

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-2-306-318>
УДК 637.344

Обзорная статья
<http://fptt.ru/>

Противодиабетическая активность белков молочной сыворотки

Е. Ю. Агаркова*^{ORCID}, К. А. Рязанцева^{ORCID}, А. Г. Кручинин^{ORCID}



Дата поступления в редакцию: 24.04.2020
Дата принятия в печать: 29.05.2020

ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
молочной промышленности»,
115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35

*e-mail: e_agarkova@vniimi.org



© Е. Ю. Агаркова, К. А. Рязанцева, А. Г. Кручинин, 2020

Аннотация.

Введение. С появлением технологий мембранной фильтрации молочная сыворотка перестала рассматриваться как низкоценный побочный продукт, полученный при производстве сыра и творога. Использование методов глубокой переработки сыворотки в совокупности с биотехнологическими подходами позволило получать не только концентраты сывороточных белков, но и функциональные ингредиенты на ее основе.

Объекты и методы исследования. В результате информационно-аналитического поиска были изучены и структурированы современные результаты исследований российских и зарубежных научных коллективов в области разработки функциональных противодиабетических ингредиентов на основе гидролизованных белков молока и сыворотки.

Результаты и их обсуждение. Наиболее мощным пептидом, ингибирующим дипептидилпептидазу IV (DPP-IV), идентифицированным зарубежными учеными в молочных белках, является Пе-Pro-Ile (дипротин А) со значением IC_{50} 4,7 μ М, предшественником которого является к-казеин. В работах по гидролизу β -лактоглобулина трипсином показано получение пептидного фрагмента IPAVF с наиболее сильной ингибирующей активностью DPP-IV (IC_{50} 44,7 μ М). В других работах гидролиз β -лактоглобулина приводил к получению фрагментов LKPTPEGDL и LKPTPEGDLLEIL с ингибирующей активностью DPP-IV IC_{50} 45 и 57 μ М соответственно. Ряд исследований описывает получение аналогичных фрагментов со схожей активностью при последовательном воздействии фермента Нейтраза на β -лактоглобулин с последующим гидролизом пепсином. В исследованиях по гидролизу α -лактальбумина пепсином учеными были идентифицированы пептиды WLAHKALCSEKLDQ и LANKALCSEKL, обладающие ингибирующей активностью DPP-IV на уровне IC_{50} 141 и 166 μ М соответственно.

Выводы. Анализ результатов исследований российских и зарубежных ученых показал перспективность гидролиза молочных белков и необходимость разработки противодиабетических добавок на основе молочного белка. Они могут с успехом использоваться в терапии больных сахарным диабетом 2 типа. Кроме того, авторы работ отмечают необходимость в проведении дальнейших исследований в этой области с целью установления безопасности применения биологически активных пептидов.