиску, мм рт.ст
$\alpha$ -La	Пепсиновий, хімотрип-синовий і трипсиновий гідролізат	f 50-53	Тир-Глі-Лей-Фен	0,1	– 23,4
$\beta$ -Lg	Протеїназа К (гідролізат)	f 78-80	Іле-Про-Ала	8	– 31,0
$\beta$ -Lg	Термолізін (гідролізат)	f 103-105	Лей-Лей-Фен	10	– 31,0
$\beta$ -Lg	Термолізін (гідролізат)	f 58-61	Лей-Глн-Ліз-Три	10	– 18,1
Lf	Пепсин (гідролізат)	f 20-25	Арг-Арг-Три-Глн-Три-Арг	10	– 16,7
Lf	Пепсин (гідролізат)	f 22-23	Три-Глн	10	– 11,4

Фітцджеральд і співавтори узагальнили результати дослідів з впливу короткотермінового перорального введення SHR гідролізатів молочних білків та індивідуальних пептидних іАПЕ [179]. Основним висновком цих досліджень є відсутність кореляцій між інгібіторною дією на АПЕ *in vitro* та антигіпертензивним ефектом *in vivo*. Автори пояснюють це різною біодоступністю пептидних іАПЕ в організмі, а також наявністю інших механізмів регуляції артеріального тиску біоактивними пептидами з протеїнів сироватки молока. Це може бути інгібіторна дія на ендотелін-перетворювальний ензим або ренін, регуляція тиску через опіюїдні рецептори, блокування кальцієвих каналів та ін. [381]. Так, було встановлено, що  $\beta$ -лактокінін гальмує утворення ендотеліального пептиду ендотелін-1 (ЕТ-1), який викликає скорочення клітин гладкої мускулатури [295]. При підшкірному введенні  $\alpha$ -лакторфіну спостерігається зменшення артеріального тиску крові у SHR і WKY щурів. Оскільки антигіпертензивний ефект зникає при використанні антагоніста опіюїдних рецепторів налоксону, автори роблять висновок про участь у цьому опіюїдних рецепторів [382]. Пізніше було показано, що  $\alpha$ -лакторфін викликає релаксацію артерій брижі у SHR, яка гальмується інгібітором ендотеліальної ізоформи NO-синтази [494]. Таким чином, пропонується механізм NO-залежної вазодилатації через стимуляцію  $\alpha$ -лакторфіном периферійних опіюїдних рецепторів. Відомо, що, окрім АПЕ, в перетворенні ангіотензину I бере участь ще один ензим – ренін. Його гальмування теж могло би призводити до зниження кров'яного тиску. Проте, на сьогодні серед продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока, а також казеїнів інгібітори реніну не виявлені. Цікаві дані були отримані щодо  $\beta$ -лакторфіну, який здатний проявляти антигіпертензивну дію, взаємодіючи з рецепторами шлунково-кишкового тракту [494, 554]. При цьому відпадає необхідність проникнення пептиду в кров'яне русло. Активні лактокініни, окрім основних фракцій протеїнів сироватки

молока, також були виділені з пепсинового гідролізату лактоферину: Лей-Іле-Три-Ліз-Лей (Lf, f 266-270, IC<sub>50</sub> – 0,47 μM); Арг- Про-Тир-Лей (Lf, f 133-136, IC<sub>50</sub> – 56,5 μM) і Лей-Асн-Асн-Сер-Арг-Ала-Про (Lf, f 232-238, IC<sub>50</sub> – 105,3 μM). У дослідях на SHR-щурах ці пептиди підтвердили свою антигіпертензивну дію і знижували систолічний тиск на 25,3, 18,9 і 15,3 мм рт.ст. відповідно. Крім цього, два з них (Лей-Іле-Тир-Ліз-Лей і Арг-Про-Тир-Лей) спричиняли звуження артерій кролика в дослідях *ex vivo* [455]. Також є дані, що низькомолекулярні пепсинові пептиди з лактоферину (<3000 Да) гальмують звуження судин, спричинене ендотелін-перетворювальним ензимом [171].

На основі гідролізованого ізоляту з протеїнів сироватки молока компанія «Davisco» (США) виробляє комерційний продукт «Bio Zate» [366]. Основними біоактивними сполуками цього продукту є антигіпертензивні пептиди з β-лактоглобуліну. Дослідження, проведені на тридцяти добровольцях із гіпертензією протягом шести тижнів, показали достовірне зменшення артеріального тиску на 8 мм рт.ст. у порівнянні з контрольною групою, яка отримувала негідролізований ізолят соєвих протеїнів [423]. В іншому дослідженні впливу регулярного вживання ферментованого лактобактеріями молока на тиск крові добровольців встановлено зменшення систолічного тиску на 2,45 мм рт.ст. [531]. При цьому діастолічний тиск залишався без змін. У цьому випадку можлива спільна дія антигіпертензивних пептидів із протеїнів сироватки й казеїнового комплексу молока, які утворюються внаслідок дії протеолітичних систем лактобактерій.

### 3.2.2 Бактерицидні, фунгіцидні та антивірусні пептиди

За кількістю відкритих біоактивних пептидів із протеїнів сироватки молока на другому місці є антимікробні пептиди. Джерелом цих пептидів є насамперед лактоферин, а також α-лактальбумін і β-лактоглобулін [199, 211, 397, 410]. Ще в 1892 році Ерліх вказував на

наявність у молоці захисних речовин. Пізніше було встановлено, що до них належать протеїни: імуноглобуліни, лізоцим і лактоферин [410]. У 1930 році Джонс і Сімс [247] виділили з підсирної сироватки коров'ячого молока лактенін, який був стійкий до дій трипсину й гальмував розвиток стрептококів. Будова та походження цього пептиду залишаються невідомими.

Інтактні попередники антимікробних пептидів із сироватки молока проявляють значно слабшу активність, ніж продукти їх протеолізу. Так, найбільш активний із них – лактоферин може безпосередньо взаємодіяти з клітинною мембраною бактерій, змінюючи її проникність. Бактеріостатична дія інтактного лактоферину полягає у зв'язуванні іонів феруму в середовищі [357]. Антимікробні властивості  $\alpha$ -лактальбуміну і  $\beta$ -лактоглобуліну слабо виражені та проявляються в їхній здатності протидіяти адгезії патогенних бактерій (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*) клітинами кишечника [409].

Антимікробна дія пептидів, отриманих у результаті протеолізу Lf,  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg, стосується багатьох Грам-негативних і Грам-позитивних бактерій, дріжджів, мікроскопічних грибів, а також вірусів [118, 126, 493]. Коротка характеристика окремих антимікробних пептидів із протеїнів сироватки молока наведена в табл. 32.

Одним з найбільш важливих антимікробних пептидів є фрагмент лактоферину (f 17-41/42), який отримав назву лактоферицин [84]. Лактоферицин утворюється внаслідок дії пепсину на лактоферин у кислому середовищі [392]. Цей пептид є стійким до високих температур і проявляє антимікробну дію в широкому діапазоні значень рН середовища [506]. Показано, що при порівняно низьких концентраціях лактоферицин пригнічує розвиток багатьох видів Грам-негативних (*E. coli*, *Salmonella spp.*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*), Грам-позитивних (*Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *E. faecalis*, *Streptococcus spp.*) бактерій, дріжджів, грибів (*Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*), а також йому

притаманна антивірусна дія (вірус гепатиту С, вірус герпесу, аденовірус) [293]. При цьому важливо відзначити, що штами молочнокислих бактерій, зокрема видів *Lc. lactis* та *Lb. casei* є стійкими до дії лактоферицину [257].

**Таблиця 32. Антимікробні пептиди з протеїнів сироватки молока (адаптовано з McSweeney, 2016)**

Протеїн-попередник	Ензими	Біоактивний пептид	Антимікробна дія
$\beta$ -лактоглобулін і $\alpha$ -лактальбумін	Протеїнази ШКТ	Суміш пептидів	Гальмування розвитку мікроорганізмів
$\beta$ -лактоглобулін	Трипсин	$\beta$ -Lg (f 15-20), $\beta$ -Lg (f 25-40), $\beta$ -Lg (f 78-83), $\beta$ -Lg (f 92-100)	Гальмування розвитку Грам-позитивних бактерій
$\alpha$ -лактальбумін	Трипсин	$\alpha$ -La (f 1-5), $\alpha$ -La (f 17-31)	Гальмування розвитку Грам-позитивних бактерій
$\alpha$ -лактальбумін	Хімо-трипсин	$\alpha$ -La (f 61-68) і $\alpha$ -La (f 75-80) фрагменти поєднані дисульфідним зв'язком	Гальмування розвитку Грам-позитивних бактерій
Лактоферин	Пепсин, хімозин	Lf (f 17-41), Lf (f 20-25)	Гальмування розвитку Грам-позитивних і Грам-негативних бактерій, мікроскопічних грибів, дріжджів, вірусів
Лактоферин	Трипсин	Lf (f 1-280), Lf (f 345-689), Lf (f 222-230), Lf (f 264-269)	Гальмування розвитку мікроорганізмів

Залежно від виду мікроорганізму автори пропонують різні механізми бактерицидної і фунгіцидної дії лактоферицину: зв'язування з поверхнею бактеріальної клітини (*B. subtilis*, *E. coli*) і руйнування клітинної мембрани бактерій; зміна ультраструктури мікроскопічних грибів (*Aspergillus spp.*); взаємодія з фосфоліпідами бактеріальних мембран; формування додаткових іонних каналів у мембранах; звільнення ліпополісахаридів з клітинної стінки Грам-негативних бактерій [293]. Вивчення залежності активності фрагментів лактоферицину показало, що бактерицидні, фунгіцидні й антивірусні властивості пов'язані зі співвідношенням залишків триптофану й аргініну [210].

Інший важливий антимікробний пептид лактоферампін (f 265-284) був ідентифікований у складі N1 домену лактоферину [533]. Подібно до лактоферицину йому притаманний широкий спектр бактерицидної і фунгіцидної дії. Відщеплення трьох N-кінцевих амінокислотних залишків призводить до підвищення його антимікробної дії. Окрім лактоферицину і лактоферампіну в продуктах протеолізу лактоферину знайдені інші пептиди, які проявляли свою активність проти багатьох патогенних мікроорганізмів і вірусів. Їхні послідовності розташовані у N-кінцевій ділянці лактоферину (f 1-48).

Враховуючи те, що первинна структура  $\alpha$ -лактальбуміну майже на 40% гомологічна до первинної структури лізоциму, що ці протеїни еволюціонували від спільного протеїна-предка, мають ідентичну екзон-інтронну будову, то багато дослідників сподівалися виявити сильну антимікробну дію  $\alpha$ -лактальбуміну або продуктів його протеолізу [410]. Проте, антимікробна дія інтактного  $\alpha$ -лактальбуміну, а також продуктів його протеолізу пепсином не виявлена. Два бактерицидні пептиди (LDT1, LDT2) було ідентифіковано внаслідок дії на  $\alpha$ -лактальбумін трипсину й один за дії хімотрипсину (LDC) [408]. Пептиди LDT2 і LDC складаються з двох фрагментів, з'єднаних між собою дисульфідними зв'язками. Роз'єднані фрагменти LDT2 і LDC не проявляють бактерицидної дії. Усі три пептиди є аніонними (pI – 4,5-6,1) і

пригнічують розвиток Грам-позитивних бактерій. Найактивнішим є пептид LDT2, а найслабшим – LDT1. Необхідно також відзначити, що, всупереч сподіванням, бактерицидні пептиди були отримані з ділянок  $\alpha$ -лактальбуміну, які не є гомологічними до лізоциму [410].

Чотири бактерицидні пептиди було відкрито й охарактеризовано серед продуктів протеолізу  $\beta$ -лактоглобуліну трипсином (LGDT1, LGDT2, LGDT3, LGDT4). Тестування показали, що всі ці пептиди пригнічують розвиток лише Грам-позитивних бактерій [408]. Заміна в синтетичному пептиді LGDT3 аспарагінової кислоти (f 98) на аргінін та приєднання до С-термінального амінокислотного залишку лізину призводить до утворення катіонного пептиду Вал-Лей-Вал-Лей-Асп-Тре-Арг-Тир-Ліз-Ліз з позитивним зарядом. Цей синтетичний пептид почав проявляти бактерицидну дію щодо Грам-негативних бактерій і в меншій мірі гальмувати розвиток Грам-позитивних бактерій. Цим же автором було встановлено, що гомологічна послідовність до пептиду LGDT3 є в складі протеїну, пов'язаного з кольоровим зором людини – опсину (f 55-64) [408]. Синтетичний пептид гомолог опсину (f 55-64) пригнічував ріст Грам-негативних і Грам-позитивних бактерій, а також йому була притаманна фунгіцидна дія.

Враховуючи все сказане, позитивна роль антимікробних пептидів із протеїнів сироватки молока в складі молочних продуктів не викликає сумнівів. У подальшому ці пептиди можуть бути використані, як консерванти в харчових продуктах або як інгредієнти з антибіотичними властивостями [55, 548].

### 3.2.3 Імуномодуляторні пептиди

Імуномодуляторні пептиди можуть посилювати функціонування імунних клітин, що проявляється в активації і проліферації лімфоцитів, синтезі антитіл, активності природних клітин кілерів, регуляції утворення цитокінів. Також вони можуть знижувати алергічну реакцію й підвищувати імунітет слизової шлунково-кишкового тракту [191, 259].



Значна кількість наукових робіт присвячена впливу протеїнів сироватки молока на проліферацію лімфоцитів. Що стосується продуктів протеолізу білків сироватки, то переважно дослідження були проведені на сумішах пептидів і лише в окремих випадках вивчалась імуномодуляторна дія індивідуальних пептидів [259, 293, 349, 506, 508]. Так, було показано, що мітогенна активність  $\beta$ -лактоглобуліну по відношенню до клітин селезінки миші зростає після тригодинного протеолізу пепсином, трипсином, хімотрипсином або панкреатином, що підтверджує значення пептидів у цьому процесі [296]. Цими ж авторами було показано суттєве збільшення росту  $\beta$ -лімфоцитів людини лінії U266 внаслідок дії панкреатинового гідролізату  $\beta$ -лактоглобуліну. Міяучі зі співавторами [347] встановили активізацію проліферації  $\beta$ -лімфоцитів, а також клітин перових бляшок пепсиновим гідролізатом лактоферину. Пепсиновий гідролізат лактоферину гальмував бластогенез, спричинений мітогенами. Це свідчить про те, що пепсиновий гідролізат лактоферину містить як імуностимулюючі, так і імуноінгібіторні пептиди [191]. Кайзер і Мейзель синтезували два пептиди Тир-Глі і Тир-Глі-Глі, які ідентичні фрагментам  $\alpha$ -лактальбуміну f 18-19, f 50-51 і f 18-20. Ці пептиди проявляли виражену стимулюючу дію щодо проліферації периферійних лімфоцитів крові людини [250].

Пепсиновий гідролізат лактоферину здатний впливати на синтез антитіл, зокрема встановлено підвищення продукції імуноглобулінів (Ig M, Ig G і Ig A) у культурі клітин селезінки миші, а також утворення Ig A у клітинах перових бляшок [347]. Стимулюючу дію на синтез антитіл клітинами селезінки підтверджено *in vivo* при згодовуванні мишам панкреатинового гідролізату концентрату протеїнів сироватки молока. Пепсинові гідролізати лактоферину також досліджували на здатність впливати на синтез антитіл у мишей, імунізованих токсином холери [347]. Показано, що в порівнянні з контрольною групою тварин рівень специфічних антитіл Ig A був значно вищим.

Щодо модуляції неспецифічної імунної відповіді показано, що синтетичний пептид, який є фрагментом  $\alpha$ -лактальбуміну (f 51-53), здатний підвищувати фагоцитоз еритроцитів вівці перитонеальними макрофагами миші, а також захищає організм миші від летальної інфекції *Klebsiella pneumoniae*. Цей же пептид стимулює в дозозалежний спосіб приєднання і фагоцитоз старих еритроцитів клітинами моноцитарних макрофагів людини [191].

У досліджах із мишами лінії BALB/c було вивчено вплив гідролізатів  $\beta$ -Lg на індукцію оральної толерантності [51, 52]. Оральна толерантність визначається як стан імунологічної ареактивності до антигену, який раніше потрапляв в організм. Процес формування оральної толерантності виникає після першого контакту з лімфоїдною тканиною кишечника. У результаті було встановлено, що здатність  $\beta$ -Lg викликати оральну толерантність знижується при його розщепленні трипсином. Індукція оральної толерантності пов'язана з генерацією T-регуляторних клітин, які відповідають за гальмування розвитку алергічних реакцій.

У літературі описані дослідження впливу суміші, а також індивідуальних протеїнів сироватки молока на модуляцію експресії цитокінів, на активність гранулоцитів і природних клітин кілерів [191, 506]. Щодо впливу окремих пептидів, то такі дані відсутні за винятком інгібіторної дії лактоферицину на експресію цитокінів моноцитарними клітинами людини [194, 292]. У досліджах із залученням більше 3000 здорових добровольців було продемонстровано зв'язок між довготривалим (18 місяців) споживанням молочних продуктів і суттєвим зменшенням слабовиражених запальних процесів [400]. Більшість авторів не заперечують важливості імуномодуляторної дії продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока, проте для їх практичного застосування в складі функціональних продуктів необхідні подальші дослідження. В першу чергу це стосується механізму дії на рівні окремих пептидів, а також його підтвердження в досліджах *in vivo*. На

сьогодні не створені комерційні функціональні продукти або інгредієнти на базі імуномодуляторних пептидів із протеїнів сироватки молока.

### 3.2.4 Пептиди з опіюючою дією

Екзорфіни отримані із протеїнів сироватки молока належать до нетипових опіюючих пептидів і отримали назву лакторфінів [259]. Типові опіюючі пептиди, які утворюються з проенкефаліну, продинорфіну мають сталу N-термінальну послідовність Тир-Глі-Глі-Фен. N-термінальна ділянка відомих лакторфінів відрізняється від послідовності типових опіюючих пептидів. Ця послідовність амінокислотних залишків (N-термінальний Тир і Фен у третьому або четвертому положенні) відіграє важливу роль у зв'язуванні лакторфінів опіюючими рецепторами клітин кишкового епітелію. Приклади опіюючих пептидів із протеїнів сироватки молока наведено в табл. 33.

**Таблиця 33. Приклади опіюючих пептидів із протеїнів сироватки молока (адаптовано з Nongonierma et al., 2016)**

Опіюючий пептид	Фрагмент протеїну	Первинна структура пептиду	IC <sub>50</sub> * (μM)	Спосіб отримання
α-лакторфін	α-La (f 50-53)	Тир-Глі-Лей-Фен	67	Гідроліз пепсином, синтез
β-лакторфін	β-Lg (f 102-105)	Тир-Лей-Лей-Фен	38	Гідроліз трипсином, синтез
β-лактотензин	β-Lg (f 146-149)	Гіс-Іле-Арг-Лей	–	Гідроліз хімотрипсином
Серорфін	BSA (f 399-404)	Глу-Тир-Глі-Фен-Глн-Асн	85	Гідроліз пепсином

Примітка. \* Концентрація пептиду, яка гальмує зв'язування ліганду на 50 %.

Серед продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока було відкрито три лакторфіни [422]. Це  $\alpha$ -лакторфін з  $\alpha$ -лактальбуміну (f 50-53),  $\beta$ -лакторфін з  $\beta$ -лактоглобуліну (f 102-105) і серорфін з альбуміну сироватки (f 399-404). Усі ці пептиди відносяться до агоністів опіоїдних рецепторів  $\mu$ -типу і їхня біологічна дія подібна до дії ендогенних лігандів. Дані щодо біологічної активності лакторфінів неповні й несистематизовані. Відомо, що опіоїдні ліганди впливають на емоційний стан, діють як анальгетики, продовжують термін травлення завдяки гальмуванню перистальтики й рухливості кишківника, проявляють антисекреторну дію, впливаючи на інтестинальний транспорт електролітів [210]. Цікаві результати були отримані на щурах [509]. Встановлено, що попередня ін'єкція лакторфіну 5-18-денним щурам суттєво зменшувала їхню стривоженість при забиранні від матері. Цей ефект був досягнутий за допомогою опіоїд-опосередкованого механізму. Для практичного використання лакторфінів у функціональному харчуванні людини також необхідні подальші дослідження.

### **3.2.5 Інші види біологічної дії пептидів із протеїнів сироватки молока**

Окрім розглянутих видів біологічної дії виявлено інші види впливу продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока на функції організму. Перспективні результати отримані при вивченні впливу пептидів із протеїнів сироватки молока на засвоєння мінеральних речовин, обмін вуглеводів і ліпідів, регуляцію апетиту, окислювально-відновні процеси, проліферацію і розвиток клітин та інші [63, 74, 289, 306, 314, 366, 587]. Так, використовуючи клітини лінії СНО-СаТ1, японські вчені [484] показали дозозалежний ефект пептидів на засвоєння іонів кальцію. Було встановлено, що за біологічну дію відповідає пептид Іле-Про-Ала. Синтетичний пептид такої структури ( $\beta$ -Lg, f 78-80) знижував рівень засвоєння іонів кальцію у тварин. З  $\alpha$ -La

також були виділені пептиди, які зв'язують іони металів [399, 454]. Зокрема, пептид ( $\alpha$ -La, f 47-51) здатний зв'язувати іони кальцію.

Серед продуктів протеолізу  $\beta$ -лактоглобуліну трипсином відкриті пептиди з гіпохолестеролемічною дією [364]. Ідентифіковані чотири пептиди (f 9-14, f 41-60, f 71-75, f 142-146), які є супресорами абсорбції холестерину в клітинах Caco-2. Дія одного з цих пептидів – Іле-Іле-Ала-Глу-Ліз (f 71-75) була підтверджена на щурах. Показано достовірне зниження рівню холестеролу в сироватці крові тварин.

Пептиди гідролізату сироваткових протеїнів можуть впливати на гени клітин ендотелію судин людини, які пов'язані з активністю каталази і глутатіону, і які мають безпосереднє відношення до антиоксидантних процесів організму [387]. Також пептиди з лактоферину здатні *in vitro* гальмувати активність ензиму, який каталізує утворення активних форм кисню – ксантиноксидази [371]. Важливу роль у структурі цих пептидів відіграє залишок триптофану, який забезпечує подібність їхньої структури до ксантину або до відомого інгібітора ксантиноксидази – алопуринолу. В гідролізатах сироваткових протеїнів знайдені пептиди, які здатні знешкоджувати активні форми кисню. Особливості їхньої будови й механізм дії подібні до антиоксидантних пептидів із казеїнів (п. 3.1.6). Приклади таких пептидів наведені в табл. 34.

**Таблиця 34. Антиоксидантні пептиди з протеїнів сироватки молока (адаптовано з Nongonierma et al., 2016)**

Фрагмент протеїну сироватки	Первинна структура пептиду	CO EC <sub>50</sub> * ( $\mu$ M)	Літературне джерело
$\alpha$ -La (f 26-27)	Три-Вал	131,02	[372]
Lf (f 346-347)	Вал-Три	114,52	[372]
Lf (f 548-549)	Вал-Три	114,52	[372]

Примітка. \* CO EC<sub>50</sub> – половина максимально ефективною концентрації супероксиду.

Для окремих пептидів із протеїнів сироватки молока притаманна антиканцерогенна дія. Насамперед це стосується пептидів із лактоферину. Так лактоферицин (Lf, f 4-41), а також його фрагмент (Lf, f 4-14) показали цитотоксичний ефект по відношенню до декількох ліній ракових клітин людини *in vitro* [185, 232]. Цікаві результати були отримані з чоловіками-добровольцями старшого віку, які мали аденоматозні колоректальні поліпи. Споживання ними трьох грамів лактоферину щоденно протягом 12-ти місяців призвело до суттєвого зниження інтенсивності росту поліпів [263]. Очевидно, що в даному випадку біологічну дію спричиняли продукти розщеплення лактоферину травними протеазами ШКТ. Короткий фрагмент лактоферину, що включає залишок  $\beta$ -дифенілаланіну, здатний викликати регресію лімфоми при безпосередній ін'єкції його в пухлину [88]. Другим важливим наслідком таких ін'єкцій є індукція клітинного імунітету проти певних видів лімфом.

Подібно до казеїнових пептидів (підрозділ 3.1.6) пептиди з протеїнів сироватки молока можуть проявляти антидіабетичну дію по відношенню до діабету другого типу. В першу чергу це стосується впливу інсулінотропних амінокислот і дипептидів. Причому гідролізати протеїнів сироватки містять їх більше і є ефективнішими, ніж гідролізати казеїнів [190, 210, 522]. Також серед продуктів гідролізу протеїнів сироватки молока знайдені інгібітори дипептидил пептидази IV, яка регулює (знижує) активність інсулінотропних поліпептидів GIP і GLP-I [267]. Приклади таких пептидів наведені в табл. 35.

**Таблиця 35. Пептиди з  $\alpha$ -La і  $\beta$ -Lg – інгібітори дипептидил пептидази IV [492, 528]**

Фрагмент фракції протеїнів сироватки	Первинна структура пептиду	IC <sub>50</sub> * (μM)
$\beta$ -Lg (f 15-20)	Вал-Ала-Глі-Тре-Три-Тир	174
$\beta$ -Lg (f 78-82)	Іле-Про-Ала-Вал-Фен	44,7
$\beta$ -Lg (f 78-83)	Іле-Про-Ала-Вал-Фен-Ліз	143,0
$\beta$ -Lg (f 92-100)	Вал-Лей-Вал-Лей-Асп-Тре-Асп-Тир-Ліз	424,4
$\beta$ -Lg (f 125-135)	Тре-Про-Глу-Вал-Асп-Асп-Глу-Ала-Лей-Глу-Ліз	319,5
$\alpha$ -La (f 26-27)	Три-Вал	65,69

Примітка. \* Концентрація (μM), яка забезпечує половину максимальної інгібіторної дії.

Особливо важливими є результати дослідження впливу інтактних протеїнів сироватки молока і їхніх гідролізатів на секрецію інсуліну в здорових і хворих на діабет добровольців [57, 289, 427]. Основними висновками є те, що інсулінотропні амінокислоти й пептиди з протеїнів сироватки, особливо в комбінації з вуглеводами, підвищують секрецію інсуліну, а гідролізати характеризуються більшою інсулінотропною дією, ніж інтактні протеїни сироватки молока.

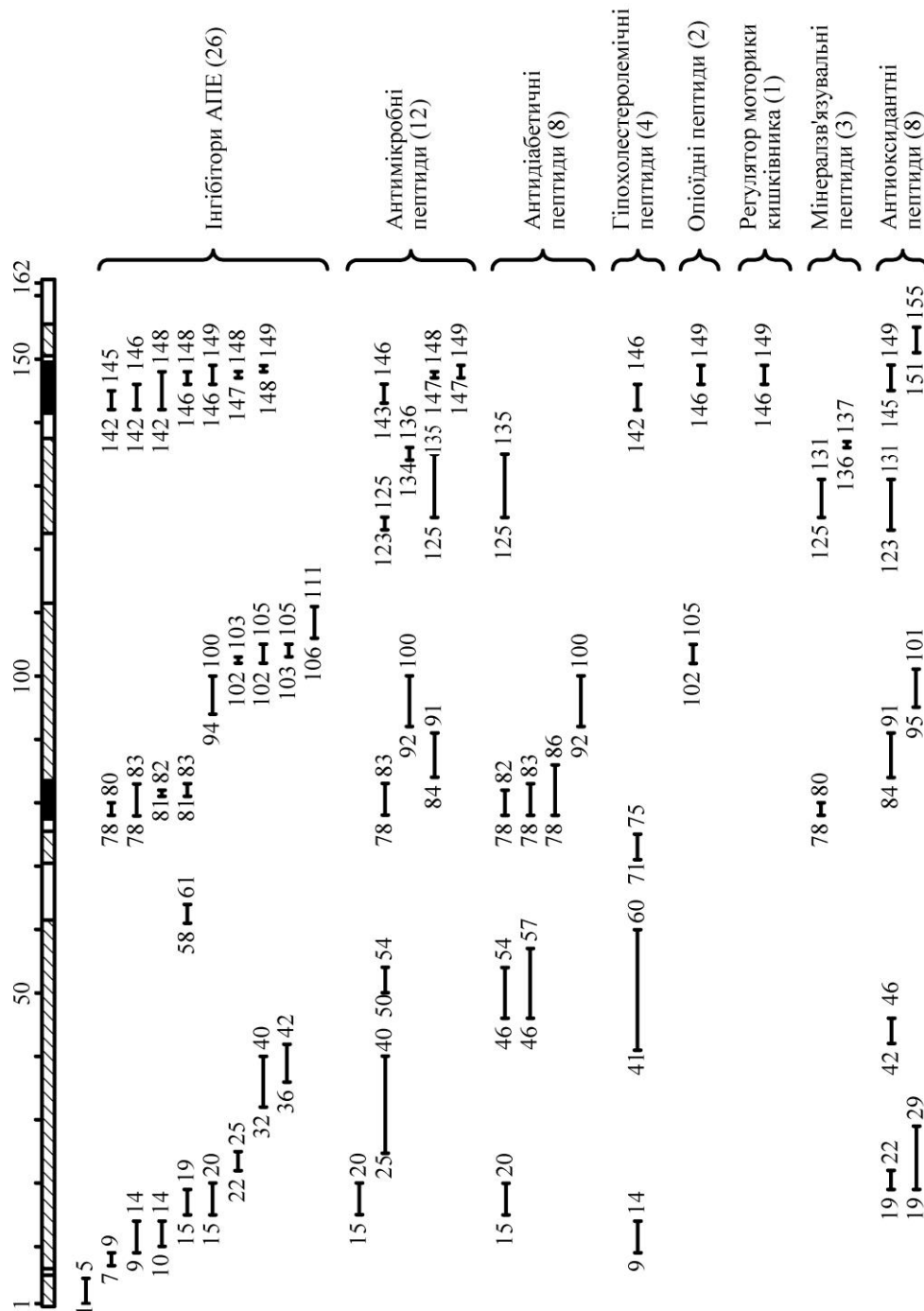
Окремі пептиди, виділені з продуктів протеолізу протеїнів сироватки молока, проявляють два або декілька видів біологічної дії. Так, наприклад, альбутензин і  $\beta$ -лактотензин є одночасно інгібіторами АПЕ і стимуляторами скорочення гладких м'язів кишечника [366]. Мультифункціональні властивості притаманні

$\beta$ -лакторфіну, який проявляє опіоїдну дію і є сильним інгібітором АПЕ [487]. Лактоферицин, окрім бактерицидної та імуномодуляторної дії, здатний впливати на розвиток ракових клітин [191]. Показано, що цей пептид у першу чергу індукує апоптоз у ракових клітинах людини (ТНР-1), а також гальмує розвиток метастазів із клітин меланоми й лімфоми мишей. Наведені приклади свідчать про те, що поняття «мультифункціональність» характерне не тільки для багатьох протеїнів, а також для природних біоактивних пептидів.

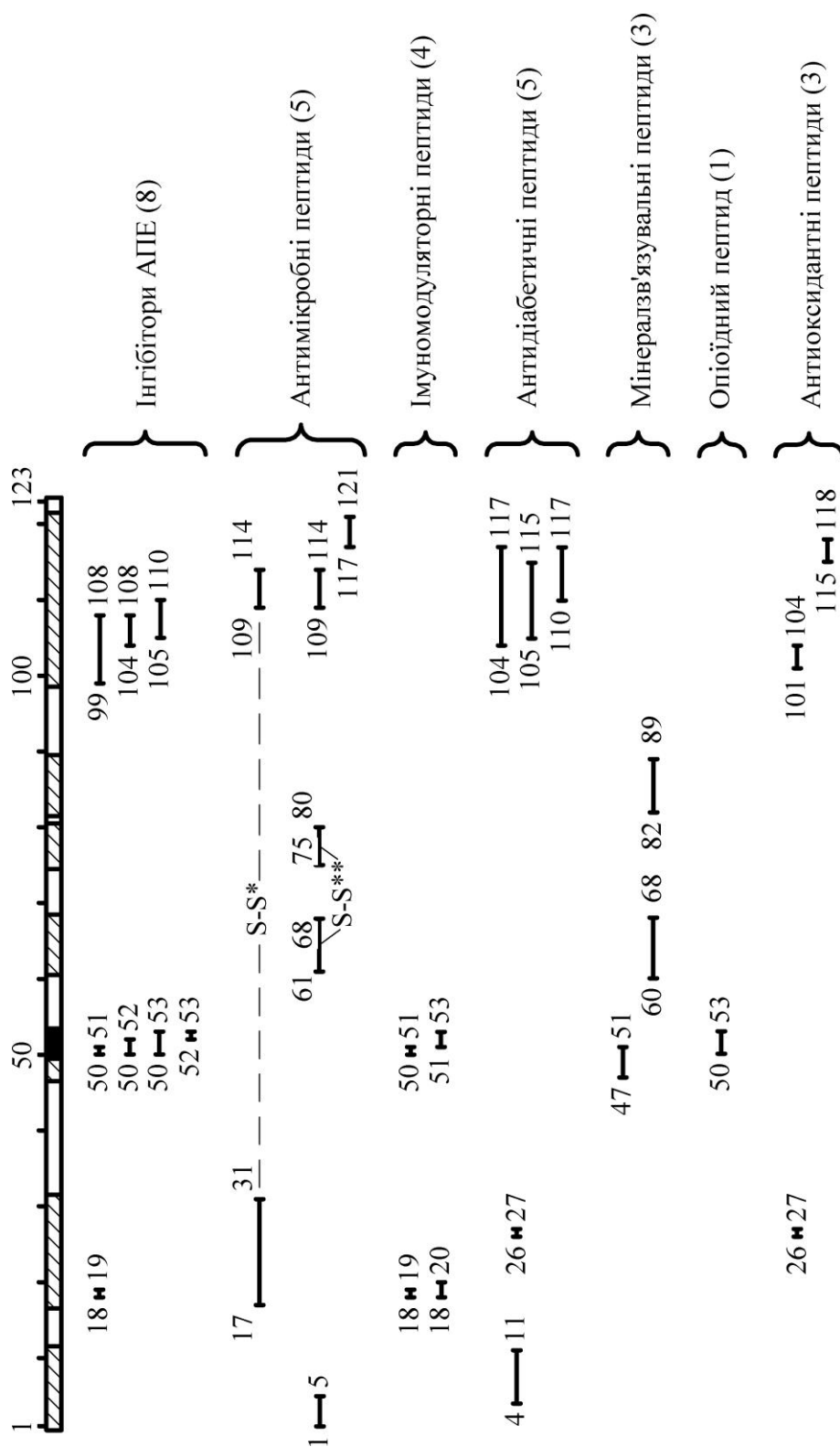
### **3.2.6 Розміщення амінокислотних послідовностей біоактивних пептидів серед фракцій протеїнів сироватки молока**

Для розробки стратегії отримання і використання біоактивних пептидів із протеїнів сироватки молока важливо враховувати їхній розподіл за біологічною дією та розміщення в первинній структурі протеїнових фракцій. Описані в попередніх розділах БАП були згруповані за видами біологічної дії й позначені відрізками, які відповідають певним ділянкам первинної структури відповідних протеїнів-попередників із сироватки молока (рис. 38, 39, 40). З представлених рисунків видно, що в порівнянні з казеїнами значно менша частка амінокислотних залишків входить до складу БАП, а також утворюється менша кількість БАП.





**Рис. 38. Біоактивні пептиди з  $\beta$ -лактоглобуліну (генетичний варіант В) молока корови.** Прозорими прямокутниками позначені ділянки первинної структури, які не входять до складу БАП. Заштриховані ділянки входять до складу БАП. Темні прямокутники – ділянки первинної структури, які входять до складу багатьох БАП (стратегічні зони). Цифрами позначені порядкові номери амінокислотних залишків у протеїновій фракції

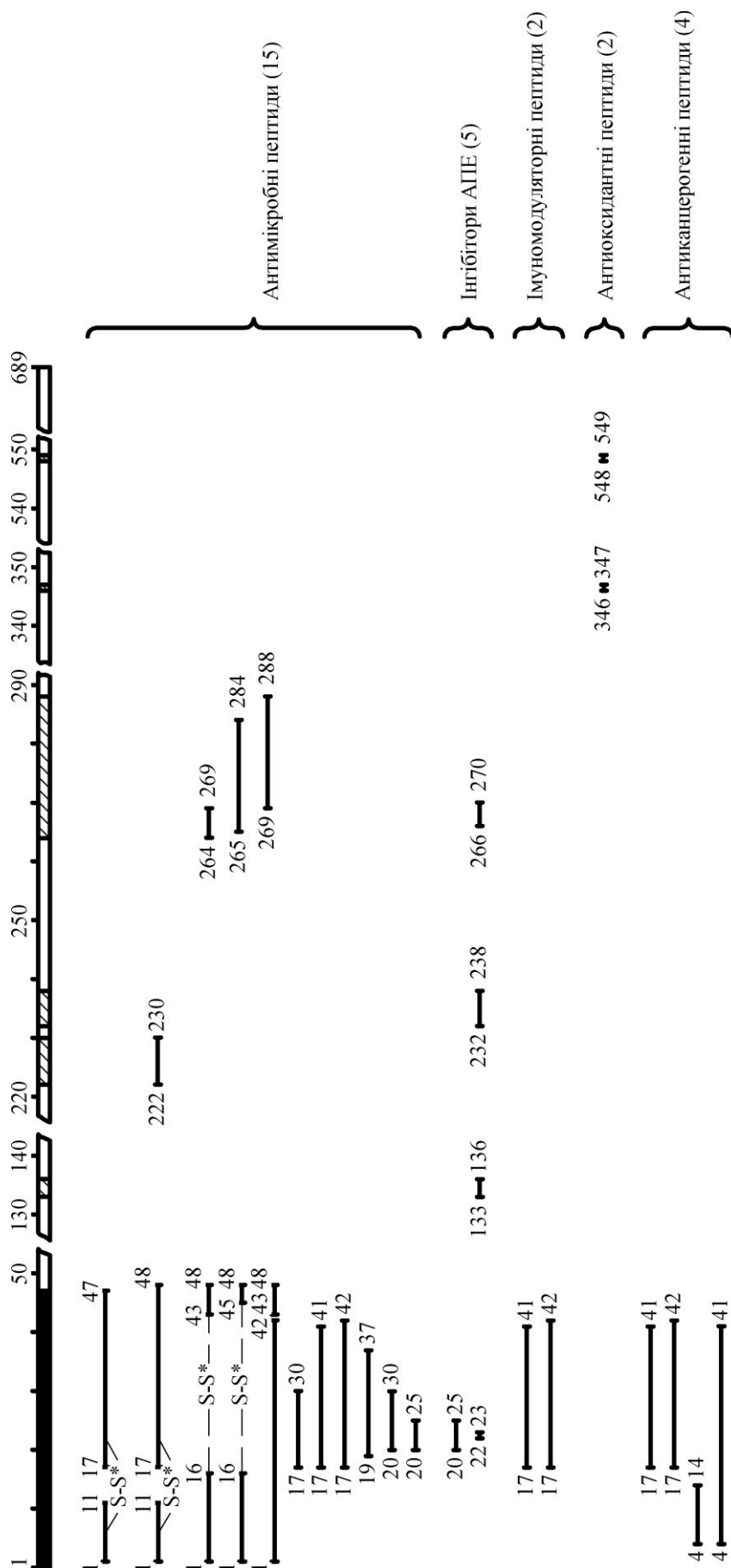


\* Два фрагменти зв'язані дисульфідним зв'язком між амінокислотними залишками Цис<sup>28</sup> і Цис<sup>111</sup>.

\*\* Два фрагменти зв'язані дисульфідним зв'язком між амінокислотними залишками Цис<sup>61</sup> і Цис<sup>77</sup>.

**Рис. 39. Біоактивні пептиди з  $\alpha$ -лактальбуміну (генетичний варіант В) молока корови.**

Прозорими прямокутниками позначені ділянки первинної структури, які не входять до складу БАП. Заштриховані ділянки входять до складу БАП. Темні прямокутники – ділянки первинної структури, які входять до складу багатьох БАП (стратегічні зони). Цифрами позначені порядкові номери амінокислотних залишків у протеїновій фракції



**Рис. 40. Біоактивні пептиди з лактоферину молока корови.**

Прозорими прямокутниками позначені ділянки первинної структури, які не входять до складу БАП. Заштриховані ділянки входять до складу БАП. Темні прямокутники – ділянки первинної структури,

Найважливішим попередником БАП серед протеїнів сироватки молока є  $\beta$ -Lg. Близько 78 % амінокислотних залишків (127 із 162) входить до складу відомих БАП. У первинній структурі можна виділити дві так звані «стратегічні зони» – ділянки первинної структури, з яких утворюється велика кількість пептидів з різними видами біологічної дії (f 78-83 і f 142-149). Другим за кількістю амінокислотних залишків у складі БАП (78 із 123 або ~ 63 %) є  $\alpha$ -La. Ці БАП більш-менш рівномірно розташовані в його поліпептидному ланцюзі. В  $\alpha$ -La можна виділити лише одну невелику «стратегічну зону» (f 50-53), яка входить до складу шести пептидів з чотирма видами біологічної дії.

Дуже нерівномірно розміщені амінокислотні послідовності БАП у структурі лактоферину. Тому на схемі (рис. 40) представлені лише фрагменти первинної структури Lf, які включають БАП. Більшість БАП розміщені в «стратегічній зоні» (f 1-48), з якої утворюються пептиди майже всіх видів біологічної дії, які характерні для цього протеїну. Загалом до складу БАП з лактоферину входить 97 амінокислотних залишків (~ 14 %) із 689-ти. Найменше БАП утворюється з альбуміну сироватки (BSA). Це два відомі пептиди: альбутензин А й серорфін, які становлять лише 2,6 % первинної структури BSA.

За різноманітністю видів біологічної дії БАП з протеїнів сироватки мало відрізняються від казеїнів. Узагальнені дані з розподілу БАП у  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg, Lf і BSA представлені у табл. 36. Найбільш поширеними, як і в казеїнів, є антигіпертензивні пептиди – лактокініни, які утворюються з усіх фракцій. Також характерними для протеїнів сироватки (окрім BSA) є різні види антимікробних пептидів. БАП з іншими видами біологічної дії розподілені нерівномірно між фракціями. Так антидіабетичні і гіпохолестеролемічні пептиди утворюються в основному лише з  $\beta$ -Lg, а антиканцерогенні – з Lf.

**Таблиця 36. Розподіл пептидів між фракціями протеїнів сироватки молока за видами біологічної дії**

Вид біологічної дії пептиду	Фракції протеїнів сироватки молока			
	$\beta$ -Lg	$\alpha$ -La	Lf	BSA
Інгібітор ангіотензин-перетворювального ензиму (АПЕ)	26	8	5	1
Антимікробна дія	10	5	15	–
Імуномодуляторна дія	–	4	2	–
Опіююча дія	2	–	–	1
Антидіабетична дія	5	1	–	–
Гіпохолестеролемічна дія	4	–	–	–
Антиканцерогенна дія	–	–	4	–
Антиоксидантна дія	–	1	2	–
Засвоєння іонів двовалентних металів	1	1	–	–
Регуляція моторики кишківника	1	–	–	1

Дослідження останніх років свідчать про можливість відкриття в майбутньому інших біоактивних пептидів з новими видами біологічної дії з протеїнів сироватки молока. Також з пептидами пов'язують низку фізіологічних ефектів впливу молока й молочних продуктів на організм [209].

### **3.3. Функціональні продукти та інгредієнти на основі біоактивних пептидів із протеїнів молока**

#### **3.3.1 Загальна оцінка протеїнів молока як попередників біологічно активних пептидів**

Враховуючи дані, наведені в підрозділах 3.1 і 3.2, можна відзначити, що відповідно до принципу біохімічної економії, який був сформульований Альбертом Ленінджером [10], природа наділила

протеїни молока окрім основної функції (забезпечення амінокислотами) багатьма іншими, які пов'язані з виживанням і розвитком новонароджених ссавців. Ці функції реалізуються не тільки на рівні протеїнів, а також на рівні пептидів, які утворюються під час процесів травлення в шлунково-кишковому тракті. Звичайно, це стосується лише природних харчових або запасних протеїнів, до яких відносяться протеїни молока. Враховуючи сучасні дані можна сформулювати поняття «додаткових функцій» харчових протеїнів, які не є основними, але створюють певні переваги і відіграють позитивну роль на ранніх етапах розвитку організму. Підтвердженням цього може бути наступне:

1. Наявність великої кількості біоактивних пептидів серед продуктів розщеплення протеїнів молока травними протеазами, що дозволило назвати ці протеїни прогормонами.

2. Значна частина первинної структури протеїнів молока ( $\beta$ -Lg – 78 %,  $\alpha$ -La – 63 %,  $\alpha_{S1}$ -казеїн – 77 %,  $\alpha_{S2}$ -казеїн – 84,5 %,  $\beta$ -казеїн – 89 %,  $\kappa$ -казеїн – 37 %) відповідає біоактивним пептидам. В протеїнах іншого походження (не з молока) такі послідовності зустрічаються значно рідше й біоактивні пептиди, очевидно, утворюються випадково.

3. Здатність біоактивних пептидів проявляти біологічну дію не тільки в шлунково-кишковому тракті новонароджених, але і проникати в кров'яне русло за рахунок особливостей процесів абсорбції продуктів розщеплення протеїнів.

4. Стійкість біоактивних пептидів із протеїнів молока до дії протеаз травного тракту та крові.

5. Висока ймовірність досягнення біоактивними пептидами своїх біологічних цілей в інтактному вигляді за рахунок утворення великих кількостей цих пептидів у травному тракті.

Важливість процесу утворення біоактивних пептидів із протеїнів молока на сьогодні не викликає сумніву і повинна враховуватись при визначенні біологічної цінності харчових протеїнів, а також при

виробництві харчових продуктів, які включають протеїни молока або продукти їхнього протеолізу. Окрім традиційних ферментованих молочних продуктів, до них можна віднести продукти для спортсменів, різні суміші для дитячого харчування, гіпоалергенні продукти на основі гідролізатів молочних протеїнів. На жаль, при створенні вказаних продуктів дія біоактивних пептидів у більшості випадків не була врахована. У зв'язку з цим привертає увагу серія робіт польських вчених, які запропонували критерії та методику оцінки потенційної здатності харчових протеїнів і зокрема протеїнів молока утворювати різні види біоактивних пептидів [148, 149, 151]. Для цього було використано базу даних протеїнів і відомих біоактивних пептидів BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>). Загалом було встановлено, що протеїни молока потенційно можуть бути джерелом дуже великої кількості біоактивних пептидів (табл. 37). Як свідчать дані, наведені в таблиці, ця кількість значно перевищує вже відкриті й досліджені БАП з казеїнів та протеїнів сироватки.

Що стосується харчування новонароджених, то можна не сумніватись у досконалості природи, але багато дискусій є навколо використання цього явища в харчуванні дорослої людини. Багаторічний емпіричний досвід вживання молочних ферментованих продуктів свідчить про їх позитивний вплив на здоров'я і тривалість життя.

Підсумовуючи сказане, можна відзначити, що на сьогодні відсутні дані, які свідчили б про шкідливість біоактивних пептидів з протеїнів молока для здорових дорослих людей. Проте є багато результатів, які доводять їхній позитивний вплив на різні фізіологічні системи організму, причому без негативних побічних ефектів. У сукупності вони проявляють оздоровчу дію та можуть бути визначені також як лікарства для здорових.

**Таблиця 37. Характеристика основних протеїнів молока як потенційних попередників біоактивних пептидів (BIOPEP) [151]**

Активність пептидів	Частота знаходження (A)* і кількість фрагментів з даною активністю (L)									
	$\alpha_{S1}$ -казеїн	$\alpha_{S2}$ -казеїн	$\beta$ -казеїн	$\kappa$ -казеїн	$\beta$ -лакто-глобулін	$\alpha$ -лакт-альбумін	BSA	лактоферин		
1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Антигіпертензивні	A=0,482 L=96	A=0,396 L=82	A=0,608 L=122	A=0,402 L=68	A=0,444 L=72	A=0,341 L=42	A=0,328 L=202	A=0,371 L=253		
Імуномодуляторні	A=0,020 L=4	A=0,011 L=1	A=0,023 L=5	A=0,012 L=2	-	A=0,024 L=3	A=0,005 L=3	A=0,010 L=7		
Антимікробні	A=0,030 L=6	A=0,058 L=12	-	A=0,065 L=11	A=0,025 L=4	A=0,041 L=5	-	A=0,023 L=16		
Інгібітори дипептидил пептидази IV	A=0,075 L=15	A=0,041 L=10	A=0,143 L=31	A=0,065 L=11	A=0,070 L=13	A=0,027 L=3	A=0,065 L=38	A=0,068 L=46		
Опіїдні	A=0,020 L=4	-	A=0,028 L=6	A=0,012 L=2	A=0,006 L=1	A=0,008 L=1	-	-		
Опіїдні антагоністи	A=0,005 L=1	-	-	A=0,012 L=2	-	A=0,008 L=1	-	-		
Ліганд бактеріальної пермеази	A=0,005 L=1	A=0,015 L=3	A=0,005 L=1	A=0,006 L=1	A=0,012 L=2	A=0,008 L=1	A=0,003 L=2	A=0,010 L=7		
Активация убіквітин-медійованого протеолізу	A=0,005 L=1	-	-	-	A=0,006 L=1	A=0,008 L=1	A=0,010 L=6	A=0,016 L=11		



Продовження таблиці 37

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Антитромботичні	-	A=0,005 L=1	A=0,029 L=6	A=0,024 L=6	-	-	A=0,002 L=1	A=0,004 L=3
Антиоксидантні	A=0,085 L=17	A=0,068 L=14	A=0,081 L=17	A=0,030 L=18	A=0,098 L=16	A=0,065 L=8	A=0,074 L=43	A=0,051 L=35
Антиамнезійні	A=0,005 L=1	A=0,005 L=1	A=0,048 L=10	-	-	-	A=0,002 L=1	A=0,004 L=3
Антиканцерогенні	A=0,020 L=4	-	A=0,019 L=4	-	-	-	-	A=0,003 L=2
Регуляція активності гладких м'язів	-	A=0,005 L=1	A=0,029 L=6	A=0,012 L=2	-	-	A=0,002 L=1	-
Стимуляція засвоєння глюкози	A=0,070 L=3	A=0,015 L=3	A=0,043 L=9	A=0,024 L=4	A=0,068 L=11	A=0,016 L=2	A=0,041 L=24	A=0,029 L=20
Стимуляція звільнення вазоактивних субстанцій	A=0,008 L=4	A=0,072 L=14	A=0,029 L=6	A=0,006 L=1	A=0,012 L=2	A=0,008 L=1	A=0,010 L=6	A=0,006 L=4
Нейропептиди	A=0,010 L=2	A=0,010 L=4	-	-	A=0,012 L=2	-	A=0,005 L=3	A=0,007 L=5
Регуляція фосфоінзотольного механізму	A=0,005 L=1	-	-	-	-	A=0,008 L=1	-	A=0,006 L=4
Зв'язування гепарину	-	-	-	-	-	-	-	A=0,006 L=4

Закінчення таблиці 37

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Інгібітор кальмодулін-залежної фосфодіестерази I	-	A=0,008 L=2	A=0,005 L=1	-	A=0,012 L=2	A=0,008 L=1	A=0,010 L=6	A=0,007 L=5
Гіпотензивні	-	A=0,010 L=2	A=0,005 L=1	A=0,006 L=1	A=0,012 L=2	A=0,008 L=1	A=0,010 L=6	A=0,007 L=5
Інгібітори хімозину	A=0,005 L=1	-	-	A=0,006 L=1	-	-	-	-
Гемолітичні	-	A=0,024 L=5	-	-	-	-	-	-
Кальмодулін-зв'язувальний пептид	-	A=0,024 L=5	-	-	-	-	-	-
Хемотаксичні	-	-	A=0,005 L=1	-	-	-	-	-
Анорексичний	-	-	A=0,005 L=1	-	-	-	-	-
Регуляція потоку іонів	-	-	-	-	A=0,006 L=1	-	A=0,002 L=1	-

Примітка. \* Частота знаходження пептиду (A) визначається як:  $A = \frac{a}{N}$ ,

де a – кількість фрагментів з даною активністю у первинній структурі протеїну;

N – кількість амінокислотних залишків у молекулі протеїну.

### **3.3.2 Шляхи утворення біоактивних пептидів у молоці та молочних продуктах**

Після відкриття біоактивних пептидів, які звільняються з казеїнів і протеїнів сироватки молока внаслідок дії травних ензимів у шлунково-кишковому тракті виникло припущення про можливість їхнього утворення в молочних продуктах [13, 26, 319]. Це припущення базувалося на участі різних груп протеолітичних ензимів у процесі виробництва молочних продуктів. До них належать природні протеази молока, складні протеолітичні системи молочнокислих бактерій і молокозсідальні препарати. Для об'єктивної оцінки їхнього значення в утворенні БАП доцільно розглянути склад, властивості і специфічність дії ензимів кожної групи.

#### **3.3.2.1 Природні ензими молока**

До 60-х років минулого століття вважалось, що ензими, які знаходяться в коров'ячому молоці, мають екзогенне походження (бактеріальне). Для більшості з них відсутні субстрати в молоці й не зрозуміле їх біологічне значення. Детальніші дослідження в стерильних умовах показали, що близько шістдесяти ензимів потрапляє в молоко з цитоплазми секреторних клітин, з мембранами жирових кульок, з крові через дефектні мембрани клітин молочних залоз [184]. Серед цих ензимів можна виділити принаймі дві протеази, які постійно присутні в молоці. Це плазмін (К.Ф. 3.4.21.7) і катепсин D (К.Ф. 3.4.23.5) або лужна та кисла протеїнази молока відповідно. Фізіологічною функцією плазміну є розщеплення фібрину в згустках крові [2]. У крові плазмін входить до складної системи плазміногену, яка включає його попередник – плазміноген, власне плазмін, активатори та інгібітори. Дослідження коров'ячого молока показало, що концентрація плазміну зростає в процесі його зберігання. При цьому концентрація плазміногену знижується. Компоненти системи плазміногену

потрапляють у молоко з крові. Крім плазміну і плазміногену в молоці є активатори плазміногену і інгібітори плазміну. Плазмін, плазміноген і активатори плазміногену асоційовані з міцелами казеїну, а інгібітори плазміну і плазміногену знаходяться в сироватці молока. Імунологічним методом плазмін було виявлено також у мембранах жирових кульок коров'ячого молока.

Плазмін належить до серинових протеїназ. Його активність інгібується диізопропілфторофосфатом, фенілметилсульфонілфторидом, а також інгібітором трипсину [80]. Плазмін розщеплює пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами лізину й аргініну. Найбільш стійким до дії плазміну є  $\kappa$ -казеїн, хоча він і включає ряд залишків лізину і аргініну [167]. Очевидно, це зумовлено порівняно впорядкованою вторинною і третинною структурою цього казеїну. Більш чутливим до дії плазміну є  $\alpha_{S1}$ -казеїн. Його інкубація з плазміном у 0,005 М натрій тетраборатному буфері (рН 8,4) призвела до утворення одного пептиду з меншою електрофоретичною рухливістю, ніж у  $\alpha_{S1}$ -казеїну й декількох пептидів із більшою електрофоретичною рухливістю. Два швидко мігруючі пептиди включали фосфосеринові залишки. Пізніше було встановлено, що електрофореграма плазмінового гідролізату  $\alpha_{S1}$ -казеїну ідентична до електрофореграми невивченої казеїнової фракції –  $\lambda$ -казеїну. Аналогічні фрагменти, які були виділені з гелю після електрофорезу, давали ідентичні трипсинові пептидні карти й характеризувались однаковими фізико-хімічними властивостями. Це дозволило зробити заключення, що  $\lambda$ -казеїн виникає в молоці в результаті дії плазміну на  $\alpha_{S1}$ -казеїн.

Плазмін розщеплює також  $\alpha_{S2}$ -казеїн з утворенням декількох пептидів із високою електрофоретичною рухливістю [80]. При дії плазміну на 1% розчин  $\alpha_{S2}$ -казеїну відбувається розщеплення зв'язків Ліз<sub>21</sub>-Глн<sub>22</sub>, Ліз<sub>24</sub>-Асп<sub>25</sub>, Арг<sub>114</sub>-Асп<sub>115</sub>, Ліз<sub>149</sub>-Ліз<sub>150</sub>, Ліз<sub>150</sub>-Тре<sub>151</sub>, Ліз<sub>181</sub>-

Тре<sub>182</sub>, Ліз<sub>187</sub>-Тре<sub>188</sub> і Ліз<sub>188</sub>-Ала<sub>189</sub>. Проте невідомо, чи так само відбувається розщеплення  $\alpha_{S2}$ -казеїну у складі нативних міцел молока.

Найбільш чутливою фракцією до дії плазміну є  $\beta$ -казеїн. В ньому швидко розщеплюються такі пептидні зв'язки: Ліз<sub>28</sub>-Ліз<sub>29</sub>, Ліз<sub>105</sub>-Гіс<sub>106</sub> і Ліз<sub>107</sub>-Глу<sub>108</sub> [184]. В результаті утворюються відомі компоненти молока:  $\gamma_1$ -казеїн –  $\beta$ -CN (f 29-209),  $\gamma_2$ -казеїн –  $\beta$ -CN (f 106-209),  $\gamma_3$ -казеїн  $\beta$ -CN (f 108-209). Крім того, утворюються компоненти протеозо-пептонної фракції молока: PP5 –  $\beta$ -CN (f 1-105) 5P; PP5 –  $\beta$ -CN (f 1-107) 5P; PP8 S –  $\beta$ -CN (f 29-105) 1P; PP8 S –  $\beta$ -CN (f 29-107) 1P; PP8 –  $\beta$ -CN (f 1-28) 4P.

Протеозо-пептонна фракція молока включає 38 компонентів. Порівнювання властивостей цих компонентів із властивостями продуктів протеолізу індивідуальних казеїнових фракцій плазміном показало, що 25 з 38 компонентів протеозо-пептонної фракції молока можуть бути продуктами розщеплення казеїнів плазміном. З допомогою кількісного електрофорезу в поліакриламідному гелі було встановлено, що 52 % протеозо-пептонної фракції утворюється з  $\beta$ -казеїну, 29 % – з  $\alpha_{S1}$ -казеїну, 9 % – з  $\alpha_{S2}$ -казеїну і 4 % – з  $\kappa$ -казеїну [64]. Лише 6% компонентів протеозо-пептонної фракції утворюється в результаті дії інших протеолітичних ферментів молока.

Другим протеолітичним ферментом, який у малих кількостях міститься в коров'ячому молоці, є катепсин D (К.Ф. 3.4.23.5). Він ще отримав назву кислій протеїнази молока, оскільки оптимум рН його дії є біля 4,0. Катепсин D є порівняно термолабільним ферментом. Він інактивується в молоці при 70°C. Його роль і біохімічні властивості детально описані [12]. Дія катепсину D на білки молока вивчена недостатньо. Є дані, що казеїни стійкі до його дії. За специфічністю дії на  $\alpha_{S1}$ - і  $\beta$ -казеїни він нагадує хімозин, проте, на відміну від хімозину, володіє дуже низькою молокозсідальною активністю.

### 3.3.2.2 Протеолітичні системи молочнокислих бактерій.

#### Протеїнази

Лактококи й лактобацили, які ростуть у молочному середовищі, є ауксотрофами за рядом амінокислот (від 6- до 14-ти). Тому здатність рости в молоці в них залежить від активності протеолітичної системи, яка забезпечує звільнення есенціальних амінокислот у процесі розщеплення протеїнів казеїнового комплексу, котрі бактерії використовують у синтезі своїх протеїнів [124, 470, 574]. Протеолітична система молочнокислих бактерій складається з трьох частин:

1. Протеїнази, які забезпечують розщеплення казеїну до пептидів.
2. Пептидази, які розщеплюють пептиди до амінокислот.
3. Транспортна система, яка забезпечує перенесення продуктів протеолізу через цитоплазматичну мембрану.

Протеїнази молочнокислих бактерій, які каталізують розщеплення казеїнів, є мономерними сериновими протеїназами з молекулярною масою 180 000-190 000 Да (табл. 38). Вони зв'язані з клітинною стінкою бактерії та мають назву приклітинних протеїназ або скорочено PrtP. Для більшості видів лактобактерій встановлена первинна структура PrtP і гену, який кодує їх синтез [159]. У лактококів і *Lb. paracasei* приклітинна протеїназа включає 1902 амінокислотних залишки у *Lb. Delbrueckii* – 1946, а у *Lb. Lactis* – 1962. Первинна структура PrtP на 98 % ідентична в різних лактококів і на 95 % ідентична з *Lb. Paracasei* [90]. Аналіз первинної структури протеїназ PrtP показує їх подібність до субтилізинів, які теж є сериновими протеїназами з подібними каталітичними доменами. С-термінальна частина PrtP подібна до такої в багатьох Грам-позитивних бактерій, вона включає сигнальну послідовність і  $\alpha$ -спіральну ділянку, яка зв'язується з мембраною. Позаклітинна локалізація PrtP показана в дослідженнях із застосуванням різних методичних підходів. Зокрема, показано, що PrtP здатна звільнятися з клітинної стінки при додаванні бактерій до буферного розчину, у якому відсутній кальцій [517], або за дії

на клітини бактерій лізоциму [130]. У першому випадку звільняється фермент із меншою молекулярною масою (165 000 Да), ніж за дії лізоциму (180 000 Да). Не виключено, що це зумовлено автопротеолізом.

**Таблиця 38. Протеїнази молочнокислих бактерій [265, 470]**

Види і штами бактерій	Молекулярна маса <sup>1</sup> , кДа	Субстрат	Тип протеїнази <sup>2</sup>	pH <sup>1</sup> оптимум	Локалізація <sup>3</sup>
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> WG2		κ-, β-казеїни	С		прикліт. <sup>а</sup>
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> HP		κ-, β-казеїни	С	6,4	прикліт. <sup>а</sup>
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> SKII	187п	α <sub>S1</sub> -, κ-, β-казеїни	С		прикліт. <sup>а,б</sup>
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AC1		α <sub>S1</sub> -, κ-, β-казеїни			прикліт. <sup>а</sup>
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM1		α <sub>S1</sub> -, κ-, β-казеїни			прикліт. <sup>а</sup>
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> H2	180е	κ-, β-казеїни	С	6,0	прикліт. <sup>а</sup>
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> NCD0763		α <sub>S1</sub> -, κ-, β-казеїни	С		прикліт. <sup>а</sup>
<i>Lb. casei ssp. casei</i> NH14		β-казеїн	С		прикліт. <sup>а</sup>
<i>Lb. casei ssp. casei</i> NCD0151			С	6,5	прикліт. <sup>а</sup>
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> CNRZ397	170е	α <sub>S1</sub> -, β-казеїни	С	5,5	прикліт. <sup>а</sup>
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ303		α <sub>S1</sub> -, β-казеїни	С	7,5	прикліт. <sup>а</sup>
<i>Lb. helveticus</i> CP709	45е	α <sub>S1</sub> -, β-казеїни	С	6,5	прикліт. <sup>а</sup>
<i>Lb. helveticus</i> L89	180е	α <sub>S1</sub> -, β-казеїни	С	7,0	прикліт. <sup>а</sup>

Примітки: 1. Молекулярну масу фермента визначали шляхом електрофорезу в поліакриламідному гелі (позначка – е) або обчислювали за первинною структурою (позначка – п).

2. Тип протеїнази «С» означає серинову протеїназу.

Локалізацію фермента визначали за наявністю сигнальних послідовностей (а) або під час субклітинного фракціонування бактерій (б).

За специфічністю дії на  $\alpha_{S1}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN приклітинні протеїнази лактококів розділили на 2 типи –  $P_I$  і  $P_{III}$ . Протеїназа  $P_I$  розщеплює  $\beta$ -CN і не розщеплює  $\alpha_{S1}$ -CN і  $\kappa$ -CN; протеїназа  $P_{III}$  гідролізує  $\beta$ -CN, а також  $\alpha_{S1}$ - і  $\kappa$ -CN [431]. Аналіз специфічності протеїназ автори проводили на фрагменті  $\alpha_{S1}$ -CN, що включав амінокислотні залишки 1-28. При цьому використовували протеїнази, виділені із шістнадцяти різних штамів *L. lactis* [159]. За результатами цих досліджень протеїнази лактококів розділили на 7 груп, які відрізнялися за специфічністю розщеплення вказаного фрагменту  $\alpha_{S1}$ -CN. Порівняння амінокислотних послідовностей, відповідальних за зв'язування субстрату, у протеїназ із різною специфічністю показало, що їхня специфічність зумовлена мінорними генетичними варіаціями структурного гену *PrtP*. Первинна структура каталітичного домену є консервативною не тільки в лактококів, а й у лактобацил із приклітинними протеїназами.

В останні десятиліття проводилися дослідження з метою детального вивчення продуктів протеолізу казеїнів приклітинними протеїназами молочнокислих бактерій. Встановлено, що найбільш чутливим до дії приклітинних протеїназ є  $\beta$ -CN. У ранніх роботах специфічність дії протеїназ вивчалася при інкубації очищених фракцій казеїну з інтактними клітинами бактерій. При цьому було доведено, що протеолітичну дію проявляє лише приклітинна протеїназа [517]. Пізніше в дослідах *in vitro* використовували очищені ензими, одержані з різних штамів молочнокислих бактерій, і відповідну фракцію казеїну. Зокрема, досліджували дію *PrtP* *L. lactis* і *Lb. helveticus* на  $\beta$ -казеїн. Продукти протеолізу  $\beta$ -казеїну відділяли методами рідинної хроматографії, очищували і встановлювали первинну структуру. Перші результати показали, що за дії *PrtP* розщеплюється лише частина  $\beta$ -казеїну. При цьому в основному утворюються великі фрагменти. Подальші дослідження з використанням методу рідинної хроматографії під високим тиском і мас-спектрометрії дозволили проаналізувати більше 95 % пептидів, що



утворювалися при розщепленні  $\beta$ -казеїну протеїназою типу  $P_I$  [248]. Було виявлено більше 100 пептидів, що склалися із 4-30 амінокислотних залишків. Більшість пептидів містили 4-10 залишків. Ди- і трипептиди майже не виявлялися. Було встановлено, що половина пептидів утворюється із *C*-термінальної частини  $\beta$ -казеїну, особливо з ділянки 60-105. Аналіз продуктів протеолізу  $\beta$ -казеїну, що утворюються за дії протеїнази типу  $P_{III}$ , дозволив виявити тринадцять ідентичних зв'язків, що завжди розщеплюються протеїназами  $P_{III}$  і  $P_I$  типів та шість зв'язків, що часто розщеплюються приклітинними протеїназами різних штамів бактерій. Згадані пептиди утворюються в основному з *C*-термінальної частини молекули  $\beta$ -казеїну. Крім протеїназ, характерних для *Lb. helveticus* і *L. lactis* в штамі *Lb. helveticus* CP790, була виявлена значно менша приклітинна протеїназа (45 000 Да). Вона належить до класу серинових протеїназ і проявляє специфічність по відношенню до  $\beta$ -казеїну.

Продукти протеолізу  $\kappa$ -казеїну вивчалися при дії приклітинних протеїназ різних типів у ряду штамів лактококів *L. lactis* [542]. Було показано, що розщеплення  $\kappa$ -казеїну призводить до утворення великої кількості малих пептидів переважно з *C*-термінальної частини молекули. Більшість пептидних зв'язків постійно гідролізується всіма типами протеїназ, проте знайдені також пептиди, які утворюються при дії деяких видів специфічних протеїназ.

Розщеплення  $\alpha_{S1}$ - і  $\alpha_{S2}$ -казеїнів зумовлене переважно дією протеїназ  $P_{III}$ -типу або протеїназ змішаного типу [444]. Протеїнази  $P_I$  не гідролізують  $\alpha_S$ -казеїни. У цих дослідженнях виділення продуктів протеолізу проводили електрофорезом у ПАГ у присутності додецилсульфату натрію. Серед продуктів протеолізу було ідентифіковано 25 основних олігопептидів, половина з яких утворюється в результаті розщеплення *C*-термінальної ділянки [585]. Крім того, було виділено ряд малих пептидів, які утворюються з ділянок, що межують із чутливими до протеїнази пептидними зв'язками.

Можна зробити висновок, що приклітинні протеїнази характеризуються дуже широкою субстратною специфічністю. На основі аналізу численних продуктів знайдені ділянки, що переважно чутливі до дії протеїназ різних типів. Слід зазначити, що ди- і трипептиди, а також вільні амінокислоти за дії приклітинних протеїназ молочнокислих бактерій на  $\alpha_s$ -,  $\beta$ - і  $\kappa$ -казеїни утворюються в незначних кількостях. Проте утворюється багато трохи більших пептидів (4-8 амінокислотних залишків).

### 3.3.2.3 Пептидази молочнокислих бактерій

Пептидази гідролізують пептиди, які потрапляють у клітини лактобактерій, до амінокислот. Багато робіт присвячено вивченню будови, властивостей і специфічності пептидаз, основні результати яких систематизовані в табл. 39 [124, 265, 290, 470, 501, 562].

У молочнокислих бактерій виявлено дві амінопептидази – N і C. Амінопептидаза N має скорочену назву PepN. Це мономерна металопептидаза (Zn-залежна) з молекулярною масою близько 95 000 Да. Вивчення генів PepN у різних видів бактерій (*Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis*, *L. lactis subsp. cremoris*) показало великий ступінь їхньої ідентичності. PepN може відщеплювати N-кінцеві амінокислоти в багатьох пептидів різної величини і структури. Специфічність PepN переважно досліджувалася при розщепленні ди- і трипептидів. Було показано, що дипептиди, у яких міститься залишок проліну в першому або другому положеннях, не розщеплюються PepN, тоді як такий же зв'язок у трипептидах піддається гідролізу. PepN краще гідролізує дипептиди, у яких N-кінцевий амінокислотний залишок аргінін. Меншою мірою гідролізуються дипептиди, які містять лізин і лейцин у першому положенні [369, 585]. Активність ензиму зростає із підвищенням гідрофобності C-кінцевого амінокислотного залишку дипептиду Арг-Х. PepN з *Lb. helveticus* має подібні властивості стосовно дипептидів Ала-Х і Лей-Х. На прикладі використання як субстрату продуктів трипсинового гідролізату  $\beta$ -казеїну було показано

**Таблиця 39. Пептидази молочнокислих бактерій [124, 265]**

Назва ферменту	Субстрат	Штам бактерії	Молекулярна маса, кДа	Четвертинна структура	Тип пептидази*
1	2	3	4	5	6
Амінопептидази N PepN	X↓(X) <sub>n</sub>	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> Wg2	95	мономер	М
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> MG1363	95		
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> HP	95		
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> LGG	87	мономер	М
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> IFPL731	95	мономер	М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	95	мономер	М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	95	мономер	М
		<i>Lb. helveticus</i> ITGL1	97	мономер	М
		<i>Lb. helveticus</i> SBT2171	95	мономер	М
		<i>Lb. sanfrancisco</i> CB1	75	мономер	М
<i>S. salivarius ssp. thermophilus</i> CNRZ302	97	мономер	М		
Амінопептидази C PepC	X↓(X) <sub>n</sub>	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	50	гексамер	Ц
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	51		Ц
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	54	тетрамер	Ц
		<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	50		Ц
		<i>S. salivarius ssp. thermophilus</i>	50	гексамер	Ц
Амінопептидази A PepA		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	40	гексамер	М
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> MG1363	38		
		<i>S. salivarius ssp. thermophilus</i>	45	октамер	М
Трипептидази PepT	X↓X-X	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> Wg2	52	димер	М
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	52	димер	М
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> IMN-C12	23	тример	Ц
Дипептидази V PepV	X↓X	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> Wg2	49	мономер	
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> MG1363	51		М
		<i>L. lactis biov. diacetylactis</i>	50		М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	52		М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	51	мономер	М
		<i>Lb. helveticus</i> SBT2171	50	мономер	М
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> IFPL731	46	мономер	М
		<i>Lb. sake</i>	50	мономер	М
		<i>Lb. sanfrancisco</i> CB1	65	мономер	М
Дипептидази D PepD	X↓X	<i>Lb. helveticus</i> 53/7	54	октамер	Т

## Закінчення таблиці

1	2	3	4	5	6
Пролідази Q PepQ	X↓Про	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	42	мономер	М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	41		М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	41		М
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> IFPL731	41	мономер	М
Пролінази R PepR	Про↓X	<i>Lb. helveticus</i> CNBZ32	33	тетрамер	С
		<i>Lb. rhamnosus</i>	34		
Пролінази P PepP	X↓Про- (X)n	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> NCDO763	43	мономер	М
		<i>L. lactis</i>	46		М
Пролінази L PepL		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	35		С
X-проліл- дипептидил- аміно- пептидази PepX	X-Про↓ (X)n	<i>L. lactis ssp. lactis</i> H1	83	димер	С
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> P-8-2-47	90		С
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	59	димер	С
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> nTR	88	димер	С
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> LLG	79		С
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	88		С
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	95	димер	С
		<i>Lb. helveticus</i> 53/7	91	димер	С
		<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	90		С
		<i>S. salivarius ssp. thermophilus</i> ACA-DC4	80	димер	С
Пролін- імінопеп- тидази PepI	Про↓ X-(X)n	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> HP	50		М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	33		С
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> CNRZ397	33		С
		<i>Lb. helveticus</i> 53/7	34	димер	С
Ендопеп- тидази Pep E Pep G Pep O  PepF1, PepF2		<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	52		Ц
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	50		Ц
		<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	71		М
		<i>L. lactis</i>	71		М
		<i>L. lactis</i>	70		

Примітка. \*<sup>1</sup> Тип пептидаз: М – металопептидаза; С – серинова; Ц – цистеїнова пептидаза.

здатність  $PerN$  розщеплювати олігопептиди, які включають від 4-х до 14-ти амінокислотних залишків. Було встановлено, що оптимальним субстратом для  $PerN$  є гексапептид [369].

З багатьох штамів лактобацил і лактококів було виділено амінопептидазу із широкою специфічністю – амінопептидаза С ( $PerC$ ) [346]. Використовуючи  $\beta$ -нафтіламідні ( $-\beta NAP$ ) і паранітроанілідні ( $-pNA$ ) похідні пептидів типу  $AA-\beta NAP$  і  $AA-pNA$ , було встановлено значну активність  $PerC$  при розщепленні пептидних зв'язків, утворених основними (Арг, Гіс, Ліз), кислими (Глу, Асп), гідрофобними (Ала, Лей) й ароматичними (Фен) амінокислотами. При цьому не розщеплювалися зв'язки, утворені проліном типу: Про- $pNA$ , Про- $\beta NAP$ , Х-Про- $pNA$ , Х-Про- $\beta NAP$ . Дослідження дії  $PerC$  на субстрат типу  $Gly_n$  (де  $n=2-5$ ) показало найвищу активність при розщепленні тетрапептидів.

Амінопептидаза А ( $PerA$ ) має також назву глутаміламінопептидаза.  $PerA$  була відкрита у *L. lactis* і *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* [456, 585]. Ця пептидаза характеризується здатністю відщеплювати кислі  $N$ -термінальні амінокислотні залишки. Фермент добре гідролізує Глу- і Асп- $pNA$ , а Глу- і Асп- $\beta NAP$  значно менше. Амінопептидаза А здатна відщеплювати  $N$ -термінальні Глу й Асп у пептидів різної величини (від 2 до 10 залишків) і незалежно від їхнього амінокислотного складу.

У штамів багатьох видів молочнокислих бактерій (*Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*, *Lb. helveticus*, *L. lactis*, *S. salivarius ssp. thermophilus*) була виявлена Х-проліл-дипептидил-амінопептидаза. Х-проліл-дипептидил-амінопептидаза ( $PerX$ ) відщеплює дипептиди типу Х-Про з  $N$ -термінальної частини пептидів. Крім того,  $PerX$  проявляє амідазну й естеразну активність [189, 208]. Найвища активність  $PerX$  виявлена при розщепленні Х-Про- $pNA$  субстратів, у яких  $N$ -термінальна амінокислота не

заряджена (Ала, Глі) або має позитивний заряд (Арг). Дипептиди  $\text{PerX}$  не гідролізує. Відоме розщеплення пептидів, які містять від трьох до семи амінокислотних залишків. Дипептиди, які звільняються в результаті дії  $\text{PerX}$ , можуть містити в першому положенні залишки основних амінокислот (Арг, Гіс, Ліз), ароматичні (Фен, Тир) і гідрофобні (Ала, Іле, Вал, Глі) амінокислоти. Використовуючи фрагмент  $\beta$ -казеїну f 176-182 (Ліз-Ала-Вал-Про-Тир-Про-Глн), було встановлено додаткову специфічність  $\text{PerX}$  до субстратів типу X-Ала-(X)<sub>n</sub> і одержано при розщепленні два дипептиди Ліз-Ала і Вал-Про. Крім того,  $\text{PerX}$  здатна гідролізувати субстрати типу Про-Про-(X)<sub>n</sub>, але майже не розщеплює X-Про-Про.

Крім амінопептидаз у молочнокислих бактерій виявлені дипептидази  $\text{PerD}$  і  $\text{PerV}$  [124, 470]. Дипептидаза  $\text{PerD}$  виділена з *Lb. Helveticus*. Друга дипептидаза  $\text{PerV}$  була виділена з багатьох молочнокислих бактерій: *Lb. casei*, *Lb. helveticus*, *Lb. sace*, *Lb. sanfrancisco*, *L. lactis*. Ця пептидаза володіє широкою специфічністю, проте не гідролізує AA-pNA, дипептиди, які містять пролінові залишки і дипептиди з N-термінальними залишками гліцину. На відміну від пептидази  $\text{PerD}$ , пептидаза  $\text{PerV}$  є більш важливою для росту молочнокислих бактерій. На прикладі *L. lactis* було показано, що штами, у яких відсутня  $\text{PerV}$ , на 22 % відставали в рості.

Широко розповсюджена серед молочнокислих бактерій також пролін-імінопептидаза. Ця пептидаза ( $\text{PerI}$ ) характеризується здатністю відщеплювати N-термінальний залишок проліну в пептидів.  $\text{PerI}$  було знайдено в штаммах *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *L. lactis* [124]. У  $\text{PerI}$  лактобацил визначено послідовність Глі-Глн-Сер-Три-Глі-Глі, яка характерна для активного сайту ферментів родини проліл-олігопептидаз. Каталітична тріада ферменту складається із Сер-107, Асп-246 і Гіс-273 [352]. Гідролітичну активність  $\text{PerI}$  проявляє щодо пептидів типу Про-X, де X може бути гідрофобним залишком (Ала, Іле, Лей, Вал), кислим (Глу) або ароматичним

залишком (Фен, Тир). Використання як субстратів пептидів різної величини показало, що РерІ з лактобацил і лактококів в основному відщеплює N-термінальний пролін в ди- і трипептидах (рідко у тетрапептидах, наприклад, Про-Фен-Глі-Ліз). Ні один із досліджуваних пентапептидів не розщеплювався пролін-імінопептидазою. За своєю специфічністю РерІ лактококів і лактобацил суттєво відрізняються між собою. РерІ лактококів належить до металопептидаз, а РерІ лактобацил є сериною пептидазою.

Пептидаза, яка відщеплює N-термінальну амінокислоту, коли в другому положенні знаходиться залишок проліну, була виділена зі штамів *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* і *L. lactis* [265]. Цей ензим отримав назву пролідаза або РерQ. Пролідаза вважається ензимом, котрий гідролізує дипептид X-Про. Проте не всі пролідази є дипептидазами, а також не всі субстрати типу X-Про вони здатні гідролізувати. Насамперед РерQ гідролізує дипептиди, у яких у першому положенні є залишки гідрофобних (Ала, Іле, Лей, Вал), основних (Гіс), ароматичних (Фен, Тир) і сірковмісних (Мет) амінокислот. Деякі пролідази виявляють не зовсім зрозумілу високу здатність розщеплювати пептиди, які не містили залишків проліну, або містили його в першому положенні (Про-Ала, Про-Про, Про-Вал). У молочному середовищі штами *Lb. helveticus*, дефіцитні за РерQ, розвивалися на 13 % повільніше. Порівняльні дослідження штамів бактерій, у яких нормально функціонує РерQ, і штамів, у яких відсутній цей фермент, показали, що майже 100 % дипептидів Мет-Про, Лей-Про і Фен-Про гідролізується за участю РерQ.

Лише в лактококів *L. lactis* було виявлено оригінальну амінопептидазу РерР, яка звільняє N-термінальні амінокислоти з пептидів типу X-Про-Про-(Y)<sub>n</sub> [500]. Найвищу активність РерР проявляла щодо пентапептидів; гідролізу піддавалися пептиди, які містили від трьох до дев'яти амінокислотних залишків. Було

встановлено специфічність *PepP* до таких N-термінальних амінокислот (X): Арг, Мет, Ліз, Лей і Тир. Різниця у швидкості росту в штучному й молочному середовищах у мутантів із делецією гену *PepP* і диких штамів *L. lactis* незначна.

З різних штамів *L. lactis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. sake*, *Pediococcus pentosaceus* були виділені пептидази, які розщеплюють трипептиди [354]. Трипептидаза *PepT*, виділена з *L. lactis*, гідролізує трипептиди, до складу яких входять різні амінокислоти крім пептидів типу X-Про-У. Вони не здатні гідролізувати ди-, тетра- або більші пептиди. Інші трипептидази характеризуються більшою здатністю розщеплювати трипептиди із гідрофобними й ароматичними амінокислотними залишками.

Пептидазу *PepO*, яка здатна гідролізувати великі пептиди, було виділено з *L. Lactis*, *Lb. helveticus* і *Bifidobacterium* [119, 243]. *PepO* розщеплює олігопептиди, які включають від 5- до 35-ти амінокислотних залишків. Це Мет- і Лей-енкефаліни, фрагмент  $\alpha_{S1}$ -казеїну (f 165-199), брадикінін, нейротензин, ангіотензин. Подібно до термолізину, *PepO* гідролізує пептидні зв'язки, утворені лейцином і фенілаланіном. Хоча *PepO* розщеплює ряд казеїнових фрагментів, нативні білки казеїнового комплексу гідролізу не піддаються.

Ще одна пептидаза (*PepF*), здатна розщеплювати олігопептиди, була виявлена лише в лактококів [350]. *PepF* гідролізує олігопептиди, які включають від п'яти до сімнадцяти амінокислотних залишків. Проте, найвищу активність *PepF* проявляє по відношенню до субстратів, що складаються з восьми або дев'яти залишків. У фрагменті АКТГ (f 1-24) *PepF* гідролізує три зв'язки, звільняючи пептиди від трьох до п'яти залишків. Відсутність активності *PepF* до  $\beta$ -ланцюга інсуліну (30 залишків), глюкагону (29 залишків) і фрагменту АКТГ (f 1-24) дозволяє визначити межу розмірів субстратів (менше 24 залишків). Нативні білки казеїнового комплексу протеїназа *PepF* не розщеплює.



Серед великої кількості різних за специфічністю пептидаз молочнокислих бактерій не було виявлено ні однієї з карбоксипептидазною активністю.

Питання локалізації пептидаз у клітинах молочнокислих бактерій від часу його виникнення зазнало змін. У ранніх роботах приводилися докази їхньої локалізації на клітинних мембранах і навіть поза клітинами [517]. На сьогодні більшість дослідників схиляються до думки про внутрішньоклітинну локалізацію всіх пептидаз молочнокислих бактерій [470, 590]. Доказами цього може бути відсутність сигнальних послідовностей, а також анкорних ділянок для фіксування на мембрані у всіх пептидаз, для яких була встановлена первинна структура. Крім цього, транспортна система олігопептидів молочнокислих бактерій може забезпечити проходження в клітину великих пептидів, що утворюються при протеолізі казеїну. Таким чином відпадає необхідність у розщепленні пептидів поза клітиною або на клітинних мембранах.

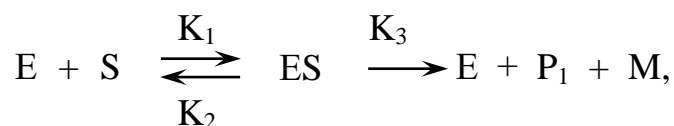
#### **3.3.2.4 Молокозсідальні протеолітичні препарати**

Молокозсідальні ензими здатні викликати зсідання молока шляхом специфічного протеолізу казеїнів. Протеоліз протеїнів сироватки молока не відіграє суттєвого значення в цьому процесі [1]. Молокозсідальні препарати використовуються при виробництві твердих сирів. Традиційно при виготовленні сирів застосовують так званий «сичужний фермент», виділений із сичугів телят, яких годували молоком. До складу сичужного ферменту входить, як основний компонент, природна молокозсідальна протеїназа – хімозин (К.Ф.3.4.23.4.). Синтезується хімозин у вигляді неактивного проферменту хімозиногену (373 амінокислотні залишки). Хімозиноген активується при значеннях рН менше 6,5. При цьому звільняється N-термінальний активуючий пептид (42 амінокислотні

залишки), внаслідок чого молекулярна маса знижується з 36 000 Да до 30 700 Да. За рахунок відщеплення позитивно заряджених амінокислотних залишків у складі активуючого пептиду знижується значення ізоелектричної точки від рІ 5 у хімозиногену до рІ 4,6 у хімозину. Хімозин був виділений із сичужного ферменту й очищений до гомогенного стану [184]. Було встановлено, що цей фермент належить до карбоксильних протеїназ. Первинна структура хімозину значною мірою збігається з первинною структурою пепсину. Оптимум рН дії хімозину при розщепленні гемоглобіну становить 3,7, при розщепленні сироваткового альбуміну і казеїну – 3,4 і 4,0. Протеолітична активність хімозину проявляється вже при температурі 0 °С і досягає максимального рівня при температурі 40 °С. Подальше збільшення температури призводить до зменшення активності ензиму і повної втрати її при температурі 60 °С. Хімозин характеризується високою молокозсідальною активністю і низькою протеолітичною активністю. Фізіологічне значення дії хімозину полягає в утворенні згустку білків казеїнового комплексу в шлунку і кращого їх засвоєння [1]. При цьому не потрібна висока протеолітична активність, яка може спричинити утворення пептидів – інгібіторів і загальмувати процес ферментативної коагуляції казеїнів.

Коагуляція казеїнових міцел хімозином – складний і багатостадійний процес, деталі його до кінця не з'ясовані. Це зумовлено в першу чергу складністю будови казеїнових міцел, залежністю процесу коагуляції від багатьох факторів, які впливають не тільки на активність хімозину, але й на будову і властивості казеїну [236]. Весь процес взаємодії хімозину та казеїнових міцел молока поділяють на три стадії: ферментативна стадія; агрегація казеїнів; утворення згустку.

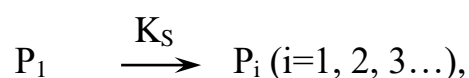
Перша стадія описується рівнянням одностадійної ферментативної реакції:



де  $P_1$  – неагреговані міцели казеїну;

$M$  – глікомакропептид  $\kappa$ -казеїну (f 106-169).

Друга стадія відбувається як процес бімолекулярної агрегації:



де  $K_S$  – константа швидкості утворення агрегатів міцел  $P_i$ .

Під час першої стадії хімоzin специфічно розщеплює чутливий пептидний зв'язок  $\kappa$ -казеїну (Фен<sub>105</sub>-Мет<sub>106</sub>). При цьому звільняється гідрофільний макропептид, який містить олігосахаридні групи. Пара- $\kappa$ -казеїн (гідрофобний домен) залишається в складі міцели. За час коагуляції казеїнових міцел хімоzin гідролізує до 90 % згаданих зв'язків  $\kappa$ -казеїну.

Межа між ферментативною стадією і стадією агрегації досить умовна [326]. Під час ферментативної стадії казеїнові міцели постійно змінюються. На початку дії ферменту відбувається дезінтеграція міцел на менші частинки, які мають кратну величину до субміцел. При цьому зменшується в'язкість розчину. У другій половині ферментативної стадії починається агрегація міцел, яка супроводжується збільшенням в'язкості й завершується в другій стадії. Надмолекулярні структури, які утворюються в другій і третій стадіях коагуляції, виникають за рахунок гідрофобних взаємодій, кальційфосфатних мостиків та меншою мірою за рахунок водневих і дисульфідних зв'язків [44].

Протеоліз казеїнів не завершується розщепленням к-казеїну на першій стадії [184, 235]. Було показано, що хімозин здатний розщеплювати інші пептидні зв'язки в основних казеїнових фракціях. Так, знайдено 24 сайти у  $\alpha_{S1}$ -казеїну і 9 сайтів у  $\beta$ -казеїну, які чутливі до дії хімозину. Протеоліз по цих сайтах відбувається зі значно меншою інтенсивністю. Дослідження його залежності від таких факторів, як температура, рН і іонна сила показало, що специфічність протеолізу  $\alpha_{S1}$ - і  $\beta$ -казеїнів визначається характером їхнього розміщення в агрегатах казеїнових міцел.

Сичужний фермент, а також інші види натуральних молокозсідальних препаратів містять домішки пепсину [1, 18]. Тому ці препарати, на відміну від хімозину, можуть активно розщеплювати всі казеїнові фракції молока. Це так званий «неспецифічний протеоліз». Розщеплення к-казеїну хімозином у хімії молочних продуктів називають специфічним протеолізом. В останні десятиліття в промисловості використовують переважно препарати рекомбінантного хімозину. Вони не містять пепсину, є більш економічними й ефективними [7]. За специфічністю протеолізу молочних протеїнів і властивостями рекомбінантний хімозин не відрізняється від натурального.

### **3.3.2.5 Модельна протеолітична система для виявлення біоактивних пептидів з протеїнів молока**

Враховуючи наведені дані про активність і специфічність дії природних ензимів молока, молокозсідальних препаратів і протеолітичних систем лактобактерій, можна цілком обґрунтовано сподіватися на утворення великої кількості біоактивних пептидів у процесі виробництва молочних продуктів. Особливо це актуально в продуктах, де одночасно діють усі три групи протеолітичних ензимів і де відбувається тривалий протеоліз. Насамперед це стосується

твердих сичужних сирів. Також велику різноманітність пептидів, але в меншій концентрації можна отримати у ферментованих молочних продуктах, де задіяні протеолітичні системи різних лактобактерій. Перші вдалі спроби виявити біоактивні пептиди в молочних продуктах були зроблені в кінці 90-х років минулого століття і на початку 2000-х років. З різних видів сирів, а пізніше і кисломолочних продуктів і навіть молока було виділено та ідентифіковано окремі біоактивні пептиди з встановленням їхньої біологічної дії [202, 495, 521, 523].

Дослідження біоактивних пептидів у ферментованих молочних продуктах пов'язане зі значними труднощами. Це порівняно низька протеолітична активність більшості лактобактерій, велика різноманітність продуктів протеолізу і одночасно мала концентрація кожного індивідуального пептиду. Все це ускладнює виділення та ідентифікацію індивідуальних пептидів або виявлення їх за біологічною дією.

У зв'язку з цим виникла необхідність створення модельної протеолітичної системи, яка дозволила б, з одного боку, інтенсифікувати процеси протеолізу казеїнів ензимами молочнокислих бактерій і отримати велику кількість продуктів протеолізу, а з іншого боку давала б можливість відтворити умови протеолізу, які мають місце під час виробництва певного молочного продукту.

Раніше для дослідження процесів протеолізу в молочних продуктах використовували різні модельні системи [103, 161, 540, 541]. Найчастіше ці системи застосовували при дослідженні процесів протеолізу загального казеїну або його фракцій штамами молочнокислих бактерій, вирощених на штучних поживних середовищах [271]. При цьому умови протеолізу відрізнялися від умов, які є в молоці, оскільки відомо, що компоненти штучного середовища впливають на співвідношення і активність протеолітичних ензимів молочнокислих бактерій [517]. Відомі також

моделі протеолізу казеїнів ензимами, виділеними з клітин лактобактерій. Це дозволило встановити властивості і специфічність окремих протеолітичних ензимів, але спільна дія всіх протеаз лактобактерій при цьому залишається не з'ясованою. При моделюванні протеолізу у твердих сичужних сирах їх виробляли в асептичних умовах із використанням тільки молокозсідальних препаратів або їх комбінації з певним штамом лактобактерій [79, 540]. Така модельна система дозволила встановити походження смакових казеїнових пептидів, але вона має такий же недолік, як і пряме виділення пептидів із ферментованих продуктів: у результаті протеолізу утворюється багато різних пептидів в незначній кількості, що ускладнює виділення та ідентифікацію біологічно активних пептидів.

З метою отримання продуктів протеолізу окремих фракцій казеїну ми здійснювали інокуляцію в стерильні розчини  $\alpha_{S1}$ - і  $\beta$ -казеїнів відібраних протеолітично активних штамів лактококів, вирощених у молочному середовищі. Проте, навіть при довготривалій інкубації (до 7 днів), при цьому одержували низьку концентрацію продуктів протеолізу (3-6 мг%). Лактококи повільно росли в розчинах казеїнових фракцій і кількість клітин була недостатньою для отримання високих концентрацій пептидів. Водночас, збільшувати кількість інокульованих лактококів не можна було, оскільки при цьому вносились компоненти поживного середовища. Як відомо, при вирощуванні лактобактерій у молочному середовищі основною проблемою є очищення клітин від казеїнів, які коагулюють і утворюють згустки. Коагуляцію викликали як молочна кислота, так і протеолітичні ферменти лактобактерій.

Для отримання великої кількості продуктів протеолізу казеїнів необхідно було проводити інкубацію казеїнів з високими концентраціями лактобактерій, вирощених у природному молочному середовищі та очищених від його компонентів [31, 33]. У першу чергу

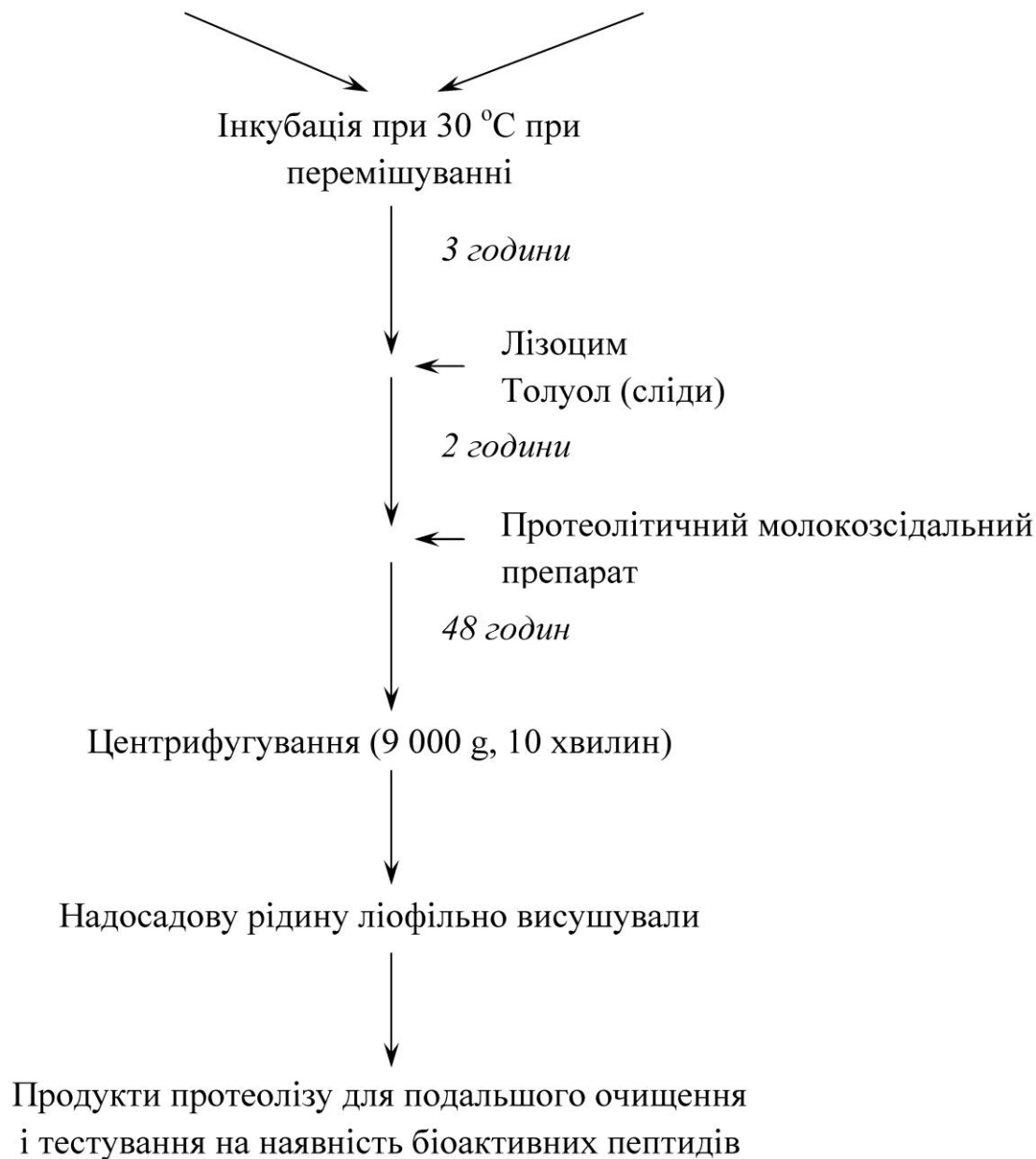
це стосується коагульованих казеїнів. Для цього ми використали  $\beta$ -гліцерофосфат, який, як показали Т. Томас і О. Мілс [517], запобігає коагуляції казеїнів, не впливає на склад протеолітичних ензимів лактобактерій під час вирощування у молоці і дозволяє отримати високу концентрацію клітин лактобактерій.

Схема запропонованої нами модельної протеолітичної системи показана на рис. 41. Крім  $\beta$ -гліцерофосфату для вирощування і виділення лактококів наша система передбачає на другому етапі протеолізу казеїнів штучний лізис лактобактерій, що призводить до звільнення внутрішньоклітинних протеолітичних ензимів, а також можливе використання молокозсідальних ферментних препаратів. Інші фактори (рН, температура, концентрації солей) задаються відповідно до технології конкретного молочного продукту, яка моделюється.

У результаті застосування такої модельної системи можна отримати до 40 мг% продуктів протеолізу при використанні різних штамів лактококів, а при використанні їх у комбінації з молокозсідальними препаратами – до 70 мг% [566, 567, 568]. Після проведення протеолізу й осадження нерозчинних компонентів середовища низькомолекулярні продукти протеолізу фракціонували гель-фільтрацією на сефадексі G-25. На рис. 42-45 показані результати фракціонування й електрофоретичного аналізу продуктів протеолізу  $\alpha_{S1}$ -CN і  $\beta$ -CN у модельній системі з використанням протеолітично активного штаму *L. lactis subsp. lactis* 1<sub>12</sub> і молокозсідальних препаратів. Виділені фракції ліофільно висушували і використовували для тестування на наявність біоактивних пептидів [27, 28, 569].

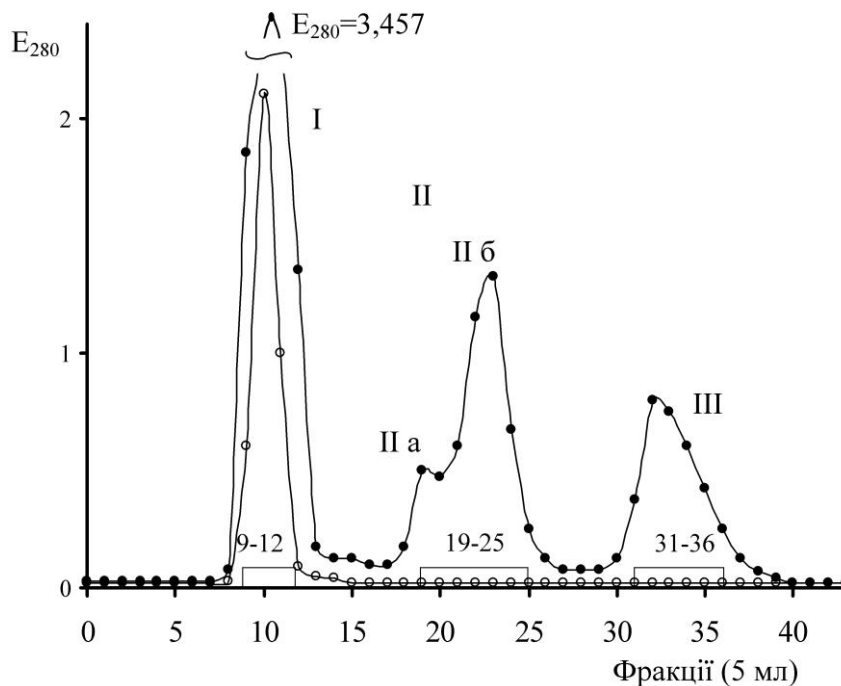
Біомаса лактококів, отримана в молочному середовищі у присутності  $\beta$ -гліцерофосфату. Після концентрування –  $10^{10}$  клітин/мл

1 % розчин казеїнових фракцій в 0,05 М ацетатному буфері (рН 5,5)

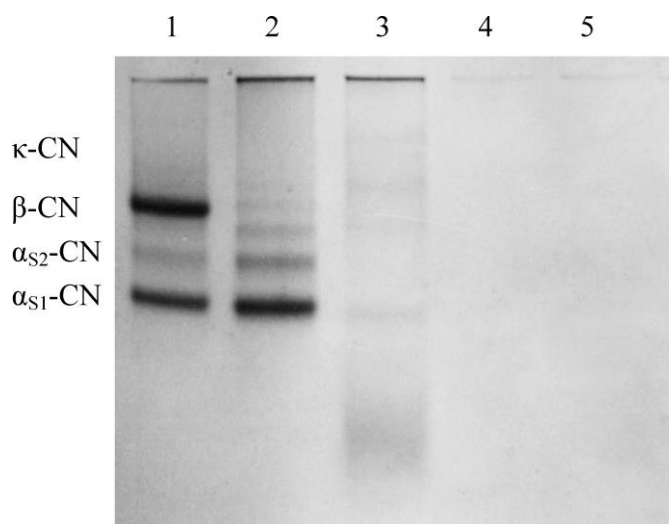


**Рис. 41. Схема проведення модельного протеолізу казеїнових фракцій ензимами лактококів та молокозсідальних препаратів**

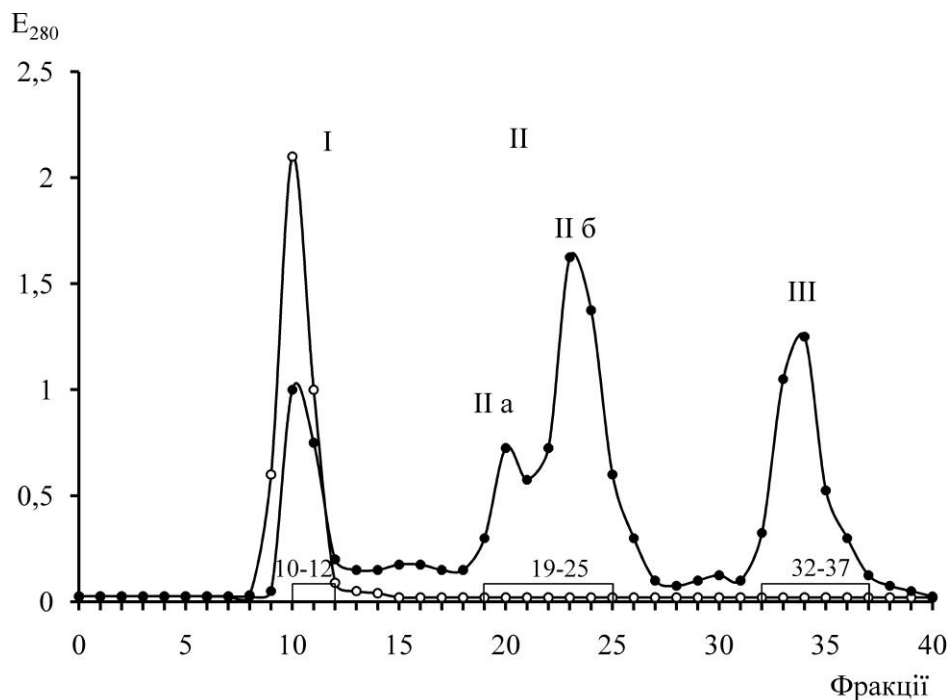




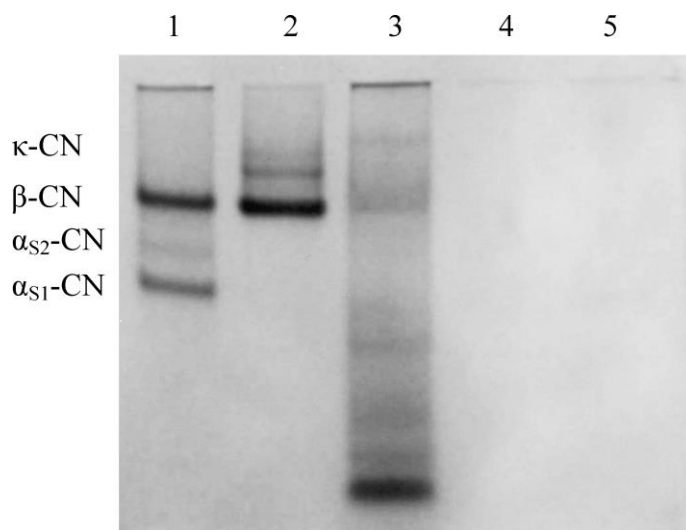
**Рис. 42.** Хроматограма  $\alpha_{S1}$ -казеїну (○) та водорозчинних продуктів протеолізу  $\alpha_{S1}$ -казеїну (●) після інкубації зі штамом I<sub>12</sub> *Lactococcus lactis subsp. lactis*



**Рис. 43.** Електрофореграма загального казеїну (1),  $\alpha_{S1}$ -казеїну після трьох годин інкубації з лактококами (2) та хроматографічних фракцій I (3), II (4) і III (5), одержаних після розділення продуктів протеолізу  $\alpha_{S1}$ -казеїну на сефадексі G-25 (рис. 42)



**Рис. 44.** Хроматограма β-казеїну (○) та водорозчинних продуктів протеолізу β-казеїну (●) після інкубації зі штамом I<sub>12</sub> *Lactococcus lactis subsp. lactis* та пепсином



**Рис. 45.** Електрофореграма загального казеїну (1), β-казеїну після трьох годин інкубації з лактококами штаму I<sub>12</sub> (2) та хроматографічних фракцій I (3), II (4) і III (5), одержаних після розділення продуктів протеолізу β-казеїну на сефадексі G-25 (рис. 44)

Серед біологічно активних пептидів казеїнового походження найбільш поширеними й перспективними для застосування є інгібітори АПЕ (казокініни). Їхня дія добре вивчена і вони можуть знайти застосування при гіпертензії людей [6, 179, 318, 330, 390]. У зв'язку з цим отримані в модельній системі продукти протеолізу були протестовані на інгібіторну дію щодо АПЕ при використанні синтетичного субстрату гіпурил-L-гістидил-L-лейцину. Проведені дослідження показали, що інгібіторну дію на АПЕ проявляють лише низькомолекулярні (< 1000 Да) пептиди третьої хроматографічної фракції, отриманої з  $\alpha_{S1}$ - і  $\beta$ -казеїнів (табл. 40). Продукти протеолізу  $\alpha_{S2}$ - і  $\kappa$ -казеїнів знижували активність АПЕ менше, ніж на 5 %, що можна пояснити неспецифічним впливом на ензим [27, 28, 568].

**Таблиця 40. Інгібіторна дія низькомолекулярних продуктів протеолізу  $\alpha_{S1}$ - і  $\beta$ -казеїнів (хроматографічна фракція III) на активність АПЕ ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Варіанти дослідів	Концентрація розчинних у ТХО продуктів протеолізу, мкг/мл	Інгібіторний ефект стосовно АПЕ, %
$\beta$ -казеїн + штам I <sub>12</sub>	348±25	51,9±0,7
$\beta$ -казеїн + пепсин	194±13	<5
$\beta$ -казеїн + фромаза	171±11	<5
$\beta$ -казеїн + штам I <sub>12</sub> + пепсин	419±17	82,5±0,9
$\beta$ -казеїн + штам I <sub>12</sub> + фромаза	397±14	67,2±0,5
$\alpha_{S1}$ -казеїн + штам I <sub>12</sub>	317±23	27,3±0,5
$\alpha_{S1}$ -казеїн + пепсин	234±19	<5
$\alpha_{S1}$ -казеїн + фромаза	503±25	5,2±0,1
$\alpha_{S1}$ -казеїн + штам I <sub>12</sub> + пепсин	521±27	43,3±0,5
$\alpha_{S1}$ -казеїн + штам I <sub>12</sub> + фромаза	847±37	37,9±0,6

Аналіз відомих даних стосовно специфічності приклітинних протеїназ лактококів щодо  $\alpha_{S1}$ - і  $\beta$ -казеїнів показує, що в результаті протеолізу цих казеїнових фракцій можуть утворюватися численні пептиди (від 3 до 25 амінокислотних залишків), серед яких ідентифіковані інгібітори АПЕ [39, 40, 60]. Молокозсідальні препарати (пепсин, фромаза) посилюють утворення казокінінів з  $\alpha_{S1}$ - і  $\beta$ -казеїнів. Про можливість такого ефекту писав Г. Мейзель [330]. Дві фракції казеїнів ( $\kappa$ -CN і  $\alpha_{S2}$ -CN) не показали інгібіторної дії після інкубації з лактококами та молокозсідальними препаратами, хоч у літературі описані казокініни, які утворюються з  $\kappa$ - і  $\alpha_{S2}$ -казеїнів. Утворення казокінінів за сумісної дії лактококів і пепсину може свідчити про те, що протеолітичні ензими лактококів звільняють попередники казокінінів, які далі перетворюються в казокініни при розщепленні протеазами шлунково-кишкового тракту.

Таким чином, розроблена нами схема модельного протеолізу доводить можливість утворення казокінінів у результаті розщеплення казеїну ензимами лактококів, особливо внаслідок їхньої сумісної дії з протеолітичними ензимами молокозсідальних препаратів.

Отримані нами результати свідчать про можливість утворення казокінінів у результаті протеолітичних процесів, які проходять при виготовленні молочних продуктів, а штами лактококів, які розщеплюють казеїни під час модельного протеолізу зі звільненням інгібіторів АПЕ, також можуть спричиняти утворення їх у молочних продуктах. Попереднє тестування штамів на здатність утворювати інгібітори АПЕ може бути використане при створенні стартових культур для виробництва функціональних ферментованих молочних продуктів.

### 3.3.2.6 Вторинні біоактивні пептиди в молочних продуктах

Починаючи з кінця 90-х років минулого століття і до теперішнього часу було ідентифіковано багато інгібіторів АПЕ, а також інших біоактивних пептидів у результаті ферментації молока живими

лактобактеріями або внаслідок дії виділених із них протеолітичних ензимів на протеїни молока (табл. 41). В останні роки з використанням методів сучасної хроматографії, маспектрометрії у молочних продуктах були виявлені різні біоактивні пептиди з казеїнів і протеїнів сироватки (табл. 42). Очевидно, вони утворюються завдяки широкій специфічності ензимів, які беруть участь у протеолізі, і (або) особливостям будови протеїнів молока, зокрема доступності певних пептидних зв'язків для протеолітичних ензимів. Дійсно, при співставленні ділянок первинної структури казеїнів, що містять послідовності казокінінів, і пептидних зв'язків, які піддаються гідролізу ензимами лактококів, молокозсідальних препаратів та травних ензимів [266, 272], можна відзначити їхній збіг. Особливо це помітно у  $\beta$ -казеїну (ділянки 47-54, 56-70, 159-175). Явище утворення біоактивних пептидів під час фізіологічного або технологічного протеолізу протеїнів казеїнового комплексу і сироватки розширює уявлення не тільки про біологічну цінність протеїнів молока, але й саме поняття біологічної цінності протеїнів [25]. На рис. 46 показано протеолітичні процеси, які можуть призвести до утворення біологічно активних пептидів у молочних продуктах. Залишається відкритим питання стосовно біохімічних механізмів детермінації цих процесів і їх практичного використання.

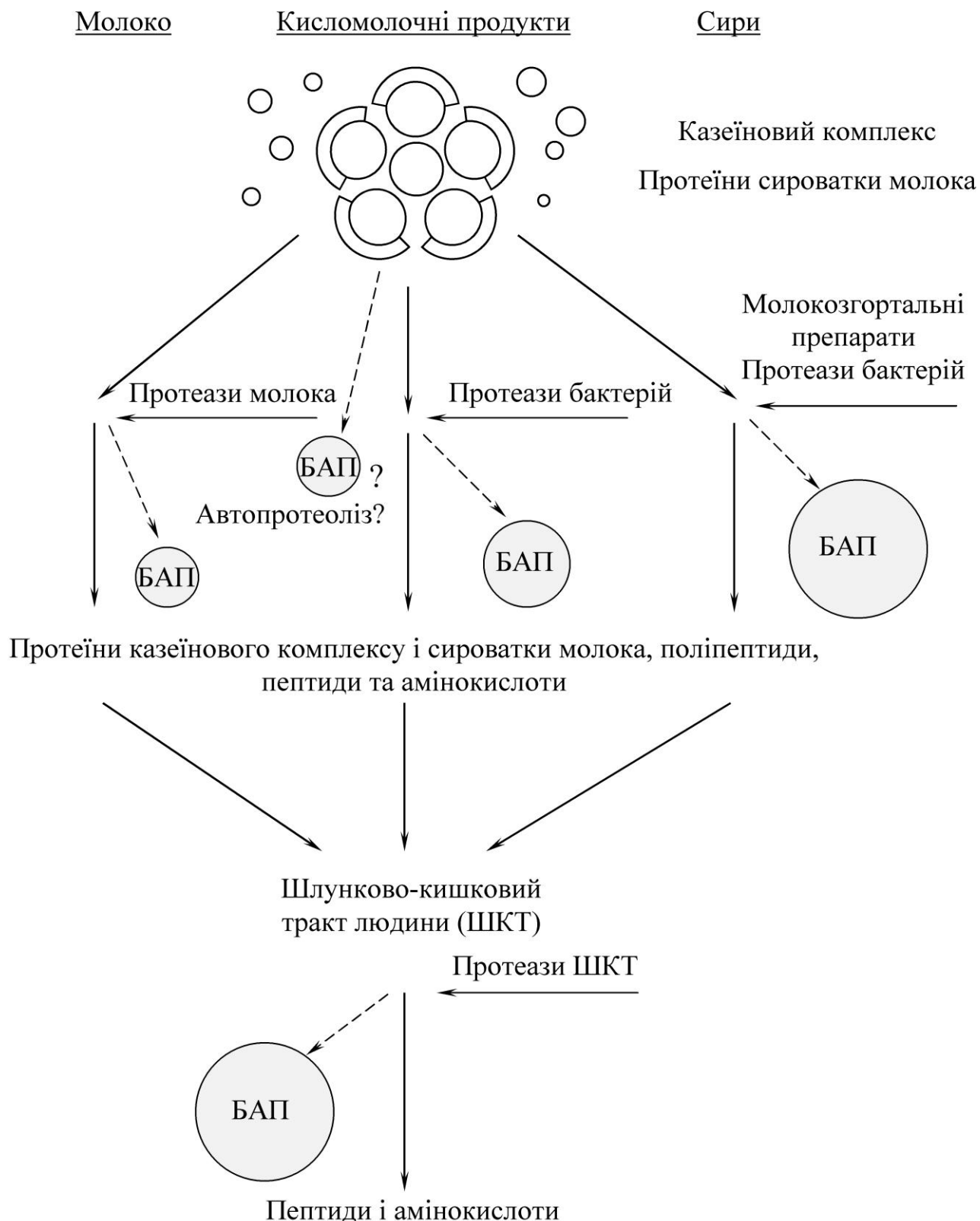
Створення функціональних молочних продуктів з біоактивними пептидами може здійснюватися декількома шляхами. По-перше, це забезпечення умов для утворення таких пептидів під час протеолітичних процесів, які супроводжують виробництво молочних продуктів. Другий шлях полягає в отриманні біоактивних пептидів (синтезом або обмеженим протеолізом) і подальшим їх використанням у складі функціональних продуктів. Синтез біоактивних пептидів аналогічних природним є дорогим процесом і частіше використовується в медицині для отримання лікарських засобів. У харчових технологіях більш прийнятними є протеоліз протеїнів молока для виділення біоактивних пептидів або створення умов для їх утворення в молочних продуктах.

**Таблиця 41. Біоактивні пептиди, які утворюються в результаті дії протеолітичних систем лактобактерій на протеїни молока**

Мікроорганізми	Протеїн-попередник	Первинна структура пептиду	Біологічна активність
1	2	3	4
<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\beta$ -казеїн, к-казеїн	Вал-Про-Про, Іле-Про-Про	Інгібітори АПЕ
<i>Lactobacillus</i> GG (ензими) + пепсин і трипсин	$\beta$ -казеїн, $\alpha_{S1}$ -казеїн	Тир-Про-Фен-Про, Ала- Вал-Про-Тир-Про-Глн- Арг, Тре-Тре-Мет-Про-Лей-Три	Опіод, інгібітори АПЕ, імуностимулятори
<i>Lb. helveticus</i> CP90 (протеїназа)	$\beta$ -казеїн	Ліз-Вал-Лей-Про-Вал- Про-(Глу)	Інгібітори АПЕ
<i>Lb. helveticus</i> CPN4	Протеїни сироватки	Тир-Про	Інгібітори АПЕ
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> SS1 IFO 13953	к-казеїн	Ала-Арг-Гіс-Про-Гіс-Про- Гіс-Лей-Сер-Фен-Мет	Антиоксиданти
<i>Lb. rhamnosus</i> + гідроліз пепсином і Corolase PP	$\beta$ -казеїн	Асп-Ліз-Іле-Гіс-Про-Фен, Тир-Глн-Глу-Про-Вал- Лей, Вал-Ліз-Глу-Ала- Мет-Ала-Про-Ліз	Інгібітори АПЕ, антиоксиданти
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	$\beta$ -казеїн	Сер-Ліз-Вал-Тир-Про- Фен-Про-Глі-Про-Іле	Інгібітори АПЕ
<i>Lb. helveticus</i> ICM 1004 (екстракт)	Гідролізат із знежиреного молока	Вал-Про-Про, Іле-Про-Про	Інгібітори АПЕ
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> F3	$\alpha_{S1}$ -казеїн	Арг-Про-Ліз-Гіс-Про-Іле- Ліз-Гіс-Глн	Інгібітори АПЕ
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 3923 і <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> F3	$\beta$ -казеїн	Сер-Ліз-Вал-Лей-Про-Вал- Про-Глу	Інгібітори АПЕ
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 3923 і <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> F3	$\beta$ -казеїн	Лей-Лей-Тир-Глн-Глі- Про-Вал-Лей-Глі-Про- Вал-Арг-Глі-Про-Фен- Про-Іле-Іле-Вал	Імуномодулятор
<i>Lb. helveticus</i> 1198	$\beta$ -казеїн	Вал-Сер-Ліз-Вал-Ліз-Глу- Ала	Інгібітори АПЕ

**Таблиця 42. Біоактивні пептиди, ідентифіковані в молочних продуктах [112, 259, 260]**

Продукти	Ідентифіковані біоактивні пептиди	Біологічна дія	Посилання
1	2	3	4
<b><i>Сири</i></b>			
Чеддер	$\alpha_{S1}$ -CN (f 1-6), (f 1-7), (f 1-9), (f 24-32), (f 102-110) $\beta$ -CN (f 47-52), (f 193-209)	Інгібітори АПЕ	Ong et al. (2007)
Чеддер	Активні пептиди з протеїнів молока	Антимікробні, антигіпертензивні, антиоксидантні	Pritchard et al. (2011)
Різні види (44) твердих, напівтвердих і м'яких сирів	Вал-Про-Про, Іле-Про-Про	Інгібітори АПЕ	Bütikafer et al. (2007)
Гауда	$\alpha_{S1}$ -CN (f 1-9), $\beta$ -CN (f 60-68)	Інгібітори АПЕ	Saito et al. (2000)
Festivo	$\alpha_{S1}$ -CN (f 1-6), (f 1-7), (f 1-9)	Інгібітори АПЕ	Ryhänen et al. (2001)
Emmental	Фрагменти $\alpha_{S1}$ -CN і $\beta$ -CN	Імуностимулятори, антимікробні, фосфопептиди	Gagnaire et al. (2001)
Artisanal Coahlo	Активні пептиди з протеїнів молока	Антикоагулянти, антимікробні	Silva et al. (2012)
Emmental	Активні пептиди з протеїнів молока	Інгібітори АПЕ	Parrot et al (2003)
<b><i>Ферментовані молочні продукти</i></b>			
Кисле молоко	$\beta$ -CN (f 74-76), (f 84-86), $\kappa$ -CN (f 108-111)	Інгібітори АПЕ	Nakamura et al. (1995) ]
Dahi	Сер-Ліз-Вал-Тир-Про	Інгібітори АПЕ	Ashar and Chand (2004)
Ферментоване молоко	Ліз-Вал-Лей-Про-Вал-Про-Глн	Антиоксиданти	Hernandez-Ledesma et al. (2005)
Йогурт	Активні пептиди з протеїнів молока	Антиоксиданти	Sanlidere Aloglu and Öner (2011)



**Рис. 46. Можливі шляхи утворення біологічно активних пептидів (БАП) із протеїнів молока**



### **3.3.3 Виділення біоактивних пептидів із протеїнів молока**

#### **3.3.3.1 Методи ідентифікації протеїнів-попередників біоактивних пептидів**

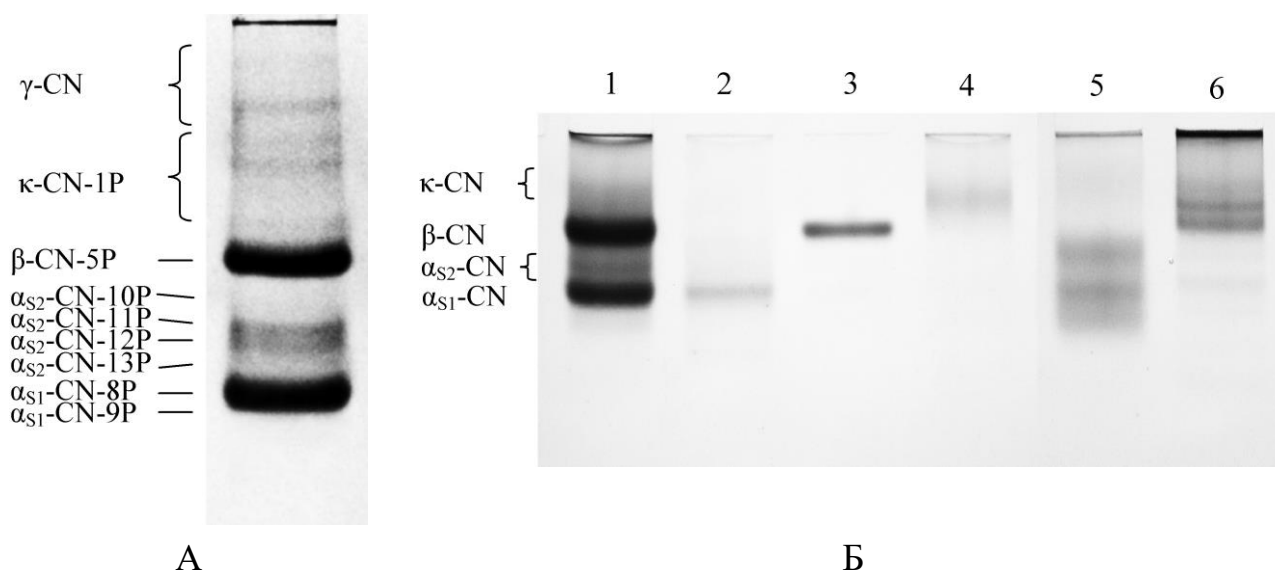
Аналіз розміщення біоактивних пептидів у первинній структурі протеїнів молока свідчить про доцільність використання індивідуальних протеїнів-попередників або їхніх груп для виділення БАП із певною біологічною дією. У зв'язку із цим розробка способів отримання БАП тісно пов'язана з постійним контролем фракційного складу та ідентифікацією протеїнів-попередників з допомогою доступного та ефективного експрес-методу.

У лабораторних дослідженнях для кількісного і якісного аналізу протеїнів молока використовують хроматографічні та електрофоретичні методи [35, 37, 184, 479, 573, 578]. Основними недоліками хроматографічних методів є дороге обладнання і реактиви, а також неможливість проведення одночасного порівняльного аналізу серій зразків. Більше підходять для експрес-аналізу електрофоретичні методи. Ефективним методом аналізу протеїнів молока є електрофорез у поліакриламідному гелі (ПАГ). Одновимірний електрофорез у стовпчиках або пластинках ПАГ дозволяє надійно ідентифікувати всі основні й деякі мінорні фракції [44, 78]. Варіанти двовимірного електрофорезу ефективно використовуються в протеоміці сироватки молока та дозволяють виявити десятки основних і сотні мінорних протеїнових фракцій [112, 122, 187, 589].

Комітет з номенклатури і методології протеїнів молока американської асоціації молочних наук рекомендує використовувати одновимірну анодну систему ПАГ у присутності сечовини для аналізу казеїнів і систему диск-електрофорезу в присутності додецилсульфату натрію (ДСН) для протеїнів сироватки молока [167]. У нашій лабораторії для аналізу протеїнів сироватки молока була успішно застосована модифікована аналітична система диск-електрофорезу Девіса для кислих і нейтральних протеїнів у нативних умовах [34]. Електрофоретичні системи для одночасного аналізу казеїнів і протеїнів сироватки неефективні через велику

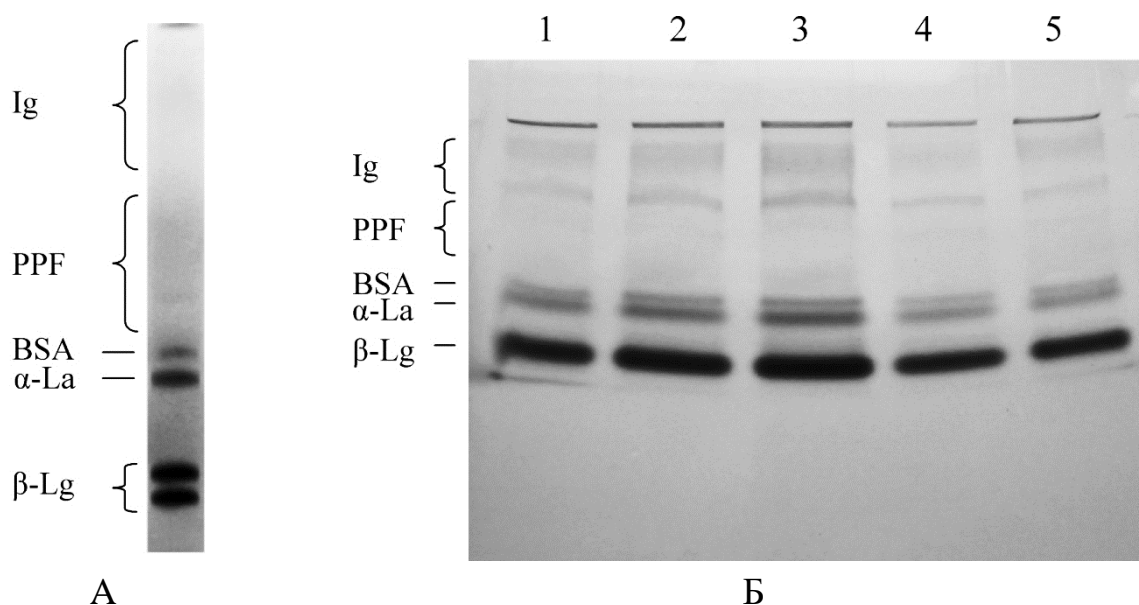
гетерогенність протеїнів молока та подібність значень їх електрофоретичної рухливості. У зв'язку з цим нами було окремо розроблені методики електрофорезу для експрес-аналізу казеїнів і протеїнів сироватки молока.

При аналізі казеїнів найбільш поширена для аналізу протеїнів електрофоретична система ПАГ із ДСН виявилась малоефективною. Це пов'язано з аномальним характером взаємодії фракцій казеїну з ДСН, а також близькими значеннями молекулярних мас  $\alpha_{S1}$ - і  $\alpha_{S2}$ -груп казеїнів [577]. Анодні системи електрофорезу за присутності сечовини дозволяють ідентифікувати казеїнові фракції відповідно до сучасної класифікації [167]. Проте вони не розраховані на проведення оперативного дослідження великої кількості зразків і основним недоліком є висока тривалість аналізу. Результати електрофорезу загального казеїну в такій системі показані на рис. 47 (А). На електрофореграмі можна побачити характерний розподіл усіх відомих фракцій казеїну коров'ячого молока відповідно до міжнародної класифікації. Всього на електрофореграмі ідентифікуються понад 13 фракцій. Їхня кількість при використанні молока від різних тварин варіює від 13 до 15 залежно від кількості  $\kappa$ -казеїнів, які відрізняються вмістом негативно заряджених олігосахаридних груп. Для адаптації цієї системи для експрес-аналізу було збільшено значення рН буферу для гелю, для взірців та електродного буферу, знижена концентрація ПАГ, вилучено  $\beta$ -меркаптоетанол і зменшені розміри електрофоретичної камери [240]. Відсутність  $\beta$ -меркаптоетанолу не впливає на якість розділення, оскільки в експрес-варіанті електрофоретичної системи мінорні фракції, які містять залишки цистеїну ( $\kappa$ - і  $\alpha_{S2}$ -казеїни) рухаються однією смугою. Через 45 хвилин аналізу вже можна ідентифікувати основні казеїнові попередники БАП, а через 90 хвилин можна отримати якісні електрофореграми (рис. 47 (Б)) для денситометрії. Важливим є також те, що протеїни сироватки молока (рис. 47 (Б<sub>5</sub>)) і протеїни бобів сої (рис. 47 (Б<sub>6</sub>)) у запропонованій системі відрізняються за електрофоретичною рухливістю. Таким чином ця методика може бути корисна для аналізу натуральності молочних продуктів.



**Рис. 47. А – Електрофореграма загального казеїну молока, отримана в аналітичній системі однорідного ПАГ. Б – Електрофореграма загального казеїну (1),  $\alpha_{S1}$ -казеїну (2),  $\beta$ -казеїну (3),  $\kappa$ -казеїну (4), протеїнів сироватки молока (5), протеїнів сої (6), отримана з допомогою експрес-системи в присутності сечовини [240]**

Обидві аналітичні системи диск-електрофорезу (з ДСН і в нативних умовах), які використовуються для ідентифікації протеїнів сироватки молока занадто складні й довготривалі. Для адаптації до експрес-аналізу на основі системи диск-електрофорезу в нативних умовах (рис. 48 (А)) нами була розроблена система однорідного ПАГ [580]. Причому за рахунок різниці в складі іонів буферу для ПАГ і електродного буферу вдалося зберегти ефект концентрування протеїнів сироватки в перші хвилини електрофорезу. Це забезпечує високу ефективність і відтворюваність експрес-системи (рис. 48 (Б)). Запропоновані електрофоретичні системи дозволяють оперативно ідентифікувати основні попередники БАП із казеїнового комплексу ( $\alpha_{S1}$ -CN,  $\alpha_{S2}$ -CN,  $\beta$ -CN і  $\kappa$ -CN) та протеїнів сироватки молока ( $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La, BSA і Ig).



**Рис. 48. А – Електрофореграма протеїнів сироватки молока, отримана в аналітичній системі диск-електрофорезу. Б – Електрофореграма п'яти зразків сироватки молока (1-5), отримана з допомогою експрес-системи однорідного ПАГ в нативних умовах [580]**

### 3.3.3.2 Виділення основних протеїнів-попередників біоактивних пептидів

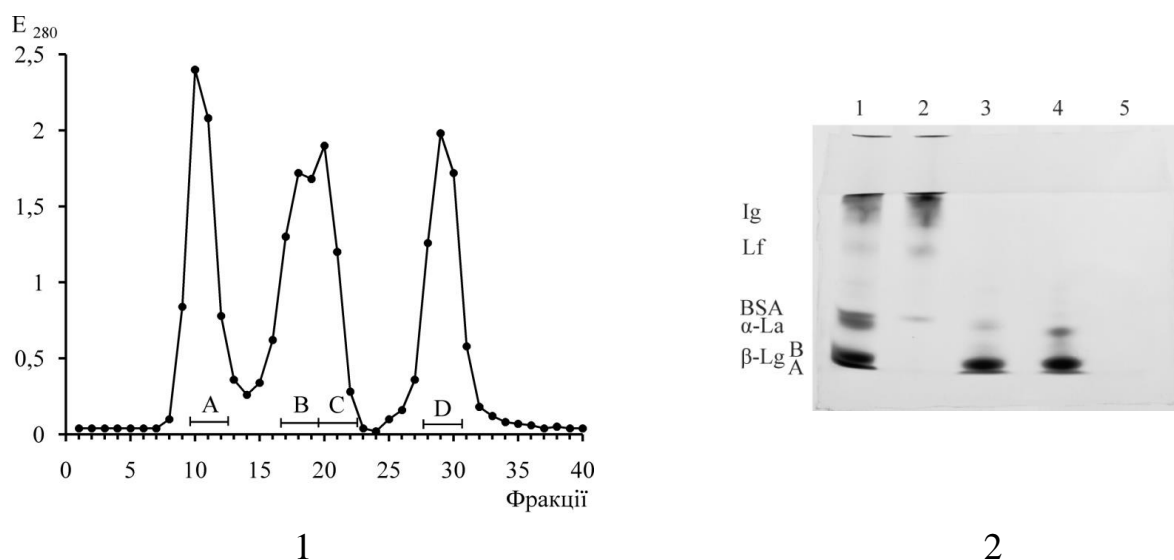
Перші біоактивні пептиди отримували із загального протеїну молока або з казеїнового комплексу чи протеїнів сироватки [126]. В результаті наповнення баз даних і встановлення розподілу пептидів між фракціями за біологічною дією стало зрозуміло, що в більшості випадків для отримання БАП як субстрати для специфічного протеолізу необхідно використовувати окремі гомогенні фракції або їх комбінації [65, 303, 425]. Це потрібно в першу чергу для детального вивчення механізмів дії, а також розробки доступних способів виділення БАП, у тому числі в промислових масштабах. Наявні лабораторні методи виділення індивідуальних протеїнів молока є складними, багатостадійними, що часто призводить до змін їх структури і складу протеїнів [30, 93, 256, 287, 570, 571, 572]. Нечисленні промислові методи виділення протеїнових

фракцій із молока були розроблені для харчових систем і не забезпечують достатній ступінь гомогенності [184, 233, 326].

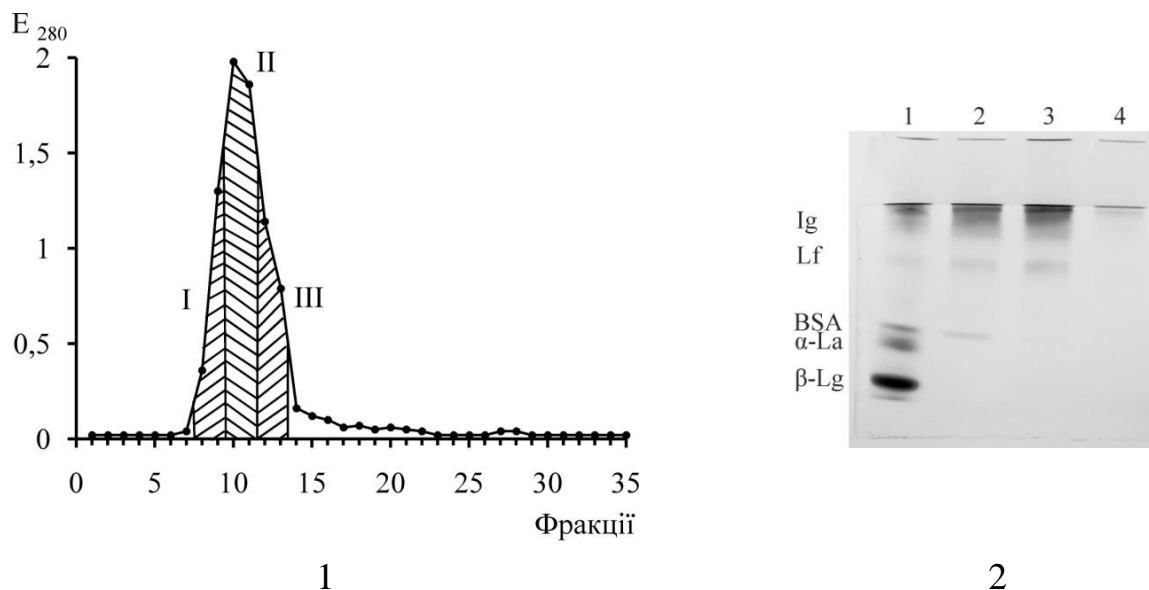
У зв'язку з цим перспективним способом фракціонування протеїнів сироватки молока може бути гель-фільтрація. Вона рідко використовується для отримання харчових компонентів, але її застосування для біологічно активних сполук може бути доцільним. Гель-фільтрація не відноситься до методів із високою роздільною здатністю, але має суттєві переваги [11]. Це мінімальне пошкодження молекул при фракціонуванні, а також можливість проведення фракціонування в широкому діапазоні значень рН, температури, складу іонів, тобто забезпечення умов для збереження структури та хімічного складу протеїнів. Властивості протеїнів сироватки молока на відміну від казеїнів дозволяють ефективно застосовувати гель-фільтрацію для їхнього фракціонування. Це велика різниця в молекулярних масах: Ig (>150000 Da), Lf (76110 Da), BSA (66399 Da),  $\beta$ -Lg (18363 Da) і  $\alpha$ -La (14178 Da); типова глобулярна будова молекул; хороша розчинність і відсутність тенденції до утворення агрегатів у фізіологічних умовах [21, 36, 184]. Гель-фільтрація успішно використовувалася для одночасного виділення нативних казеїнових міцел, загального протеїну сироватки, а також низькомолекулярних компонентів протеозо-пептонної фракції. Проте для отримання очищених індивідуальних протеїнів із сироватки молока вона недостатньо ефективна [325]. Для підвищення ефективності гель-фільтрації нами було використано повторне розділення, а також розділення хроматографічних піків на сектори [34, 576, 582].

Враховуючи діапазон молекулярних мас основних протеїнів сироватки молока для проведення гель-фільтрації було обрано сефадекс G-100. У результаті гель-фільтрації сироватки молока на колонці з цим сефадексом було отримано три піки, з яких один асиметричний було розділено на два сектори (рис. 49 (1)). Всього отримано чотири сектори з трьох піків. Далі було проведено електрофоретичний аналіз у поліакриламідному гелі протеїнового складу всіх секторів (рис. 49 (2)). Сектор А (перший пік) включав імуноглобуліни, лактоферин, альбумін

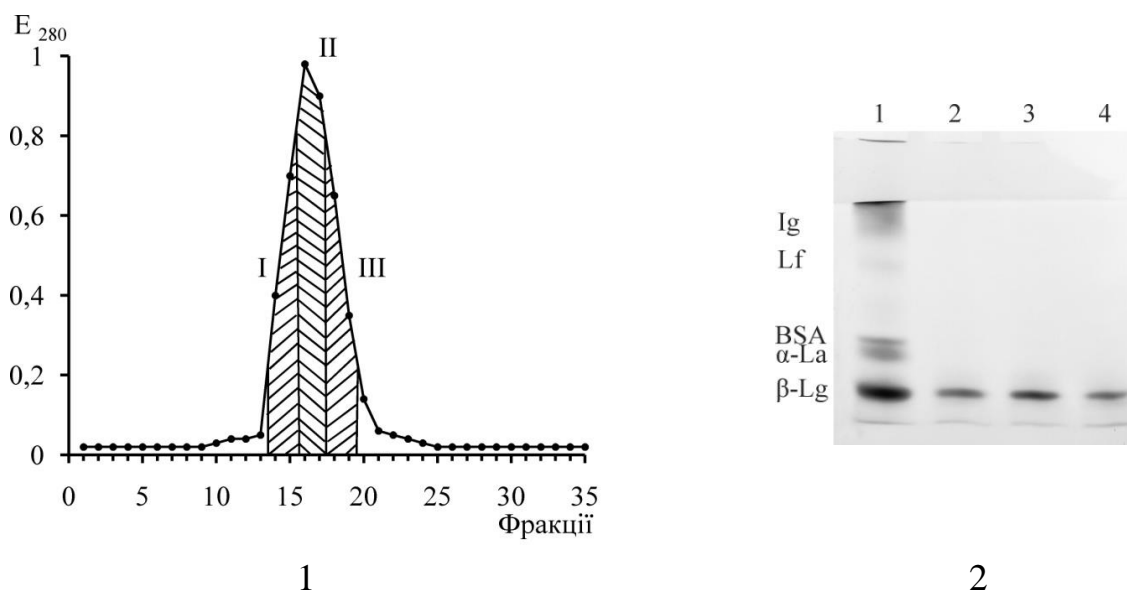
сироватки. Сектори В і С (другий пік) склалися з  $\beta$ -лактоглобуліну і  $\alpha$ -лактальбуміну в різних співвідношеннях. Компоненти сектору D (третьої пік) мали малу молекулярну масу й не містили протеїнів. Наступним етапом роботи було виділення гомогенних протеїнів сироватки. Для цього було проведено повторну гель-фільтрацію об'єднаних фракцій секторів А, В і С (рис. 50, 51, 52). Кожен з отриманих хроматографічних піків для аналізу протеїнового складу було поділено на три діапазони. Аналітичний електрофорез об'єднаних хроматографічних фракцій кожного діапазону показав, що в шести із дев'яти діапазонів були гомогенні протеїни-попередники біоактивних пептидів. У результаті проведеної таким чином повторної гель-фільтрації на сефадексі G-100 було отримано дві гомогенні фракції ( $\beta$ -лактоглобулін, імуноглобуліни), які разом за результатами трьох гель-фільтрацій становили 59 % від усього протеїну молочної сироватки. Обробка електрофореграм із використанням функції зчитування графічних зображень *imgread* показала високий ступінь гомогенності отриманих фракцій (імуноглобуліни > 90% і  $\beta$ -лактоглобулін > 94 %).



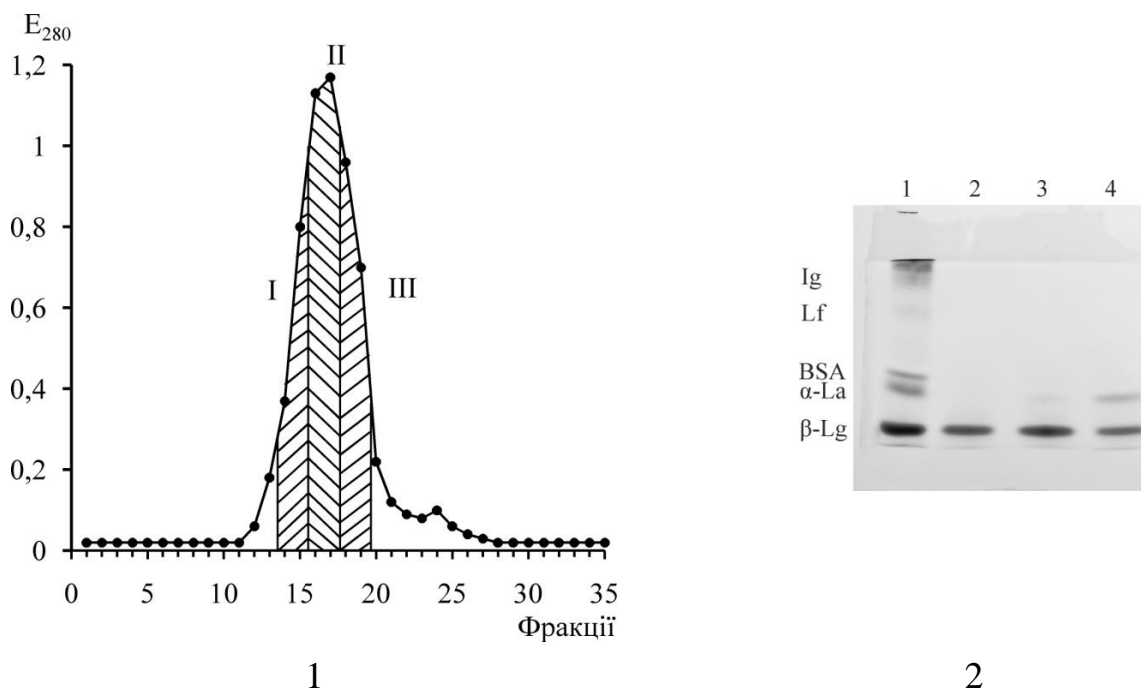
**Рис. 49. Хроматограма (1) протеїнів сироватки молока, отримана в результаті гель-фільтрації на сефадексі G-100. Електрофореграма (2) загального протеїну сироватки (2.1) та об'єднаних фракцій сектору А (2.2), сектору В (2.3), сектору С (2.4) і сектору D (2.5)**



**Рис. 50. Хроматограма (1) повторної гелі-фільтрації об'єднаних фракцій сектору А на сефадексі G-100. Електрофореграма (2) загального протеїну сироватки (2.1) та об'єднаних фракцій діапазонів I (2.4), II (2.3) і III (2.2)**



**Рис. 51. Хроматограма (1) повторної гелі-фільтрації об'єднаних фракцій сектору В на сефадексі G-100. Електрофореграма (2) загального протеїну сироватки (2.1) та об'єднаних фракцій діапазонів I (2.2), II (2.3) і III (2.4)**



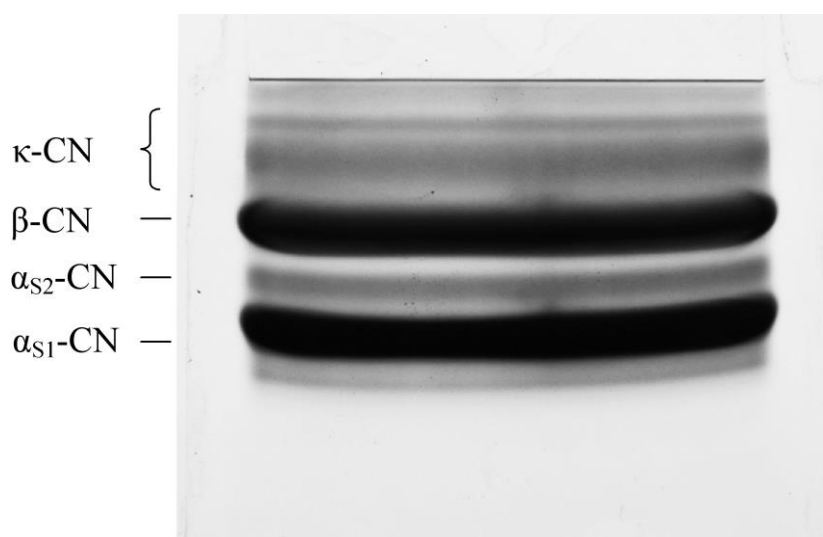
**Рис. 52. Хроматограма (1) повторної гель-фільтрації об'єднаних фракцій сектору С на сефадексі G-100. Електрофореграма (2) загального протеїну сироватки (2.1) та об'єднаних фракцій діапазонів I (2.2), II (2.3) і III (2.4)**

Іншим підходом до отримання гомогенних протеїнів-попередників БАП і з казеїнового комплексу, і з сироватки молока може бути препаративний електрофорез, причому він може мати хороші перспективи для використання в промислових масштабах. Основними вимогами до такої електрофоретичної системи є максимальне спрощення й забезпечення гомогенності всіх протеїнів-попередників. За основу для препаративного виділення казеїнових фракцій було взято анодну систему однорідного ПАГ за присутності сечовини [34]. У результаті змін у складі системи було скорочено тривалість електрофорезу до 50 хвилин. За рахунок модифікації електрофоретичної камери збільшено кількість казеїну в зразках (у 100 разів) [239]. Результат препаративного електрофорезу (повністю забарвлена пластина) показано на рис. 53. Запропонована система дозволяє розділяти граміві кількості загального казеїну на чотири групи казеїнів, які характеризуються однаковими первинними

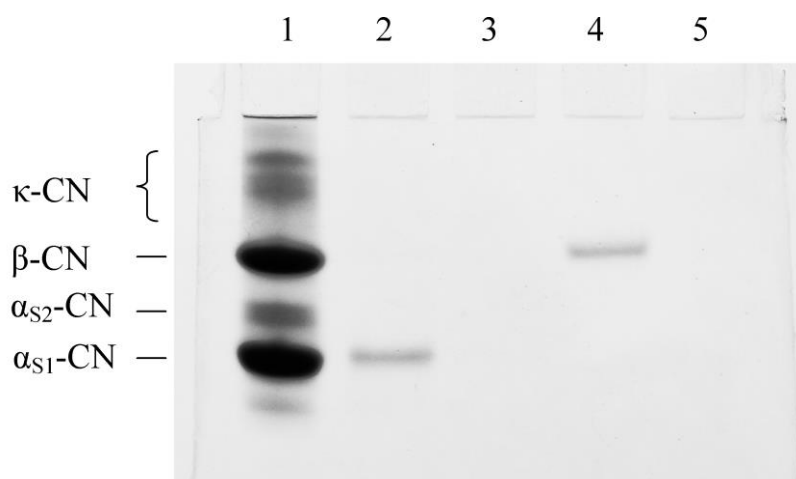


структурами і є попередниками БАП:  $\alpha_{S1}$ -казеїни,  $\alpha_{S2}$ -казеїни,  $\beta$ -казеїн і  $\kappa$ -казеїни. Після екстракції відповідних ділянок гелю отримані препарати казеїну аналізували на гомогенність (рис. 54). На електрофореграмі видно гомогенні фракції  $\alpha_{S1}$ -CN і  $\beta$ -CN. Смуги  $\kappa$ -CN і  $\alpha_{S2}$ -CN більш розмиті, оскільки вони складаються з декількох фракцій (див. п. 2.1.1).

Для препаративного виділення протеїнів-попередників БАП із сироватки молока було взято за основу систему диск-електрофорезу в нативних умовах для кислих і нейтральних протеїнів [573, 577]. Внесені модифікації до електрофоретичної системи дозволили зменшити тривалість процесу розділення до двох годин і в десятки разів збільшити об'єм сироватки для фракціонування [579, 584]. При використанні оптимальних кількостей молочної сироватки після препаративного електрофорезу повністю забарвлена пластинка ПАГ має такий вигляд (рис. 55). Результат свідчить про чітке розділення основних попередників БАП:  $\beta$ -лактоглобуліну,  $\alpha$ -лактальбуміну, альбуміну сироватки та імуноглобулінів. Гомогенність фракцій була перевірена аналітичним електрофорезом (рис. 56).



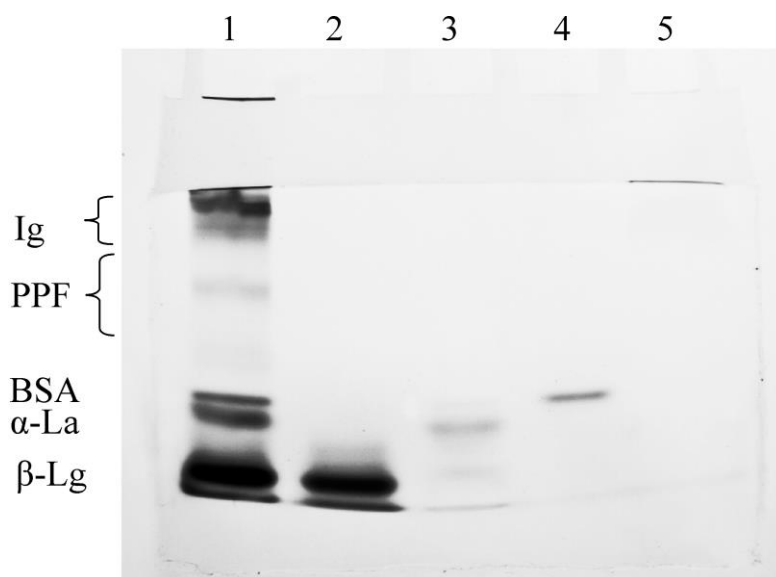
**Рис. 53. Забарвлена пластинка після фракціонування загального казеїну з використанням препаративного варіанту анодної електрофоретичної системи в однорідному ПАГ [239]**



**Рис. 54. Електрофореграма загального казеїну (1) і казеїнових фракцій, отриманих з допомогою препаративного електрофорезу: α<sub>S1</sub>-CN (2); α<sub>S2</sub>-CN (3); β-CN (4) і κ-CN (5) [239]**



**Рис. 55. Забарвлена пластинка після фракціонування протеїнів сироватки молока з використанням препаративного варіанту диск-електрофорезу [584]**



**Рис. 56. Електрофореграма протеїнів сироватки молока (1) і їх фракцій, отриманих з допомогою препаративного диск-електрофорезу:  $\beta$ -лактоглобулін (2);  $\alpha$ -лактальбумін (3); альбумін сироватки (4) та імуноглобуліни (5) [584]**

В обох варіантах препаративного електрофорезу вихід гомогенних протеїнових фракцій перевищує 50%. Отримані препарати можуть використовуватися для лабораторного виділення біоактивних пептидів.

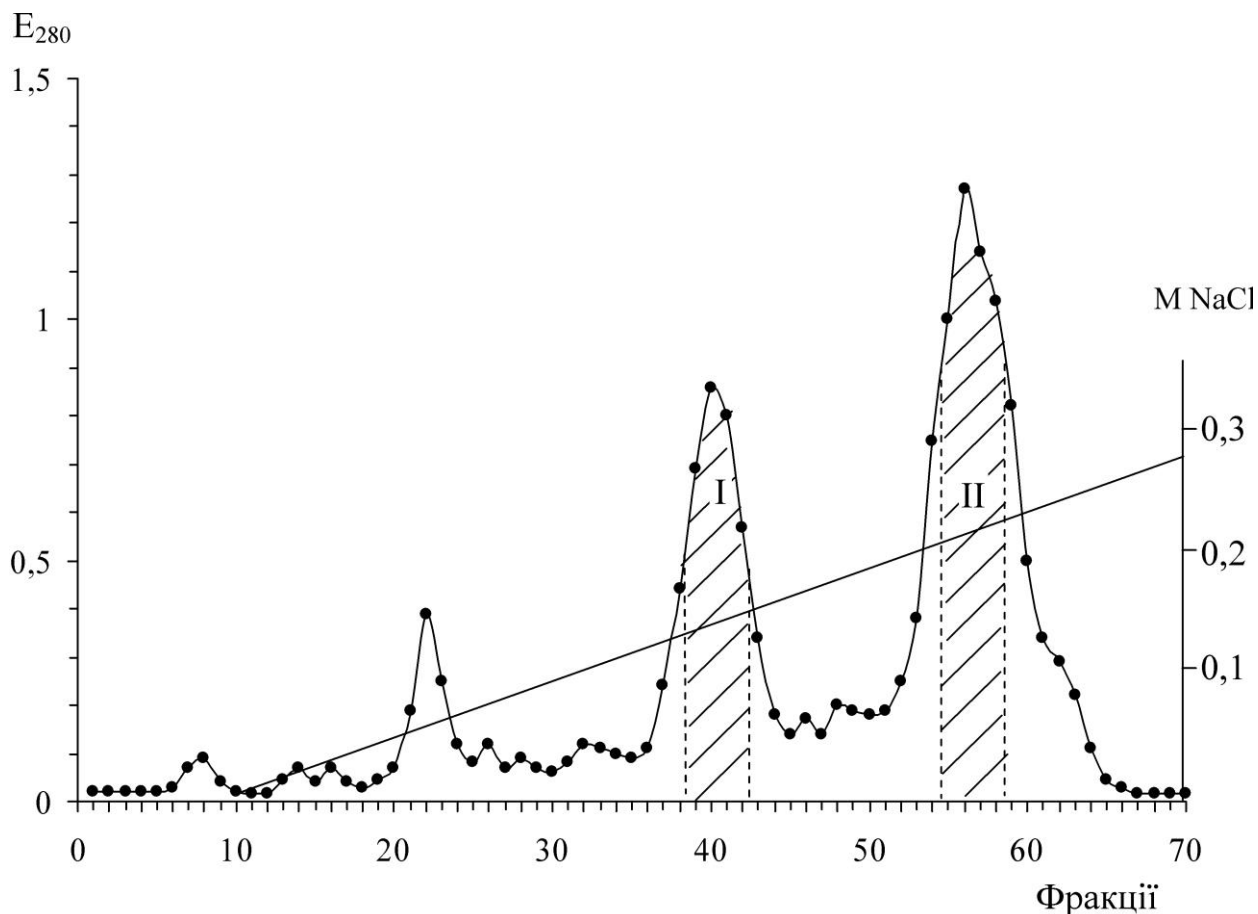
Ще одним перспективним підходом для виділення протеїнів молока, що базується на різниці в зарядах їх молекул, є препаративна іонообмінна хроматографія на слабких аніонообмінниках. Вона вже використовується для виділення протеїнів-попередників БАП із молока в лабораторних умовах [339].

Класична іонообмінна хроматографія на колонках із ДЕАЕ-целюлозою дозволяє виділити граміві кількості протеїнових фракцій. На рис. 57 показано результати фракціонування загального казеїну. Як аніонообмінник використовували мікрогранульовану ДЕАЕ-целюлозу, яка має вдвічі більшу ємність щодо протеїнів у порівнянні з волокнистою, а також забезпечує більшу швидкість проходження, елюента. Хроматографію проводили в лінійному градієнті NaCl (0-

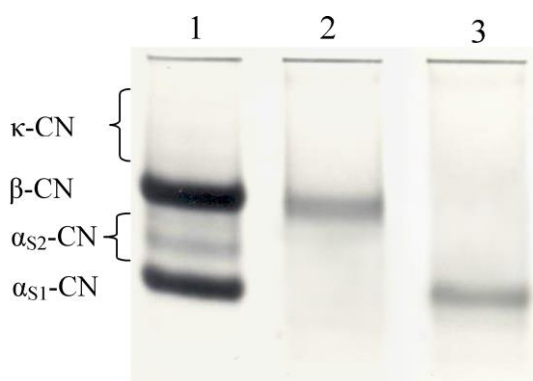
0,27 M). Електрофоретичний аналіз показав, що лише у двох хроматографічних фракціях знаходяться гомогенні протеїни: у фракції I виявлено гомогенний  $\beta$ -казеїн, а у фракції II – гомогенний  $\alpha_{S1}$ -CN (рис. 58).

Масштабування колонкової іонообмінної хроматографії є проблематичним, тому перспективнішою є іонообмінна хроматографія в об'ємі. Вона дозволяє значно збільшити кількість протеїну для фракціонування. Розглянемо це на прикладі казеїну [29, 241]. Фракціонування загального казеїну в об'ємі на ДЕАЕ-целюлозі проводили при використанні 0,02 M ацетатного буфера (рН 6,45), що включав 3,3 M сечовину, 0,03 M ЕДТА і 0,01 M 2-меркаптоетанол. Буфери подібного складу, але з більшим значенням рН (до 8) використовувалися в аніонообмінній хроматографії казеїнів. Такий буфер протидіє вираженій властивості казеїнів утворювати агрегати в розчинах при природних значеннях рН, а також утворенню дисульфідних зв'язків між молекулами  $\alpha_{S2}$ - і  $\kappa$ -казеїнів. Використання ЕДТА необхідне для зв'язування іонів кальцію, які входять до складу казеїнових міцел і можуть впливати на процес зв'язування іонів кальцію іонообмінником.

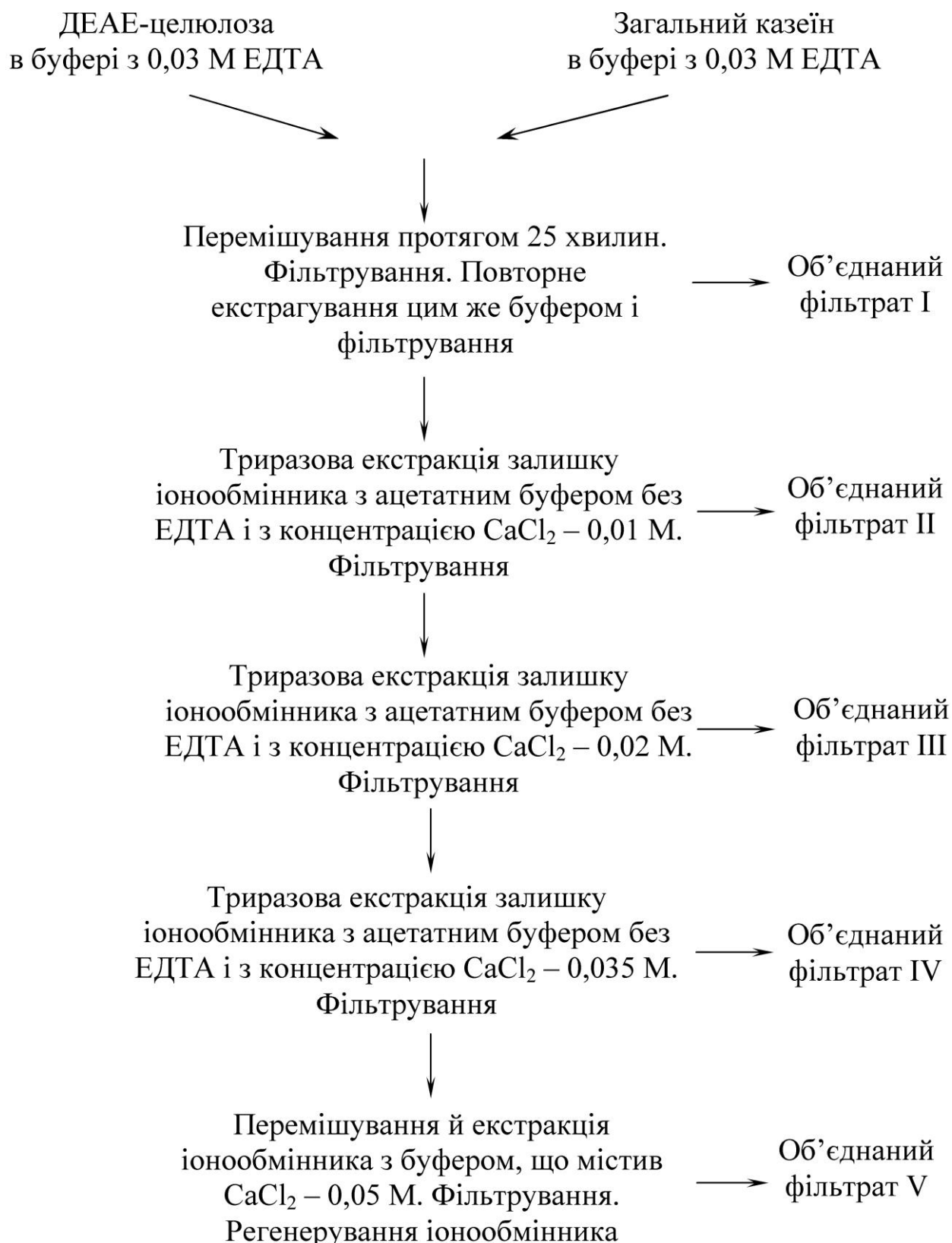
Послідовність процедур при фракціонуванні загального казеїну на ДЕАЕ-целюлозі в об'ємі була такою, як показано на рис. 59. При цьому використовували ДЕАЕ-целюлозу (ДЕ-52, «Serva»), яку після стандартної обробки зрівноважували з описаним буфером і змішували з препаратом ліофілізованого загального казеїну, розчиненого в цьому ж буфері. Після обережного перемішування суміш фільтрували. Таку процедуру із залишком іонообмінника на фільтрі повторювали двічі з новими порціями буферу. Три фільтрати, одержані з буфером одного складу, об'єднували. Надалі залишок іонообмінника аналогічно інкубували з буфером, що включав ступінчато зростаючі концентрації  $\text{CaCl}_2$  і не містив ЕДТА.



**Рис. 57. Хроматограма загального казеїну, отримана на ДЕАЕ-целюлозі. Заштриховані ділянки використовували для електрофоретичного аналізу [34]**

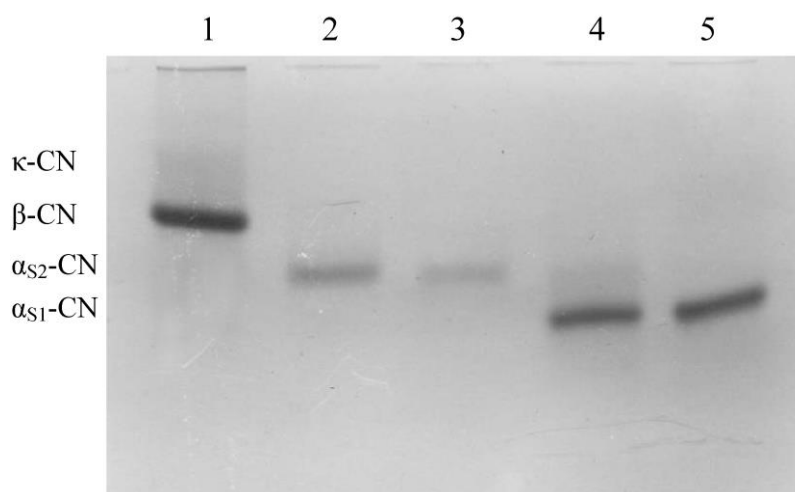


**Рис. 58. Електрофореграма загального казеїну (1), а також хроматографічних фракцій, отриманих на ДЕАЕ-целюлозі (рис. 57): 2 – перша заштрихована фракція; 3 – друга заштрихована фракція**



**Рис. 59.** Схема фракціонування загального казеїну іонообмінною хроматографією на ДЕАЕ-целюлозі в об'ємі [29]

Фракційний склад казеїнів кожного фільтрату аналізували електрофорезом на пластинках у лужній системі ПАГ. Електрофореграми білків фільтратів наведені на рис. 60. Результати електрофорезу свідчать про те, що фільтрат I включає з головних фракцій  $\kappa$ -CN і  $\beta$ -CN, а також продукти розпаду  $\beta$ -казеїну з низькою електрофоретичною рухливістю. Фільтрати II і III складаються з  $\alpha_{S2}$ -казеїнів. Фільтрат IV містить суміш  $\alpha_{S2}$ - і  $\alpha_{S1}$ -казеїнів, а фільтрат V включає лише  $\alpha_{S1}$ -CN. При цьому і  $\alpha_{S2}$ - і  $\alpha_{S1}$ -казеїни у фільтратах II, III і V були електрофоретично чисті. Фільтрати I і IV можуть бути використані для подальшого очищення і виділення  $\kappa$ -,  $\beta$ - і  $\alpha_{S1}$ -казеїнів.



**Рис. 60. Електрофореграми білків фільтратів I (1), II (2), III (3), IV (4) і V (5), отриманих під час фракціонування загального казеїну іонообмінною хроматографією на ДЕАЕ-целюлозі в об'ємі [29]**

Нами був використаний ступінчатий градієнт  $\text{CaCl}_2$  для витіснення казеїнів з іонообмінника під час фракціонування. Іони кальцію є набагато ефективнішими, ніж іони натрію при іонообмінній хроматографії фосфопротеїдів на аніонообмінниках. Це дозволило знизити майже на порядок його концентрацію. До того ж іони кальцію є природними складниками казеїнових міцел [29, 325]. Значення рН буферу було зменшено нами до значень, характерних для молока. Очевидно, ця зміна рН спричинила зменшення заряду на молекулах  $\kappa$ - і

$\beta$ -казеїнів і їхнє одночасне звільнення іонообмінником у складі першого об'єднаного фільтрату (рис. 60). Подальше фракціонування суміші двох казеїнів ( $\alpha_{S1}$ -CN і  $\alpha_{S2}$ -CN) з використанням малого інтервалу між концентраціями  $\text{CaCl}_2$  дозволило отримати три фільтрати (II, III, V) з гомогенними казеїнами.

Таким чином, для отримання гомогенних протеїнів-попередників БАП із молока в лабораторних умовах може бути використана гель-фільтрація, препаративний електрофорез і іонообмінна хроматографія на аніонообмінниках. Для промислового виробництва протеїнів-попередників перспективні є іонообмінна хроматографія в об'ємі і препаративний електрофорез.

### **3.3.3.3 Отримання біоактивних фосфопептидів з протеїнів казеїнового комплексу**

Виділення біоактивних пептидів із протеїнів молока обов'язково включає стадії специфічного обмеженого протеолізу протеїнів-попередників та подальше очищення пептидів [209]. Для проведення протеолізу використовуються препарати травних ензимів, а також усе частіше протеолітичні препарати рослинного і тваринного походження [65, 303]. Стратегія виділення БАП залежить від особливостей їхнього розміщення в первинній структурі протеїнів молока. За цією ознакою всі БАП можна умовно розділити на три великі групи:

1. Багато різних БАП, об'єднаних одним видом біологічної дії, які розміщені в усіх або багатьох основних протеїнах-попередниках із молока.
2. Декілька БАП із певною біологічною дією, розміщені в одному протеїні-попереднику.
3. Унікальний біоактивний пептид у первинній структурі одного протеїна-попередника.

До БАП першої групи належать інгібітори АПЕ (утворюються з усіх основних протеїнів молока) і фосфопептиди (утворюються з усіх



казеїнових фракцій). До другої групи можна віднести казоплателіні (утворюються лише з  $\kappa$ -казеїну). Прикладом третьої групи може бути антиконвульсант –  $\alpha$ -казозепін, який розташований лише в одному місці  $\alpha_{S1}$ -казеїну (f 91-100).

Виділення БАП першої групи видається найпростішим. Як субстрат при цьому можна використовувати концентрат білків молока, концентрат сироваткових білків або казеїн, які вже давно виробляються молочною промисловістю. Проте і в цьому випадку виникають два важливі запитання: якими препаратами і в яких умовах проводити протеоліз для отримання БАП? Розглянемо це на прикладі біоактивних фосфопептидів.

Для отримання казеїнових фосфопептидів як субстрати можуть бути використані кислотний казеїн, казеїнат натрію, казеїнат кальцію, знежирене молоко, концентрати казеїнів, отримані шляхом ультрафільтрації або зворотного осмосу [184]. Найчастіше використовують загальний казеїн або його збагачені фракції. Для протеолізу казеїнових субстратів використовують різні протеолітичні препарати тваринного, рослинного і мікробіологічного походження. Найчастіше протеоліз проводять трипсином, а також препаратами хімотрипсину, пепсину, панкреатину, папаїну, термолізину. Крім ферментних препаратів для отримання казеїнових фосфопептидів можуть застосовуватися мікроорганізми, зокрема молочнокислі бактерії [68, 276].

При застосуванні різних ферментних препаратів показано, що вихід фосфопептидів може становити від 3,4 до 16 % [158, 177]. В останні роки все частіше використовують ферментні препарати мікробіологічного походження, які характеризуються вищою протеолітичною активністю і широкою специфічністю щодо різних пептидних зв'язків. Так, описано використання алкалази для отримання казеїнових фосфопептидів [591]. У результаті осадження іонами кальцію було отримано два типи пептидів: казеїнові фосфорильовані й нефосфорильовані пептиди. При цьому було гідролізовано близько 20 % зв'язків у казеїнах. Автори відзначили хорошу розчинність казеїнових фосфопептидів навіть у кислому

середовищі і запропонували використовувати їх як інгредієнти для різних харчових продуктів.

Казеїнові фосфопептиди потенційно можуть бути застосовані для профілактики остеопорозу, рекальцифікації кісток після переломів, при лікуванні рахіту, для запобігання розвитку карієсу [117, 443]. Також показано, що казеїнові фосфопептиди можуть бути корисними при анемії, при недостатчі ряду мікроелементів (Zn, Cu, Cr, Co, Mn, Se), при дефіциті магнію у вагітних жінок і людей похилого віку, для підвищення рівня фосфору при гуманізації молока, регулюванні секреції шлункового соку, регулюванні кров'яного тиску, як антиоксиданти, імуностимулятори та радіопротектори [170, 259, 437, 438]. Проте механізми біологічної дії казеїнових фосфопептидів остаточно не встановлені. У зв'язку з цим застосовувати біологічно активні фосфопептиди необхідно з певною обережністю, особливо при використанні для гідролізу ензимів не із шлунково-кишкового тракту.

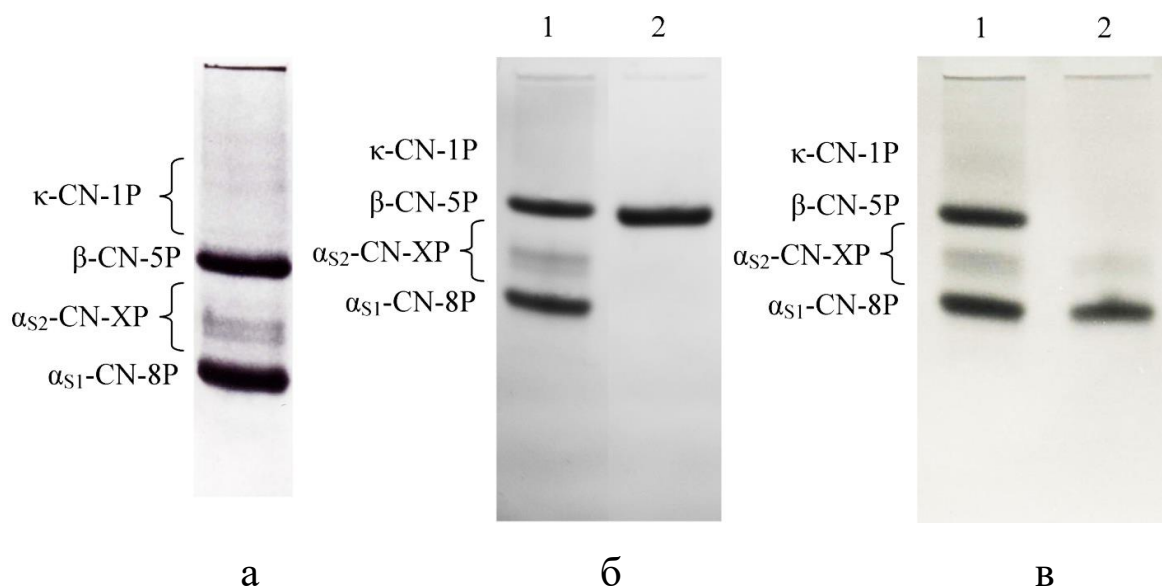
При використанні таких протеаз у результаті гідролізу можуть утворюватися неприродні пептиди, які в кращому випадку втрачають свою позитивну біологічну дію, а в гіршому – можуть негативно впливати на системи організму людини. Це пов'язано з тим, що метою більшості розробок було досягнути максимального виходу фосфопептидів, але при цьому не враховувалася специфічність протеолізу і відповідність структури утворених пептидів до тих, що вивільняються при нормальному травленні. Тому лише відтворення природної специфічності протеолізу може забезпечити збереження цінних біоактивних пептидів, зокрема й тих, що не відносяться до казеїнових фосфопептидів, але можуть бути виділені паралельно при виробництві фосфопептидів. При використанні дешевих протеаз мікробіологічного походження із широкою специфічністю протеолізу не можна розраховувати на утворення всього спектру природних біологічно активних пептидів.

У зв'язку з цим для отримання природних біоактивних фосфопептидів необхідно виконати такі умови:

1. Використати природний за складом і властивостями фосфопротеїновий субстрат.
2. Підібрати відповідний склад протеолітичних ензимів.
3. Забезпечити фізіологічні умови протеолізу.

Враховуючи сказане, нами були виділені різні фосфопротеїнові субстрати в умовах мінімального пошкодження структури і складу. Одним із використаних для протеолізу субстратів був препарат загально-го казеїну молока, виділений шляхом диференційного осадження [570]. Його електрофореграма показана на рис. 61 а. Фосфопротеїн  $\beta$ -CN-5P виділяли ексклюзивною хроматографією на сефадексі G-150 [34]. При цьому використовували повторну хроматографію без застосування редукуючих агентів. Електрофоретичний аналіз препарату  $\beta$ -CN-5P показано на рис. 61 б. Фосфопротеїни  $\alpha_{S1}$ -CN і  $\alpha_{S2}$ -CN характеризуються найвищим вмістом фосфосеринових залишків серед казеїнів. Для виділення фосфопротеїнового субстрату на основі їх суміші нами було використано диференційне осадження [38]. При цьому були вибрані умови, які виключають застосування екстремальних значень рН, іонної сили і температури. Аналіз складу отриманої суміші  $\alpha_{S1}$ -CN і  $\alpha_{S2}$ -CN показано на електрофореграмі (рис. 61 в).

Результати виходу фосфопептидів внаслідок дії п'яти ферментних препаратів представлені в табл. 43. Для всіх трьох субстратів найвищий вихід було отримано за дії панкреатину. Найменший вихід показав папаїн. Порівнюючи концентрацію всіх продуктів протеолізу і дані табл. 5, можна відзначити, що при близьких значеннях ступеню протеолізу було досягнуто різного виходу фосфопептидів. Очевидно, це пов'язано з різною специфічністю протеолізу фосфопротеїнового субстрату. Така особливість може відобразитися на молекулярно-масовому розподілі, структурі та властивостях фосфопептидів.



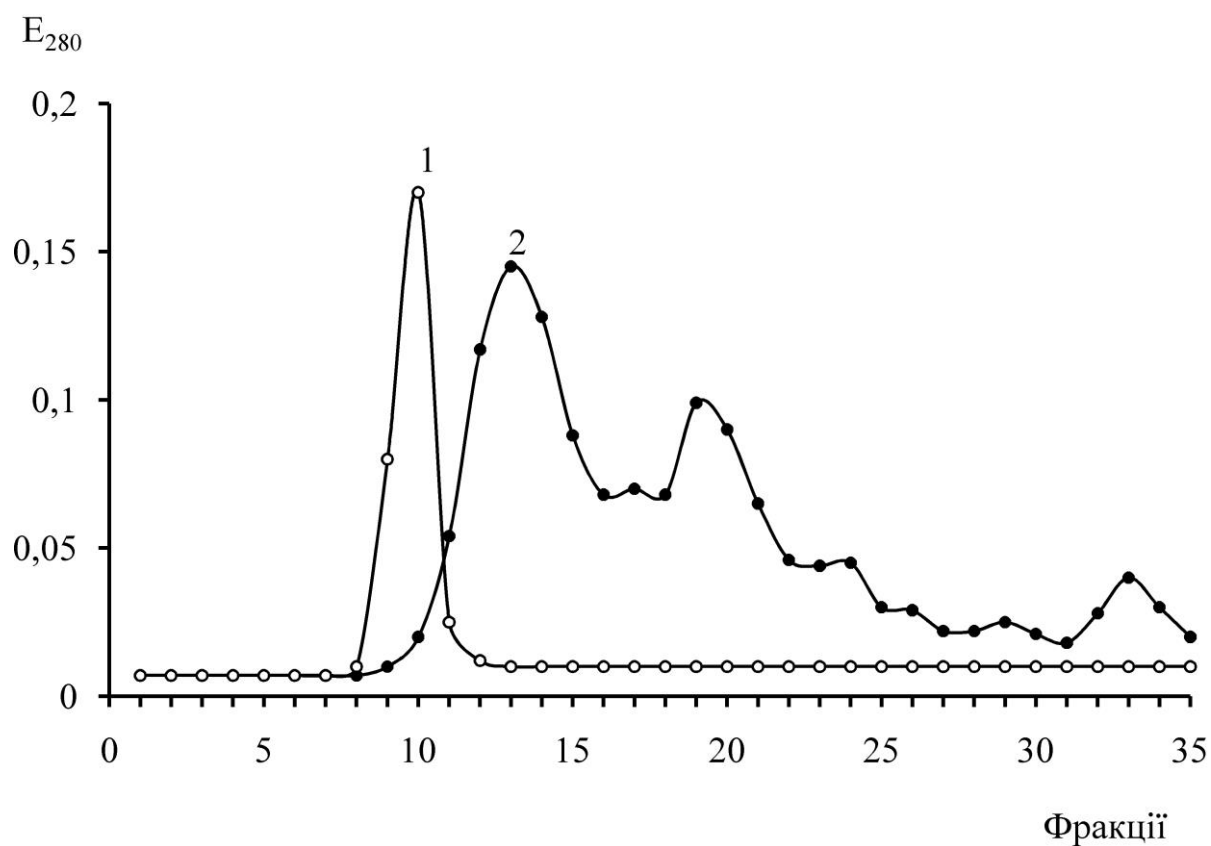
**Рис. 61.** Електрофореграма осаду загального казеїну молока (а); електрофореграма (б) загального казеїну (1) та очищеної фракції β-CN (2) після повторної ексклюзивної хроматографії; електрофореграма (в) загального казеїну (1) та суміші α<sub>S1</sub>-CN і α<sub>S2</sub>-CN (2), отриманих диференційним осадженням

**Таблиця 43.** Вихід фосфопептидів після протеолізу фосфопротеїнових субстратів ензимними препаратами (M±m, n=5) [41]

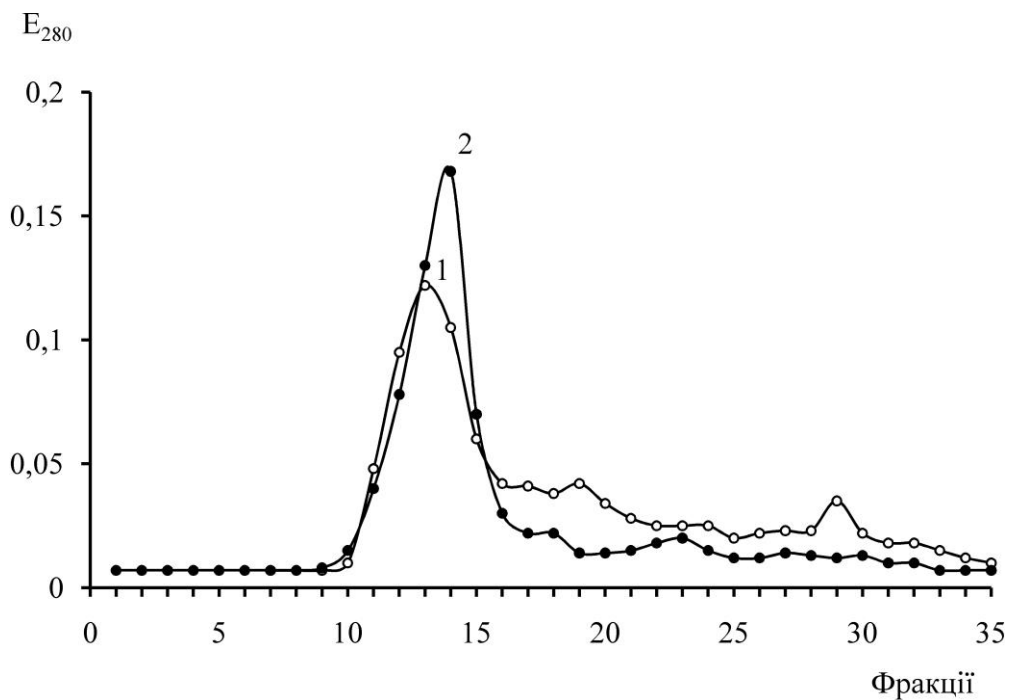
Ферментний препарат	Субстрат					
	загальний казеїн		α <sub>S1</sub> -CN+α <sub>S2</sub> -CN		β-CN-5P	
	к-сть фосфо-пептидів, мг	вихід, %	к-сть фосфо-пептидів, мг	вихід, %	к-сть фосфо-пептидів, мг	вихід, %
Панкреатин	21,2±0,5	11,8	25,1±0,5	13,9	15,0±0,3	8,3
Хімотрипсин	17,9±0,5	9,9	19,0±0,5	10,6	13,9±0,4	7,7
Трипсин	19,9±0,3	11,1	23,7±0,6	13,2	13,3±0,4	7,4
Папаїн	14,9±0,6	8,3	16,1±0,6	8,9	9,5±0,3	5,3
Нейтральна протеаза	16,5±0,3	9,2	17,2±0,4	9,6	13,2±0,3	7,3

На різних етапах протеолізу нами були відібрані проби для проведення аналізу фосфопептидів методом гель-фільтрації на сефадексі G-25. Результати хроматографії (рис. 62-67) свідчать, що у всіх випадках молекулярна маса основної частини фосфопептидів знаходиться в діапазоні від 1000 до 5000 Да. Лише у випадку панкреатинових фосфопептидів – значна їх частина має молекулярну масу до 2000 Да. З літературних даних [184] відомо, що така молекулярна маса характерна для природних фосфопептидів молока.

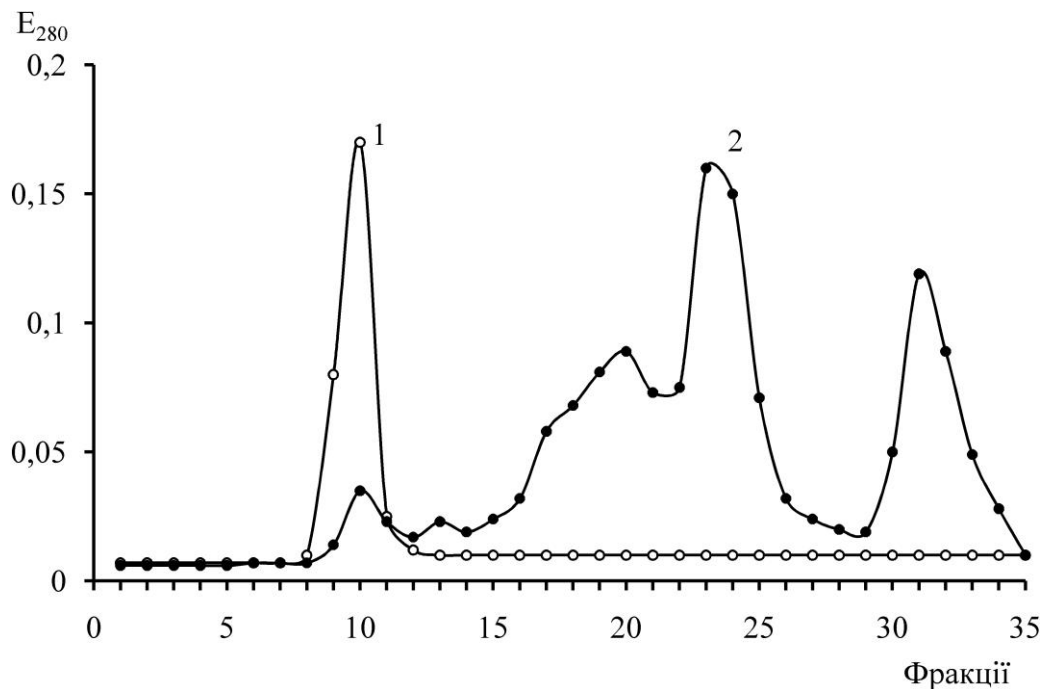
Очевидно, що фосфопептиди, отримані внаслідок дії різних протеолітичних препаратів, мають різну молекулярну масу й первинну структуру. Аналіз отриманих результатів показує, що для виділення природних біоактивних фосфопептидів доцільно використовувати як субстрат загальний казеїн молока і протеолітичний препарат панкреатин.



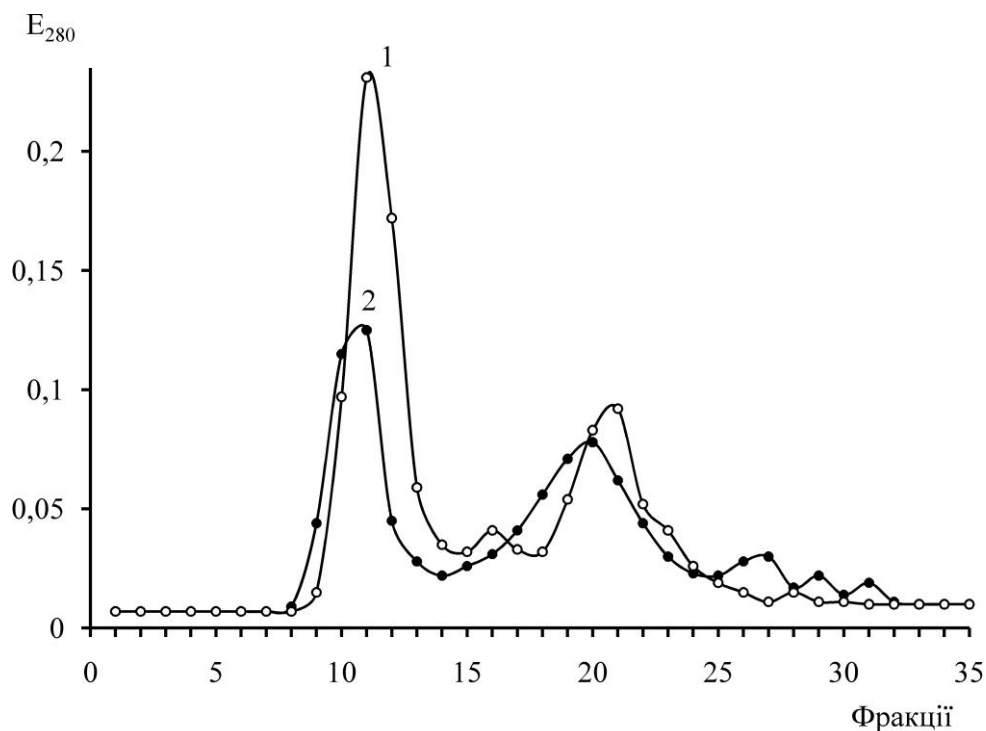
**Рис. 62.** Хроматограми загального казеїну (1) і фосфопептидів, отриманих внаслідок дії панкреатину на загальний казеїн (2)



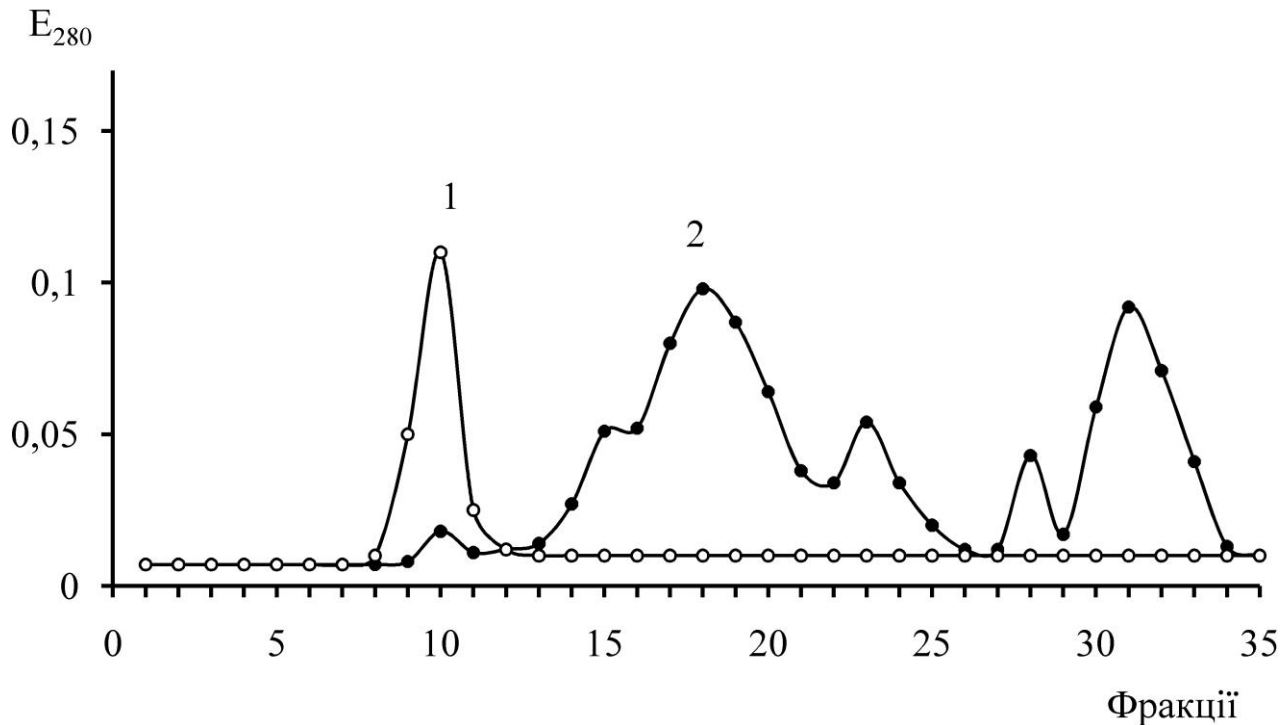
**Рис. 63. Хроматограми фосфопептидів, отриманих внаслідок дії папаїну (1) і нейтральної протеази (2) на загальний казеїн**



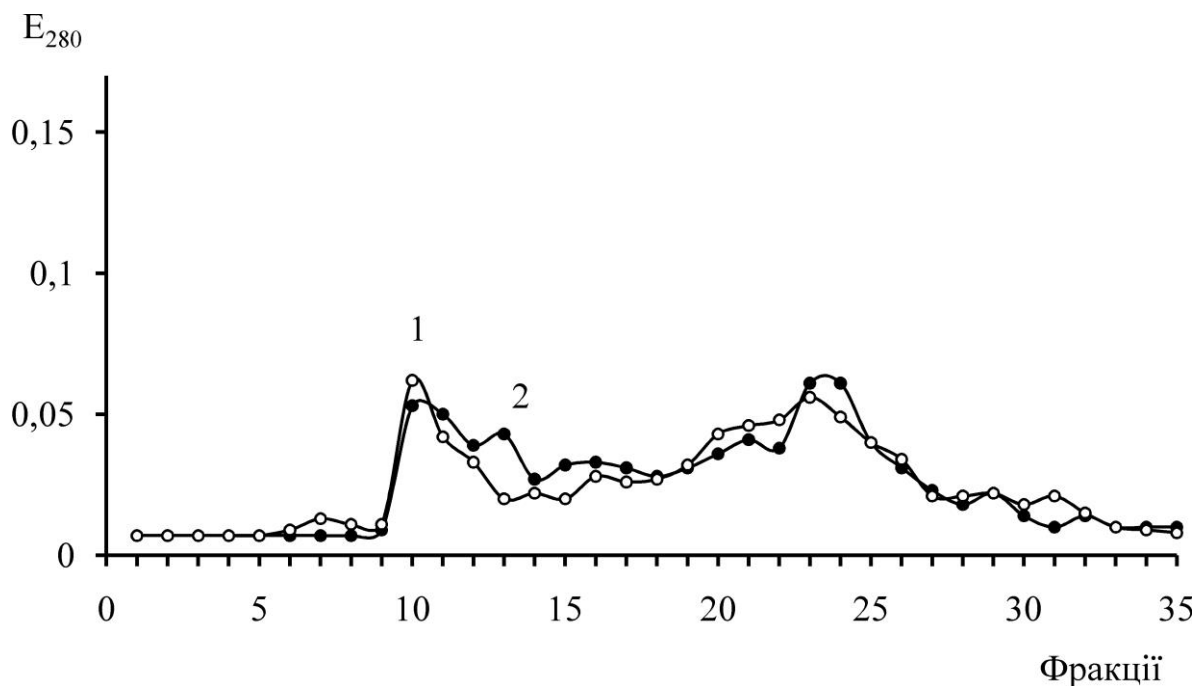
**Рис. 64. Хроматограми суміші  $\alpha_{S1}$ -CN і  $\alpha_{S2}$ -CN (1) та фосфопептидів, отриманих внаслідок дії панкреатину на суміш  $\alpha_{S1}$ -CN і  $\alpha_{S2}$ -CN (2)**



**Рис. 65. Хроматограми фосфопептидів, отриманих внаслідок дії трипсину (1) і хімотрипсину (2) на суміш  $\alpha_{S1}$ -CN і  $\alpha_{S2}$ -CN**



**Рис. 66. Хроматограми фракції  $\beta$ -CN-5P (1) і фосфопептидів, отриманих внаслідок дії панкреатину (2) на препарат  $\beta$ -CN-5P**



**Рис. 67. Хроматограми фосфопептидів, отриманих внаслідок дії трипсину (1) і хімотрипсину (2) на препарат  $\beta$ -CN-5P**

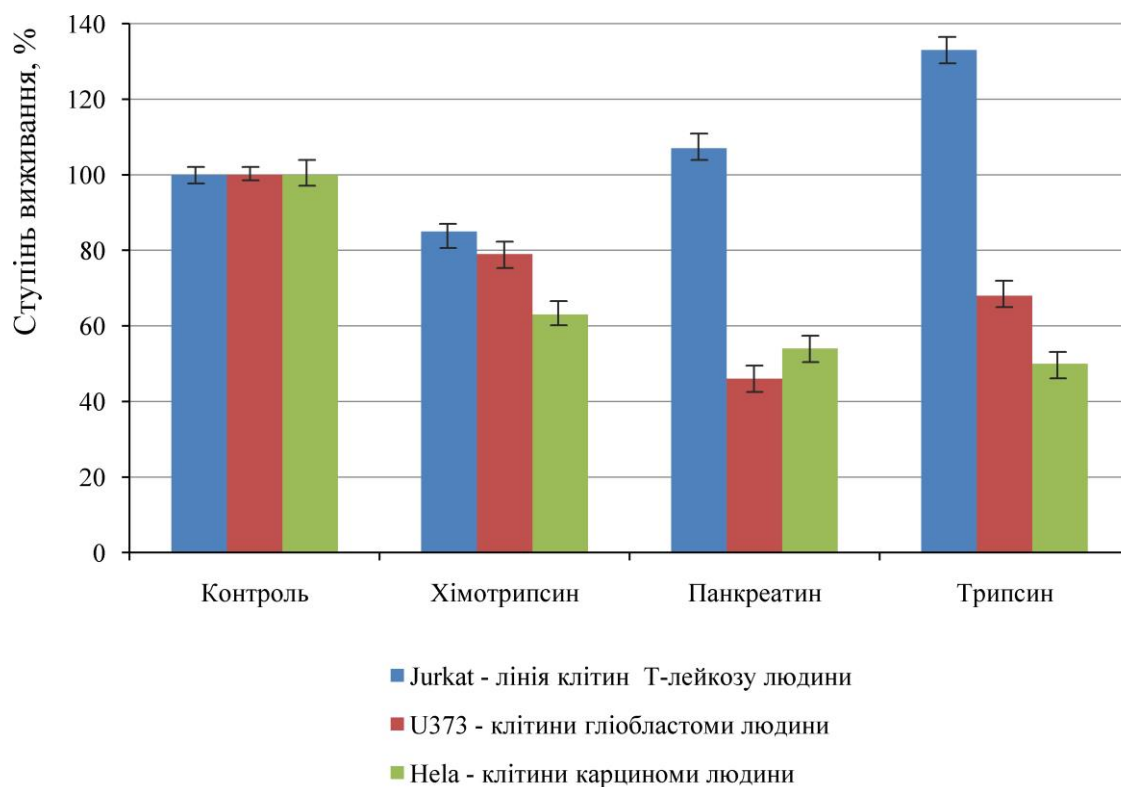
При виборі умов протеолізу необхідно враховувати дані про протеоліз у шлунково-кишковому тракті [2]. Аналіз літературних джерел показав, що більшість низькомолекулярних фосфопептидів утворюється при рН 7,9 і температурі 37 °С. Для встановлення оптимального співвідношення «ензим:субстрат» були проведені протеолізи при різних співвідношеннях у діапазоні від 1:20 до 1:260. Аналіз результатів виходу фосфопептидів вказує на доцільність використання для протеолізу співвідношення «ензим:субстрат» близько 1:100 [42, 43].

На основі проведених досліджень нами пропонуються умови протеолізу, при яких забезпечується можливість утворення природних біологічно активних фосфопептидів. Такі умови створюються при фізіологічних значеннях рН і температури (рН 7,9; 37 °С), співвідношенні «ензим:субстрат» у межах від 1:100 до 1:140. Аналіз молекулярно-масового розподілу отриманих у таких умовах фосфопептидів проводили з використанням набору сефадексів. Такий



підхід дозволив встановити вміст фосфопептидів у чотирьох фракціях: від 0 до 700 Да – 3 %; від 700 до 1500 Да – 51 %; від 1500 до 5000 Да – 33 %; більше 5000 Да – 13 %. Показано, що основна частина фосфопептидів припадає на діапазони 700-1500 Да та 1500-5000 Да, які охоплюють більшість відомих природних фосфопептидів [575].

Враховуючи літературні дані [462], в Інституті біології клітин НАНУ (м. Львів) було проведено дослідження впливу отриманих на кафедрі харчової біотехнології і хімії ТНТУ імені Івана Пулюя фосфопептидів на життєздатність трьох ліній ракових клітин людини, а саме Jurkat (лінія Т-лейкемії людини), U373 (клітини гліобластоми людини) і Hela (клітини карциноми людини). Клітини Т-лейкемії людини (Jurkat) і клітини карциноми людини (Hela) були отримані з колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАНУ (м. Київ); клітини гліобластоми людини (U 373 MG) були отримані з Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ (м. Київ). Клітини обробляли кальцієвими фосфопептидами фінальною концентрацією 0,1 мг/мл та інкубували протягом 48 годин. Було використано фосфопептиди, отримані за дії хімотрипсину, панкреатину та трипсину. На рис. 68 показано вплив фосфопептидів, отриманих із застосуванням різних ензимних препаратів, на життєздатність трьох ліній ракових клітин людини в порівнянні з контролем. У результаті досліджень було встановлено, що різні кальцій-фосфопептиди, отримані із загального казеїну молока, володіють різною активністю відносно ракових клітин *in vitro*. Так, фосфопептидам, отриманим гідролізом загального казеїну коров'ячого молока внаслідок дії хімотрипсину, притаманна суттєво менша інгібіторна активність до всіх трьох типів використаних клітин. На противагу цьому, пептиди, отримані гідролізом загального казеїну панкреатином і трипсином, здатні стимулювати проліферацію клітин Jurkat, але одночасно суттєво гальмувати ріст клітин U373 і Hela. Ці результати свідчать про специфічність біологічної активності кальцій-фосфопептидів залежно від вибраного протеолітичного ензиму [363].



**Рис. 68. Вплив фосфопептидів на життєздатність клітин *in vitro***

Порівняльний аналіз отриманих внаслідок дії різних препаратів протеаз казеїнових фосфопептидів показав, що вони суттєво відрізняються між собою хроматографічними профілями, молекулярно-масовим розподілом, і що найважливіше – біологічною активністю. Тому при отриманні біоактивних фосфопептидів, а також загального спектру БАП із протеїнів молока необхідно задати умови, які забезпечують не тільки високий рівень протеолізу, а й максимальну можливість утворення природних біологічно активних пептидів.

### **3.3.3.4 Промислове виробництво біоактивних пептидів з протеїнів молока**

Процес отримання малих груп БАП певної дії з окремих протеїнів-попередників, а тим більше індивідуальних БАП, складний і дорогий. У лабораторних умовах для цього використовують сучасні методи хроматографії та електрофорезу, імунологічні методи. У виділених із

гідролізатів біоактивних пептидів встановлюють первинну структуру (найчастіше методом мас-спектроскопії) і досліджують їх біологічну дію *in vitro* та *in vivo*. Для підтвердження біологічної дії та встановлення зв'язків між структурою та біологічною активністю використовують синтетичні аналоги природних пептидів [112, 380, 401].

Для фракціонування БАП у промислових масштабах використовують їхні відмінності у фізико-хімічних властивостях (молекулярна маса, заряд, гідрофобність, розчинність). Для кожної групи БАП або окремих БАП використовують свій підхід, який, як правило, складається з декількох стадій виділення та очищення.

У найбільш загальному вигляді в першу чергу з гідролізату молочних протеїнів-попередників виділяють низькомолекулярну фракцію пептидів. Відомо, що близько 88 % всіх БАП включають до 25 амінокислотних залишків, а 42 % – від двох до шести залишків [401]. Це може бути досягнуто шляхом осадження нерозщеплених протеїнів та поліпептидів [477], екстракцією пептидів [461] або ультрафільтрацією [5, 82, 362]. Найпоширенішою є ультрафільтрація, часто в комбінації з діафільтрацією з використанням селективних мембран. Основним недоліком ультрафільтрації є низька селективність відділених пептидів за молекулярними масами. Тому найчастіше вдається виділити групи пептидів з однією або декількома біологічними активностями (інгібітори АПЕ, імуномодуляторні пептиди, антиоксидантні пептиди, інгібітори дипептидил дипептидази IV та ін.) [222, 392, 448]. Очевидно, що ці групи містять, окрім БАП з цільовою активністю, багато інших пептидів з подібною молекулярною масою [380].

Враховуючи відмінності в електричних зарядах БАП і, відповідно, значеннях ізоелектричних точок, для їх фракціонування було застосовано ізоелектричне фокусування [338, 377, 380, 463]. Особливий інтерес викликає ізоелектричне фокусування без амфолітів, які необхідно відновлювати [56, 157, 212]. За допомогою такої техніки, зокрема, були успішно виділені імуномодуляторні пептиди [338].

Відмінності в гідрофобності БАП використовують для їхнього фракціонування за допомогою препаративної зворотно-фазової рідинної хроматографії під високим тиском (ЗФРХВТ). Метод забезпечує високу ефективність фракціонування, проте погано піддається масштабуванню. Перспективнішим у зв'язку з цим є використання твердофазної екстракції сорбентами з різною гідрофобністю. Основною перевагою твердофазної екстракції є можливість фракціонування значно більших кількостей пептидних сумішей, ніж у випадку з ЗФРХВТ, а також одночасної адсорбції різних груп БАП різними сорбентами [220, 373, 380]. До недоліків твердофазної екстракції можна віднести меншу селективність, ніж у ЗФРХВТ і втрати частини пептидів унаслідок незворотної абсорбції. З допомогою твердофазної екстракції було виділено декілька груп біоактивних пептидів з гідролізатів протеїнів молока: антидіабетичні пептиди [373], інгібітори ксантинооксидази [371], активатори серотонінових рецепторів [377].

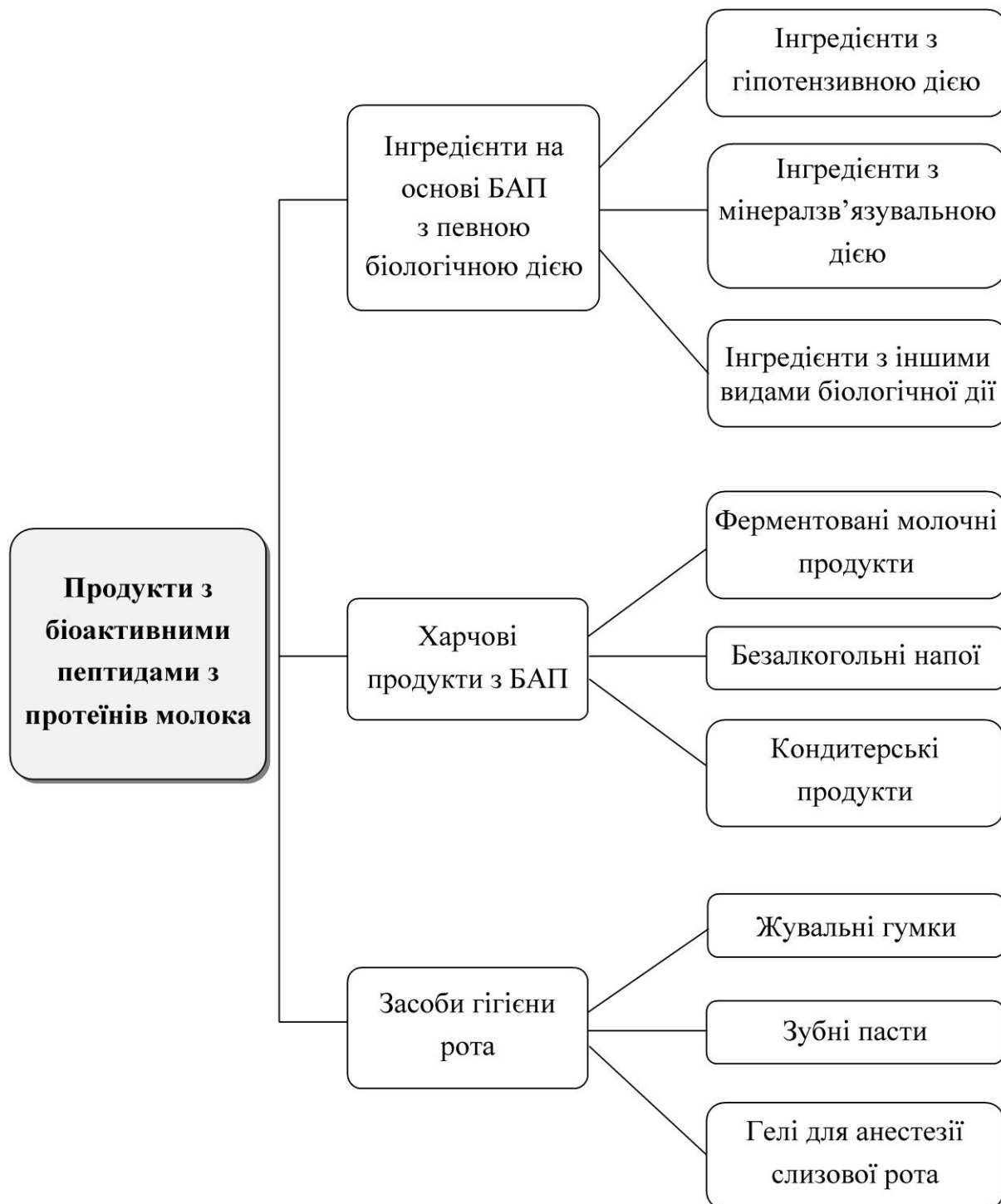
Принципово новий підхід до виділення та застосування БАП із протеїнів молока передбачає використання методів генної інженерії та отримання відповідної рекомбінантної ДНК. Перше таке дослідження було присвячене виділенню пептидів – інгібіторів ангіотензин-перетворювального ензиму, які відповідають фрагментам  $\beta$ -казеїну (f 47-52, f 57-66 і f 73-82). Автори для цього використали клітини молочнокислих бактерій *Lactobacillus helveticus* [286]. Інша група дослідників отримала ці ж пептиди шляхом клонування і експресії синтетичних генів, які їх кодували в клітинах *Bifidobacterium pseudocatenulatum* [416]. Ці біфідобактерії входять до складу нормальної мікрофлори травного тракту людини. У першому випадку біоактивні пептиди можуть бути виділені та використані в складі молочних продуктів, а в другому – вони можуть безпосередньо виділятися рекомбінантними бактеріями в травному тракті людини.

### 3.3.4 Продукти з біоактивними пептидами

В тій чи іншій мірі біоактивні пептиди присутні у всіх молочних продуктах, які містять протеїни молока. БАП вносять певний вклад у формування їхньої біологічної цінності. Кількість і різноманітність БАП тісно пов'язана з інтенсивністю протеолітичних процесів, які використовуються під час їхнього виробництва. Насамперед до продуктів з великою кількістю БАП відносяться сири [112].

Окрім цього, на сьогодні промислово виробляються продукти на базі БАП із протеїнів молока або створюються спеціальні умови для їх утворення. Основні групи таких продуктів представлені на схемі (рис. 69). Приклади та короткі характеристики інгредієнтів і продуктів з БАП наведені в табл. 44.

Найчастіше продукти містять не індивідуальні біоактивні пептиди, а неочищені гідролізати або продукти ферментації з багатьма БАП. Це насамперед пов'язано з малим виходом БАП при їхньому виділенні, а також дорогим процесом очищення. Так, вихід препаратів БАП може становити від долей відсотка для окремих пептидів до 12-15 % для мінералзв'язувальних фосфопептидів [177, 380]. З метою здешевлення продуктів з БАП для протеолізу використовують вторинну молочну сировину (перегін, підсирна й казеїнова сироватка) [505]. Аналіз асортименту продуктів з БАП свідчить, що в основному це рідкі продукти з антигіпертензивною або мінералзв'язувальною дією (ферментовані молочні продукти, молочні напої, безалкогольні напої) [85]. Встановлено, що в рідких харчових продуктах краще проявляється біологічна дія БАП, ніж у твердих [344]. Однією з проблем застосування БАП є їхній гіркий смак (особливо гідролізатів казеїну), а також можливість їхнього розщеплення протеазами шлунково-кишкового тракту. У зв'язку з цим використовують технологію мікрокапсулювання БАП або їх розміщення в ліпосомах [77, 255, 276, 502, 563].



**Рис. 69. Основні групи продуктів, які виробляються в промислових масштабах і містять БАП з протеїнів молока**

**Таблиця 44. Інгрєдїєнти і продукти, які містять біологічно активні пептиди з протеїнів молока [112, 370, 380, 416]**

Назва продукту	Виробник	Тип продукту	Заявлена біологічна дія
1	2	3	4
C12 Peptide	DMV, Нідерланди	Інгрєдїєнт	Гіпотензивна
Cardi-04	Chr. Hansen A/S, Данія	Інгрєдїєнт	Гіпотензивна
Biozate 1	Davisco Foods International	Інгрєдїєнт	Гіпотензивна
Ameal BP, Ameal peptide	Calpis Co.	Інгрєдїєнт	Гіпотензивна
Pepto Pro	DSM Food Specialists, Нідерланди	Інгрєдїєнт	Покращує фізичний розвиток спортсменів
Alphalactalbumin	Davisco Foods International	Інгрєдїєнт	Покращує сон і пам'ять
Lactium	Ingredia Nutritional	Інгрєдїєнт	Знижує дію стресу
CE90 CPP	DMV International	Інгрєдїєнт	Зв'язує мінерали
Lacprodan D1-2021	Arla Foods	Інгрєдїєнт	Покращує гігієнічний стан ротової порожнини. Сприяє засвоєнню вітамінів і мінералів
Glycomacropeptide	Davisco Foods International	Інгрєдїєнт	Антикаріогенна, антимікробна і антитромботична
Peptigen 110	MD Foods	Інгрєдїєнт	Зв'язує мінерали
Capolac MM 0525	Arla Foods	Інгрєдїєнт	Зв'язує мінерали
CPPB і CPPC	Armor Proteines	Інгрєдїєнт	Антикаріогенна
CPP-I, II і III	Meiji Seika	Інгрєдїєнт	Антикаріогенна
Recaldent	Cadbury Adams	Інгрєдїєнт	Антикаріогенна
Pro Diet F 200	Ingredia, Франція	Молочний напій, кондитерські продукти	Знижує стрес

Закінчення таблиці 44

1	2	3	4
Calpico (Європа) або Calpis AMEALS (Японія)	Calpis Co., Японія	Ферментоване молоко	Гіпотензивна
Casein DP Peptio Drink	Kanebo, Японія	Безалкогольний напій	Гіпотензивна
Evolus	Valio, Фінляндія	Ферментоване молоко, збагачене кальцієм	Гіпотензивна
Tekkotsu Inryou	Suntory	Безалкогольний напій	Зв'язує мінерали
Kotsu Calcium	Asahi	Безалкогольний напій	Зв'язує мінерали
Meiji Milc Recaldent	Meiji	Молочний напій	Підтримує міцність зубів
Trident white sugar gum	Cadbury	Жувальна гумка з Recaldent	Активно зміцнює і відновлює зуби
Recaldent Mints	Cadbury	М'ятні цукерки	-
MI Paste (GC Tooth Mousse)	GC	Зубна паста з Recaldent	Сприяє ремінералізації і відновленню зубів
MI Paste Plus (GC Tooth Mousse Plus)	GC	Зубна паста з Recaldent	Сприяє ремінералізації і відновленню зубів
Prospec MI Paste	GC	Гель для анестезії слизової рота з Recaldent	Знижує ерозію зубів

У спеціальній літературі інгредієнти та харчові продукти з БАП із молочних протеїнів відносяться до функціональних харчових продуктів (іноді до нутрицевтиків), оскільки вони, окрім основної харчової цінності, проявляють позитивний вплив на здоров'я. Також окремі молочні продукти з БАП у Японії включені в список продуктів FOSHU (Food for Specified Health Uses). До FOSHU відносяться продукти, які містять біоактивні інгредієнти і їх дія доведена на людях [485, 486].



Ринок функціональних продуктів зростає у всьому світі й особливо в США, Європі та Японії. Люди стали більше уваги звертати на здоров'я у зв'язку з дорогим лікуванням, бажанням підвищити якість життя, а також як наслідок старіння людства. Основним рушієм купівлі функціональних продуктів є сприйняття їх споживачами як таких, що пов'язані зі здоровим способом життя, підтримкою інтелектуального розвитку, скороченням випадків хронічних захворювань, пов'язаних із харчуванням [3, 274, 380, 450].

В Україні до функціональних молочних продуктів належать молочні продукти, які містять біологічно активні компоненти і які в процесі регулярного споживання забезпечують корисну дію на організм в цілому або на певні системи чи їхні функції (ДСТУ 2212:2003). Причому корисна дія функціонального продукту на організм споживача має бути обов'язково підтверджена клінічними дослідженнями. Безумовно, багато українських молочних продуктів містять БАП. Проте функціональні молочні продукти з біоактивними БАП певної дії в Україні не виробляються. Враховуючи те, що в Україні переробляється велика кількість молока, доцільно було б розширити фундаментальні і прикладні дослідження з отримання біоактивних пептидів із протеїнів молока та створення на їх основі функціональних інгредієнтів та продуктів. Це могло би підвищити рентабельність молочної галузі. Окрім цього, враховуючи сучасні дані про БАП із молочних протеїнів, доцільно переглянути наявні технології отримання молочних продуктів спеціального призначення, при виробництві яких передбачено стадію протеолізу протеїнів. До них відносяться гіпоалергенні молочні продукти, молочні продукти для дитячого харчування, різні гідролізати для спортсменів, а також продукти для парентерального харчування [21, 45, 46, 47, 105]. Більшість цих технологій розроблено в часи, коли про БАП із протеїнів молока було мало даних і вони ніяк не враховувалися. Основна увага при цьому була зосереджена на досягненні певних технологічних і органолептичних показників. Для протеолізу, як правило, використо-

ували дешеві препарати мікробіологічного походження з широкою специфічністю протеолітичної дії. Отримані в результаті пептиди відрізняються за молекулярно-масовим розподілом і первинною структурою від пептидів, що утворюються у фізіологічних умовах за дії ензимів ШКТ [3, 380, 581]. Повне розщеплення молочних протеїнів при їх засвоєнні організмом може відбуватися декількома шляхами (рис. 70).



**Рис. 70. Шляхи утворення природних БАП залежно від способу проведення технологічного протеолізу при виробництві молочних продуктів спеціального призначення**

При споживанні молока і традиційних молочних продуктів протеоліз в основному здійснюється протеазами ШКТ, що призводить до утворення в складі проміжних продуктів природних біоактивних пептидів. Споживання молочних продуктів спеціального призначення з гідролізованими протеїнами може забезпечити утворення природних БАП лише у випадку, коли технологічний протеоліз здійснювався протеазами ШКТ і у фізіологічних умовах. При використанні для технологічного протеолізу ензимів мікробіологічного або рослинного походження можливість утворення природних БАП залишається під питанням. Навіть якщо при цьому утворюються пептиди з біологічною активністю, то їхню відповідність природним БАП і корисну дію на організм ще необхідно довести.

## ВИСНОВКИ

Молоко, окрім забезпечення пластичного і енергетичного обміну, здійснює важливі регуляторні функції в постнатальний період розвитку організму. Основну роль в реалізації цих функцій відіграють протеїни і пептиди молока. Їх різноманітність і складна будова також свідчать про те, що вони є не тільки джерелом амінокислот.

Давно відома біологічна дія протеїнів сироватки молока, куди частина їх потрапляє з крові. Це транспорт гідрофобних молекул вітамінів А, D і жирних кислот ( $\beta$ -лактоглобулін); регуляція синтезу лактози, транспорт іонів кальцію, апоптоз ракових клітин ( $\alpha$ -лактальбумін); транспорт багатьох гідрофобних молекул, зв'язування і транспорт іонів кальцію (альбумін сироватки крові). Для частини з протеїнів сироватки молока біологічна активність є основною функцією (імуноглобуліни, лактоферин, лактопероксидаза, пептидні гормони, фактори росту, цитокіни, адипокіни та ін.). Деякі з цих протеїнів виробляються у промислових масштабах і використовуються як біологічно активні добавки і функціональні інгредієнти (лактоферин, лактопероксидаза, імуноглобуліни, остеопонтин, лізоцим та ін.).

На теперішній час у коров'ячому молоці виявлено понад тисячу різних мінорних протеїнів і пептидів. У більшості випадків їх функція в молоці ще не встановлена. Навряд чи всі такі мінорні компоненти (до 5 % від усіх протеїнів молока) виконують певну строгу функцію, а не є просто матеріалом для пластичного обміну. Цілком імовірно, що на рівні таких малих концентрацій частина з них потрапляє у молоко випадково. Можливо, саме тут проходить межа досконалості в природі. Тому в першу чергу, як наголошує у своїй книзі Патрік Фокс (2015 р.), необхідно звернути увагу на ті протеїни і пептиди, концентрація яких у молоці вища, ніж у крові. У наш час мінорні компоненти інтенсивно вивчаються методами протеоміки та пептидоміки і можна сподіватися,

що деякі з них знайдуть своє застосування в харчуванні людини і фармації.

Біологічна активність також встановлена для таких класичних харчових протеїнів як казеїни. Їх гетерогенність і складну просторову будову, яка ще до цього часу остаточно не встановлена, пояснювали лише забезпеченням фізико-хімічних властивостей (розчинність, здатність до коагуляції) та утворенням розчинних сполук з іонами кальцію, а також комплексів з неорганічними фосфатами кальцію та інших металів для кращого їх засвоєння. Виявилось, що самим інтактним молекулам протеїнів казеїнового комплексу притаманна біологічна дія, подібна до дії шаперонів. Але основна їхня біологічна активність проявляється через пептиди, які утворюються в процесі протеолізу казеїнів травними протеазами. Трохи пізніше подібні пептиди були знайдені у гідролізатах протеїнів сироватки молока. На сьогодні відомо більше 300 різних вторинних біоактивних пептидів з протеїнів молока, які впливають на всі основні фізіологічні системи організму (опіодні, антигіпертензивні, фосфопептиди, імуномодуляторні, антитромботичні, антивірусні, бактерицидні, регулятори апетиту, антиканцерогенні, холестеролемічні та ін.). Більша частина амінокислотних залишків (до 90 %) первинної структури основних протеїнів молока входить до складу вторинних біоактивних пептидів. Різноманітність і кількість цих пептидів свідчить про їхню важливу роль у нормальному розвитку організму в постнатальний період, а саме явище можна назвати додатковою функцією природних харчових протеїнів молока.

Фармацевти перші відкрили (Віктор Брантл) і перші були розчаровані вторинними БАП з протеїнів молока. Молоко – це не суміш ліків. Біоактивні пептиди утворюються при травленні у великих кількостях і вони не можуть мати таку високу активність, як лікарські засоби. Вони проявляють всеохоплюючу м'яку дію, безумовно, позитивну, але без швидких різких змін в організмі. Молоко – це,

насамперед, ліки для здорового організму і без побічних ефектів. Молоко, за визначенням Ганса Мейзеля, саме по собі є функціональним харчовим продуктом.

Використання потенціалу біологічно активних протеїнів і пептидів (БАПП) насамперед полягає в тому, щоб не втратити його під час виробництва молочних продуктів. Для цього необхідно продовжити детальне вивчення механізмів і умов прояву біологічної активності, стійкості БАПП до впливу технологічних факторів, збереження їх активності у складі готових продуктів. Це також потребує перегляду технологій білкових молочних продуктів, особливо тих, де використовуються протеолітичні процеси. Іншим шляхом застосування БАПП є створення функціональних продуктів зі збільшеним вмістом БАПП певної біологічної дії. Цього досягають за рахунок підбору мікроорганізмів заквасок з відповідною специфічністю протеолітичних систем, використання протеолітичних препаратів або додавання функціональних інгредієнтів на основі БАПП молока (лактоферин, лактопероксидаза, імуноглобуліни, остеопонтин, лізоцим, препарати індивідуальних або комплексних вторинних БАП).

Природні вторинні БАП з протеїнів молока утворюються в нативних умовах. Використання комплексних протеолітичних препаратів рослинного і мікробіологічного походження для гідролізу протеїнів молока дозволяє досягнути вищу ступінь протеолізу, але не природний спектр БАП. Отримання гідролізатів в умовах, що максимально забезпечують утворення природних БАП, може підвищити їх біологічну цінність.

На сьогодні виробляється декілька десятків харчових продуктів і біологічно активних добавок, а також засобів гігієни, зубних паст, фармацевтичних препаратів з використанням біоактивних протеїнів і пептидів молока. Це, звичайно, мало порівняно з кількістю відкритих у молоці БАПП. Подальший прогрес у цьому напрямку потребує створення нових ефективних і дешевих методів фракціонування і

очищення БАПП молока, а також вивчення їх властивостей і механізмів дії, надійних клінічних досліджень оцінки їх впливу на організм, прицезійних і доступних методів ідентифікації (особливо коротких біоактивних пептидів).

І наостанок необхідно відзначити, що, не зважаючи на всі досягнення у вивченні біологічної дії протеїнів і пептидів молока, їх продовжують оцінювати лише за такими класичними показниками як амінокислотний скор, перетравлюваність і засвоюваність. Безумовно, природні харчові протеїни і пептиди молока потребують нових підходів у їх оцінці.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Бородай С. В., Бондарчук З. В. Дія ензимних молокозсідальних препаратів на протеїновий комплекс молока. *Biotechnologia Acta*. 2010. Т. 3, № 4. С. 29–36.
2. Ганонг В. Ф. Фізіологія людини: Пер. з англ. Львів : БаК, 2002. 784 с.
3. Головач Т. Н., Курченко В.П. Гидролиз белков молока ферментными препаратами и протеолитическими системами молочнокислых бактерий. *Труды БГУ*. 2012. Т. 7, Ч. 1-2. С. 106-126.
4. Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов. Санкт-Петербург : Гиорд, 2001. 320 с.
5. Єресько Г. О., Шинкарик М. М., Ворощук В. Я. Технологічне обладнання молочних виробництв. Київ : Фірма «ІНКОС», Центр навчальної літератури, 2007. 344 с.
6. Жарінов О. Й. Захист серця і судин майбутнє покликання інгібіторів ангіотензин-претворюючого ферменту. *Медицина світу*. 2000. Т.8, № 2. С. 80–85.
7. Капрельянц Л. В. Ферменты в пищевых технологиях. Одесса : Друк, 2009. 468 с.
8. Капрельянц Л. В., Іоргачова К. Г. Функціональні продукти. Одеса : Друк, 2003. 312 с.
9. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2012. 656 с.
10. Нельсон Д. Л., Кокс М. М. Основи біохімії за Ленінджером: Навч. посібник / Переклад з англ. Наук. ред. перекладу С. Комісаренко. Львів : БаК, 2015. 1280 с.
11. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М. : Наука, 1985. 536 с.
12. Сологуб Л. І., Пашковська І. С., Антоняк Г. Л. Протеази клітин та їх функції. Київ : Наукова думка, 1992. 196 с.



13. Стан Е. Я. Казеины молока и их физиологически активные пептиды. *Вопросы питания*. 1987. № 1. С. 3–9.
14. Столяр О. Б. Біологічна хімія : навч. посібн. Тернопіль : Посібники і підручники, 2014. 368 с.
15. Твердохлеб Г. В., Раманаускас Р. И. Химия и физика молока и молочных продуктов. М.: ДеЛи принт, 2006. 360 с.
16. Тутельян В. А. Концепция оптимального питания: научные обоснования. Здоровье населения и среда обитания. М.: ЗНиСО, Информационный бюллетень. 2001. № 11. С. 6–12.
17. Уголев А. М. Теория адекватного питания и трофология. СПб . : Наука, 1991. 271 с.
18. Цісарик О. Й., Білик, О. Я., Мусій Л. Я., Сливка І. М. Хімія і фізика молока: навч. посіб. [для студ. вищ. навч. закл.]. Львів, 2019. – 200 с.
19. Чагаровський О. П., Ткаченко Н. А., Лисогор Т. А. Хімія молочної сировини: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Одеса : «Сімекс-прінт», 2013. – 268 с.
20. Черников М. П. Протеолиз и биологическая ценность белков (казеины как собственно пищевые белки). М. : Медицина, 1975. 231 с.
21. Шаркова Н. О., Жукотський Е. К., Декуша Г. В., Авдеева Л. Ю., Турчина Т. Я. Технологія вітчизняного продукту спеціального дієтичного призначення «білок гідролізований сухий». *Наукові праці ОНАХТ*. 2015. Вип. 47, Т.2. С. 216-218.
22. Фільченков О. О., Стойка Р. С. Апоптоз і рак: від теорії до практики. Тернопіль : ТДМУ, 2006. 524 с.
23. Холодна Л. С. Імунологія: Підручник. К: Вища школа, 2007. 271 с.
24. Юкало А. В., Сторож Л. А, Юкало В. Г. Білки казеїнового комплексу молока корови (*Bos Taurus*) як попередники біологічно активних пептидів. *Біотехнологія*. 2012. Т. 5, № 4. С. 21–33.
25. Юкало А. В., Дацишин К. Є., Юкало В. Г. Біоактивні пептиди протеїнів сироватки молока корів (*Bos Taurus*). *Biotechnologia Acta*. 2013. Т. 6, № 5. С. 49–61.

26. Юкало В. Г., Шуляк Т. Л. Протеоліз казеїнов ферментами молочнокислих бактерій. Тезиси докладов Всесоюзной конф. «Химические превращения пищевых полимеров». Калининград : ИНЭОС АН СССР, 1991. С. 22.
27. Юкало В. Г., Луговий Б. Л. Утворення антигіпертензивних пептидів при модельному протеолізі  $\beta$ -казеїну. *Фізіологічний журнал*. 2000. Т. 46, № 3. С. 78–83.
28. Юкало В. Г. Вплив продуктів протеолізу  $\alpha_{S1}$ -казеїну на активність ангіотензин-перетворюючого ферменту. *Український біохімічний журнал*. 2001. Т. 73, № 5. С. 28–32.
29. Юкало В. Г. Іоннообмінна хроматографія білків казеїнового комплексу в об'ємі. *Медична хімія*. 2001. Т.3, № 4. С. 87-90.
30. Юкало В. Г. Препаративне виділення гомогенного  $\alpha_{S1}$ -казеїну. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2001. № 4. С. 52–56.
31. Юкало В. Г. Інтенсифікація протеолізу  $\alpha_{S1}$ -казеїну лактококами з метою одержання фізіологічно-активних пептидів. *Медична хімія*. 2002. Т. 4, № 1. С. 33–36.
32. Юкало В. Г. Виділення міцел казеїнового комплексу коров'ячого молока. *Біологія тварин*. 2004. Т. 6. № 1-2. С. 397–400.
33. Юкало В. Г. Утворення казокінінів у модельному протеолізі  $\alpha_{S1}$ -казеїну. *Медична хімія*. 2004. Т. 6, № 1. С. 92–95.
34. Юкало В. Г. Білки казеїнового комплексу коров'ячого молока та продукти їх протеолізу за дії ферментів молочнокислих бактерій: дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.04 / Тернопільський державний технічний університет імені Івана Пулюя. Тернопіль, 2007. 359 с.
35. Юкало В. Г. Електрофорез загального казеїну в анодній системі поліакриламідного гелю. *Ветеринарна біотехнологія*. 2007. №11. С. 246–251.

36. Юкало В. Г., Сторож Л. А. Виділення електрофоретично гомогенної фракції  $\beta$ -CN-5P казеїну коров'ячого молока. *Медична хімія*. 2007. №2. С. 91–95.
37. Юкало В. Г., Яворський Б. І., Сторож Л. А., Соловодзінська І. Є. Кількісний електрофоретичний аналіз білків казеїнового комплексу. *Біологія тварин*. 2007. Т.9, №1–2. С. 295–298.
38. Юкало В. Г., Сторож Л. А. Виділення суміші  $\alpha_S$ -казеїнів коров'ячого молока для отримання біоактивних пептидів. *Наукові праці НУХТ*. 2010. № 33. С. 58–60.
39. Юкало В. Г., Сторож Л. А. Протеолітична активність приклітинних і внутрішньоклітинних ферментів у лактококів. *Наукові праці НУХТ*. 2011. № 37, 38. С. 98–102.
40. Юкало В. Г., Сторож Л. А. Протеоліз різних фракцій казеїну ферментними системами лактококів. *Харчова промисловість*. 2011. № 10, 11. С. 144–148.
41. Юкало В., Сторож Л. Выделение фосфопептидов из общего казеина и его фракций. *Maisto chemija ir technologija*. 2013. Т. 47 № 2. Р. 32–40.
42. Юкало В. Г., Сторож Л. А. Гель-фільтрація казеїнових фосфопептидів. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2014. Т.16, № 2 (59), Ч. 4. С. 225–231.
43. Юкало В. Г., Сторож Л. А., Штокало М. О. Визначення умов отримання природних біоактивних казеїнових фосфопептидів. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2014. Т. 16, № 3 (60), Ч. 4. С. 192–200.
44. Юкало В. Г. Лабораторний практикум з хімії та фізики молока і молочних продуктів: навчальний посібник. Тернопіль : Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, 2018. 176 с.
45. Юкало В. Г., Дацишин К. Є., Семенишин Г. М. Характеристика молекулярних мас продуктів протеолізу концентрату сироваткових

- білків отриманих за дії панкреатину. *Наукові праці НУХТ*. 2019. Т. 25, № 5. С. 233–239.
46. Юкало В. Г., Дацишин К. Є. Технологія соєво-молочного комбінованого продукту спеціального призначення з гідролізатом білків сироватки молока. *Наукові праці НУХТ*. 2019. Т. 25, № 6. С. 202–209.
47. Юкало В., Дацишин К. Технологія низькоалергенного молока з гідролізатом білків сироватки. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2019. Т. 21, № 92. С. 14–18.
48. Abdou A. M., Elbarbary H. A. Bioactive Lactoferrin-Derived Peptides. *Milk Proteins – From Structure to Biological Properties and Health Aspects* / Ed. I. Gigli. Rijeka, Croatia : InTech, 2016. P. 157–180.
49. Abubakar A., Saito T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*. 1998. Vol. 81, № 12. P. 3131–3138.
50. Actor J. K., Hwang S. A., Kruzel M. L. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Current Pharmaceutical Design*. 2009. Vol. 15, № 17. P. 1956–1973.
51. Adel-Patient K., Wavrin S., Bernard H., Meziti N., AhLeung S., Wal J. M. Oral tolerance and Treg cells are induced in BALB/c mice after gavage with bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Allergy*. 2011. Vol. 66. P. 1312–1321.
52. Adel-Patient K., Nutten S., Bernard H., Fritsché R., Ah-Leung S., Meziti N., Prioult G., Mercenier A., Wal J-M. Immunomodulatory potential of partially hydrolyzed  $\beta$ -lactoglobulin and large synthetic peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012. Vol. 60. P. 10858–10866.
53. Affolter M., Grass L., Vanrobaeys F., Casado B., Kussmann M. Qualitative and quantitative profiling of the bovine milk fat globule membrane proteome. *Journal of Proteomics*. 2010. Vol. 73. P. 1079–1088.

54. Agregán R., Echegaray N., López-Pedrouso M., Kharabsheh R., Franco D., Lorenzo J. M. Proteomic Advances in Milk and Dairy Products. *Molecules*. 2021, Vol. 26. 3832.
55. Agyei D., Danquah M. K. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends in Food Science & Technology*. 2012. Vol. 23. P. 62–69.
56. Akahoshi A., Sato K., Nawa Y., Nakamura Y., Ohtsuki K. Novel approach for large-scale, biocompatible, and low-cost fractionation of peptides in proteolytic digest of food protein based on the amphoteric nature of peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. Vol. 48. P. 1955–1959.
57. Akhavan T., Luhovyy B. L., Brown P. H., Cho C. E., Anderson G. H. Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010. Vol. 91. P. 966–975.
58. Aît-Oukhatar N., Bouhallab S., Arhan P., Maubois J. L., Drosdowsky M., Bouglé D. Iron Tissue Storage and Hemoglobin Levels of Deficient Rats Repleted with Iron Bound to the Caseinophosphopeptide 1–25 of  $\beta$ -Casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999. Vol. 47, № 7. P. 2786–2790.
59. Aît-Oukhatar N., Bouhallab S., Bureau F., Arhan P., Maubois J. L., Bouglé D. L. In vitro digestion of caseinophosphopeptide-iron complex. *Journal of Dairy Research*. 2000. Vol. 67. P. 125–129.
60. Algaron F., Miranda G., Le Bars D., Monnet V. Milk fermentation by *Lactococcus lactis* with modified proteolytic systems to accumulate potentially bio-active peptides. *Lait*. 2004. Vol. 84, № 1–2. P. 115–123.
61. Álvarez-Ordóñez A., Begley M., Clifford T., Deasy T., Considine K., Hill C. Structure-activity relationship of synthetic variants of the milk-derived antimicrobial peptide  $\alpha_{S2}$ -casein f(183-207). *Applied and Environmental Microbiology*. 2013. Vol. 79, №. 17. P. 5179–5185.

62. Aluko R. E. *Functional Foods and Nutraceuticals*. New York : Springer, 2012. 115 p.
63. Anderson G. H., Moore S. E. Dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans. *The Journal of Nutrition*. 2004. Vol. 134. S. 974–979.
64. Andrews A. T., Alichanidis E. Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk. *Journal Dairy Research*. 1983. Vol. 50, № 3. P. 275–290.
65. Anusha R., Bindhu O. S. Bioactive Peptides from Milk. *Milk Proteins – From Structure to Biological Properties and Health Aspects* / Ed. I. Gigli I. Rijeka, Croatia : InTech, 2016. P. 101–139.
66. Aoi W., Naito Y., Nakamura T., Akagiri S., Masuyama A., Takano T., Mizushima K, Yoshikawa T. Inhibitory effect of fermented milk on delayed-onset muscle damage after exercise. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2007. Vol. 18. P. 140–145.
67. Artym J., Zimecki M. Milk-derived proteins and peptides in clinical trials. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013. Vol. 67. P. 800-816.
68. Arunachalam K. D., Raja R. B. Isolation and characterisation of CPP (casein phosphopeptides) from fermented milk. *African Journal of Food Science*. 2010. Vol. 4, № 4.– P. 167–175.
69. Ashar M. N., Chand R. Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft*. 2004. Vol. 59. P. 363–366.
70. Assargard U., Larsson C., Norby U. Human  $\beta$ -casomorphin-5 containing peptides in human body fluids.  $\beta$ -Casomorphins and related peptides : recent developments. Weinheim : VCH, 1994. P. 247–254.
71. Atamer Z., Post A. E., Schubert T., Holder A., Boom R.M. Hinrichs J. Bovine  $\beta$ -casein : Isolation, properties and functionality. A review. *International Dairy Journal*. 2017. Vol. 66. P. 115–125.
72. Athira S., Mann B., Sharma R., Kumar R., Saini P., Singh A. K. Production and characterization of whey protein hydrolysate having

- antioxidant activity from cheese whey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015. Vol. 95, № 14. P. 2908–2915.
73. Atmani D., Baghiani A., Harrison R., Benboubatra M. NADH oxidation and superoxide production by caprine milk xanthine oxidoreductase. *International Dairy Journal*. 2005. Vol. 15. P. 1113–1121.
74. Aziz A., Anderson G. H. The effect of dairy components on food intake and satiety : mechanisms of actions and implications for the development of functional foods. *Functional Dairy Products*. Cambridge, UK : Woodhead Publishing Limited. 2007. Vol. 2. 709 P.
75. Bafort F., Parisi O., Perraudin J. P., Jijakli M. H. Mode of action of lactoperoxidase as related to its antimicrobial activity : a review. *Enzyme Research*. 2014. Vol. 2014. 517164.
76. Bal dit Sollier C., Drouet L., Pignaud G., Chevallier C., Caen J., Fiat A-M., Izquierdo C., Jolles P. Effect of  $\kappa$ -casein split peptides on platelet aggregation and on thrombus formation in the guinea-pig. *Thrombosis Research*. 1996. Vol. 81. P. 427–437.
77. Barbosa C. M. S., Morais H. A., Delvivo F. M., Mansur H. S., De Oliveira M.C., Silvestre M.P.C. Papain hydrolysates of casein : molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2004. Vol. 84. P. 1891–1900.
78. Basch J. J., Douglas F. W., Procino L. G., Holsinger V., Farrell H. M. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure. *Journal of Dairy Science*. 1985. Vol. 68, № 1. P. 23–31.
79. Basch J. J., Farrel H. M., Walsh R. A., Konstance R. P. Kumosinski T. F. Development of quantitative model for enzyme-catalyzed changes in protein composition of cheddar cheese during storage. *Journal of Dairy Science*. 1989. Vol. 72, № 3. P. 591–603.
80. Bastian E. D., Brown R. J. Plasmin in milk and dairy products: an update. *International Dairy Journal*. 1996. Vol. 6. P. 435–457.

81. Baomy J. J., Guenot P., Sinbandhit S., Brule G. Study of calcium binding to phosphoserine residues of beta-casein and its phosphopeptides (1-25) by  $^{31}\text{P}$  NMR. *Journal of Dairy Research*. 1989. Vol. 56, № 3. P. 403–409.
82. Bazinet L., Firdaous L. Separation of bioactive peptides by membrane processes: technologies and devices. *Recent Patents on Biotechnology*. 2013. Vol. 7. P. 9–27.
83. Beerens M. W., van der Veen M. H., van Beek H., ten Cate J. M. Effects of casein phosphopeptide amorphous calcium fluoride phosphate paste on white spot lesions and dental plaque after orthodontic treatment: a 3-month follow-up. *European Journal Of Oral Sciences*. 2010. Vol. 118. P. 610–617.
84. Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1992. Vol. 1121, № 1–2. P. 130–136.
85. Beltrán-Barrientos L. M., Hernández-Mendoza A., Torres Llanez M. J., González-Córdova A. F., Vallejo-Córdoba B. Fermented milk as antihypertensive functional food. *Journal of Dairy Science*. 2016. Vol. 99, № 6. P. 4099–4110.
86. Benkerroum N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *International Journal of Dairy Technology*. 2010. Vol. 63. P. 320–338.
87. Bennett T., Desmond A., Harrington M., McDonagh D., FitzGerald R., Flynn A., Cashman K. D. The effect of high intakes of casein and casein phosphopeptide on calcium absorption in the rat. *British Journal of Nutrition*. 2000. Vol. 83, № 6. P. 673–680.
88. Berge G., Eliassen L. T., Camilio K. A., Bartnes K., Sveinbjornsson B., Rekdal O. Therapeutic vaccination against a murine lymphoma by intratumoral injection of a cationic anticancer peptide. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 2010. Vol. 59. P. 1285–1294.



89. Berrocal R., Chanton S., Juillerat M. A., Favillare B., Scherz J.-C., Jost R. Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *Journal of Dairy Research*. 1989. Vol. 56, № 3. P. 335–341.
90. Bockelmann W., Monnet V., Geis A., Teuber M., Gripon J. C. Comparison of cell wall proteinases from *Lactococcus lactis* ssp. cremoris AC1 and *Lactococcus lactis* ssp. latis NCDO 763. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1989. Vol. 31. P. 278–282.
91. Boland M., Singh H. (eds.). Milk protein. From expression to food (Third Edition). London, United Kingdom : Academic Press, 2020. 764 p.
92. Bonfatti V., Grigoletto L., Cecchinato A., Gallo L., Carnier P. Validation of a New Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for Separation and Quantification of Bovine Milk Protein Genetic Variants. *Journal of Chromatography A*. 2008, Vol. 1195. P. 101–106.
93. Bonnaille L., Tomasula P. Fractionation of Whey Protein Isolate with Supercritical Carbon Dioxide to Produce Enriched  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Food Ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012. Vol. 60, № 20. P. 5257-5266.
94. Bouglé D., Bouhallab S. Mineral-Binding Proteins and Peptides and Bioavailability of Trace Elements. *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease. Nutraceutical Science and Technology* / Eds. Y. Mine, F. Shahidi. New Your, USA : CRC Precc, Taylor and Francis Group, 2006. P. 29–40.
95. Boutrou R., Coirre E., Jardin J., Léonil J. Phosphorylation and Coordination Bond of Mineral Inhibit the Hydrolysis of the  $\beta$ -Casein (1–25) Peptide by Intestinal Brush-Border Membrane Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. Vol. 58, № 13. P. 7955–7961.

96. Brandsch M., Brust P., Neubert K.  $\beta$ -Casomorphins chemical signals of intestinal transport system.  $\beta$ -Casomorphins and related peptides: recent developments. Weinheim : VCH, 1994. P. 207–219.
97. Brantl V., Teschemacher H., Henschen A., Lottspeich F. Novel opioid peptides derived from casein (  $\beta$ -Casomorphins) 1. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 1979. Vol. 360, № 9. P. 1211–1216.
98. Brantl V., Pfeiffer A., Herz A. Antinociceptive potencies of  $\beta$ -Casomorphin analogs as compared to their affinities towards  $\mu$  and  $\delta$  opiate receptor sites in brain and periphery. *Peptides*. 1982. Vol. 3. P. 793–797.
99. Brantl V., Neubert K. Opioid peptides derived from food proteins. *Trends in Pharmacological sciences*. 1986. Vol. 7, № 1. P. 6–7.
100. Brew K.  $\alpha$ -lactalbumin. *Advanced dairy chemistry. Volume 1: Proteins /* Eds. P. F. Fox, P. L. H. McSweeney. 3rd Edition. New York : Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. P. 387–419.
101. Brew K.  $\alpha$ -Lactalbumin. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects /* Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 261–273.
102. Brinkmann C. R., Thiel S., Larsen M. K., Petersen T. E., Jensenius, J. C., Heegaard C. W. Preparation and comparison of cytotoxic complexes formed between oleic acid and either bovine or human  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Dairy Science*. 2011. Vol. 94, №5. P. 2159–2170.
103. Broadbent J. R., Barnes M., Brennand C. Strickland M., Houck K., Johnson M. E., Steele J. L. Contribution of lactococcus lactis cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced- fat cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. Vol. 66, № 4. P. 1778–1785.
104. Brody E. P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*. 2000. Vol. 84, Suppl. 1. P. 39–46.

105. Bu G., Luo Y., Chen F., Liu K., Zhu T. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Science and Technology*. 2013. V. 93. P. 211–223.
106. Buchanan F. C., Van Kessel A. G., Waldner C., Christensen D. A., Laarveld B., Schmutz S. M. Hot topic: an association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *Journal of Dairy Science*. 2003. Vol. 86, № 10. P. 3164–3166.
107. Bullappa D., Puranik M. P., Uma S.R. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a review. *International Journal of Dental and Health Sciences*. 2015. Vol. 2, № 1. P. 116–125.
108. Bütikofer U., Meyer J., Sieber R., Wechsler D. Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*. 2007. Vol. 17, № 8. P. 968–975.
109. Caetano-Silva M. E., Bertoldo-Pacheco M. T., Paes-Leme A. F., Netto F. M. Ironbinding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC\_MS/MS. *Food Research International*. 2015. Vol. 71. P. 132–139.
110. Campagna S., Mathot A. G., Fleury Y., Girardet J. M., Gaillard J. L. Antibacterial activity of lactophoricin, a synthetic 23-residues peptide derived from the sequence of bovine milk component-3 of proteose peptone. *Journal of Dairy Science*. 2004. Vol. 87. P. 1621–1626.
111. Campbell B., Petersen W .E. Antibodies in milk for protection against human disease. *Milchwissenschaft*. 1959. Vol. 14. P. 469–473.
112. Carrasco-Castilla J., Hernandez-Alvarez A. J., Jimenez-Martinez C., Gutierrez-Lopez G. F., Davila-Ortiz G. Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Engineering Reviews*. 2012. Vol. 4. P. 224–243.
113. Caruana P. C., Al Mulaify S., Moazzez R., Bartlett D. The effect of casein and calcium containing paste on plaque pH following a

- subsequent carbohydrate challenge. *Journal of Dentistry*. 2009. Vol. 37. P. 522–526.
- 114.Cederlund A., Gudmundsson G. H., Agerberth B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *The FEBS Journal*. 2011. Vol. 278. P. 3942–3951.
- 115.Chabance B., Marteau P., Rambaud J. C., Migliore-Samour D., Boynard M., Perrotin P., Guillet R., Jollès P., Fiat A.M. Casein Peptide Release and Passage to the Blood in Humans during Digestion of Milk or Yogurt. *Biochimie*. 1998. Vol. 80, № 2. P. 155–165.
- 116.Chang K. J., Killian A., Hazum E. Morphiceptine (NH<sub>4</sub>-Tyr-Pro-Phe-Pro-CONH<sub>2</sub>): a potent and specific agonist for morphine ( $\mu$ ) receptors. *Science*. 1981. Vol. 212, № 4490. P. 75–77.
- 117.Chandan R.C., Kilara A. R.C. Dairy ingredients for food processing. USA : Wiley-Blackwell, 2011. 604 p.
- 118.Chatterton D. E. W., Smithers G., Roupas P., Brodkorb A. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin – Technological implications and processing: review. *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16, № 11. P. 1229–1240.
- 119.Chen Y. S., Christensen J. E., Broadbent J. R., Steele J. L. Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with post-proline specificity, *Applied and Environmental Microbiology*, 2003 Vol. 69, № 2. P. 1276–1282.
- 120.Chiba H., Tani F., Yoshikawa M. Opioid antagonist peptides derived from  $\kappa$ -casein. *Journal Dairy Research*. 1989. Vol. 56, № 3. P. 363–366.
- 121.Chiba H., Yoshikawa M. Bioactive peptides derived from food proteins. *Kagaku to Seibutsu*. 1991. Vol. 29. P.454–458.
- 122.Chich J.-F. A mini review: proteomic analysis, a post-genomic approach. *Lait*. 2001. Vol. 81, № 1–2. P. 13-18.
- 123.Christensen B., Sørensen E. S. Structure, function and nutritional potential of milk osteopontin. *International Dairy Journal*. 2016. Vol. 57. P. 1–6.

124. Christensen J. E., Dudley E. G., Pederson J. A., Steele J. L. Peptidase and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999. Vol. 76. P. 217–246.
125. Cicero A., Aubin F., Azais-Braesco V., Borghi C. Do the lactotriptides isoleucine-proline-proline and valine-proline-proline reduce systolic blood pressure in European subjects? A meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Hypertension*. 2013. Vol. 26, № 3. P. 442–449.
126. Clare D. A., Swaisgood H. E. Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*. 2000. Vol. 83, № 6. P. 1187–1195.
127. Clare D. A., Catignani G. L., Swaisgood H. E. Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*. 2003. Vol. 9, №16. P. 1239–1255.
128. Contreras M. M., Hernandez-Ledesma B., Amigo L., Martin-Alvarez P. J., Recio I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT – Food Science and Technology*, 2011. Vol. 44, № 4. P. 9–15.
129. Contreras M. M., Sancho A. I., Recio I., Mills C. Absorption of Casein Antihypertensive Peptides through an In Vitro Model of Intestinal Epithelium. *Food Digestion*. 2012. Vol. 3, №1. P. 16–24.
130. Coolbear T., Reid J. R., Pritchard G. G., Lutz-Wahl S., Fischer L. Stability and specificity of the cell wall associated proteinase from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* H2 released by treatment with lysozyme in the presence of calcium ions. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992. Vol. 58, № 10. P. 3263–3270.
131. Cosentino S., Gravaghi C., Donetti E., Donida B. M., Lombardi G., Bedoni M., Fiorilli A., Tettamanti G., Ferraretto A. Casein-phosphopeptide-Induced Calcium Uptake in Human Intestinal Cell Lines HT-29 and Caco2 is Correlated to Cellular Differentiation. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2010. Vol. 21, № 3. P. 247–254.

132. Goulding D. A., Fox P. F., O'Mahony J. A. Milk protein: An overview. *Milk protein. From expression to food* / Eds. M. Boland, H. Singh. 3rd edn. London, United Kingdom : Academic Press, 2020. P. 21–98.
133. Cross K. J., Huq N. L., Reynolds E. C. Anticariogenic peptides. *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease. Nutraceutical Science and Technology* / Eds. Y. Mine, F. Shahidi. New York : CRC, 2006. P. 335–351.
134. Crowley S. V., O'Mahony J. A., Fox P. F. The proteins of milk. *Achieving Sustainable Production of Milk. Volume 1: Milk composition, genetics and breeding* / Ed. N. Van Belzen. Philadelphia, USA : Burleigh Dodds Science Publishing Limited, 2017. 360 p.
135. Dalabasmaz S., Dittrich D., Kellner I., Drewello T., Pischetsrieder M. Identification of Peptides Reflecting the Storage of UHT Milk by MALDI-TOF-MS Peptide Profiling. *Journal of Proteomics*. 2019. Vol. 207. 103444.
136. Damodaran S., Parkin K. L. Fennema's food chemistry. Boca Raton : CRC Press, 2017. 1107 p.
137. D'Auria E., Mameli C., Piras C., Cococcioni L., Urbani A., Zuccotti G. V., Roncada P. Precision Medicine in Cow's Milk Allergy: Proteomics Perspectives from Allergens to Patients. *Journal of Proteomics*. 2018, Vol. 188. P. 173–180.
138. DeBoer R. Information sheets: Milk, lipids, cheese, whey. *From milk by-products to milk ingredients: Upgrading the cycle* / Ed. R. DeBoer. Chichester, UK : John Wiley & Sons Ltd, 2014. P. 207–262.
139. De Kruif C. G., Holt C. Casein micelle structure, functions and interactions. *Advanced dairy chemistry. Volume 1: Proteins* / Eds. P. F. Fox, P. L. H. McSweeney. 3rd edn. New York : Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. P. 233–276.
140. De Kruif C. G. The structure of casein micelles: A review of small-angle scattering data. *Journal of Applied Crystallography*. 2014. Vol. 47. P. 1479–1489.

141. Demers-Mathieu V., Gauthier S. F., Britten M., Fliss I., Robitaille G., Jean J. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. *International Dairy Journal*. 2013. Vol. 28, № 2. P. 94–101.
142. Demmelmair H., Prell C., Timby N., Lönnerdal B. Benefits of lactoferrin, osteopontin and milk fat globule membranes for infants. *Nutrients*. 2017. Vol. 9, №7. 817.
143. Devold T.G., Rykke M., Isabey D., Sørensen E. S., Christensen B., Langsrud T., Svenning C., Borch-Johnsen B., Karlsen J., Vegarud G. E. In vitro studies of adsorption of milk proteins onto tooth enamel. *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16, № 9. P. 1013–1017.
144. Deeth H. C., Bansal N. (eds.) *Whey protein: From Milk to Medicine* (1st edition). London, United Kingdom : Academic Press, 2019. 746 p.
145. Drucker D. J. Enhancing the action of incretin hormones: a new whey forward? *Endocrinology* . 2006. Vol. 147. P 3171–3172.
146. Dupont D., Croguennec T., Brodkorb A., Kouaouci R. Quantitation of proteins in milk and milk products. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 87–134.
147. Dupree E. J., Jayathirtha M., Yorkey H., Mihasan M., Petre B. A., Darie C. C. A Critical Review of Bottom-up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field. *Proteomes*. 2020. Vol. 8, № 3. 14.
148. Dziuba M., Dziuba B., Iwaniak A. Milk proteins as precursors of bioactive peptides. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*. 2009. Vol. 8, № 1. P. 71–90.
149. Dziuba J., Kostyra H., Dziuba M. *Food biochemistry: (methods, assignments and tests)*. 1.15. Bioinformatic methods used in the study of bioactive proteins and peptides – database of bioactive proteins and peptides – BIOPEP. *Wyd. UWM Olsztyn*, 2012. P. 102-113.

150. Dziuba J., Iwaniak A., Niklewicz M. (2003) Database of protein and bioactive peptide sequences – BIOPEP. URL: <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>. Accessed 24 Sept 2012.
151. Dziuba B., Dziuba M. Milk proteines-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*. 2014. Vol. 13, № 1. P. 5–25.
152. Ebner J., Baum F., Pischetsrieder M. Identification of Sixteen Peptides Reflecting Heat and/or Storage Induced Processes by Profiling of Commercial Milk Samples. *Journal of Proteomics*. 2016. Vol. 147. P. 66–75.
153. Ecroyd H., Thorn D. C., Liu Y., Carver J. A. The dissociated form of  $\kappa$ -casein is the precursor to its amyloid fibril formation. *Biochemical Journal*. 2010. Vol. 429, Iss. 2. P. 251–260.
154. Edwards P. J. B., Jameson G. B. Structure and stability of whey proteins. *Milk protein. From expression to food* / Eds. M. Boland, H. Singh. 3rd edn. London, United Kingdom : Academic Press, 2020. P. 251–291.
155. El-Agamy E. I. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*. 2007. Vol. 68, № 1-2. P. 64–72.
156. Elbarbary H. A., Abdou A. M., Park E. Y., Nakamura Y., Mohamed H. A., Sato K. Novel antibacterial lactoferrin peptides generated by rennet digestion and autofocusing technique. *International Dairy Journal*. 2010. Vol. 20. P. 646–651.
157. Elbarbary H. A., Abdou A. M., Nakamura Y., Park E. Y., Mohamed H. A., Sato K. Identification of novel antibacterial peptides isolated from a commercially available casein hydrolysate by autofocusing technique. *Biofactors*. 2012. Vol. 38. P. 309–315.
158. Ellegard K. H., Gammelgard-Larsen C., Sorensen E. S., Fedosov S. Process Scale Chromatographic Isolation, Characterization and



- Identification of Tryptic Bioactive Casein Phosphopeptides. *International Dairy Journal*. 1999. Vol. 9, № 9. P. 639–652.
- 159.Exterkate F. A., Albing A. C., Bruinenberg P. G. Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993. Vol. 59. P. 3640–3647.
- 160.Fang Z. H., Visker M. H. P. W., Miranda G. Delacroix-Buchet A., Bovenhuis H., Martin P. The relationships among bovine  $\alpha_S$ -casein phosphorylation isoforms suggest different phosphorylation pathways. *Journal of Dairy Science*. 2009. Vol. 99, №10. P. 8168–8177.
- 161.Farkye N. Y., Madkor S. A., Atkins H. G. Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system. *International Dairy Journal*. 1995. Vol. 5, № 7. P. 715–725.
- 162.Farkye N. Y., Bansal N. Enzymes indigenous to milk. Other enzymes. *Encyclopedia of dairy sciences: Volume 2* / Eds. J. W. Fuquay, P. F. Fox, P. L. H. McSweeney. 2nd ed. San Diego, CA : Academic Press, 2011. P. 327–334.
- 163.Farrell H. M. Jr., Kumosinski T. F., Thompson M. P., Pulaski P. Calcium-induced associations of the caseins: a thermodynamic linkage approach to precipitation and resolubilization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1998. Vol. 265, №. 1. P. 146–158.
- 164.Farrell H. M., Wickham E. D., Groves M. L. Environmental influences on purified  $\kappa$ -casein: disulfide interactions. *Journal of Dairy Science*. 1998. Vol. 81, №.11. P. 2974–2984.
- 165.Farrell H. M., Wickham E. D., Unruh J. J., Qi P. X., Hoagland P. D. Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of  $\beta$ -casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. *Food Hydrocolloids*. 2001. Vol. 15, №4-6. P. 341–354.
- 166.Farrell H. M., Cooke H. Y., Wickham E. D., Piotrowski E. G., Hoagland P. D. Environmental influences on bovine kappa-casein:

- Reduction and conversion to fibrillar (amyloid) structures. *Journal of Protein Chemistry*. 2003. Vol. 22, № 3. P. 259–273.
167. Farrell H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Swaisgood H. E. Nomenclature of the proteins of cows' milk sixth revision. *Journal of Dairy Science*. 2004. Vol. 87, № 6. P. 1641–1674.
168. Farrell H. M., Malin E. L., Brown E. M., Mora-Gutierrez A. Review of the chemistry of  $\alpha_{S2}$ -casein and the generation of a homologous molecular model to explain its properties. *Journal of Dairy Science*. 2009. Vol. 92, № 4. P. 1338–1353.
169. Fedosov S. N., Petersen T. E., Nexo E. Transcobalamin from cow milk: isolation and physico-chemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1996. Vol. 1292, № 1. P. 113–119.
170. Fekete A. A., Givens D. I., Lovegrove J. A. The impact of milk proteins and peptides on blood pressure and vascular function: A review of evidence from human intervention studies. *Nutrition Research Reviews*. 2013. Vol. 26. P. 177–190.
171. Fernández-Musoles R., Salom J. B., Martínez-Maqueda D., López-Díez J. J., Recio I., Manzanares P. Antihypertensive effects of lactoferrin hydrolyzates: inhibition of angiotensin- and endothelin-converting enzymes. *Food Chemistry*. 2013. Vol. 139. P. 994–1000.
172. Ferraretto A., Gravaghi C., Fiorilli A., Tettamanti G. Casein – derived bioactive phosphopeptides: Role of phosphorylation and primary structure in promoting calcium uptake by Ht-29 tumor cells. *FEBS Letters*. 2003. Vol. 551, № 1–3. P. 92–98.
173. Feuermann Y., Mabjeesh S.J., Shamay A. Leptin affects prolactin action on milk protein and fat synthesis in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*. 2004. Vol. 87, № 9. P. 2941–2946.
174. Feuermann Y., Mabjeesh S. J., Niv-Spector L., Levin D., Shamay A. Prolactin affects leptin action in the bovine mammary gland via the

- mammary fat pad. *Journal of Endocrinology*. 2006. Vol. 191, № 2. P. 407–413.
175. Feuermann Y., Shamay A., Mabweesh S. J. Leptin up-regulates the lactogenic effect of prolactin in the bovine mammary gland in vitro. *Journal of Dairy Science*. 2008. Vol. 91, № 11. P. 4183–4189.
176. Fiat A. M., Migliore D., Jolles P. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunostimulating activities. *Journal of Dairy Science*. 1993. Vol. 76, № 1. P. 301–310.
177. FitzGerald R. J. Potential uses of caseinophosphopeptides. *International Dairy Journal* 1998. Vol. 8. № 5–6. P. 451–457.
178. FitzGerald R. J., Meisel H. Lactokinins: Whey protein derived ACE inhibitory peptides. *Nahrung*. 1999. Vol. 43, № 3. P. 165–167.
179. FitzGerald R. J., Murray B. A., Walsh D. I. Hypertensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition*. 2004. Vol. 134, № 4. P. 980S–988S.
180. Florisa R., Recio I., Berkhout B., Visser S. Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Current Pharmaceutical Design*. 2003. Vol. 9, № 16. P. 1257–1275.
181. Fox P. F., Kelly A. L. Developments in the chemistry and technology of milk proteins 2. Minor milk proteins. *Food Australia*. 2003. Vol. 55. P. 231–234.
182. Fox P. F., Kelly A. L. Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects. Part 1. *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16. P. 500–516.
183. Fox P. F., Brodtkorb A. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*. 2008. Vol. 18, Iss. 7. P. 677–684.
184. Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. *Dairy Chemistry and Biochemistry (Second Edition)*. New York : Springer, 2015. 585 p.

185. Freiburghaus C., Lindmark-Månsson H., Paulsson M., Oredsson S. Reduction of ultraviolet light- induced DNA damage in human colon cancer cells treated with a lactoferrin-derived peptide. *Journal of Dairy Science*. 2012. Vol. 95. P. 552–5560.
186. Gagnaire V., Molle D., Herrouin M., Leonil J. Peptides identified during Emmental cheese ripening: Origin and proteolytic systems involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. Vol. 49. P. 4402–4413.
187. Gagnaire V., Jardin J., Jan G., Lortal S. Invited review: Proteomics of milk and bacteria used in fermented dairy products: from qualitative to quantitative advances. *Journal of Dairy Science*. 2009. Vol. 92, № 3. P. 811–825.
188. Garcia-Nebot M. J., Barbera R., Alegria A. Iron and zinc bioavailability in Caco-2 cells: influence of caseinophosphopeptides. *Food Chemistry*. 2013. Vol. 138. P. 1298–1303.
189. Gatti M., Fornasari M.E., Lazzi C. Peptidase activity in various species of dairy thermophilic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 2004. Vol. 96, № 2. P. 223–229.
190. Gaudel C., Nongonierma A. B., Maher S., Flynn S., Murray B. A., Kelly P. M., Krause M., FitzGerald R. J., Newsholme P. A whey protein hydrolysate promotes insulinotropic activity in a clonal pancreatic  $\beta$ -cell line and enhances glycemic function in ob / ob mice. *The Journal of Nutrition*. 2013. Vol. 143. P. 1109–1114.
191. Gauthier S. F., Pouliot Y., Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*. 2006. V. 16, № 11. P. 1315–1323.
192. Geerts B. F., van Dongen M. G. J., Flameling B., Moerland M. M., de Kam M. L., Cohen A. F., Romijn J. A., Gerhardt C. C., Kloek J., Burggraaf J. Hydrolyzed casein decreases postprandial glucose concentrations in T2DM patients irrespective of leucine content. *Journal of Dietary Supplements*. 2011. Vol. 8. P. 280–292.

193. Giacometti J., Buretić-Tomljanović A. Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. *Food Chemistry*. 2017. Vol. 230. P. 91–98.
194. Gill H. S., Doull F., Ruterfurd K. J., Cross M. L. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*. 2000. V. 84, Suppl.1. P. 111–117.
195. Girardet J. M., Linden G. PP3 component of bovine milk: a phosphorylated whey glycoprotein. *Journal of Dairy Research*. 1996. Vol. 63, № 2. P. 333–350.
196. Givens I. Milk and dairy foods: implications for cardiometabolic health. *Cardiovascular Endocrinology and Metabolism*. 2018. Vol. 7, № 3. P. 56–57.
197. Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F., Addeo F. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. Vol. 66, № 9. P. 3898–3904.
198. Gobbetti M., Stepaniak L., De Angelis M., Corsetti A., Cagno R. Di. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*. 2002. Vol. 42, № 3. P. 223–239.
199. Gobbetti M., Minervini F., Grizzello C. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Dairy Journal*. 2004. Vol. 57, № 2/3. P. 173–188.
200. Gobbetti M., Minervini F., Rizzello C. Bioactive Peptides in Dairy Products. *Handbook of Food Products Manufacturing: Principles, Bakery, Beverages, Cereals, Cheese, Confectionary, Fats, Fruits and Functional Foods* / Ed. Y.H. Hui. Hoboken, New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2007. P. 489–517.
201. Gómez-Ruiz J. Á., Ramos M., Recio I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different

- starter cultures. *International Dairy Journal*. 2002. Vol. 12, № 8. P. 697–706.
202. Gómez-Ruiz J., Taborda G., Amigo L., Recio I., Ramos M. Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology*. 2006. Vol. 223, № 5. P. 595–601.
203. Guaadaoui A., Benaicha S., Elmajdoub N., Bellaoui M., Namal A. What is a Bioactive Compound? A Combined Definition for a Preliminary Consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 2014. Vol. 3, №. 3. P. 174–179.
204. Guasch L., Ojeda M. J., Gonzalez-Abuin N., Sala E., Cereto-Massague A., Mulero M., Valls C., Pinent M., Ardevol A., Garcia-Vallve S., Pujadas G. Identification of novel human dipeptidyl peptidase-IV Inhibitors of natural origin (part I): virtual screening and activity assays. *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 9. e 44971.
205. Guilloteau P., Rome V., Delaby L., Mendy F., Roger L., Chayvialle J. A. A new role of phosphopeptides as bioactive peptides released during milk casein digestion in the young mammal: regulation of gastric secretion. *Peptides*. 2009. Vol. 30. P. 2221–2227.
206. Guo M. R., Fox P. F., Flynn A., Kindstedt P. S. Susceptibility of  $\beta$ -lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. *Journal of Dairy Science*. 1995. Vol. 78, № 11. P. 2336–2344.
207. Gurunathan D., Somasundaram S., Kumar S. A. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a remineralizing agent of enamel. *Australian Dental Journal*. 2012. Vol. 57. P. 404–408.
208. Hafeez Z., Cakir-Kiefer C., Girardet J. M., Jardin J., Perrin C., Dary A., Miclo L. Hydrolysis of milk-derived bioactive peptides by cell-associated extracellular peptidases of *Streptococcus thermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 97. P. 9787–9799.
209. Hafeez Z., Cakir-Kiefer C., Roux E., Perrin C., Mido L., Dary-Mourot A. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to

- functionalize fermented milk products. *Food Research International*, 2014. Vol. 63. P. 71-80
210. Haque E., Chand R., Kapila S. Biofunctional Properties of Bioactive Peptides of Milk Origin. *Food Reviews International*. 2009. Vol. 25, № 1. P. 28–43.
211. Hartmann R., Meisel H. Food derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007. Vol. 18, № 2. P. 163–169.
212. Hashimoto K., Sato K., Nakamura Y., Ohtsuki K. Development of continuous type apparatus for ampholyte-free isoelectric focusing (autofocusing) of peptides in protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. Vol. 54. P. 650–655.
213. Hata I., Higashiyama S., Otani H. Identification of a Phosphopeptide in Bovine  $\alpha_{S1}$ -Casein Digest as a Factor Influencing Proliferation and Immunoglobulin Production in Lymphocyte Cultures. *Journal of Dairy Research*. 1998. Vol. 65, № 4. P. 569–578.
214. Hata I., Ueda J., Otani H. Immunostimulatory Action of a Commercially Available Casein Phosphopeptide Preparation, CPP-III. in Cell Cultures. *Milchwissenschaft*. 1999. Vol. 54, № 1. P. 3–7.
215. Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Hatzoglou C., Martin P-M., Castanas E. Antiproliferative and receptor binding properties of  $\alpha$ - and  $\beta$ -casomorphins in the T47D human breast cancer cell line. *European Journal of Pharmacology*. 1996. Vol. 310. P. 217–223.
216. Hayes M., Ross R. P., FitzGerald G. F., Hill C., Stanton C. Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC 6026. *Applied Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 72, № 3. P. 2260–2264.
217. Heid H. W., Moll R., Schwetlick I., Rackwitz H. R., Keenan T. W. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell and Tissue Research*. 1998. Vol. 294, № 2. P. 309–321.

218. Hernández-Ledesma B., Miralles B., Amigo L., Ramos M., Recio I. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 2005. Vol. 85, № 6. P. 1041–1048.
219. Hernandez-Ledesma B., Hsieh C.C. *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*. Rijeka, Croatia : InTech, 2013. 266 p.
220. Herraiz T., Casal V. Evaluation of solid-phase extraction procedures in peptide analysis. *Journal of Chromatography A*. 1995. Vol. 708. P. 209–221.
221. Hindmarsh J. P., Watkinson P. Experimental evidence for previously unclassified calcium phosphate structures in the casein micelle. *Journal of Dairy Science*. 2017. Vol. 100, №9. P. 6938–6948.
222. Holder A., Birke A., Eisele T., Klaiber I., Fischer L., Hinrichs J. Selective isolation of angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides from micellar casein and  $\beta$ -casein hydrolysates via ultrafiltration. *International Dairy Journal*. 2013. Vol. 31. P. 34–40.
223. Holland J. W., Deeth H. C., Alewood P. F. Proteomic analysis of  $\kappa$ -casein microheterogeneity. *Proteomics*. 2004. Vol. 4, Iss. 3. P. 743–752.
224. Holland J. W., Deeth H. C., Alewood P. F. Analysis of O-glycosylation site occupancy in bovine  $\kappa$ -casein glycoforms separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2005. Vol. 5, Iss. 4. P. 990–1002.
225. Holland J. W., Deeth H. C., Alewood P. F. Resolution and characterisation of multiple isoforms of bovine  $\kappa$ -casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy. *Proteomics*. 2006. Vol., Iss. 10. P. 3087–3095.
226. Holt C. The biological function of casein. *Yearbook / Ed. E. Taylor*. Ayr, United Kingdom : Hannah Research Institute, 1994. P. 60-68.
227. Holt C., Timmins P. A., Errington N., Leaver J. A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by  $\beta$ -casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small angle X-ray and



- neutron scattering measurements. *European Journal of Biochemistry*. 1998. Vol. 252, № 1. P. 73–78.
- 228.Holt C. (2001), ‘Calcium phosphate nanoclusters and their application’, World Patent, WO014410.
- 229.Holt C., Carver J. A., Ecroyd H., Thorn D. C. Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*. 2013. V. 96, № 10. P. 6127–6146.
- 230.Holt C. Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species. *International Dairy Journal*. 2016. Vol. 60. P. 2–13.
- 231.Horne D. S. Casein micelle structures and stability. *Milk proteins: From expression to food* / Eds. H. Singh, M. Boland, A. Thompson. 2nd ed. Amsterdam, Netherland : Elsevier, 2014. P. 169–200.
- 232.Hoskin D. W., Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *BBA Biomembranes*. 2008. Vol. 1778. P. 357–375.
- 233.Huppertz T. Chemistry of the caseins. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 130–160.
- 234.Huppertz T., Fox P. F., Kelly A. L. The caseins: structure, stability, and functionality. *Proteins in Food Processing* / Ed. R. Y. Yada. 2nd ed. Cambridge, United Kingdom : Woodhead Publishing, 2018. P. 49–92.
- 235.Hynes E. R., Meinardi C. A., Sabbag N., Cattaneo T., Candiotti M. C., Zalazar C. A. Influence of milk-clotting enzyme concentration on the  $\alpha_{S1}$ -casein hydrolysis. *Journal of Dairy Science*. 2001. Vol. 84, № 6. P. 1335–1340.
- 236.Hyslop D. B. Enzymatic coagulation of milk. *Advanced dairy chemistry. Volume 1: Proteins* / Eds. P. F. Fox, P. L H. McSweeney. 3rd edn. New York : Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. P. 839–878.

- 237.Imafidon G. F., Farkye N. Y., Spanier A. M. Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: A review. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*. 1997. Vol. 37, № 7. P. 663–689.
- 238.Ismail B., Nielsen S. S. Invited review: Plasmin protease in milk: current knowledge and relevance to dairy industry. *Journal of Dairy Science*. 2010. Vol. 93. P. 4999–5009.
- 239.Iukalo A. V. New Approach for Isolation of Individual Caseins from Cow Milk by the Preparative Electrophoresis. *Advances in Biological Chemistry*. 2014. V. 4. P. 382–387.
- 240.Iukalo A. V. Identification of protein fractions of milk cows casein complex. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2015. – Vol. 87, № 4. P. 87–91.
- 241.Iukalo A., Tsisaryk O., Yukalo V. Obtaining of casein fractions by preparative ion-exchange chromatography on weak anion-exchangers. Abstracts American Dairy Science Association. *Journal of Dairy Science*. 2015. Vol. 98, Suppl. 2. P. 43.
- 242.Iwasa M., Aoi W., Mune K., Yamauchi H., Furuta K., Sasaki S., Takeda K., Harada K., Wada S., Nakamura Y., Sato K., Higashi A. Fermented milk improves glucose metabolism in exercise-induced muscle damage in young healthy men. *Nutrition Journal*. 2013. Vol. 12. P. 83.
- 243.Janer C., Arigoni F., Lee B. H. Peláez C., Requena T. Enzymatic ability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to hydrolyze milk proteins: identification and characterization of endopeptidase O. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71, № 12. P. 8460–8465.
- 244.Jhaveri A., Arya S. S. Lactoferrin: health benefits, technology and applications. *Agro Food Industry Hi-Tech*. 2015. Vol. 26, № 6. P 40–43.
- 245.Jiang R. L., Lonnerdal B. Biological roles of milk osteopontin. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2016. Vol. 19. P. 214–219.

246. Jolles P., Fiat A.M., Migliore-Samour D. et al. Peptides from milk proteins implicated in infant nutrition. New York : Thieme medical publications, 1992. P. 53–57.
247. Jones F.S., Simms H. S. The bacterial growth inhibitor (lactenin) of milk. *Journal of Experimental Medicine*. 1930. Vol. 51. P. 327–339.
248. Juillard V., Laan H., Kunji E. R. S. The extracellular P<sub>1</sub>-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes  $\beta$ -casein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal of Bacteriology*. 1995. Vol. 177. P. 3472–3478.
249. Kamau S.M., Cheison S.Ch., Chen W., Liu X.-M., Lu R.-R. Alpha-Lactalbumin: its production technologies and bioactive peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010. Vol. 9. P. 197–212.
250. Kayser H., Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters*. 1996. V. 383, № 1–2. P. 18–20.
251. Kibangou I.B., Bouhallab S., Henry G., Bureau F., Blais A., Guérin P., Arhan P., Bouglé D. L. Milk Proteins and Iron Absorption: Contrasting Effects of Different Caseinophosphopeptides. *Pediatric Research*. 2005. Vol. 58, № 4. P. 731–734.
252. Kitts D. D. Antioxidant properties of caseinophosphopeptides. *Trends in Food Science & Technology*. 2005. Vol. 16. P. 549–554.
253. Kitts D. D. Calcium binding peptides. *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease. Nutraceutical Science and Technology* / Eds. Y. Mine, F. Shahidi. New York, USA : CRC Precc, 2006. P. 11–27.
254. Koch K., Wiedemann K., Drebes E. Human  $\beta$ -casomorphin-8 immunoreactive material in the plasma of women during pregnancy and after delivery. *Regulatory Peptides*. 1998. Vol. 20. P. 107–117.
255. Kohl S., Behrens M., Dunkel A., Hofmann T., Meyerhof W. Amino acids and peptides activate at least five members of the human bitter

- taste receptor family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013. Vol. 61, № 1. P. 53–60.
256. Konrad G., Klenschmidt T. A new method for isolation of native  $\alpha$ -lactalbumin from sweet whey. *International Dairy Journal*. 2008. Vol. 18, № 1. P. 47–54.
257. Korhonen H. Antibacterial and antiviral activities of whey proteins, the impotence of whey and whey components in food and nutrition. Proc. 3rd *International Whey Conference. Munich, Germany*. 2001. P. 303–321.
258. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: Novel applications for milk proteins. *Applied Biotechnology. Food Science and Policy*. 2003. Vol. 1. P. 133–144.
259. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16, № 9. P. 945–960.
260. Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*. 2009. Vol. 1, № 2. P. 177–187.
261. Korhonen H., Marnila P. Lactoferrin. *Encyclopedia of dairy sciences: Volume 3* / Eds. J. W. Fuquay, P. F. Fox, P. L. H. McSweeney. 2nd ed. San Diego, CA : Academic Press, 2011. P. 807–815.
262. Kovacs-Nolan Y., Mine J. Heavy-Metal-Binding Proteins. *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease. Nutraceutical Science and Technology* / Eds. Y. Mine, F. Shahidi. New Your, USA : CRC Precc, 2006. P. 69–80.
263. Kozu T., Iinuma G., Ohashi Y., Saito Y., Akasu T., Saito D., Alexander D.B., Iigo M., Kakizoe T., Tsuda H. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the growth of adenomatous colorectal polyps in a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Cancer Prevention Research*. 2009. Vol. 2. P. 975–983.
264. Kramski M., Center R. J., Wheatley A. K., Jacobson J. C., Alexander M. R., Rawlin G., Purcel D. F. J. Hyperimmune bovine colostrum as a low-cost, large-scale source of antibodies with broad neutralizing activity for

- HIV-1 envelope with potential use in microbicides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012. Vol. 56. P. 4310-4319.
265. Kunji E. R., Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings W. N. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1996. Vol. 70, № 2-4. P.187-221.
266. Kunji E. R. S., Fang G., Geronimus-Stratingh C. M., Bruins A. P., Poolman B., Konings W. N. Reconstruction of the proteolytic pathway for use of beta-casein by *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*. 1998. Vol. 27, № 6. P. 1107–1118.
267. Lacroix I. M., Li-Chan E. C. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides*. 2014. Vol. 54. P. 39–48.
268. Lahov E., Edelsten D., Sode-Morgensen M. T., Sofer E. Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat. *Milchwissenschaft*. 1971. Vol. 26. P. 489–495.
269. Lahov E., Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: caseicidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*. 1996. V.34 P. 131–145.
270. Lalor F., Wall P. G. Making and justifying health claims. *International Journal of Dairy Technology*. 2013. Vol. 66. P. 321–324.
271. Law B. A., Sezgin E., Sharpe M. A. Amino acid nutrition of some commercial cheese starters in relation to their growth in peptone supplemented whey media. *Journal Dairy Research*. 1976. Vol. 43, № 2. P. 291–300.
272. Law B. A., Haandrikman A. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 1997. Vol. 7, № 1. P. 1–11.
273. LeBlanc J. G., Matar C., Valdez J. C, LeBlanc J., Perdigon G. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus* . *Journal of Dairy Science*. 2002. Vol. 85. P. 2733–2742.

- 274.Lee M., Lee H., Kim J. Dairy food consumption is associated with a lower risk of the metabolic syndrome and its components: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition*. 2018. Vol. 120, № 4. P. 373–384.
- 275.Leopold J. A., Loscalzo J Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009. Vol. 47. P.1673–1706.
- 276.Li-Chan E. C. Y. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*. 2015. Vol. 1. P. 28–37.
- 277.Lilius E. M., Mamila P. The role of colostral antibodies in prevention of microbial infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2001. Vol. 14. P 295–300.
- 278.Llena C., Forner L., Baca P. Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a review of the literature. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2009. Vol. 10. P. 1–9.
- 279.Lönnerdal B., Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annual Review of Nutrition*. 1995. Vol. 15. P. 93–100.
- 280.Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003. Vol. 77. P. 1537–1543.
- 281.Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *The Journal of Pediatrics*. 2010. Vol. 156. P. 26–S30.
- 282.Lönnerdal B. J. Bioactive proteins in breast milk. *Pediatrics and Child Health*. 2013. Vol. 49. P. 1–7.
- 283.Lönnerdal B., Suzuki Y. A. Lactoferrin. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 295–315.
- 284.Lopes-Fandino R., Otte J., van Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk protein derived peptides with

- antihypertensive and ACE inhibitory activity. *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16, № 11. P. 1277–1293.
- 285.Lopez C. Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Curent Opinion in Colloid and Interface Science*. 2011. Vol. 16, № 5. P. 391–404.
- 286.Losacco M., Gallerani R., Gobbetti M., Minervini F., De Leo F. Production of active angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine  $\beta$ -casein by recombinant DNA technologies. *Biotechnology Journal*. 2007. Vol. 2. P. 1425–1434.
- 287.Lozano J., Giraldo G., Romero C. An improved method for isolation of  $\beta$ -lactoglobulin. *International Dairy Journal*. 2008. Vol. 18, № 1. P. 55–63.
- 288.Lucey J. A., Horne D. S. Perspectives on casein interactions. *International Dairy Journal*. 2018. V. 85. P. 56–65.
- 289.Luhovyy B., Akhavan T., Anderson G.H. Whey Proteins in Regulation of Food Intake and Satiety. *Journal of American College of Nutrition*. 2007. Vol. 26., № 6. P. 704–712.
- 290.Luoma S., Peltoniemi K., Joutsjoki V., Rantanen T., Tamminen M., Heikkinen I., Palva A. Expression of six peptidases from *Lactobacillus helveticus* in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, Vol. 67, № 3. P. 1232–1238.
- 291.MacDonald R. S., Thornton W. H. Jr., Marshall R. T. A cell culture model to identify biologically active peptides generated by bacterial hydrolysis of casein. *Journal of Dairy Science*. 1994. Vol. 77. P. 1167–1175.
- 292.Madureira A. R., Pereira C. I., Gomes A. M. P. Bovine whey proteins. Overview on the main biological properties. *Food Research International*. 2007. Vol. 40, № 10. P. 1197–1211.
- 293.Madureira A. R., Tavares T., Gomes A. M. P., Pintado M. E., Malcata F.X. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 2010. V. 93, № 2. P. 437–455.

294. Maeno M., Yamamoto N., Takano T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*. 1996. Vol. 79, Iss. 8. P.1316–1321.
295. Maes W., Van Camp J., Vermeirssen V., Hemeryck M., Ketelslegers J. M., Schrezenmeir J., Van Oostveldt P., Huyghebaert A. Influence of the lactokinin, Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides*. 2004. Vol. 118, № 1–2. P. 105–109.
296. Mahmud R., Matn M.A., Otani H. Mitogenic effect of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and its proteolytic digests on mouse spleen resting cells. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2004. Vol. 7, № 12. P. 2047–2050.
297. Malik S., Fu L., Juras D. J., Karmali M., Wong B. Y., Gozdzik A., Cole D. E. C. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2013, Vol. 50. P. 1–22.
298. Malin E. L., Brown E. M., Wickham E. D., Farrell H. M. Jr. Contributions of terminal peptides to associative behavior of  $\alpha_{S1}$ -casein. *Journal of Dairy Science*. 2005. Vol. 88, №7. P. 2318–2328.
299. Malkoski M., Dashper S.G., O'Brien-Simpson N. M., Talbo G. H., Macris M., Cross K. J., Reynolds E. C. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001. Vol. 45, № 8. P. 2309–2315.
300. Manders R. J., Koopman R., Sluijsmans W. E., van den Berg R., Verbeek K., Saris W. H., Wagenmakers A. J., van Loon L. J. Co-ingestion of a protein hydrolysate with or without additional leucine effectively reduces postprandial blood glucose excursions in type 2 diabetic men. *The Journal of Nutrition*. 2006. Vol. 136. P. 1294–1299.
301. Manders R. J. F., Hansen D., Zorenc A. H. G., Dendale P., Kloek J., Saris W. H. M., van Loon L. J. Protein co-ingestion strongly increases



- postprandial insulin secretion in type 2 diabetes patients. *Journal of Medicinal Food*. 2014. Vol. 17, № 7. P. 758–763.
302. Mann B., Kumari A., Kumar R., Sharma R., Prajapati K., Mahboob S., Athira S. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*. 2015. Vol. 52, № 6. P. 3235–3241.
303. Mann B., Athira S., Sharma R., Kumar R., Sarkar P. Bioactive Peptides from Whey Proteins. *Whey Proteins* / Eds. H. C. Deeth, N. Bansal. London : Academic Press, 2019. P. 519–547.
304. Manso M. A., López-Fandiño R.  $\kappa$ -Casein Macropeptides from Cheese Whey: Physicochemical, Biological, Nutritional, and Technological Features for Possible Uses. *Food Reviews International*. 2004. Vol. 20, № 4. P. 329–355.
305. Marchbank T., Playford R. J. Colostrum: Its health benefits in milk and dairy products as functional foods. *Milk and Dairy Products as Functional Foods* / Ed. A. Kanekanian. London, UK: Wiley-Blackwell, 2014. P. 55–83.
306. Marcone S., Belton O., Fitzgerald D. Milk derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2017. Vol. 83, № 1. P. 152–162.
307. Marnila P., Korhonen H. Immunoglobulins. *Encyclopedia of dairy sciences: Volume 2* / Eds. J. W. Fuquay, P. F. Fox, P. L. H. McSweeney. 2nd ed. San Diego, CA : Academic Press, 2011. P. 807–815.
308. Martin P., Bianchi L., Cebo C., Miranda G. Genetic polymorphism of milk proteins. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 463–514.
309. Martinez-Maqueda D., Miralles B., Recio I., Hernandez-Ledesma B. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food and Function*. 2012. Vol. 3. P. 350–361.

310. Maruyama S., Suzuki H. A peptide inhibitor of angiotensin-I-converting enzyme in the tryptic hydrolyzate of casein. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1982. Vol. 46. P. 1393–1394.
311. Maruyama S., Nakagomi K., Tomizuka N., Suzuki H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II Isolation and bradykinin – potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1985. Vol. 49. P. 1405–1409.
312. Maruyama S., Mitachi H., Awaja J., Kurono M., Tomizuka N., Suzuki H. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory of the C-terminal hexapeptide of casein. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1987. Vol. 51, № 9. P. 2557–2561.
313. Massey V., Harris C. M. Milk xanthine oxidoreductase: the first one hundred years. *Biochemical Society Transactions*. 1997. Vol. 25. P. 750–755.
314. Matar C., Le Blanc J. G., Martin L., Perdigon G. Biologically active peptides released in fermented milk : Role and functions . Handbook of fermented functional foods. Functional foods and nutraceuticals series. Boca Raton : CRC Press, 2003. P. 177–201.
315. Mather I. H., Keenan T.W. Origin and secretion of milk lipids. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 1998. Vol. 3. P. 259–273.
316. Mather I. H. A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane. *Journal of Dairy Science*. 2000. Vol. 83, №2. P. 203–247.
317. Matsuoka Y., Serizawa A., Yoshioka T., Yamamura J., Morita Y., Kawakami H., Toba Y., Takada Y., Kumegawa M. Cystatin C in milk basic protein (MBP) and its inhibitory effect on bone resorption in vitro. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2002. Vol. 66. P. 2531–2536.
318. Mattila-Sandholm T., Saarela M. Functional dairy products., Cambridge, England : Woodhead publishing limited, 2003. 394 p.

319. Maubois J. L., Leonil J. Biologically active peptides from milk. *Lait*. 1989. Vol. 69, № 4. P. 245–269.
320. May C., Brosseron F., Pfeiffer K., Meyer H. E., Marcus K. Proteome analysis with classical 2D-PAGE. *Quantitative Methods in Proteomics* / Ed. K. Marcus. Totowa, NJ, USA : Humana Press, 2012. P. 37–46.
321. McCann K. B., Shiell B. J., Michalski W. P., Lee A., Wan J., Roginski H., Coventry M. J. Isolation and characterization of antibacterial peptides derived from the f(164-207) region of bovine  $\alpha_{S2}$ -casein. *International Dairy Journal*. 2005. Vol. 15, Iss 2. P. 133–143.
322. McDonagh D., FitzGerald R. J. Production of caseinophosphopeptides (CPPs) from sodium caseinate using a range of commercial protease preparations. *International Dairy Journal*. 1998. Vol. 8. P. 39–45.
323. McGregor R., Poppitt S. Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. *Nutrition & Metabolism*. 2013. Vol. 10. P. 46.
324. McMahon D. J., Oommen B. S. Casein micelle structure, functions, and interaction. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 185–209.
325. McSweeney P. L. H., Fox P. F. (eds). *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. 548 p.
326. McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A. (eds.) *Advanced Dairy Chemistry – Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*, 4th edn. New York: Springer, 2016. P. 498.
327. Meisel H., Schlimme E. Inhibitors of angiotensin-converting-enzyme derived from bovine casein (casokinins).  *$\beta$ -Casomorphins and related peptides: recent developments* / Eds. V. Brantl, H. Teschemacher. Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1994. P. 27-33.
328. Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*. 1997. Vol. 43, № 1. P. 119–128.

- 329.Meisel H. Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*. 1998. Vol. 8. P. 363–373.
- 330.Meisel H., Bochemann W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhock*. 1999. Vol. 76. P 207–215.
- 331.Meisel H., FitzGerald R. J. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition*. 2000. Vol. 84, Suppl. 1. P. 27–31.
- 332.Meisel H., Bernard H., Fairweather-Tait S., FitzGerald R. J., Hartmann R., Lane C. N., McDonagh D., Teucher B., Wal J. M. Detection of Caseinophosphopeptides in the Distal Ileostomy Fluid of Human Subjects. *British Journal of Nutrition*. 2003. Vol. 89, № 3. P. 351–359.
- 333.Meisel H., FitzGerald R. J. Biofunctional Peptides from Milk Proteins: Mineral Binding and Cytomodulatory Effects. *Current Pharmaceutical Design*. 2003. V. 9, № 16. P. 1289–1295.
- 334.Meisel H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Bio Factors*. 2004. Vol. 21, № 1–4. P. 55–61.
- 335.Mellander O. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta medica Scandinavica*. 1950. Vol. 55, № 5–6. P. 247–255.
- 336.Melnik B. C. Milk – the promoter of chronic Western diseases. *Medical Hypotheses*. 2009. Vol. 72. P. 631–639.
- 337.Mercadante D., Melton L. D., Laurence D., Norris G. E., Loo T. S., Williams M. A. K., Dobson R.C.J., Jameson G. B. Bovine  $\beta$ -lactoglobulin is dimeric under imitative physiological conditions: dissociation equilibrium and rate constants over the pH range of 2.5-7.5. *Biophysical Journal*. 2012. Vol. 103, № 2. P. 303–312.
- 338.Mercier A., Gauthier S. F., Fliss I. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *International Dairy Journal*. 2004. Vol. 14. P. 175–183.

339. Miclo L., Perrin E., Driou A., Papadopoulos V., Boujrad N., Vanderesse R., Boudier J. F., Desor D., Linden G., Gaillard J. L. Characterization of  $\alpha$ -casozepine, a tryptic peptide from bovine  $\alpha_{S1}$ -casein with benzodiazepine-like activity. *The FASEB Journal*. 2001. Vol. 15, № 10. P. 1780–1782.
340. Migliore-Samour D., Jolles P. Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn? *Experientia*. 1988. Vol. 44. P. 188–193.
341. Minervini F., Algaron F., Rizzello C.G., Fox P.F., Monnet V., Gobetti M. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. Vol. 69. P. 5297–5305.
342. Minkiewicz P., Slangen C. J., Lagerwerf F. M., Haverkamp J., Rollema H. S., Visser S. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of bovine kappa-casein macropeptide and characterization of isolated fractions. *Journal of chromatography A*. 1996. Vol. 743, Iss.1. P. 123–135.
343. Minkiewicz P., Slangen C. J., Dziuba J., Visser S., Mioduszevska H. Identification of peptides obtained via hydrolysis of bovine casein by chimosin using HPLC and mass spectrometer. *Milchwissenschaft*. 2000. Vol. 55, № 1. P. 14–17.
344. Miquel E., Farré R. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*. 2007. Vol. 18. P. 139–143.
345. Miralles O., Sánchez J., Palou A., Picy C. A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. *Obesity*. 2006. Vol. 14. P. 1371–1377.
346. Mistou M. Y., Gripon J. C. Catalytic properties of the cysteine aminopeptidase Pep C, a bacterial bleomycin hydrolase. *Biochimica et*

- Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1998. Vol. 1383, № 1. P. 63–70.
347. Miyauchi H., Kaino A., Shinoda I., Fukuwatari Y., Hayasawa H. Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolyzate on murine splenocytes and Peyer's patch cells. *Journal of Dairy Science*. 1997. Vol. 8, № 10. P. 2330–2339.
348. Mohan K. V. P. C., Kumaraguruparan R., Prathiba D., Nagini S. Modulation of xenobiotic-metabolizing enzymes and redox status during chemoprevention of hamster buccal carcinogenesis by bovine lactoferrin. *Nutrition*. 2006. Vol. 22, №9. P. 940–946.
349. Möller N.P., Scholz-Ahrens K.E., Roos N., Schrezenmeir J. Bioactive peptides and proteins from foods : indication for healths effects. *European Journal of Nutrition*. 2008. Vol. 47, № 4. P. 171–182.
350. Monnet V., Nardi M., Chopin A., Chopin M. C., Gripon J. C. Biochemical and genetic characterization of Pep F, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry*. 1994. Vol. 269, №51. P. 32070–32076.
351. Moore S. A., Anderson B. F., Groom G. R., Haridas M., Baker E. N. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 1997. Vol. 274, № 2. P. 222–236.
352. Morel F., Gilbert C., Geourjon C. Frot-Coutaz J., Portalier R, Atlan D. The prolyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* belongs to the alpha/beta hydrolase fold family. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1999. Vol. 1429, № 2. P. 501–505.
353. Morgan M. V., Adams G. G., Bailey D. L., Tsao C. E., Fischman S. L., Reynolds E. C. The Anticariogenic Effect of Sugar-Free Gum Containing CPP-ACP Nanocomplexes on Approximal Caries Determined Using Digital Bitewing Radiography. *Caries Research*. 2008. Vol. 42. P. 171–184.

354. Mori S., Sumino S., Kasumi T. Substrate specificity of a tripeptidase as a metalloenzyme purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ATCC 13675. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002. Vol. 93, № 4. P. 360–366.
355. Morifuji M., Ishizaka M., Baba S., Fukuda K., Matsumoto H., Koga J., Kanegae M., Higuchi M. Comparison of different sources and degrees of hydrolysis of dietary protein: effect on plasma amino acids, dipeptides, and insulin responses in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. Vol. 58. P. 8788–8797.
356. Morita Y., Matsuyama H., Serizawa A., Takeya T., Kawakami H. Identification of angiogenin as the osteoclastic bone resorption-inhibitory factor in bovine milk. *Bone*. 2008. Vol. 42, № 2. P. 380–387.
357. Morris P. E., FitzGerald R. J. Whey proteins and peptides in human health. *Whey processing, functionality and health benefits* / Eds. C. Onwulata, P. Huth. Ames : Wiley-Blackwell, 2009. P. 285–343.
358. Motta T. M. C., Hoff R. B., Barreto F., Andrade R. B. S., Lorenzini D. M., Meneghini L. Z., Pizzolato T. M. Detection and Confirmation of Milk Adulteration with Cheese Whey Using Proteomic-like Sample Preparation and Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Talanta*. 2014. Vol. 120. P. 498–505.
359. Moughan P. J. Milk protein: A rich source of bioactives for developing functional foods. *Milk protein. From expression to food* / Eds. M. Boland, H. Singh. 3rd edn. London, United Kingdom : Academic Press, 2020. P. 633–649.
360. Mullally M. M., Meisel H., FitzGerald R. J. Synthetic peptides corresponding to  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 1996. Vol. 377, №4. P. 259–260.
361. Murakami M., Tonouchi H., Takahashi R., Kitazawa H., Kawai Y., Negishi H., Saito. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide

- ( $\beta$ -lactosin B) isolated from a commercial whey product. *Journal of Dairy Science*. 2004. Vol. 87, № 7. P. 1967–1974.
362. Muro C., Riera F., Fernández A. Advancements in the fractionation of milk biopeptides by means of membrane processes. *Bioactive food peptides in health and disease* / Ed. B. Hernández-Ledesma. Rijeka : InTech, 2013. P. 241–266.
363. Myronovskij S., Negrych N., Nehrych T., Starykovych M., Tkachenko V., Yukalo V., Storozh L., Nemchenko O., Lavryk G., Stoika R., Kit Y. Isolation and characterization of peptides from blood serum of patients with multiple sclerosis. *Studia Biologica*. 2015. Vol. 9, №2. P. 51–58.
364. Nagaoka S.Y., Futamura K., Miwa T. Identification of novel hypoholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001. Vol. 281, № 1 . P. 11–17.
365. Nagaune S., Azuma N., Ishino Y., Mori H., Kaminogava S., Yamauchi K. DNA – synthesis stimulating peptide from bovine  $\beta$ -casein. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1989. Vol. 53. P.3275–3278.
366. Nagpal R., Behare P., Rana R., Kumar A., Kumar M., Anu Arora S., Morotta F., Jain S., Yadav H. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food and Function*. 2011. Vol. 2, № 1. P. 18–27.
367. Naidu A. S. Natural Food Antimicrobial Systems. Boca Raton : CRC Press, 2000. 818 p.
368. Nakamura Y., Yamamoto M., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., Takano T. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*. 1995. Vol. 78. P. 777–783.
369. Niven G. W., Holder S. A., Stroman P. A study of the substrate specificity of aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995. Vol. 43. P. 91–97.



370. Nongonierma A. B., FitzGerald R. J. Biofunctional properties of caseinophosphopeptides in the oral cavity. *Caries Research*. 2012. Vol. 46. P. 234–267.
371. Nongonierma A. B., FitzGerald R. J. Tryptophan-containing milk protein-derived dipeptides inhibit xanthine oxidase. *Peptides*. 2012. Vol. 37. P. 263–272.
372. Nongonierma A. B., FitzGerald R. J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides*. 2013. Vol. 39. P. 157–163.
373. Nongonierma A. B., Gaudel C., Murray B. A., Flynn S., Kelly P. M., Newsholme P., FitzGerald R. J. Insulinotropic properties of whey protein hydrolysates and impact of peptide fractionation on insulinotropic response. *International Dairy Journal*. 2013. Vol. 32. P. 163–168.
374. Nongonierma A. B., FitzGerald R. J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food-drug interaction. *International Dairy Journal*. 2013. Vol. 32. P. 33–39.
375. Nongonierma A. B., Mooney C., Shields D., FitzGerald R. J. Inhibition of dipeptidyl peptidase and xanthine oxidase by amino acids and milk-derived dipeptides. *Food Chemistry*. 2013. Vol. 141. P. 644–653.
376. Nongonierma A. B., FitzGerald R. J. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by tryptophan containing dipeptides. *Food & Function*. 2013. Vol. 4. P. 1843–1849.
377. Nongonierma A. B., Schellekens H., Dinan T., Cryan J. F., FitzGerald R. J. Milk protein hydrolysates activate 5-HT<sub>2c</sub> serotonin receptors: influence of the starting substrate and isolation of bioactive fractions. *Food & Function*. 2013. Vol. 4. P. 728–737.
378. Nongonierma A. B., FitzGerald R. J. Susceptibility of milk protein-derived peptides to dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) hydrolysis. *Food Chemistry*. 2014. Vol. 145. P. 845–852.

379. Nongonierma A., FitzGerald R. J. The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A review. *Journal of Functional Foods*. 2015. Vol. 17. P. 640–656.
380. Nongonierma A. B., O’Keeffe M. B., FitzGerald R. J. Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. *Advanced Dairy Chemistry – Volume 1B: Proteins: Applied Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, J. A. O’Mahony. 4th edn. New York : Springer, 2016. P. 417–482.
381. Norris R., FitzGerald R. J. Antihypertensive peptides from food proteins. *Bioactive food peptides in health and disease* / Ed. B. Hernandez-Ledesma. Rijeka : InTech, 2013. P. 46–72.
382. Nurminen M. L., Sipola M., Kaarto H., Pihlanto-Leppälä A., Piilola K., Korpela R., Tossavainen O., Korhonen H., Vapaatalo H.  $\alpha$ -lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*. 2000. Vol. 66, № 16. P. 1535–1543.
383. Nygren-Babol L., Sternesjö Å., Björck L. Factors influencing levels of folate-binding protein in bovine milk. *International Dairy Journal*, 2004. Vol. 14. P. 761–765.
384. Nygren-Babol L., Jägerstad M. Folate-binding protein in milk: A review of biochemistry, physiology, and analytical methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012, Vol. 52. P. 410–425.
385. O’Connell J. E., Grinberg V. Ya., De Kruif C. G. Association behavior of  $\beta$ -casein. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003. Vol. 258, №1. P. 33–39.
386. Oftedal O. T. Origin and evolution of the major constituents of milk. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 1–42.
387. O’Keeffe M. B., FitzGerald R. J. Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells. *International Dairy Journal*. 2014. Vol. 36. P. 128–135.

- 388.O'Mahony J. A., Fox P. F. Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 43–85.
- 389.O'Mahony J. A., Fox P. A., Kelly A. L. Indigenous Enzymes of Milk. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 337–385.
- 390.Ondetti M. A., Cushman D. W. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*. 1982. № 51. P. 283–308.
- 391.Ong L., Henriksson A., Shah N. P. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Le Lait*. 2007. Vol. 87, № 2. P. 149–165.
- 392.Oo T. Z., Cole N., Garthwaite L., Willcox M. D. P., Zhu H. Evaluation of synergistic activity of bovine lactoferricin with antibiotics in corneal infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010. Vol. 65, № 6. P. 1243–1251.
- 393.O'Riordan N., Gerlach J. Q., Kilcoyne M., O'Callaghan J., Kane, M., Hickey R. M., Joshi L. Profiling temporal changes in bovine milk lactoferrin glycosylation using lectin microarrays. *Food Chemistry*. 2014. Vol. 165. P. 388–396.
- 394.Ortiz Chao P.J.A., Gomez-Ruiz R.A., Rastall D., Mills D., Cramer R., Pihlanto A., Korhonen H. and Jauregi P. Production of novel ACE inhibitory peptides from  $\beta$ -lactoglobulin using Protease N Amano. *International Dairy Journal*. 2009. Vol. 19, № 2. P. 69–76.
- 395.Otani H., Hata I. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests. *Journal Dairy Research*. 1995. Vol. 62. P. 339–348.

396. Pakkanen R., Aalto J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrums. *International Dairy Journal*. 1997. Vol. 7, № 5. P. 285–297.
397. Pan Y., Rowney M., Guo P., Hobman P. Biological properties of lactoferrin: an overview. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2007. Vol. 62, № 1. P. 31–42.
398. Pan D., Cao J., Guo H., Zhao B. Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 2012. Vol. 130. P. 121–12.
399. Pan D., Lu H., Zeng X. A newly isolated Ca binding peptide from whey protein. *International Journal of Food Properties*. 2013. Vol. 16. P. 1127–1134.
400. Panagiotakos D. B., Pitsavos C. H., Zampelas A. D., Chrysohoou C. A., Stefanadis C. I. Dairy products consumption is associated with decreased levels of inflammatory markers related to cardiovascular disease in apparently healthy adults: the ATTICA study. *Journal of the American College of Nutrition*. 2010. Vol. 29. P. 357–364.
401. Panchaud A., Affolter M., Kussmann M. Mass spectrometry for nutritional peptidomics: how to analyze food bioactives and their health effects. *Journal of Proteomics*. 2012. Vol. 75. P. 3546–3559.
402. Park Y. W. Bioactive components in milk and dairy products. Park. USA : Wiley-Blackwell, 2009. 426 p.
403. Parker F., Migliore-Samour D., Floch F., Zerial A., Werner G.H., Jolles P. Immunostimulating hexapeptide from human casein: Amino acid sequence, synthesis and biological properties. *European Journal of Biochemistry*. 1984. Vol. 145, № 3. P. 137–141.
404. Parola R., Macchi E., Fracchia D., Sabbioni A., Avanzi D., Motta M., Accornero P., Baratta M. Comparison between plasma and milk levels of leptin during pregnancy and lactation in cow, a relationship with  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2007. Vol. 91, № 5–6. P 240–246.

- 405.Parrot S., Degraeve, P., Curia C., Martial-Gros A. In vitro study on digestion of peptides in Emmental cheese: Analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Nahrung*. 2003. Vol. 47. P. 87–94.
- 406.Paulsson M. A., Svensson U., Kishore A. R., Naidu A. S. Thermal behavior of bovine lactoferrin in water and its relation to bacterial interaction and antibacterial activity. *Journal of Dairy Science*. 1993. Vol. 76. P. 3711–3720.
- 407.Pedersen N. L., Nagain-Domaine C., Mahé S., Chariot J., Rozé C., Tomé D. Caseinomacropptide specifically stimulates exocrine pancreatic secretion in the anesthetized rat. *Peptides*. 2000. Vol. 21, № 10. P. 1527-1535.
- 408.Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Hunziker P., von Fellenberg R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1999. V. 1426, №. 3 P. 439–448.
- 409.Pellegrini A., Dettling C., Thomas H., Hunziker P. Izolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*. 2001. Vol. 1526, № 2. P. 131–140.
- 410.Pellegrini A. Antimicrobial peptides from food proteins. *Current Phamaceutical Design*. 2003. Vol. 9, № 16. P. 1225–1238.
- 411.Perego S., Cosentino S., Fiorilli A., Tettamanti G., Ferraretto A. Casein phosphopeptides modulate proliferation and apoptosis in HT-29 cell line through their interaction with voltage-operated L-type calcium channels. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012. Vol. 23. P. 808–816.
- 412.Perpetuo E. A., Juliano L., Lebrum I. Biochemical and pharmacological aspects of two bradykinin-potentiating peptides obtained from tryptic hydrolysis of casein. *Journal of Protein Chemistry*. 2003. Vol. 22, № 7/8. P. 601–606.

- 413.Perraudin J.-P. (2011). Method for production of lactoferrin. Patent US 2011/0301077A1
- 414.Peterson J. A. Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. *Biology of the Neonate*. 1998. Vol. 74. P. 143–162.
- 415.Phelan M., Aherne-Bruce S. A., O’Sullivan D., FitzGerald R. J., O’Brien N. M. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. *International Dairy Journal*. 2009. Vol. 19. P. 279–285.
- 416.Phelan M., Aherne A., FitzGerald R. J., O’Brien N. M. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*. 2009. Vol. 19. P. 634–654.
- 417.Phelan M., Aisling Aherne S., O’Sullivan D., FitzGerald R. J., O’Brien N. M. Growth inhibitory effects of casein hydrolysates on human cancer cell lines. *Journal of Dairy Research*. 2010. Vol. 77. P. 176–182.
- 418.Picariello G., Ferranti P., Fierro O., Mamone G., Caira S., Di Luccia A., Monica S., Addeo F. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: biological and toxicological implications. *Journal of chromatography B*. 2010. Vol. 878. P. 295–308.
- 419.Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16. P. 1306–1314.
- 420.Pihlanto-Leppälä A., Rokka T., Korhonen H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*. 1998. Vol. 8. P. 325–331.
- 421.Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Pülola K., Tupasela T., Korhonen H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory properties of whey proteins digests: Concentration and characterization of active peptides. *Journal Dairy Research*. 2000. Vol. 67, № 1. P. 53–64.
- 422.Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology*. 2001. Vol. 11, № 9–10. P. 347–356.

- 423.Pins J. J., Keenan J. M. Effects of whey peptides on cardiovascular disease risk factors. *The Journal of Clinical Hypertension*. 2006. Vol. 8, № 11. P. 775–782.
- 424.Pinto G., Caira S., Cuollo M., Lilla S., Chianese L., Addeo F. Bioactive Casein Phosphopeptides in Dairy Products as Nutraceuticals for Functional Foods. *Milk Proteins* / Ed. W. L. Hurley. Croatia : In Tech, 2012. P. 3–44.
- 425.Post A. E., Ebert M., Hinrichs J.  $\beta$ -casein as a bioactive precursor – Processing for purification. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2009. Vol. 64. P. 84–88.
- 426.Pouliot Y., Gauthier S. F. Milk growth factors as health products: Some technological aspects. *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16. P. 1415–1429.
- 427.Power O., Hallihan A., Jakeman P. Human insulinotropic response to oral ingestion of native and hydrolysed whey protein. *Amino Acids*. 2009. Vol. 37. P. 33–339.
- 428.Power O., Jakeman P., FitzGerald R. J. Antioxidative peptides: enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*. 2013. Vol. 44. P. 797–820.
- 429.Pripp A. H., Asaksson T., Stepaniak L., Sorhaug T. Quantitative structure activity relationship modelling of ACE inhibitory peptides derived from milk proteins. *European Food Research and Technology*. 2004. Vol. 219, № 6. P. 579–583.
- 430.Pripp A. H. Effect of peptides derived from food proteins on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food & Nutrition Research*. 2008. Vol. 52. P. 1–9.
- 431.Pritchard G. G., Coolbear T. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993. Vol. 12. P. 179–206.

- 432.Pritchard S. R., Phillips M., Kailasapathy K. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*. 2010. Vol. 43, № 5. P. 1545–1548.
- 433.Pupovac J., Anderson G. H. Dietary peptides induce satiety via holecystokinin-A and peripheral opioid receptors in rats. *The Journal of Nutrition*. 2002. Vol. 132. P. 2775–2780.
- 434.Qi P. X., Wickham E. D., Piotrowski E. G., Fagerquist C. K., Farrell H. M. Jr. Implication of C-terminal deletion on the structure and stability of bovine  $\beta$ -casein. *Protein Journal*. 2005. Vol. 24, № 7-8. P. 431–444.
- 435.Qin L. Q., Xu J. Y., Dong J. Y., Zhao Y., van Bladeren P., Zhang W. Lactotriptides intake and blood pressure management: a meta-analysis of randomised controlled clinical trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2013. Vol. 23, № 5. P. 395–402.
- 436.Rahiotis C., Vougiouklakis G., Eliades G. Characterization of oral films in the presence of a CPP-ACP agent: *in situ* study. *Journal of Dentistry*. 2008. Vol. 36. P. 272–280.
- 437.Raikos V., Dassios. T. Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. *Dairy Science & Technology*. 2014. Vol. 94, № 2. P. 91–101.
- 438.Raja R. B. Anti-genotoxic potential of casein phosphopeptides (CPPs): A class of fermented milk peptides against low background radiation and prevention of cancer in radiation workers. *Toxicology and Industrial Health*. 2011. Vol. 27, № 10. P. 867–872.
- 439.Rasmussen L. K., Hojrup P., Petersen T. E. Disulphide arrangement in bovine caseins: localization of intrachain disulphide bridges in monomers of  $\kappa$ - and  $\alpha_{S2}$ -casein from bovine milk. *Journal of Dairy Research*. 1994. Vol. 61, № 4. P. 485–493.
- 440.Rau J., Korte N., Dyk M., Wenninger O., Schreiter P., Hiller E. Rapid Animal Species Identification of Feta and Mozzarella Cheese Using MALDI-TOF Mass-Spectrometry. *Food Control*. 2020, Vol. 117. 107349.



- 441.Rebouillat S., Ortega-Requena S. Potential Applications of Milk Fractions and Valorization of Dairy By-Products: A Review of the State-of-the-Art Available Data, Outlining the Innovation Potential from a Bigger Data Standpoint. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2015. Vol. 6. P. 176-203.
- 442.Recio I., Visser S. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine  $\alpha_{S2}$ -casein. *Biochimicaet Biophysica Acta*. 1999. V. 1428, № 2/3. P. 314–326.
- 443.Reema S. D., Lahiri P. K., Roy S. S. Review of casein phosphopeptides-amorphous calcium phosphate. *The Chinese Journal of Dental Research*. 2014. Vol. 17, № 1. P. 7–14.
- 444.Reid J. R., More C. N., Midwinter G. G., Pritchard G. G. Action of a cell wall proteinase from *Lactococcus lactis ssp. cremoris* SK11 on bovine  $\alpha_{S1}$ -casein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1991. Vol. 35. P. 222–227.
- 445.Reynolds E. C. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? *Australian Dental Journal*. 2008. Vol. 53. P. 268–273.
- 446.Reynolds E. C. Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate: The Scientific Evidence. *Advances in Dental Research*. 2009. Vol. 21, № 1. P. 25–29.
- 447.Robert M. C., Razaname A., Mutter M., Juillerat M. A. Identification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004. Vol. 52, № 23. P. 6923–6931.
- 448.Rodríguez-Carrio J., Fernández A., Riera F. A., Suárez A. Immunomodulatory activities of whey  $\beta$ -lactoglobulin tryptic-digested fractions. *International Dairy Journal*. 2014. Vol. 34. P. 65–7.
- 449.Rojas-Ronquillo R., Cruz-Guerrero A., Flores-Najera A., Rodriguez-Serrano G., Gomez-Ruiz L., Reyes-Grajeda J. P., Jimenez-Guzman J., Garcia-Garibay M. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme

- inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*. 2012. Vol. 26. P. 147–154.
450. Roman S., Sanchez-Siles L. M., Siegrist M. The importance of food naturalness for consumers: results of a systematic review. *Trends in Food Science and Technology*. 2017. Vol. 67. P. 44–57.
451. Roncada P., Piras C., Soggiu A., Turk R., Urbani A., Bonizzi L. Farm Animal Milk Proteomics. *Journal of Proteomics*. 2012. Vol. 75. P. 4259–4274.
452. Rose R. K. Binding Characteristics of *Streptococcus mutans* for Calcium and Casein Phosphopeptide. *Caries Research*. 2000. Vol. 34, № 5. P. 427–431.
453. Roufik S., Gauthier S. F., Turgeon S. L. In vitro digestibility of bioactive peptides derived from bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16, № 4. P. 294–302.
454. Rui X. Calcium binding of peptides derived from enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology*. 2009. Vol. 62. P. 170–173.
455. Ruiz-Giménez P., Salom J. B., Marcos J. F., Vallés S., Martínez-Maqueda D., Recio I., Torregrosa G., Alborch E., Manzanares P. Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: identification of novel active peptides. *Food Chemistry*. 2012. Vol. 131. P. 266–273.
456. Rul F., Gripon J. C., Monnet V. St-PepA, a *Streptococcus thermophilus* aminopeptidase with high specificity for acidic residues. *Microbiology*. 1995. Vol. 141. P. 2281–2287.
457. Russo R., Rega C., Chambery A. Rapid Detection of Water Buffalo Ricotta Adulteration or Contamination by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2016. Vol. 30. P. 497–503.

458. Rutherford K. J., Gill H. S. Peptides affecting coagulation. *British Journal of Nutrition*. 2000. Vol. 84, Suppl.1. S. 99–102.
459. Ryhänen E. L., Pihlanto-Leppälä A., Pahkala E. A new type of ripened; low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*. 2001. Vol. 11. P. 441–447.
460. Sadat L., Cakir-Kiefer C., N'Negue M. A., Gaillard J. L., Girardet J. M., Miclo L. Isolation and identification of antioxidant peptides from bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *International Dairy Journal*. 2011. Vol. 21, № 4. P. 214–221.
461. Sagardia I., Iloro I., Elortza F., Bald C. Quantitative structure–activity relationship based screening of bioactive peptides identified in ripened cheese. *International Dairy Journal*. 2013. Vol. 33. P. 184–190.
462. Sah B. N. P., Vasiljevic T., McKechnie S., Donkor O. N. Identification of Anticancer Peptides from Bovine Milk Proteins and Their Potential Roles in Management of Cancer: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2015. Vol. 14. P. 123–138.
463. Saint-Sauveur D., Gauthier S. F., Boutin Y., Montoni A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *International Dairy Journal*. 2008. Vol. 18. P. 260–270.
464. Saito T., Itoh T. Variations and distributions of O-glycosidically linked sugar chains in bovine  $\kappa$ -casein. *Journal of Dairy Science*. 1992. Vol. 75. Iss. 7. P. 1768–1774.
465. Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*. 2000. Vol. 83. P. 1434–1440.
466. Saito K., Jin D-H., Ogawa T., Muramoto K., Hatakeyama E., Yasuhara T., Nokihara K. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. Vol. 51. P. 3668–3674.

- 467.Sam A. H., Troke R. C., Tan T. M., Bewick G. A. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology*. 2012. Vol. 63. P. 46–56.
- 468.Şanlıdere Aloğlu H., Öner Z. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *Journal of Dairy Science*. 2011. Vol. 94, № 11. P. 5305–5314.
- 469.Satake M., Enjoh M., Nakamura Y., Takano T., Kawamura Y., Arai S., Shimizu M. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide Val-Pro-Pro in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2002. Vol. 66, № 2. P. 378–384.
- 470.Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006. Vol. 71, № 4. P. 394–406.
- 471.Sawyer L.  $\beta$ -Lactoglobulin. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 211–259.
- 472.Schellekens H., Clarke G., Jeffery I.B., Dinan T.G., Cryan J.F. Dynamic 5-HT<sub>2C</sub> receptor editing in a mouse model of obesity. *PLoS One*. 2012. Vol. 7, №. e32266.
- 473.Schiffer S., Scheidler E., Kiefer T., Kulozik U. Effect of Temperature, Added Calcium and pH on the Equilibrium of Caseins between Micellar State and Milk Serum. *Foods*. 2021. Vol. 10, № 4. 822.
- 474.Schlimme E., Meisel H. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung*. 1995. Vol. 39, № 1. P. 1–20.
- 475.Schrezenmeir J., Korhonen H., Willaims M., Gill H. S., Shah N. P. Foreword. *British Journal of Nutrition*. 2000. Vol. 84, № 1. S1–S1.
- 476.Severin S., Wenshui X. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005. Vol. 45. P. 645–656.

- 477.Sforza S., Ferroni L., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R. Extraction, semi-quantification, and fast on-line identification of oligopeptides in Grana Padano cheese by HPLC–MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. Vol. 51. P. 2130–2135.
- 478.Shakeel-ur-Rehman, Fleming C. M., Farkyu N. Y., Fox P. F. Indigenous Phosphatases in Milk. *Advanced dairy chemistry. Volume 1: Proteins / Eds. P. F. Fox, P. L. H. McSweeney*. 3rd Edition. New York : Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. P. 523–543.
- 479.Sharma N., Sharma R., Rajpud Y. S., Mann B., Singh R., Gandhi K. Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution. *International Dairy Journal*. 2021. Vol. 114. 104920.
- 480.Sharma R. Whey Proteins in Functional Foods. *Whey protein: From Milk to Medicine / Eds. H. C. Deeth, N. Bansal*. 1st ed. London, United Kingdom : Academic Press, 2019. P. 637-663.
- 481.Sharma S., Singh R., Rana S. Bioactive Peptides: A Review. *International Journal Bioautomation*. 2011. Vol. 15, № 4. P. 223–250.
- 482.Shcheglovitova O. N., Maksyanina E. V., Ionova I. I., Rustam'yan Y. L., Komolova G. S. Cow milk angiogenin induces cytokine production in human blood leukocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2003. Vol. 135, № 2. P. 158–160.
- 483.Sheehy P. A., Riley L. G., Raadsma H. W., Williamson P., Wynn P. C. A functional genomics approach to evaluate candidate genes located in a QTL interval for milk production traits on BTA6. *Animal Genetics*. 2009. Vol. 40, № 4. P. 492–498.
- 484.Shimizu M. Food derived peptides and intestinal functions. *Bio Factors*. 2001. Vol. 21. P. 43–47.
- 485.Shimizu T. Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison. *Nutrition Research Reviews*. 2003. Vol. 16. P. 241–252.

486. Shimizu M. Modulation of intestinal functions by dietary substances: an effective approach to health promotion. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2012. Vol. 2. P. 81–83.
487. Sieber R., Butikofer U, Egger Ch., Portmann R., Walther B., Wechsler D. ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science and Technology*. 2010. Vol. 90, № 1. P. 47–73.
488. Sienkiewicz-Szłapka E., Jarmołowska B., Krawczuk S., Kostyra E., Kostyra H., Bielikowicz K. Transport of bovine milk-derived opioid peptides across a Caco-2 monolayer. *International Dairy Journal*. 2009. Vol. 19, № 4. P. 252–257.
489. Singh V. P., Sachan N., Verma A. K. Melatonin milk; a milk of intrinsic health benefit: A review. *International Journal of Dairy Science*. 2011. Vol. 6. P. 246–252.
490. Silva S.V., Malcata F. X. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*. 2005. Vol. 15, № 1. P. 1–15.
491. Silva R. A., Lima M. S. F., Viana J. B. M., Bezerra V. S., Pimentel M. C. B., Porto A. L. F., Cavalcanti M. T. H., Lima Filho J. L. Can artisanal «Coalho» cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry*. 2012. Vol. 135, № 3. P. 1533–1538.
492. Silveira S. T., Martínez-Maqueda D., Recio I., Hernández- Ledesma B. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Chemistry*. 2013. Vol. 141. P. 1072–1077.
493. Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Sharma S., Singh T. P. Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. *International Journal of Peptide*. 2013. Vol. 2013. P. 1–12.
494. Sipola M., Finckenberg P. Vapaatalo H., Sipola M., Finckenberg P., Vapaatalo H., Pihlanto-Leppälä A., Korhonen H., Korpela R., Nurminen M.-L.  $\alpha$ -Lactorphin and  $\beta$ -lactorphin improve arterial function in

- spontaneously hypertensive rats. *Life Science*. 2002. Vol. 71, № 11. P. 1245–1253.
- 495.Smacchi E., Gobbetti M. Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme Microbiology and Technology*. 1998. Vol. 22. P. 687–694.
- 496.Smacchi E., Gobbetti M. Bioactive peptides in dairy products: Synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*. 2000. Vol. 17. P. 129–141.
- 497.Sorensen M., Sorensen M. P. L. The protein in whey. *Compte rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg, Ser. Chim.* 1939. Vol. 23, № 7. P. 55–59.
- 498.Sorrentino S. The eight «canonical» ribonucleases: molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett.* 2010. Vol. 584. P. 2194–2200.
- 499.Srinivas S., Prakash V. Bioactive peptides from bovine milk  $\alpha$ -casein: Isolation, characterization and multifunctional properties. *International Journal of Peptide Research and Therapeutic*. 2010. Vol. 16. P. 7–15.
- 500.Stressler T., Eisele T., Schlayer M. Production, active staining and gas chromatography assay analysis of recombinant aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DSM 20481. *AMB Express*. 2012. Vol. 2., № 39.
- 501.Stressler T, Eisele T., Schlayer M., Lutz-Wahl S., Fischer L. Characterization of the recombinant exopeptidases PepX and PepN from *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 important for food protein hydrolysis. *PloS One*. 2013. Vol. 8, № 7. e70055.
- 502.Subtil S.F., Rocha-Selmi G.A., Thomazini M., Trindade M.A., Netto F.M., Favaro-Trindade C.S. Effect of spray drying on the sensory and physical properties of hydrolysed casein using gum arabic as the carrier. *Journal of Food Science and Technology*. 2014. Vol. 51. P. 2014–2021.

503. Suetsuna K., Ukeda H., Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2000. Vol. 11. P. 128–131.
504. Sütas Y., Hurme M., Isolauri E. Down-regulation of anti-CD3 antibody-induced IL-4 production by bovine hydrolyzed with *Lactobacillus casei* GG-derived enzymes. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1996. Vol. 43. P. 687–689.
505. Sychevskyi M., Romanchuk I., Minorova A. Milk whey processing: prospects in Ukraine. *Food Science and Technology*. 2019. Vol. 13, № 4. P. 58–68.
506. Sz wajkowska M., Wolanciuk A., Barłowska J., Krol J., Litwinczuk Z. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system a review. *Animal Science Papers and Reports*. 2011. Vol. 29, № 4. P. 269–280.
507. Tacoma R., Fields J., Ebenstein D. B., Lam, Y. W., Greenwood S. L. Characterization of the Bovine Milk Proteome in Early-Lactation Holstein and Jersey Breeds of Dairy Cows. *Journal of Proteomics*. 2016. Vol. 130. P. 200–210.
508. Taha S. H., Mehrez M. A., Sitohy M. Z., Abdel Gawad I Abou Dawood, Mahmoud M Abd-El Hamid, Kilany W. H. Effectiveness of esterified whey proteins fractions against Egyptian Avian Influenza A (H5N1). *Virology Journal*. 2010. Vol. 7, № 1. P. 330–334.
509. Takeuchi T., Hayashida K-I., Inagaki H., Kuwahara M., Tsubone H., Harada E. Opioid mediated suppressive effect of milk-derived lactoferrin on distress induced by maternal separation in rat pups. *Brain Research*. 2003. Vol. 979. P. 216–224.
510. Talbo G. H., Suckau D., Malkoski M. Reynolds E. C. MALDI-PSD-MS analysis of the phosphorylation sites of caseinomacropeptide. *Peptides*. 2001. Vol. 22., Iss. 7. P. 1093–1098.
511. Taranath A., Pai D., Chakravarthy K. The role of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate products in remineralization of incipient



- enamel lesions and its substantivity. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 2014. Vol. 4, № 1. P. 67–70.
512. Tauzin J., Miclo L., Gaillard J. L. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine  $\alpha_{s2}$ -casein. *FEBS Letters*. 2002. Vol. 531, №2. P.369–374.
513. Taveras E. M., Rifas-Shiman S. L., Sherry B., Oken E., Haines J., Kleinman K., Rich-Edwards J. W., Gillman M. W. Crossing growth percentiles in infancy and risk of obesity in childhood. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*. 2011. Vol. 165. P. 993–998.
514. Teschemacher H. Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current Pharmaceutical Design*. 2003. Vol. 9, № 16. P. 1331–1344.
515. Théolier J., Hammami R., Labelle P., Fliss I., Jean J. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*. 2013. Vol. 5. P. 706–714.
516. Thomä-Worringer C., Sørensen J. López-Fandiño R. Health effects and technological features of caseinomacropptide. *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16, № 11. P. 1324–1333.
517. Thomas T. D., Pritchard G. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Reviews*. 1987. Vol. 46, № 3. P. 245–268.
518. Thorn D. C., Meehan S., Sunde M., Rekas A., Gras S. L. MacPhee C. E., Dobson C. M., Wilson M. R., Carver J. A. Amyloid fibril formation by bovine milk  $\kappa$ -casein and its inhibition by the molecular chaperones  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein. *Biochemistry*. 2005. Vol. 44, № 51. P. 17027–17036.
519. Thorn D. C., Ecroyd H., Sunde M., Poon S., Carver J. A. Amyloid fibril formation by bovine milk  $\alpha_{s2}$ -casein occurs under physiological conditions yet is prevented by its natural counterpart,  $\alpha_{s1}$ -casein. *Biochemistry*. 2008. Vol. 47, № 12. P. 3926–3936.
520. Thorn D. C., Ecroyd H., Carver J. A. The two-faced nature of milk casein proteins: Amyloid fibril formation and chaperone-like activity. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2009. Vol. 64, № 1. P. 34–40.

521. Tidona F., Criscione A., Guastella A. M., Zuccaro A., Bordonaro S., Marletta D. Bioactive peptides in dairy products. *Italian Journal of Animal Science*. 2009. Vol. 8, № 3. P. 315–340.
522. Toedebusch R. G., Childs T. E., Hamilton S. R., Crowley J. R., Booth F. W., Roberts M. D. Postprandial leucine and insulin responses and toxicological effects of a novel whey protein hydrolysate-based supplement in rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2012. Vol. 9. P. 1–10.
523. Torres-Llanez M. J., González-Córdova A. F., Hernandez-Mendoza A., Garcia H. S., Vallejo-Cordoba B. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*. 2011. Vol. 94, № 8. P. 3794–3800.
524. Trouillon R., Kang D.-K., Chang S., O'Hare D. Angiogenin induces nitric oxide release independently from its RNase activity. *Chemical Communications*. 2011. Vol. 47, № 12. P. 3421–3423.
525. Tsuda H., Sekine K, Fujita K, Ligo M. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms – A review of experimental and clinical studies. *Biochemistry and Cell Biology*. 2002. Vol. 80, № 1. P. 131–136.
526. Turgeon S. L., Rioux L-E. Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. *Food Hydrocolloids*. 2011. Vol. 25. P. 1915–1924.
527. Tyers M., Mann M. From Genomics to Proteomics. *Nature*. 2003. Vol. 422. P. 193–197.
528. Uchida M., Ohshiba Y., Mogami O. Novel dipeptidyl peptidase-4-inhibiting peptide derived from  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2011. Vol. 117. P. 63–67.
529. Udenigwe C. C., Aluko R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*. 2012. Vol. 77, №1. R11–R24.
530. Uenishi H., Kabuki T., Seto Y., Serizawa A., Nakajima H. Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-

- inhibitory peptide LPQNIPPL from Gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. *International Dairy Journal*. 2012. Vol. 22. P. 24–30.
531. Usinger L., Reimer C., Ibsen H. Fermented milk for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 4, CD008118. 2012.
532. Valtonen M., Kangas A.-P., Voutilainen M., Eriksson L. Diurnal rhythm of melatonin in young calves and intake of melatonin in milk. *Animal Science*. 2003. Vol. 77. P. 149–154.
533. Van der Kraan M. I. A., Groenink K., Nazmi K., Veerman E. C. I., Bolscher J. G. M., Nieuw Amerongen A. V. Lactoferrampin: A novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*. 2004. Vol. 25, № 2. P. 177–183.
534. Van der Strate B. W. A., Beljaars L., Molema G., Harmsen M. C., Meijer D. K. F. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Research*. 2001. Vol. 52, № 3. P. 225–239.
535. Van Veen H. A., Geerts M. E. J., van Berkel P. H. C., Nuijens J. H. The role of Nlinked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *European Journal of Biochemistry*. 2004. Vol. 271. P. 678–684.
536. Vargas-Bello-Pérez E., Márquez-Hernández R. I., Hernández-Castellano L. E. Bioactive peptides from milk: animal determinants and their implications in human health. *Journal of Dairy Research*. 2019. Vol. 86, № 2. P. 136-144.
537. Vermeirssen V., Deplacke B., Tappenden K.A., Van Camp J., Gaskins H. R., Verstraete W. Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a *Caco-2* Bbe monolayer. *Journal of Peptide Science*. 2002. Vol. 8, № 3. P. 95–100.
538. Vermeirssen V., Van Camp J., Decroos K., Van Wijmelbeke L., Verstraete W. The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity from

- pea and whey protein. *Journal of Dairy Science*. 2003. Vol. 86, № 2. P. 429–438.
539. Violette J.-L., Chanut E., Le Provost F., Whitelaw C. B. A., Kolb A., Shennan D. B. Genetics and biosynthesis of milk proteins. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 431–461.
540. Visser F. M. W. Contribution of enzyme from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in gouda cheese. Some observations on bitter extracts from aseptically made cheeses. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 1977. Vol. 31, № 4. P. 265–276.
541. Visser S. Proteolytic enzyme and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science*. 1993. Vol. 76, № 1. P. 329–350.
542. Visser S., Slangen C. J., Robben A. J., van Dongen W. D., Heerma W., Haverkamp J. Action of a cell-envelope proteinase (CEP<sub>III</sub>-type) from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM1 on bovine  $\kappa$ -casein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1994. Vol. 41. P. 644–651.
543. Walker G., Cai F., Shen P., Reynolds C. , Ward B., Fone C., Honda S., Koganei M., Oda M., Reynolds E. Increased remineralization of tooth enamel by milk containing added casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Journal Dairy Research*. 2006. Vol. 73, № 1. P. 74–78.
544. Walsh D.J., Bernard H., Murray B. A., MacDonald J., Pentzien A.-K., Wright G. A., Wal J.-M., Struthers A. D., Meisel H., Fitzgerald R. J.. In vitro generation and stability of the lactokinin  $\beta$ -lactoglobulin fragment (142–148). *Journal of Peptide Science*. 2004. Vol. 87, № 11. P. 3845–3857.
545. Walstra P., Jenness R. Dairy Chemistry and Physics. New York : John Wiley & Sons, 1984. 467 p.

546. Wasilewska J., Sienkiewicz-Szłapka E., Kuźbida E., Jarmołowska B., Kaczmarek M., Kostyra E. The exogenous opioid peptides and DPPIV serum activity in infants with apnoea expressed as apparent life threatening events (ALTE). *Neuropeptides*. 2011. Vol. 45, № 3. P. 189–195.
547. Waugh D. F. The interactions of  $\alpha_s$ - $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins in micelle formation. *Discussions of the Faraday Society*. 1958. Vol. 25. P. 186–192.
548. Wilson H. L., Buchanan R. M., Allan B., Tikoo S. K. Milk-derived antimicrobial peptides to protect against Neonatal Diarrheal Disease: an alternative to antibiotics. *Procedia Vaccinol*. 2012. Vol. 6. P. 21–32.
549. Wong D. W. S., Whitaker J. R. Catalase. *Handbook of Food Enzymology* / Eds. J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen, D. W. S. Wong. New York : Marcel Dekker, 2003. P. 389–401.
550. Wynn P. C., Sheehy P. A. Minor Proteins, Including Growth Factors. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* / Eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox. 4th edn. New York : Springer Science+Business Media, 2013. P. 317–335.
551. Xiao H., Ho C. T. Bioactive food components nutraceuticals and toxicants. *Fennema's Food Chemistry* / Eds. S. Damodaran, K. L. Parkin. Boca Raton : CRC Press., 2017. P. 865–903.
552. Xu R. J. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. *Food Reviews International*. 1998. Vol. 14, №1. P. 1–16.
553. Xue L., Wang X., Hu Z., Wu Z., Wang L., Wang H., Yang M. Identification and characterization of an angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein. *Peptides*. 2018. Vol. 99. P. 161–168.
554. Yamada Y., Matoba N., Usui H., Onishi K., Yoshikawa M. Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on ovokinin (2-7). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2002. Vol. 66, № 6. P. 1213–1217.
555. Yamaguchi S., Miura T., Baba A., Akuzawa R. Separation of a milk acid phosphatase from a purified lactoferrin fraction and identification

- as a member of the mammalian purple acid phosphatase family. *International Dairy Journal*. 2012. Vol. 23, № 2. P. 86–90.
556. Yamamoto N., Akino A., Takano T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP 790. *Journal of Dairy Science*. 1994. Vol. 77. P. 917–922.
557. Yamamoto M. M., Maeno M., Takano T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*. 1999. Vol. 82, № 7. P. 1388–1393.
558. Yamamura J., Takada Y., Goto M., Kumegawa M., Aoe S. Bovine milk kininogen fragment 1.2 promotes the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000. Vol. 269, № 2. P. 628–632.
559. Yamamura J., Morita Y., Takada Y., Kawakami H. The fragments of bovine high molecular weight kininogen promote osteoblast proliferation in vitro. *The Journal of Biochemistry*. 2006. Vol. 140, № 6. P. 825–830.
560. Yang B., Wang J., Tang B., Liu Y., Guo C., Yang P., Yu T., Li R., Zhao J., Zhang L., Dai Y., Li N. Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. *PLoS ONE*. 2011, Vol. 6, № 3. e17593.
561. Yang J., Yi Q. Killing tumor cells through their surface beta(2)-microglobulin or major histocompatibility complex class I molecules. *Cancer*. 2010. Vol. 116, № 7. P. 1638–1645.
562. Yang S.I., Tanaka T. Characterization of recombinant prolidase from *Lactococcus lactis* changes in substrate specificity by metal cations, and allosteric behavior of the peptidase. *The FEBS Journal*. 2008. Vol. 275, № 2. P. 271–280.
563. Yang S., Mao X-Y., Li F-F., Zhang D., Leng X-J., Ren F-Z., Teng G-X. The improving effect of spray- drying encapsulation process on the

- bitter taste and stability of whey protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*. 2012. Vol. 235. P. 91–97.
564. Ye X. Y., Wang H. X. Liu, F., Ng T. B. Ribonuclease, cell-free translation-inhibitory and superoxide radical scavenging activities of the iron-binding protein lactoferrin from bovine milk. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2000. Vol. 32. 235–241.
565. Yoshikawa M., Tani F., Ashikaga T., Yoshimura N., Chiba H. Purification and characterization of an opioid antagonist from peptic digest of bovine  $\kappa$ -casein. *Agricultural and biological chemistry*. 1986. Vol. 50, № 11. P. 2951–2954.
566. Yukalo V. G., Luhovyy B. L. Proteolysis of  $\alpha_{S1}$ - and  $\beta$ -casein by Lactococci. *Ernahrungsforschung*. 2000. Vol. 45, № 3. P. 205–206.
567. Yukalo V. G., Luhovyy B. L. The obtaining of bioactive peptide material from proteolysis  $\alpha_S$ - and  $\beta$ -casein. *Programme and Abstracts of the 27<sup>th</sup> European Peptide Symposium : Journal of Peptide Science*. 2002. Suppl. to vol. 8. P. 185.
568. Yukalo V. G. Casokinins creation during model proteolysis of  $\alpha_{S1}$  – casein by protease positive strains of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Annales Universitatis Marie Curie-Sklodowska*. 2004. Vol. XVII. P. 205–207.
569. Yukalo V. G. Casokinins: their generation and usage. *Nutra Buyers Guide*. Milano. Italy: B5Srl. 2004. P. 10–12.
570. Yukalo V. G. Obtaining of casein protein complex fractions from cow milk. *Nutracos*. 2005. № 5. P. 17–19.
571. Yukalo V. G., Shynkaryk M. M. Native casein micelles isolation by layering in water-milk protein-pectin system. *ECFS 2006 : Proceedings of the 2nd European Conference on Filtration and Separation*, 12–13 October 2006. Compiègne, France, 2006. P. 385–391.
572. Yukalo V., Storozh L., Lisovska T. The scheme of casein protein complex fractionation in natural conditions. *Food Production, Nutrition, Healthy Consumers : First European food congress*, 4–9 November 2008. Ljubljana, Slovenia, 2008. P. 48.

573. Yukalo A., Yukalo V., Shynkaryk M. Electrophoretic separation of the milk protein. *Proceeding of the International Conference on Bio and Food Electrotechnologies*. Compiègne, France, 2009. P. 227–231.
574. Yukalo V. G., Krupa O. M. The proteolytic systems of lactic acid microorganisms: a review. *Ukrainian Food Journal*. 2017. Vol. 6, Is. 3. P. 417–432.
575. Yukalo V. G., Storozh L. A. Natural bioactive phosphopeptides from the milk casein complex proteins. In: Scientific achievements of countries of Europe in the field of natural sciences: Collective monograph. Riga : Izdevnieciba «Baltija Publishing», 2018. P. 137–155.
576. Yukalo V. G., Storozh L. A. Isolation of  $\kappa$ -CN-1P and  $\beta$ -CN-5P fractions from native casein micelles. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. Vol. 90, № 4. P. 74–79.
577. Yukalo V. G., Storozh L. A., Datsyshyn K. Ye., Krupa O. M. Electrophoretic systems for the preparative fractionation of proteins-precursors of bioactive peptides from cow milk. *Food science and technology*. 2018. Vol. 12, № 2. P. 26–32.
578. Yukalo V. G., Datsyshyn K. Ye. Gel filtration of cow milk serum proteins. *Food science and technology*. 2018. Vol. 12, № 4. P. 72–78.
579. Yukalo V., Tsisaryk O., Datsyshyn K. Isolation of protein fractions of serum of milk by preparative disc-electrophoresis. *Journal of Dairy Science*. 2018. Vol. 101, Suppl. 2. P. 51.
580. Yukalo V., Datsyshyn K., Storozh L. Electrophoretic system for express analysis of whey protein fractions. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2019. 2/11 (98). P. 37–44.
581. Yukalo V., Datsyshyn K., Storozh L. Comparison of products of whey proteins concentrate proteolysis, obtained by different proteolytic preparations. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2019. 5/11(101). P. 40–47.



582. Yukalo V., Datsyshyn K., Storozh L. Obtaining of  $\beta$ -lactoglobulin by gel filtration of cow milk whey. *EUREKA: Life Sciences*. 2019. № 2. P. 33–39.
583. Yukalo V., Datsyshyn K., Storozh L. Improvement of the method of comparative study of milk whey proteins enzymatic hydrolysis. *EUREKA: Life Sciences*. 2019. № 5. P. 52–57.
584. Yukalo V., Datsyshyn K., Krupa O., Pavlistova N. Obtaining of  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA and BSA protein fractions from milk whey. *Ukrainian Food Journal*. 2019. Vol. 8, Is. 4. P. 788–798.
585. Yukalo V., Krupa O., Storozh L. Characteristics of proteolytic processes during the isolation of natural casein phosphopeptides. *Ukrainian Food Journal*. 2019. Vol. 8, Is. 1. P. 61–69.
586. Zakharova E. T., Shavlovski M. M., Bass M. G., Gridasova A. A., Pulina M. O., De Filippis V., Beltramini M., Di Muro P., Salvato B., Fontana A., Vasilyev V. B., Gaitskhoki V. S. Interaction of lactoferrin with ceruloplasmin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000. Vol. 374, № 2, P. 222–228.
587. Zemel M. B. Mechanisms of dairy modulation of adiposity. *The Journal of Nutrition*. 2003. Vol. 133. P. 252–256.
588. Zhang Q. X., Wu H., Ling Y. F., Lu R. R. Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. *Journal of Dairy Research*. 2013. Vol. 80, № 3. P. 367–373.
589. Zhang Q., Carpenter C. J. Proteomics in Milk and Milk Proces. *Proteomics in foods: Principles and applications* / Eds. F. Toldrá, L. M. L. Nollet. New York : Springer, 2013. P. 223–245.
590. Zhang S., Zhang L., Han X. Lactic acid bacteria proteinase and quality of fermented dairy products. A review. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2015. Vol. 55, № 12. P. 1530–1536.

591. Zhao L., Wang Z., Xu S. Preparation of Casein Phosphorylated Peptides and Casein non-Phosphorylated Peptides using Alcalase. *European Food Research and Technology*. 2007. Vol. 225, № 3. P. 579–584.
592. Zhao L., Huang S., Cai X., Hong J., Wang S. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolyzate. *Journal of Functional Foods*. 2014. Vol. 10. P. 46–53.
593. Zhao R., Kaakati R., Lee A. K., Liu X., Li F., Li C. Y. Novel roles of apoptotic caspases in tumor repopulation, epigenetic reprogramming, carcinogenesis, and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2018. Vol. 37, № 2-3. P. 227–236.
594. Zong H., Peng L., Zhang S., Lin Y., Feng F. Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides. *European Food Research and Technology*. 2012. Vol. 235, № 5. P. 811–816.
595. Zucht H. D., Raida M., Adermann K., Magert H. J., Forssman W. G. Casocidin I: A casein  $\alpha_{S2}$ - derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*. 1995. Vol. 372, №2–3. P. 185–188.

Додаток А

Таблиця А.1. Біоактивні пептиди з казеїнової фракції  $\alpha_{S1}$ -CN-8P

№	Протеїн попередник Назва пептиду	Фрагмент первинної структури	Первинна структура біоактивного пептиду	Спосіб одержання	Біологічна дія	Літературне джерело
1	2	3	4	5	6	7
	<b><math>\alpha_{S1}</math>-CN-8P</b>	<b>1-199</b>				
1	Лактенін (Lactenin)	Невідомі фрагменти		Молокозсідальні препарати	Бактерицидна дія	Jones and Simms (1930)
2	Казеїцидин (Caseicidin)	Невідомі фрагменти		Нагрівання або протеоліз хімозином	Бактерицидна дія	Lahov et al. (1971) Lahov and Regelson (1996) Szwajkowska et al. (2011)
3		1-6	Арг-Про-Ліз-Гіс-Про-Іле	Протеоліз (сир)	Інгібітор АПЕ	
4		1-7	Арг-Про-Ліз-Гіс-Про-Іле-Ліз	Протеоліз (сир)	Інгібітор АПЕ	
5		1-9	Арг-Про-Ліз-Гіс-Про-Іле-Ліз- Гіс-Глн	Протеоліз (сир)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 13 $\mu$ М/л)	Saito et al.(2000) FitzGerald et al. (2004)
6	Ізрацидин (Istracidin)	1-23	Арг-Про-Ліз-Гіс-Про-Іле-Ліз- Гіс-Глн-Глі-Лей-Про-Глн-Глу- Вал-Лей-Асн-Глу-Асн-Лей- Лей-Арг-Фен	Протеоліз (хімозин)	Бактерицидна дія  Імуномодуляторна дія	Silva and Malcata (2005) Lahov and Regelson (1996) Minkiewicz et al. (2000)
7		6-15	Іле-Ліз-Гіс-Глн-Глі-Лей-Про- Глн-Глу-Вал	Комерційний гідролізат	Антимікробна дія	Elbarbary et al. (2012)
8		11-13	Лей-Про-Глн	Сир «Гауда»	Антидіабетична дія	Uenishi et al. (2012)

Продовження таблиці А.1

1	2	3	4	5	6	7
9	Казеїн А (CaseinA)	21-29	Лей-Арг-Фен-Фен-Вал-Ала-Про-Фен-Про	Ферментація ( <i>Lactobacillus acidophilus</i> DPC 6026)	Бактерицидна дія	Szwajkowska et al. (2011) Hayes et al. (2005)
10	$\alpha_{S1}$ -Казокінін ( $\alpha_{S1}$ -Casokinin)	23-24	Фен-Фен	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ	Silva and Malcata (2005) Maruyama and Suzuki (1982)
11	$\alpha_{S1}$ -Казокінін-5 ( $\alpha_{S1}$ -Casokinin-5)	23-27	Фен-Фен-Вал-Ала-Про	Протеоліз (трипсин + пролін-ендопептидаза)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 6 $\mu$ М/л)	Silva and Malcata (2005) Maruyama and Suzuki (1982)
12	$\alpha_{S1}$ -Казокінін ( $\alpha_{S1}$ -Casokinin)	23-34	Фен-Фен-Вал-Ала-Про-Фен-Про-Глу-Вал-Фен-Глі-Лізі	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 77 $\mu$ М/л)	Maruyama et al. (1985)
13		24-27	Фен-Вал-Ала-Про	Синтез	Імуномодуляторна дія	Jolles et al. (1992)
14		24-47	Фен-Вал-Ала-Про-Фен-Про-Глу-Вал-Фен-Глі-Лізі-Глу-Лізі-Вал-Асп-Глу-Лей-Сер-Лізі-Асп-Ліе-Глі-Сер-Р-Глу	Протеїназа з <i>Lactobacillus helveticus</i> PR4	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 10 $\mu$ М/л)	Gobbetti et al. (2004) Maruyama et al. (1987)
15	$\alpha_{S1}$ -Казокінін ( $\alpha_{S1}$ -Casokinin)	25-27	Вал-Ала-Про	Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 2 $\mu$ М/л)	Gobbetti et al. (2004) Maruyama et al. (1987)
16		27-30	Про-Фен-Про-Глу	Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – >1000 $\mu$ М/л)	Maruyama et al. (1987)
17	$\alpha_{S1}$ -Казокінін - 7 ( $\alpha_{S1}$ -Casokinin-7)	28-34	Фен-Про-Глу-Вал-Фен-Глі-Лізі	Протеоліз (пролін-ендопептидаза)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 140 $\mu$ М/л)	Gobbetti et al. (2004) Maruyama et al. (1987)

Продовження таблиці А.1

1	2	3	4	5	6	7
18	Казеїн Б (Caseicin B)	30-37	Глу-Вал-Фен-Глі-Ліз-Глу-Ліз-Вал	Ферментація ( <i>Lactobacillus acidophilus</i> )	Бактерицидна дія	Szwajkowska et al. (2011) Hayes et al. (2005)
19		32-34	Фен-Глі-Ліз	Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 160 μM/l)	Gobbetti et al. (2004) Matsuyama (1987)
20	Казеїнофосфопептид (Caseinophosphopeptide)	41-55	СерР-Ліз-Асп-Іле-Глі-СерР-Глу-СерР-Тре-Глу-Асп-Глн-Ала-Мет-Глу	Протеоліз (пепсин+трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Pinto et al. (2012)
21	Казеїнофосфопептид (Caseinophosphopeptide)	43-58	Асп-Іле-Глі-СерР-Глу-СерР-Тре-Глу-Асп-Глн-Ала-Мет-Глу-Асп-Іле-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Silva and Malcata (2005) Smacchi and Gobetti (2000)
22	Казеїнофосфопептид (Caseinophosphopeptide)	45-55	Глі-СерР-Глу-СерР-Тре-Глу-Асп-Глн-Ала-Мет-Глу-Асп	Протеоліз	Мінералзв'язувальна дія	Silva and Malcata (2005) Smacchi and Gobetti (2000)
23	Казеїнофосфопептид (Caseinophosphopeptide)	59-79	Глн-Мет-Глу-Ала-Глу-СерР-Іле-СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-Іле-Вал-Про-Асн-СерР-Вал-Глу-Глн-Ліз	Протеоліз (трипсин) Синтез	Мінералзв'язувальна дія	Ferraretto et al. (2003)
24	Казеїнофосфопептид (Caseinophosphopeptide)	66-74	СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-Іле-Вал-Про-Асн	Гідролізат (кишківник)	Імуномодуляторна дія	Silva and Malcata (2005) Smacchi and Gobetti (2000)
25	Казеїнофосфопептид (Caseinophosphopeptide)	68-79	СерР-Глу-Глу-Іле-Вал-Про-Асн-СерР-Вал-Глу-Глн-Ліз	Протеоліз (пепсин+трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Pinto et al. (2012)
26		90-91	Арг-Тир		Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 10,5 μM/l)	McSweeney and O'Mahony (2016)

Продовження таблиці А.1

1	2	3	4	5	6	7
27		90-94	Арг-Тир-Лей-Глі-Тир	Протеоліз (пепсин)	Інгібітор АПЕ	McSweeney and O'Mahony (2016)
28	$\alpha$ -Казеїн екзорфін ( $\alpha$ -Caseinexorphin)	90-95	Арг-Тир-Лей-Глі-Тир-Лей	Протеоліз (пепсин)	Агоніст опіоїдних рецепторів Імуномодуляторна дія Антиканцерогенна дія	Meisel (1997) Hatzoglou et al. (1996)
29	$\alpha$ -Казеїн екзорфін (1-7) ( $\alpha$ -Caseinexorphin)	90-96	Арг-Тир-Лей-Глі-Тир-Лей-Глу	Протеоліз (пепсин)	Агоніст опіоїдних рецепторів Імуномодуляторна дія Антиканцерогенна дія	Meisel (1997) Hatzoglou et al. (1996)
30		91-92	Тир-Лей	Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 122 $\mu$ М/л)	Meisel (1998) Mullally (1996)
31	$\alpha$ -Казеїн екзорфін (2-7) ( $\alpha$ -Caseinexorphin)	91-96	Тир-Лей-Глі-Тир-Лей-Глу	Протеоліз (пепсин)	Агоніст опіоїдних рецепторів	Teschemacher (2003)
32	$\alpha$ -Казозепін ( $\alpha$ -Casozerpine)	91-100	Тир-Лей-Глі-Тир-Лей-Глу-Глн-Лей-Лей-Арг	Протеоліз (пепсин)	Антиконвульсант	Miclo et al. (2001)
33		94-95	Тир-Лей		Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 122 $\mu$ М/л)	McSweeney and O'Mahony (2016)
34	$\alpha$ <sub>S1</sub> -Казокінін ( $\alpha$ <sub>S1</sub> -Casokinin)	102-109	Ліз-Ліз-Тир-Ліз-Вал-Про-Глн-Лей	Протеоліз (сир)	Інгібітор АПЕ	Silva and Malcata (2005) Gómez-Ruiz et al. (2002)
35		104-109	Тир-Ліз-Вал-Про-Глн-Лей	Протеоліз ( <i>Lactobasillus helveticus</i> )	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 22 $\mu$ М/л)	Gobbetti et al. (2004) Maeno et al. (1996)

Продовження таблиці А.1

1	2	3	4	5	6	7
36		106-119	Вал-Про-Глн-Лей-Глу-Гле-Вал-Про-Асн-СерР-Ала-Глу	Протеоліз	Мінералзв'язувальна дія	Silva and Malcata (2005) Smacchi and Gobetti (2000)
37	Казеїнофосфопептид (Caseinophosphopeptide)	110-119	Глу-Гле-Вал-Про-Асн-СерР-Ала-Глу	Протеоліз (пепсин+трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Pinto et al. (2012)
38	$\alpha_{S1}$ -Казокінін ( $\alpha_{S1}$ -Casokinin)	142-147	Лей-Ала-Тир-Фен-Тир-Про	Ферментація + протеази ШКТ	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 65 $\mu$ М/л)	Gobetti et al. (2004)
39	$\alpha_{S1}$ -Казокінін ( $\alpha_{S1}$ -Casokinin)	143-147	Ала-Тир-Фен-Тир-Про	Протеоліз ( <i>Lactobacillus helveticus</i> CP 790)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – >1000 $\mu$ М/л)	Silva and Malcata (2005) Maeno et al. (1996)
40		143-148	Ала-Тир-Фен-Тир-Про-Глу	Протеоліз ( <i>Lactobacillus helveticus</i> CP 790)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 106 мкг/мл)	Gobetti et al. (2004) Yamamoto et al. (1994)
41		143-149	Ала-Тир-Фен-Тир-Про-Глу-Лей	Протеоліз (пепсин)	Інгібітор АПЕ	McSweeney and O'Mahony (2016)
42		144-149	Тир-Фен-Тир-Про-Глу-Лей	Гідроліз заг казеїну	Антиоксидантна дія	Suetsuna et al. (2000)
43		145-149	Фен-Тир-Про-Глу-Лей	Синтез	Антиоксидантна дія	Suetsuna et al. (2000)
44		146-147	Тир-Про	Протеоліз ( <i>Lactobacillus helveticus</i> Йогурт)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 720 $\mu$ М/л)	FitzGerald et al. (2004) Yamamoto et al. (1999)
45		146-149	Тир-Про-Глу-Лей	Синтез	Антиоксидантна дія	Suetsuna et al. (2000)
46		147-149	Про-Глу-Лей	Синтез	Антиоксидантна дія	Suetsuna et al. (2000)

Закінчення таблиці А.1

1	2	3	4	5	6	7
47		148-149	Глу-Лей	Синтез	Антиоксидантна дія	Suetsuna et al. (2000)
48		157-164	Асп-Ала-Тир-Про-Сер-Глі-Ала-Три	Ферментація + протеоліз (протеази ШКТ)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 98 μM/l)	Gobbetti et al. (2004)
49		170-199	Глі-Тре-Глн-Тир-Тре-Асп-Ала-Про-Сер-Фен-Сер-Асп-Іле-Про-Асн-Про-Іле-Глі-Сер-Глу-Асн-Сер-Глу-Ліз-Тре-Тре-Мет-Про-Лей-Три	Протеоліз (протеїназа з <i>Lactobacillus helveticus</i> )	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 346 μM/l)	Yamamoto et al. (1994)
50	α <sub>S1</sub> -Імуноказокінін (α <sub>S1</sub> -Immunocasinin) (α <sub>S1</sub> -Casokinin – 6)	194-199	Тре-Тре-Мет-Про-Лей-Три	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 16 μM/l)	Maruyama et al. (1987)
51		197-199	Про-Лей-Три	Синтез	Імуномодуляторна дія	Migliore-Samour and Jolles (1988) Parker et al. (1984)
52		198-199	Лей-Три	Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 36μM/l)	Gobbetti et al. (2004) Maruyama et al. (1987)
					Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 50 μM/l)	Gobbetti et al. (2004) Maruyama et al. (1987)



**Таблиця А.2. Біоактивні пептиди з казеїнової фракції  $\alpha_{S2}$ -CN-XP**

№	Протеїн – попередник Назва пептиду	Фрагмент первинної структури	Первинна структура біоактивного пептиду	Спосіб одержання	Біологічна дія	Літературне джерело
1	2	3	4	5	6	7
	<b><math>\alpha_{S2}</math>-CN-XP</b>	<b>1-207</b>				
1		1-19	Ліз-Асн-Тре-Мет-Глу-Гіс-Вал-СерP-СерP-СерP-Глу-Глу-Сер-Іле-Іле-СерP-Глн-Глу-Тре	Симуляція гастроінтестинального травлення	Мінералзв'язувальна дія	Garcia-Nebot et al. (2013)
2		1-32	Ліз-Асн-Тре-Мет-Глу-Гіс-Вал-СерP-СерP-СерP-Глу-Глу-Сер-Іле-Іле-СерP-Глн-Глу-Тре-Тир-Ліз-Глн-Глу-Ліз-Асн-Мет-Ала-Іле-Асн-Про-СерP-Ліз	Комерційний препарат казофосфопептидів СРР - III Протеоліз	Імуномодуляторна дія Мінералзв'язувальна дія	Silva and Malcata (2005) Nata et al. (1999)
3		2-21	Асн-Тре-Мет-Глу-Гіс-Вал-СерP-СерP-СерP-Глу-Глу-Сер-Іле-Іле-СерP-Глн-Глу-Тре-Тир-Ліз	Протеоліз (ШКТ)	Мінералзв'язувальна дія	Silva and Malcata (2005) Smacchi and Gobetti (2000)
4		5-18	Глу-Гіс-Вал-СерP-СерP-СерP-Глу-Глу-Сер-Іле-Іле-СерP-Глн-Глу	Протеоліз	Мінералзв'язувальна дія	FitzGerald et al. (1998)
5		25-32	Асн-Мет-Ала-Іле-Асн-Про-СерP-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 60 $\mu$ М/І)	Tauzin et al. (2002)
6		29-34	Асн-Про-СерP-Ліз-Глу-Асн	Протеоліз	Мінералзв'язувальна дія	FitzGerald et al. (1998)
7		46-70	Асн-Ала-Асн-Глу-Глу-Глу-Тир-Сер-Іле-Глі-СерP-СерP-СерP-Глу-Глу-СерP-Ала-Глу-Вал-Ала-Тре-Глу-Глу-Вал-Ліз	Протеоліз (ШКТ)	Мінералзв'язувальна дія	Silva and Malcata (2005) Smacchi and Gobetti (2000)

Продовження таблиці А.2

1	2	3	4	5	6	7
8		55-64	Глі-СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-СерР-Ала-Глу-Вал	Протеоліз	Мінералзв'язувальна дія	FitzGerald et al. (1998)
9		55-75	Глі-СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-СерР-Ала-Глу-Вал-Ала-Тре-Глу-Глу-Вал-Лізі-Іле-Тре-Вал-Асп-Асп	Протеоліз (ШКТ)	Мінералзв'язувальна дія	Smacchi and Gobetti (2000)
10		58-65	СерР-Глу-Глу-СерР-Ала-Глу-Вал-Ала	Протеоліз (пепсин+трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Pinto et al. (2012)
11		79-88	Глн-Лізі-Ала-Лей-Асн-Глу-Іле-Асн-Глн-Фен	Протеоліз (хімотрипсин)	Інгібітор АПЕ Бактерицидна дія Інгібітор пролінендопептидази	Srinivas and Prakash (2010)
12		81-89	Ала-Лей-Асн-Глу-Іле-Асн-Глн-Фен-Тир		Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 219 μM/l)	McSweeney and O'Mahony (2016)
13		81-91	Ала-Лей-Асн-Глу-Іле-Асн-Глн-Фен-Тир-Глн-Лізі	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 264 μM/l)	Tauzin et al. (2002)
14		89-95	Тир-Глн-Лізі-Фен-Про-Глн-Тир	Протеоліз (пепсин)	Інгібітор АПЕ	McSweeney and O'Mahony (2016)
15		92-98	Фен-Про-Глн-Тир-Лей-Глн-Тир	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 14 μM/l)	Tauzin et al. (2002)
16		117-122	Вал-Про-Іле-Тре-Про-Тре	Сир «Гауда»	Антидіабетична дія	Uenishi et al. (2012)
17		117-123	Вал-Про-Іле-Тре-Про-Тре-Лей	Сир «Гауда»	Антидіабетична дія	Uenishi et al. (2012)
18		124-137	Асн-Арг-Глу-Глн-Лей-СерР-Тре-СерР-Глу-Глу-Асн-Сер-Лізі	Протеоліз (пепсин+трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Pinto et al. (2012)

Продовження таблиці А.2

1	2	3	4	5	6	7
19		126-136	Глу-Глн-Лей-Сер <b>P</b> -Тре-Сер <b>P</b> -Глу-Глу-Асн-Сер-Ліз	Протеоліз (ШКТ)	Мінералзв'язувальна дія	Silva and Malcata (2005) Smacchi and Gobbetti (2000)
20		126-137	Глу-Глн-Лей-Сер <b>P</b> -Тре-Сер <b>P</b> -Глу-Глу-Асн-Сер-Ліз-Ліз	Протеоліз (пепсин+трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Pinto et al. (2012)
21		127-147	Глн-Лей-Сер <b>P</b> -Тре-Сер <b>P</b> -Глу-Глу-Асн-Сер-Ліз-Ліз-Тре-Вал-Асп-Мет-Глу-Сер <b>P</b> -Тре-Глу-Вал-Фен	Протеоліз	Мінералзв'язувальна дія	FitzGerald et al. (1998)
22		138-149	Тре-Вал-Асп-Мет-Глу-Сер <b>P</b> -Тре-Глу-Вал-Фен-Тре-Ліз	Протеоліз (ШКТ)	Мінералзв'язувальна дія	Silva and Malcata (2005) Smacchi and Gobbetti (2000)
23		148-161	Тре-Ліз-Ліз-Тре-Ліз-Лей-Тре-Глу-Глу-Глу-Ліз-Асн-Арг-Лей	Протеоліз (хімотрипсин)	Інгібітор АПЕ Бактерицидна дія Інгібітор пролінденпептидази	Srinivas and Prakash (2010)
24	Казоцидин-І (Casocidin-I)	150-188	Ліз-Тре-Ліз-Лей-Тре-Глу-Глу-Глу-Ліз-Асн-Арг-Лей-Асн-Фен-Лей-Ліз-Ліз-Лей-Сер-Глн-Арг-Тир-Глн-Ліз-Фен-Ала-Лей-Про-Глн-Тир-Лей-Ліз-Тре-Вал-Тир-Глн-Гіс-Глн-Ліз	Гідроліз молока оцтовою кислотою при кип'ятінні	Бактерицидна дія	Zucht et al. (1995) McCann et al. (2005)
25		164-179	Лей-Ліз-Ліз-Лей-Сер-Глн-Арг-Тир-Глн-Ліз-Фен-Ала-Лей-Про-Глн-Тир	Протеоліз (пепсин)	Бактерицидна дія	Gobbetti (2004) Floris(2003)
26	Сг <sub>5</sub>	164-207	Лей-Ліз-Ліз-Лей-Сер-Глн-Арг-Тир-Глн-Ліз-Фен-Ала-Лей-Про-Глн-Тир-Лей-Ліз-Тре-Вал-Тир-Глн-Гіс-Глн-Ліз-Ала-Мет-Ліз-Про-Три-Лей-Глн-Про-Ліз-Тре-Ліз-Вал-Лей-Про-Тир-Вал-Арг-Тир-Лей	Протеоліз (хімозин)	Бактерицидна дія	McCann et al. (2005)

Продовження таблиці А.2

1	2	3	4	5	6	7
27		165-188	Ліз-Ліз-Іле-Сер-Глн-Арг-Тир-Глн-Ліз-Фен-Ала-Лей-Про-Глн-Тир-Лей-Ліз-Тре-Вал-Тир-Глн-Гіс-Глн-Ліз	Комерційний гідролізат казеїну	Антимікробна дія	Elbarbary et al. (2012)
28	Казоцидин-І (Casocidin-I)	165-203	Ліз-Ліз-Іле-Сер-Глн-Арг-Тир-Глн-Ліз-Фен-Ала-Лей-Про-Глн-Тир-Лей-Ліз-Тре-Вал-Тир-Глн-Гіс-Глн-Ліз-Ала-Мет-Ліз-Про-Три-Іле-Глн-Про-Ліз-Тре-Ліз-Вал-Іле-Про-Тир	Кип'ятіння молока з оцтовою кислотою	Бактерицидна дія	Silva and Malcata (2005) Zucht et al. (1995)
29	$\alpha_{S2}$ -Казокінін ( $\alpha_{S2}$ -Casokinin)	174-179	Фен-Ала-Лей-Про-Глн-Тир	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 4,3 $\mu$ М/І)	Tauzin et al. (2002)
30		174-181	Фен-Ала-Лей-Про-Глн-Тир-Лей-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 4,3 $\mu$ М/І)	Tauzin et al. (2002)
31	Сr <sub>4</sub>	175-207	Ала-Лей-Про-Глн-Тир-Лей-Ліз-Тре-Вал-Тир-Глн-Гіс-Глн-Ліз-Ала-Мет-Ліз-Про-Три-Іле-Глн-Про-Ліз-Тре-Ліз-Вал-Іле-Про-Тир-Вал-Арг-Тир-Лей	Протеоліз (хімозин)	Бактерицидна дія	McSann et al. (2005)
32	Сr <sub>1</sub>	181-207	Ліз-Тре-Вал-Тир-Глн-Гіс-Глн-Ліз-Ала-Мет-Ліз-Про-Три-Іле-Глн-Про-Ліз-Тре-Ліз-Вал-Іле-Про-Тир-Вал-Арг-Тир-Лей	Протеоліз (хімозин)	Бактерицидна дія	McSann et al. (2005)
33		182-184	Тре-Вал-Тир	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 15 $\mu$ М/І)	Tauzin et al. (2002)
34		183-207	Вал-Тир-Глн-Гіс-Глн-Ліз-Ала-Мет-Ліз-Про-Три-Іле-Глн-Про-Ліз-Тре-Ліз-Вал-Іле-Про-Тир-Вал-Арг-Тир-Лей	Протеоліз (пепсин)	Бактерицидна дія	Silva and Malcata (2005) Recio and Visser (1999) Álvarez-Ordóñez et al. (2013)

Закінчення таблиці А.2

1	2	3	4	5	6	7
35		189-192	Ала-Мет-Ліз-Про	Протеїназа <i>Lactobacillus helveticus</i> Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 580 μM/l)	FitzGerald et al. (2004) Maeno et al. (1996)
36		189-193	Ала-Мет-Ліз-Про-Три	Протеїназа <i>Lactobacillus helveticus</i>	Інгібітор АПЕ	Silva and Malcata (2005) Maeno et al. (1996)
37		189-197	Ала-Мет-Ліз-Про-Три-Гле-Глн-Про-Ліз	Протеїназа <i>Lactobacillus helveticus</i> Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 600 μM/l)	Silva and Malcata (2005) Maeno et al. (1996)
38		190-197	Мет-Ліз-Про-Три-Гле-Глн-Про-Ліз	Протеїназа <i>Lactobacillus helveticus</i> Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 300 μM/l)	Silva and Malcata (2005) Maeno et al. (1996)
39		198-202	Тре-Ліз-Вал-Гле-Про	Протеїназа <i>Lactobacillus helveticus</i> Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 400 μM/l)	Silva and Malcata (2005) Maeno et al. (1996)
40		202-207	Про-Тир-Вал-Арг-Тир-Лей	Протеоліз (пепсин)	Інгібітор АПЕ	McSweeney and O'Mahony (2016)
41		204-207	Вал-Арг-Тир-Лей		Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 24,1 μM/l)	McSweeney and O'Mahony (2016)

Таблиця А.3. Біоактивні пептиди з казеїнової фракції  $\beta$ -CNA<sup>2</sup>-5P

№	Протеїн попередник Назва пептиду	Фрагмент первинної структури	Первинна структура біоактивного пептиду	Спосіб одержання	Біологічна дія	Літературне джерело
1	2 <b><math>\beta</math>-CNA<sup>2</sup>-5P</b>	3 <b>1-209</b>	4 Арг-Глу-Лей-Глу-Глу-Лей	5 Протеїназа з <i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> CP 790 Синтез	6 Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 1000μM/l)	7 Maeno et al. (1996)
1		1-6	Арг-Глу-Лей-Глу-Глу-Лей	Протеїназа з <i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> CP 790 Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 1000μM/l)	Maeno et al. (1996)
2	Казеїнофосфо- пептид (Caseinophospho- peptide)	1-25	Арг-Глу-Лей-Глу-Глу-Лей-Асп-Вал- Про-Глі-Глу-Іле-Вал-Глу-СерР-Лей- СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-Сер-Іле- Тре-Арг	Протеоліз (трипсин) Синтез	Мінералзв'язувальна дія Імуномодуляторна дія	Silva and Malcata (2005) Smacchi and Gobbetti (2000) Ferraretto et al.(2003) Hata et al.(1999)
3	Казеїнофосфо- пептид (Caseinophospho- peptide)	1-28	Арг-Глу-Лей-Глу-Глу-Лей-Асп-Вал- Про-Глі-Глу-Іле-Вал-Глу-СерР-Лей- СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-Сер-Іле- Тре-Арг-Іле-Асп-Лізі	Препарат казофосфо- пептидів СРР - III	Мінералзв'язувальна дія Імуномодуляторна дія	Silva and Malcata (2005) Smacchi and Gobbetti (2000) Hata et al.(1999)
4	Казеїнофосфо- пептид (Caseinophospho- peptide)	2-28	Глу-Лей-Глу-Глу-Лей-Асп-Вал-Про- Глі-Глу-Іле-Вал-Глу-СерР-Лей-СерР- СерР-СерР-Глу-Глу-Сер-Іле-Тре-Арг- Іле-Асп-Лізі	Протеоліз	Мінералзв'язувальна дія	Silva and Malcata (2005) Smacchi and Gobbetti (2000)
5		6-14	Лей-Асп-Вал-Про-Глі-Глу-Іле-Вал-Глу	Ферментація молока з <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii subsp.</i> <i>bulgaricus</i> SSI	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 11,2 мг/л)	Gobbetti et al. (2004) Gobbetti et al. (2000)

Продовження таблиці А.3

1	2	3	4	5	6	7
6		7-14	Асп-Вал-Про-Глі-Глу-Іле-Вал-Глу	Ферментація молока з <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> FT4	Інгібітор АПЕ	Gobbetti et al. (2004) Gobbetti et al. (2000)
7	Казеїнофосфо-пептид (Caseinophosphopeptide)	7-18	Асп-Вал-Про-Глі-Глу-Іле-Вал-Глу-СерР-Лей-СерР	Кишківник людини	Мінералзв'язувальна дія	Chabance et al. (1998)
8		12-17	Іле-Вал-Глу-СерР-Лей-СерР	Протеоліз (пепсин+трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Pinto et al. (2012)
9		12-23	Іле-Вал-Глу-СерР-Лей-СерР-СерР-СерР-Глу-Сер-Іле	Протеоліз	Мінералзв'язувальна дія	FitzGerald (1998)
10		12-25	Іле-Вал-Глу-СерР-Лей-СерР-СерР-СерР-Глу-Сер-Іле-Тре-Арг	Протеоліз (пепсин+трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Pinto et al. (2012)
11		15-25	СерР-Лей-СерР-СерР-СерР-Глу-Глу-Сер-Іле-Тре-Арг	Протеоліз (пепсин+трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Pinto et al. (2012)
12		19-25	СерР-Глу-Глу-Сер-Іле-Тре-Арг	Протеоліз (пепсин+трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Pinto et al. (2012)
13		26-41	Іле-Асп-Лізі-Лізі-Іле-Глу-Лізі-Фен-Глн-СерР-Глу-Глу-Глн-Глн-Тре	Симуляція гастроінтестинального травлення	Мінералзв'язувальна дія	Pisariello (2010)
14	Казеїнофосфо-пептид (Caseinophosphopeptide)	29-41	Лізі-Іле-Глу-Лізі-Фен-Глн-СерР-Глу-Глу-Глн-Глн-Тре	Кишківник людини	Мінералзв'язувальна дія	Chabance et al. (1998)
15		33-44	Фен-Глн-СерР-Глу-Глу-Глн-Глн-Глн-Тре-Глу-Асп-Глу-Лей-Глн-Асп-Лізі	Протеоліз (пепсин+трипсин)	Мінералзв'язувальна дія	Pinto et al. (2012)

Продовження таблиці А.3

1	2	3	4	5	6	7
16	43-69	Асп-Глу-Лей-Глн-Асп-Ліз-Іле-Гіс-Про-Фен-Ала-Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про-Іле-Про-Асп-Сер	Протеїназа з <i>Lactobacillus helveticus</i> CP 790	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 4 μM/l)	Yamamoto et al. (1994)	
17	48-61	Ліз-Іле-Гіс-Про-Фен-Ала-Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 39 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)		
18	49-61	Іле-Гіс-Про-Фен-Ала-Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 19 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)		
19	50-61	Гіс-Про-Фен-Ала-Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 26 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)		
20	52-61	Фен-Ала-Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 25 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)		
21	53-61	Ала-Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 76 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)		
22	54-61	Глн-Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 73 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)		
23	55-61	Тре-Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 64 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)		
24	56-61	Глн-Сер-Лей-Вал-Тир-Про	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 41 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)		
25	57-61	Сер-Лей-Вал-Тир-Про	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 40 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)		
26	57-64	Сер-Лей-Вал-Тир-Про-Фен-Про-Глі	Протеїназа з <i>Lactobacillus helveticus</i> CP 790	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> -39μM/l)	Yamamoto et al. (1994)	
27	58-61	Лей-Вал-Тир-Про	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 170 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)		



Продовження таблиці А.3

1	2	3	4	5	6	7
28		58-72	Лей-Вал-Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про-Гле-Про-Асн-Сер-Лей-Про-Глн	Протеоліз (сир)	Інгібітор АПЕ Інгібітор бактеріальних ендопептидаз ( <i>S. thermophilus</i> , <i>Lcc. Lactissubsp. lactis</i> , <i>Ps. fluorescens</i> )	Gobbetti et al. (2002)
29		58-76	Лей-Вал-Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про-Гле-Про-Асн-Сер-Лей-Про-Глн-Асн-Гле-Про-Про	Протеїназа з <i>Lactobacillus helveticus</i> PR 4	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 19 μM/l)	Minervini et al. (2003)
30		59-61	Вал-Тир-Про	Протеоліз (Протеїназа К)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 299 μM/l)	FitzGerald (2004)
31		59-64	Вал-Тир-Про-Фен-Про-Глі	Протеоліз (Протеїназа К)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 221 μM/l)	FitzGerald (2004)
32	β-Казоморфін-3 (β-Casomorphin-3)	60-62	Тир-Про-Фен	Протеоліз	Агоніст опіоїдних рецепторів	Schlimme and Meisel (1995)
33	β-Казоморфін-4 амід (β-Casomorphin-4 amid) (Morphiceptin)	60-63	Тир-Про-Фен-Про-NH <sub>2</sub>	Синтез	Агоніст опіоїдних рецепторів	Schlimme and Meisel (1995)
34	β-Казоморфін-5 (β-Casomorphin-5)	60-64	Тир-Про-Фен-Про-Глі	Протеоліз (трипсин)	Агоніст опіоїдних рецепторів	Gobbetti et al. (2004) Meisel et al. (1997)
35	β-Казоморфін-6 (β-Casomorphin-6)	60-65	Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про	Протеоліз	Антиканцерогенна дія Агоніст опіоїдних рецепторів	Hatzoglou et al. (1996) Schlimme and Meisel (1995)

Продовження таблиці А.3

1	2	3	4	5	6	7
36	$\beta$ -Казоморфін-7 ( $\beta$ -Casomorphin-7)	60-66	Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про-Гле	Протеоліз (трипсин) Сир Синтез	Агоніст опіоїдних рецепторів Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 500 $\mu$ M/l) Імуномодуляторна дія Антиканцерогенна дія	Brantl et al. (1979) Meisel and Schlimme (1994) Kaysner and Meisel (1996) Hatzoglou et al. (1996)
37	$\beta$ -Казоморфін-8 ( $\beta$ -Casomorphin-8)	60-67	Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про-Гле-Про	Протеоліз	Агоніст опіоїдних рецепторів	Schlimme and Meisel (1995)
38		60-68	Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про-Гле-Про- Асн	Протеоліз (сир)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 15 $\mu$ M/l) Антидіабетична дія	FitzGerald (2004) Uenishi et al. (2012)
39	$\beta$ -Казоморфін -11 ( $\beta$ -Casomorphin-11)	60-70	Тир-Про-Фен-Про-Глі-Про-Гле-Про- Асн-Сер-Лей	Протеоліз (трипсин) Кишківник	Агоніст опіоїдних рецепторів Імуномодуляторна дія	Gobbetti et al. (2004)
40		61-79	Про-Фен-Про-Глі-Про-Гле-Про-Асн- Сер-Лей-Про-Глн-Асн-Гле-Про-Про- Лей-Тре-Глн Фен-Про	Протеоліз	Мінералз'язувальна дія	FitzGerald (1998)
41		62-63			Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 315 $\mu$ M/l)	Nongonierma et al. (2016)
42		64-74	Глі-Про-Гле-Про-Асн-Сер-Лей-Про- Глн-Асн-Гле	Симуляція гастроінтести- нального травлення	Мінералз'язувальна дія	Garcia-Nebot et al. (2013)
43		62-68	Фен-Про-Глі-Про-Гле-Про-Асн	Сир «Гауда»	Антидіабетична дія	Uenishi et al. (2012)

Продовження таблиці А.3

1	2	3	4	5	6	7
44	Імунопептид (Immunopeptide)	63-68	Про-Глі-Про-Іле-Про-Асн	Протеоліз (пепсин, хімозин) Синтез	Імуномодуляторна дія	Silva and Malcata (2005) Parker et al. (1984)
45		63-69	Про-Глі-Про-Іле-Про-Асн-Сер	Сир «Гауда»	Антидіабетична дія	Uenishi et al. (2012)
46		70-72	Лей-Про-Глн	Сир «Гауда»	Антидіабетична дія	Uenishi et al. (2012)
47		70-76	Лей-Про-Глн-Асн-Іле-Про-Про	Сир «Гауда»	Антидіабетична дія	Uenishi et al. (2012)
48		70-77	Лей-Про-Глн-Асн-Іле-Про-Про-Лей	Сир «Гауда»	Антидіабетична дія	Uenishi et al. (2012)
49		70-97	Лей-Про-Глн-Асн-Іле-Про-Про-Лей- Тре-Глн-Тре-Про-Вал-Вал-Про-Про- Про-Фен-Лей-Глн-Про-Глу-Вал-Мет- Глі-Вал-Сер-Ліз	Протеїназа з <i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> CP 790	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 144 μM/l)	Yamamoto et al. (1994)
50		71-77	Про-Глн-Асн-Іле-Про-Про-Лей	Сир «Гауда»	Антидіабетична дія	Uenishi et al. (2012)
51		73-82	Асн-Іле-Про-Про-Лей-Тре-Глн-Тре- Про-Вал	Ферментація молока з <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii subsp.</i> <i>bulgaricus</i> SS1	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 10,3 mg/l)	Gobbetti et al. (2000)
52	β-Казокінін (β-Casokinin)	74-76	Іле-Про-Про	Кисле молоко «Calpis»	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 5 μM/l)	Nakamura et al. (1995)
53		74-82	Іле-Про-Про-Лей-Тре-Глн-Тре-Про-Вал	Сир «Гауда»	Антидіабетична дія	Uenishi et al. (2012)
54		80-90	Тре-Про-Вал-Вал-Про-Про-Фен- Лей-Глн-Про	Протеоліз (протеїназа К)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 749 μM/l)	FitzGerald (2004)

Продовження таблиці А.3

1	2	3	4	5	6	7
55	β-Казокінін (β-Casokinin)	84-86	Вал-Про-Про	Кисле молоко «Calpris»	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 9 μM/l)	Nakamura et al. (1995)
56		84-91	Вал-Про-Про-Фен-Лей-Глн-Про-Глу	Сир «Гауда»	Антидіабетична дія	Uenishi et al. (2012)
57		102-104	Мет-Ала-Про	Сир	Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
58		108-113	Глу-Мет-Про-Фен-Про-Ліз	Протеоліз (трипсин + γ- казеїн) Ферментація (закваски + травні протеази)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 423 мг/л)	Perpetuo et al. (2003) Pihlanto- Leppälä et al. (1998)
59		111-112	Фен-Про		Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 315 мг/л)	Nongonierma et al. (2016)
60		113-127	Ліз-Тир-Про-Вал-Глу-Про-Фен-Тре- Глу-Сер-Глн-Сер-Лей-Тре-Лей	Протеїназа з <i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> CP 790	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 93 μM/l)	Yamamoto et al. (1994)
61	Неоказоморфін (Neocasomorphin)	114-119	Тир-Про-Вал-Глу-Про-Фен		Агоніст опіоїдних рецепторів	Teschemacher (2003)
62		114-121	Тир-Про-Вал-Глу-Про-Фен-Тре-Глу	Протеоліз (γ-казеїн + трипсин)	Антагоніст опіоїдних рецепторів Інгібітор АПЕ	Perpetuo et al. (2003)
63		133-138	Лей-Гіс-Лей-Про-Лей-Про	Ферментація ( <i>E. faecalis</i> )	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 7 мг/л)	Nongonierma et al. (2016)
64		133-139	Лей-Гіс-Лей-Про-Лей-Про-Лей	Ферментація ( <i>E. faecalis</i> )		Nongonierma et al. (2016)
65		134-138	Гіс-Лей-Про-Лей-Про	Ферментація ( <i>E. faecalis</i> )		Nongonierma et al. (2016)
66		140-143	Лей-Глн-Сер-Три	Протеїназа з <i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> CP 790	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 500 μM/l)	Maeno et al. (1996)

Продовження таблиці А.3

1	2	3	4	5	6	7
67		157-158	Фен-Про		Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 315 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)
68		158-175	Про-Про-Глн-Сер-Вал-Лей-Сер-Лей-Сер-Глн-Сер-Ліз-Вал-Лей-Про-Вал-Про-Глн	Протеїназа з <i>Lactobacillus helveticus</i> CP 790	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 25 μM/l)	Yamamoto et al. (1994)
69		168-175	Сер-Ліз-Вал-Лей-Про-Вал-Про-Глн	Протеїназа з <i>Lactobacillus helveticus</i> CP 790	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 39 μM/l)	Yamamoto et al. (1994)
70		169-174	Ліз-Вал-Лей-Про-Вал-Про	Протеїназа з <i>Lactobacillus helveticus</i> CP 790 Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 5μM/l)	Maeno et al. (1996)
71		169-175	Ліз-Вал-Лей-Про-Вал-Про-Глн	Кисле молоко з <i>Lactococcus lactis</i> subsp. cremoris FT4	Інгібітор АПЕ	Gobbetti et al. (2002)
72		177-179	Ала-Вал-Про	Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 340 μM/l)	Maruyama et al. (1987)
73		177-181	Ала-Вал-Про-Тир-Про	Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 80 μM/l)	Maruyama et al. (1987)
74	β-Казокінін-7 (β-Casokinin-7)	177-183	Ала-Вал-Про-Тир-Про-Глн-Арг	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 274 μM/l)	Maruyama et al. (1987)
					Імуномодуляторна дія	Nagaune et al. (1989)
					Бактерицидна дія	Clare and Swaisgood (2000)
75		179-181	Про-Тир-Про	Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 220 μM/l)	Maruyama et al. (1987)

Продовження таблиці А.3

1	2	3	4	5	6	7
76		181-183	Про-Глн-Арг	Протеоліз ( $\alpha$ -хімогрисин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – >400 $\mu$ М/л)	Matuyama et al. (1987)
77		183-190	Арг-Асп-Мет-Про-Іле-Глн-Ала-Фен	Протеїназа з <i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> CP 790	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 209 $\mu$ М/л)	Yamamoto et al. (1994)
78		185-190	Мет-Про-Іле-Глн-Ала-Фен		Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 30 мг/л)	Nongonierma et al. (2016)
79	Імунопептид (Immunopeptide)	191-193	Лей-Лей-Тир	Протеоліз (пепсин, хімозин) Синтез	Імуномодуляторна дія Бактерицидна дія Інгібітор АПЕ	Silva and Malcata (2005)
80		191-197	Лей-Лей-Тир-Глн-Глу-Про-Вал	Протеїназа з <i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> CP 790	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – >1000 $\mu$ М/л)	Maeno et al. (1996)
81		193-198	Тир-Глн-Глу-Про-Вал-Лей	Ферментація (різні закваски + пепсин + трипсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 280 $\mu$ М/л)	Pihlanto- Leppä et al.(1998)
82	$\beta$ -Казокінін-10 ( $\beta$ -Casokinin-10)	193-202	Тир-Глн-Глу-Про-Вал-Лей-Глі-Про- Вал-Арг	Синтез	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 300 $\mu$ М/л) Імуномодуляторна дія	Gobbetti et al. (2004)
83		193-207	Тир-Глн-Глу-Про-Вал-Лей-Глі-Про- Вал-Арг-Глі-Про-Фен-Про-Іле	Протеоліз (хімозин)	Антимікробна дія	Nongonierma et al. (2016)
84	Імунопептид (Immunopeptide)	193-209	Тир-Глн-Глу-Про-Вал-Лей-Глі-Про- Вал-Арг-Глі-Про-Фен-Про-Іле-Іле-Вал	Протеоліз (пепсин, хімозин)	Імуномодуляторна дія Бактерицидна дія	Minkiewicz et al. (2000) Silva and Malcata (2005)
				Ферментація казеїну з <i>L. casei</i>	Антигліколітична дія	Rojas-Ronguillo et al. (2012)

Закінчення таблиці А.3

1	2	3	4	5	6	7
85		197-206	Вал-Лей-Глі-Про-Вал-Арг-Глі-Про-Фен-Про	Ферментація ( <i>E. faecalis</i> )	Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
86		199-204	Глі-Про-Вал-Арг-Глі-Про	Протеоліз (кисле молоко) (сир)	Інгібітор АПЕ	Накатура et al. (1995) Gomez-Ruiz et al. (2002)
87		201-209	Вал-Арг-Глі-Про-Фен-Про-Іле-Іле-Вал	Ферментація ( <i>E. faecalis</i> )	Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
88		205-206	Фен-Про		Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 315 μM/l)	Nongonierma et al. (2016)

Таблиця А.4. Біоактивні пептиди з казеїнової фракції κ-CN A-1P

№	Протеїн попередник Назва пептиду	Фрагмент первинної структури	Первинна структура біоактивного пептиду	Спосіб одержання	Біологічна дія	Літературне джерело
1	2	3	4	5	6	7
	<b>κ-CN A-1P</b>	<b>1-169</b>				
1	Пара κ-казеїн	1-105		Протеоліз (пепсин, хімосин)	Імуномодуляторна дія	Brody (2000)
2		17-21	Фен-Фен-Сер-Асп-Ліз	Протеоліз (пепсин, трипсин)	Імуномодуляторна дія	Kauser and Meisel (1996)
3		22-24	Іле-Ала-Ліз	Протеоліз (пепсин, трипсин, хімотрипсин)	Інгібітор АПЕ	McSweeney and O'Mahony (2016)
4	КазоксинС (Casoxin C)	25-34	Тир-Іле-Про-Іле-Глн-Тир-Вал-Лей-Сер-Арг	Протеоліз (трипсин) Синтез	Антагоніст опіоїдних рецепторів Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 100 μM/l)	Gobbetti et al. (2004) Chiba and Yoshikava (1991)
5	Казоксин-6 (Casoxin-6)	33-38	Сер-Арг-Тир-Про-Сер-Тир (-O-CH <sub>3</sub> )	Протеоліз (пепсин)	Антагоніст опіоїдних рецепторів	Gobbetti et al. (2004) Chiba et al. (1989)
6	Казоксин-5 (Casoxin-5)	34-38	Арг-Тир-Про-Сер-Тир (-O-CH <sub>3</sub> )		Антагоніст опіоїдних Рецепторів	Teschemacher (2003)
7	КазоксинА (CasoxinA)	35-41	Тир-Про-Сер-Тир-Глі-Лей-Асп		Антагоніст опіоїдних рецепторів	Gobbetti et al. (2004) Chiba and Yoshikava(1991)
8		35-42	Тир-Про-Сер-Тир-Глі-Лей-Асп-Тир	Протеоліз	Антагоніст опіоїдних рецепторів	McSweeney and O'Mahony (2016)



Продовження таблиці А.4

1	2	3	4	5	6	7
9	Казеїноімунопептид (Caseinoimmunopeptide)	38-39	Тир-Глі	Протеоліз (пепсин, трипсин)	Імуномодуляторна дія	
10		57-60	Про-Тир-Про-Тир	Протеоліз		Clare and Swaisgood (2000)
11		58-59	Тир-Про	Ферментація (йогурт з <i>Lactobacillus helveticus</i> CPN4)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 720 μM/l)	Gobbetti et al. (2004) Yamamoto et al. (1999)
12	Казоксин В (Casoxin B)	58-61	Тир-Про-Тир-Тир	Протеоліз Ферментація з <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>	Антагоніст опіоїдних рецепторів	Fiat et al. (1993)
13		63-117	Ліз-Про-...-Ліз-Тре	Протеоліз (пепсин)	Антигіпертензивна дія	McSweeney and O'Mahony (2016)
14		98-105	Гіс-Про-Гіс-Про-Гіс-Лей-Сер-Фен	Протеоліз (пепсин, трипсин, хімотрипсин)	Антимікробна дія	Nongonierma et al. (2016)
15	Казоплателін (Casoplatelin)	103-111	Лей-Сер-Фен-Мет-Ала-Гле-Про-Про-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ	McSweeney and O'Mahony (2016)
16	Казопіастрин (Casopiastrin)	106-110	Мет-Ала-Гле-Про-Про	Протеоліз (трипсин)	Антитромботична дія	Schlimme and Meisel (1995)
17	Казоплателін (Casoplatelin)	106-112	Мет-Ала-Гле-Про-Про-Ліз-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Антитромботична дія	Aluko (2012)
18	Казоплателін (Casoplatelin)	106-116	Мет-Ала-Гле-Про-Про-Ліз-Ліз-Асп-Глн-Асп-Ліз	Протеоліз (трипсин) Синтез	Антитромботична дія	Schlimme and Meisel (1995)
19	Глікомакропептид (Glicomacropptide)	106-169		Протеоліз (хімозин)	Антитромботична дія	Chabance et al. (1998) Meisel (1997)
					Регуляція виділення травних соків	Manso et al. (2004) Pedersen et al. (2000)
					Імуномодуляторна дія	Brody (2000)
					Бактерицидна дія	

Закінчення таблиці А.4

1	2	3	4	5	6	7
20	Капацин (Carrasine)	106-169	Неглікозильований, моно- або дифосфорильований глікомакропептид	Протеоліз (хімозин)	Регуляція виділення травних соків Стимуляція звільнення холецистокініну Бактерицидна дія	Korhonen and Pihlanto (2006)  Malkoski et al. (2001)
21		108-110	Гле-Про-Про	Ферментація («Calpris» (кисле молоко)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> – 5 μM/l)	Gobbetti et al. (2004) Nakamura et al. (1995)
22		112-116	Ліз-Асн-Глн-Асп-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Антитромботична дія	Clare and Swaisgood (2000)
23		113-116	Асн-Глн-Асп-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Антитромботична дія	Schlimme and Meisel (1995)
24		136-146	Тре-Глу-Ала-Вал-Глу-Сер-Тре-Вал-Ала-Тре-Лей	Комерційний гідролізат казеїну	Антимікробна дія	Elbarbary et al. (2012)
25		138-158	Ала-Вал-Глу-Сер-Тре-Вал-Ала-Тре-Лей-Глу-Асп-Сер-Про-Глу-Вал-Іле-Глу-Сер-Про-Про-Глу	Протеоліз (з капаціну)	Бактерицидна дія	Clare and Swaisgood (2000)
26		147-153	Глу-Асп-Сер-Про-Глу-Вал-Гле	Протеоліз	Мінералізв'язувальна дія	FitzGerald et al. (1998)

**Додаток Б**

**Таблиця Б.1. Біоактивні пептиди з  $\beta$ -лактоглобуліну**

№	Протеїн попередник Назва пептиду	Фрагмент первинної структури	Первинна структура біоактивного пептиду	Спосіб одержання	Біологічна дія	Літературне джерело
1	2	3	4	5	6	7
	<b><math>\beta</math>-лакто-глобулін</b>	<b>1-162</b>				
1		1-5	Лей-Іле-Вал-Тре-Глн		Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
2		7-9	Мет-Ліз-Глі		Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
3		9-14	Глі-Лей-Асп-Іле-Глн-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Гіпохолестеро-лемічна дія	Pellegrini (2003)
4		10-14	Лей-Асп-Іле-Глн-Ліз		Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
5		15-19	Вал-Ала-Глі-Тре-Три		Інгібітор АПЕ	Philanto-Leppäälä et al. (2000)
6	LGDТ-2	15-20	Вал-Ала-Глі-Тре-Три-Тир	Протеоліз (трипсин)	Бактерицидна дія Антидіабетична дія	Pellegrini (2003) Uchida et al. (2011)
7		19-22	Три-Тир-Сер-Лей	Протеоліз	Антиоксидантна дія	Zhang et al. (2013)
8		19-29	Три-Тир-Сер-Лей-Ала-Мет-Ала-Ала-Сер-Асп-Іле	Протеоліз	Антиоксидантна дія	Hernandez-Ledesma et al. (2005)
9		22-25	Лей-Ала-Мет-Ала		Інгібітор АПЕ	Philanto-Leppäälä et al. (2000)

Продовження таблиці Б.1

1	2	3	4	5	6	7
10	LGDТ-4	25-40	Ала-Ала-Сер-Асп-Гле-Сер-Лей-Лей-Асп-Ала-Глн-Сер-Ала-Про-Лей-Арг	Протеоліз (трипсин)	Бактерицидна дія	Pellegrini (2003)
11		32-40	Лей-Асп-Ала-Глн-Сер-Ала-Про-Лей-Арг		Інгібітор АПЕ	Philantone-Lerppälä et al. (2000)
12		36-42	Сер-Ала-Про-Лей-Арг-Вал-Тир	Протеоліз (протеаза з <i>B. subtilis</i> )	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> = 8 μM/l)	Madureira et al. (2010)
13		41-60	Вал-Тир-Вал-Глу-Глу-Лей-Ліз-Про-Тре-Про-Глу-Глі-Асп-Лей-Глу-Гле-Лей-Лей-Глн-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Гіпохолестеролемічна дія	Pellegrini (2003)
14		42-46	Тир-Вал-Глу-Глу-Лей	Протеоліз	Антиоксидантна дія	Hernandez-Ledesma et al. (2005)
15		46-54	Лей-Ліз-Про-Тре-Про-Глу-Глі-Асп-Лей	Протеоліз (пепсин)	Антидіабетична дія	Lacroix and Li-Chan (2014)
16		46-57	Лей-Ліз-Про-Тре-Про-Глу-Глі-Асп-Лей-Глу-Гле-Лей	Протеоліз (пепсин)	Антидіабетична дія	Lacroix and Li-Chan (2014)
17		50-54	Про-Глу-Глі-Асп-Лей	Протеоліз (пепсин)	Бактерицидна дія	Theolier et al. (2013)
18		58-61	Лей-Глн-Ліз-Три		Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
19		71-75	Гле-Гле-Ала-Глу-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Гіпохолестеролемічна дія	Pellegrini (2003)
20		78-80	Гле-Про-Ала	Протеоліз (протеаза К) Синтез	Інгібітор АПЕ	Abubakar et al. (1998)

Продовження таблиці Б.1

1	2	3	4	5	6	7
21		78-82	Гле-Про-Ала-Вал-Фен		Антидіабетична дія	Silveira et al. (2013)
22	LGDT-1	78-83	Гле-Про-Ала-Вал-Фен-Лізі	Протеоліз (трипсин)	Бактерицидна дія	Pellegrini (2003)
					Антидіабетична дія	Silveira et al. (2013)
23		78-86	Гле-Про-Ала-Вал-Фен-Лізі-Гле-Асп-Ала	Протеоліз (пепсин)	Антидіабетична дія	Lacroix and Li-Chan (2014)
24		81-82	Вал-Фен		Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
25		81-83	Вал-Фен-Лізі		Інгібітор АПЕ	Pihlanto-Leppälä et al. (2000)
26		84-91	Гле-Асп-Ала-Лей-Асн-Глу-Асн-Лізі	Протеоліз	Антиоксидантна дія	Mann et al. (2015)
				Протеоліз (пепсин)	Антимікробна дія	Demers-Mathieu et al. (2013)
27	LGDT-3	92-100	Вал-Лей-Вал-Лей-Асп-Тре-Асп-Тир-Лізі	Протеоліз (трипсин)	Бактерицидна дія	Pellegrini (2003)
					Антидіабетична дія	Silveira et al. (2013)
28		94-100	Вал-Лей-Асп-Тре-Асп-Тир-Лізі		Інгібітор АПЕ	Abubakar et al. (1998)
29		95-101	Лей-Асп-Тре-Асп-Тир-Лізі-Лізі	Протеоліз (термолізін)	Антиоксидантна дія	Contreras et al. (2011)
30		102-103	Тир-Лей	Синтез	Інгібітор АПЕ	Gobetti et al. (2004)

Продовження таблиці Б.1

1	2	3	4	5	6	7
31	$\beta$ -лакторфін ( $\beta$ -lactorphin)	102-105	Тир-Лей-Лей-Фен	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ Опійдна дія	Mullally et al. (1996)
32		106-111	Цис-Мет-Глу-Асн-Сер-Ала		Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
33		123-125	Вал-Арг-Тре	Протеоліз (пелсин)	Бактерицидна дія	Theolier et al. (2013)
34		123-131	Вал-Арг-Тре-Про-Глу-Вал-Асп-Асп-Глу	Підєирна сироватка	Антиоксидантна дія	Athira et. al. (2015)
35		125-131	Тре-Про-Глу-Вал-Асп-Асп-Глу	Протеоліз	Мінерал- зв'язуюча дія	Saetano-Silva et al. (2015)
36		125-135	Тре-Про-Глу-Вал-Асп-Асп-Глу-Ала-Лей-Глу-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Антидіабетична дія	Silveira (2013)
37		134-136	Глу-Ліз-Фен	Протеоліз (пелсин)	Бактерицидна дія	Theolier et al. (2013)
38		136-137	Фен-Асп	Протеоліз	Мінерал- зв'язуюча дія	Zhao et al. (2014)
39	$\beta$ -лактозин В ( $\beta$ -lactosin В)	142-145	Ала-Лей-Про-Мет	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ	Nurminen et al. (2000)
40		142-146	Ала-Лей-Про-Мет-Гіс	Протеоліз (трипсин)	Гіпохолестеро- лемічна дія Інгібітор АПЕ	Pellegrini (2003)
41	$\beta$ -лактокінін ( $\beta$ -lactokinin)	142-148	Ала-Лей-Про-Мет-Гіс-Іле-Арг	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ	Gobetti et al. (2004)
42		143-146	Лей-Про-Мет-Гіс	Протеоліз (пелсин)	Бактерицидна дія	Theolier et al. (2013)

Закінчення таблиці Б.1

1	2	3	4	5	6	7
43		145-149	Мет-Гіс-Іле-Арг-Лей	Протеоліз	Антиоксидантна дія	Hernandez-Ledesma (2005)
44		146-148	Гіс-Іле-Арг		Інгібітор АПЕ	Nurminen et al. (2000)
45	$\beta$ -лактогензин ( $\beta$ -lactotensin)	146-149	Гіс-Іле-Арг-Лей		Регуляція скорочення кишківника Інгібітор АПЕ	Nurminen et al. (2000)
46		151-155	Фен-Асп-Про-Тре-Глн	Протеоліз (термолізін)	Антиоксидантна дія	Contreras et al. (2011)
47		147-148	Іле-Арг		Інгібітор АПЕ	Nurminen et al. (2000)
48		147-149	Іле-Арг-Лей	Протеоліз (пепсин)	Бактерицидна дія	Theolier et al. (2013)
49		148-149	Арг-Лей		Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)

**Таблиця Б.2. Біоактивні пептиди з  $\alpha$ -лактальбуміну**

№	Протеїн попередник Назва пептиду	Фрагмент первинної структури	Первинна структура біоактивного пептиду	Спосіб одержання	Біологічна дія	Літературне джерело
1	2	3	4	5	6	7
	<b><math>\alpha</math>-лактальбумін</b>	<b>1-123</b>				
1	LDT-1	1-5	Глу-Глн-Лей-Тре-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Бактерицидна дія	Pellegrini (2003)
2		4-11	Тре-Ліз-Цис-Глу-Вал-Фен-Арг-Глу	Протеоліз (пепсин)	Антидіабетична дія	Lacroix and Li-Chan (2014)
3	LDT-1	17-31-S- S-109-114	Глі-Глі-Тир-Глі <sup>17</sup>   Вал-Сер-Лей-Про-Глу-Три-Вал-Цис-Тре-Фен <sup>31</sup>   <sup>109</sup> Ала-Лей-Цис-Сер-Глу-Ліз <sup>114</sup>	Протеоліз (трипсин)	Бактерицидна дія	Pellegrini (2003)
4	$\alpha$ -імуно- лактокінін ( $\alpha$ -immunolactokinin)	18-19	Тир-Глі	Синтез	Імуномодуляторна дія Інгібітор АПЕ	Meisel (2004) Madureira et al. (2007)
5		18-20	Тир-Глі-Глі	Синтез	Імуномодуляторна дія	Madureira et al. (2007)
6		26-27	Три-Вал		Антидіабетична дія Антиоксидантна дія	Nongonierma and FitzGerald (2013)
7		47-51	Сер-Тре-Глу-Тир-Глі		Мінерал-зв'язувальна дія	Pan et al. (2013)



Продовження таблиці Б.2

1	2	3	4	5	6	7
8	$\alpha$ -імуно-лактокінін ( $\alpha$ -immunolactokinin)	50-51	Тир-Глі	Синтез	Імуномодуляторна дія Інгібітор АПЕ	Gautier et al. (2006)
9		50-52	Тир-Глі-Лей		Інгібітор АПЕ	Philantoleppällä et al. (2000)
10	$\alpha$ -лакторфін ( $\alpha$ -lactorphin)	50-53	Тир-Глі-Лей-Фен	Протеоліз (пепсин) Синтез	Інгібітор АПЕ Опіоїдна дія	Naque et al. (2009)
11		51-53	Глі-Лей-Фен	Синтез	Імуномодуляторна дія	Gautier et al. (2006)
12		52-53	Лей-Фен		Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
13		61-68	Цис-Ліз-Асп-Асп-Глн-Асн-Про-Гіс	Протеоліз	Мінерал-зв'язувальна дія	Caetano-Silva et al. (2015)
14	LDC	61-68-S-S-75-78	<sup>61</sup> Цис-Ліз-Асп-Асп-Глн-Асн-Про-Гіс <sup>68</sup>   <sup>75</sup> Гле-Сер-Цис-Асп-Ліз-Фен <sup>78</sup>	Протеоліз (хімогрисин)	Бактерицидна дія	Pellegrini (2003)
15		82-89	Асп-Асп-Асп-Лей-Тре-Асп-Асп-Гле	Протеоліз	Мінерал-зв'язувальна дія	Caetano-Silva et al. (2015)
16		99-108	Вал-Глі-Гле-Асн-Тир-Три-Лей-Ала-Гіс-Ліз		Інгібітор АПЕ	Philantoleppällä et al. (2000)
17		101-104	Гле-Асн-Тир-Три	Протеоліз	Антиоксидантна дія	Sadat et al. (2011)

Закінчення таблиці Б.2

1	2	3	4	5	6	7
18		104-108	Три-Лей-Ала-Гіс-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Інгібітор АПЕ	Madureira et al. (2010)
19		104-117	Три-Лей-Ала-Гіс-Ліз-Ала-Лей-Цис-Сер-Глу-Ліз-Лей-Асп-Глн	Протеоліз (пепсин)	Антидіабетична дія	Lacroix and Li-Chan (2014)
20		105-110	Лей-Ала-Гіс-Ліз-Ала-Лей		Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
21		105-115	Лей-Ала-Гіс-Ліз-Ала-Лей-Цис-Сер-Глу-Ліз-Лей	Протеоліз (пепсин)	Антидіабетична дія	Lacroix and Li-Chan (2014)
22		109-114	Ала-Лей-Цис-Сер-Глу-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Бактерицидна дія	Gautier et al. (2006)
23		110-117	Лей-Цис-Сер-Глу-Ліз-Лей-Асп-Глн	Протеоліз (пепсин)	Антидіабетична дія	Lacroix and Li-Chan (2014)
24		115-118	Лей-Асп-Глн-Три	Протеоліз	Антиоксидантна дія	Sadat et al. (2011)
25		117-121	Глн-Три-Лей-Цис-Глу	Протеоліз (пепсин)	Антимікробна дія	Theolier et al. (2013)

Таблиця Б.3. Біоактивні пептиди з лактоферину

№	Протеїн попередник Назва пептиду	Фрагмент первинної структури	Первинна структура біоактивного пептиду	Спосіб одержання	Біологічна дія	Літературне джерело
1	2 <b>Лактоферин</b>	3	4	5	6	7
1		1-11-S-S-17-47 <b>1-689</b>	<sup>1</sup> Ала-Про-Арг-Ліз-Асн-Вал-Арг-Три- <b>Цис</b> <sup>1</sup> -Тре-Іле <sup>11</sup>   <sup>17</sup> Фен-Ліз- <b>Цис</b> <sup>2</sup> - Арг-Арг- * Три-Глн-Три-Арг-Мет-Ліз-Ліз-Лей-Глі-Ала-Про-Сер- Іле-Тре-Цис-Вал-Арг-Арг-Ала-Фен-Ала-Лей-Глу- <b>Цис</b> <sup>2</sup> - Іле-Арг <sup>47</sup>	Протеоліз (пепсин)	Бактерицидна дія	Madureira et al. (2010)
2		1-16-S-S-17-48	<sup>16</sup> Три-Глу-Про-Глн   <sup>1</sup> Ала-Про-Арг-Ліз-Асн-Вал-Арг-Три- <b>Цис</b> <sup>1</sup> -Тре-Іле-Сер   <sup>17</sup> Фен-Ліз- <b>Цис</b> <sup>2</sup> - Арг-Арг- * Три-Глн-Три-Арг-Мет-Ліз-Ліз-Лей-Глі-Ала-Про-Сер- Іле-Тре-Цис-Вал-Арг-Арг-Ала-Фен-Ала-Лей-Глу- <b>Цис</b> <sup>2</sup> - Іле-Арг-Ала <sup>48</sup>	Протеоліз (хімозин)	Бактерицидна дія	Madureira et al. (2010)

Продовження таблиці Б.3

1	2	3	4	5	6	7
3		1-16-S-S- 43-48	<sup>16</sup> Три- Глу-Про-Глн   <sup>1</sup> Ала-Про-Арг-Ліз-Асн-Вал-Арг-Три- <b>Цис</b> <sup>1</sup> -Тре-Іле-Сер   <sup>43</sup> Лей-Глу- <b>Цис</b> <sup>2</sup> -Іле-Арг-Ала <sup>48</sup>	Протеоліз (пепсин)	Бактерицидна дія	Gobetti et al. (2004)
4		1-16-S-S- 45-48	<sup>16</sup> Три- Глу-Про-Глн   <sup>1</sup> Ала-Про-Арг-Ліз-Асн-Вал-Арг-Три- <b>Цис</b> <sup>1</sup> -Тре-Іле-Сер   <sup>45</sup> <b>Цис</b> <sup>2</sup> -Іле-Арг-Ала <sup>48</sup>	Протеоліз (пепсин)	Бактерицидна дія	Madureira et al. (2010)
5		1-42-S-S- 43-48	<sup>1</sup> Ала-Про-Арг-Ліз-Асн-Вал-Арг-Три- <b>Цис</b> <sup>1</sup> -Тре- * Іле-Сер- Глн-Про-Глу-Три-Фен-Ліз-Цис-Арг-Арг- Три-Глн-Три-Арг-Мет-Ліз-Лей-Глі-Ала-Про- Сер-Іле-Тре- <b>Цис</b> <sup>1</sup> -Вал-Арг-Арг-Ала-Фен-Ала <sup>42</sup>   <sup>43</sup> Лей-Глу- <b>Цис</b> <sup>2</sup> -Іле-Арг-Ала <sup>48</sup>	Протеоліз (пепсин)	Бактерицидна дія	Gobetti et al. (2004)
6		4-14	Ліз-Асн-Вал-Арг-Три-Цис-Тре-Іле-Сер-Глн-Про		Антиканцеро- генна дія	Hoskin and Ramamoorthy (2008), Freiburghaus et al. (2012)
7	Лактоферин (lactoferricin)	4-41	Ліз-Асн-Вал-Арг-Три-Цис-Тре-Іле-Сер-Глн-Про-Глу-Три- Фен-Ліз-Цис-Арг-Арг-Три-Глн-Три-Арг-Мет-Ліз-Лей- Глі-Ала-Про-Сер-Іле-Тре-Цис-Вал-Арг-Арг-Ала-Фен		Антиканцеро- генна дія	Hoskin and Ramamoorthy (2008), Freiburghaus et al. (2012)

Продовження таблиці Б.3

1	2	3	4	5	6	7
8		17-30	Фен-Ліз-Цис-Арг-Арг-Три-Глн-Три-Арг-Мет-Ліз-Ліз-Лей-Глі	Синтез	Бактерицидна дія	Madureira et al. (2010)
9	Лактоферицин В (lactoferricin B)	17-41/42	Фен-Ліз-Цис-Арг-Арг-Три-Глн-Три-Арг-Мет-Ліз-Ліз-Лей-Глі-Ала-Про-Сер-Гле-Тре-Цис-Вал-Арг-Ала-Фен/Ала	Протеоліз (пепсин) Протеоліз (хімозин)	Бактерицидна дія Імуномодуляторна дія	Madureira et al. (2010)
10		19-37	Цис-Арг-Арг-Три-Глн-Три-Арг-Мет-Ліз-Ліз-Лей-Глі-Ала-Про-Сер-Гле-Тре-Цис-Вал	Синтез	Бактерицидна дія	Madureira et al. (2010)
11		20-25	Арг-Арг-Три-Глн-Три-Арг	Протеоліз (пепсин)	Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
12		20-30	Арг-Арг-Три-Глн-Три-Арг-Мет-Ліз-Ліз-Лей-Глі	Протеоліз (протеази з <i>Rhizomucor miehei</i> )	Бактерицидна дія	Elbarbary et al. (2010)
13		22-23	Три-Глн	Протеоліз (пепсин)	Інгібітор АПЕ	Nongonierma et al. (2016)
14		133-136	Арг-Про-Тир-Лей	Протеоліз (пепсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> = 56,5 μM/l)	Ruiz-Giménes et al. (2012)
15		222-230	Ала-Асп-Арг-Асп-Глн-Тир-Глу-Лей-Лей	Протеоліз (трипсин)	Антимікробна дія	Nongonierma et al. (2016)
16		232-238	Лей-Асн-Асн-Сер-Арг-Ала-Про	Протеоліз (пепсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> = 105,3 μM/l)	Ruiz-Giménes et al. (2012)
17		264-269	Глу-Асп-Лей-Гле-Три-Ліз	Протеоліз (трипсин)	Антимікробна дія	Nongonierma et al. (2016)
18	Лактоферампін (lactoferrampin)	265-284	Асп-Лей-Гле-Три-Ліз-Лей-Лей-Сер-Ліз-Ала-Глн-Глу-Ліз-Фен-Глі-Ліз-Асн-Ліз-Сер-Арг	Синтез	Бактерицидна дія	Madureira et al. (2010)

Закінчення таблиці Б.3

1	2	3	4	5	6	7
19		266-270	Лей-Гле-Три-Ліз-Лей	Протеоліз (пепсин)	Інгібітор АПЕ (IC <sub>50</sub> = 0,47 μM/l)	Ruiz-Giménes et al. (2012)
20		269-288	Ліз-Лей-Лей-Сер-Ліз-Ала-Глн-Глу-Ліз-Фен-Глі-Ліз-Асн-Ліз-Сер-Арг-Сер-Фен-Глн-Лей	Протеоліз (протеази з <i>Rhizomucor miehei</i> )	Бактерицидна дія	Elbarbary et al. (2010)
21		346-347	Вал-Три		Антиоксидантна дія	Nongonierma and FitzGerald (2013)
22		548-549	Вал-Три		Антиоксидантна дія	Nongonierma and FitzGerald (2013)

Примітка. \* Можливі варіанти дисульфідних зв'язків між двома фрагментами лактоферину

Таблиця Б.4. Біоактивні пептиди з альбуміну сироватки

№	Протеїн попередник Назва пептиду	Фрагмент первинної структури	Первинна структура біоактивного пептиду	Спосіб одержання	Біологічна дія	Літературне джерело
1	2	3	4	5	6	7
	<b>Альбумін сироватки</b>	<b>1-583</b>				
1	Альбутензин А (Albutensin A) Серокінін (Serokinin)	208-216	Ала-Лей-Ліз-Ала-Три-Сер-Вал-Ала-Арг		Інгібітор АПЕ Регулювання скорочення кишківника	Meisel (2004)
2	Серорфін	399-404	Глу-Тир-Глі-Фен-Глн-Асп	Протеоліз (пепсин)	Опліодний антагоніст	Madureira et al. (2007)

**Юкало В.Г.**

# **БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПРОТЕЇНІВ І ПЕПТИДІВ МОЛОКА**

*Монографія*

Формат 60x90/16. Обл. вид. арк. 12,16 Тираж 300 прим. Зам. № 3477.

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя.

46001, м. Тернопіль, вул. Руська, 56.

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4226 від 08.12.11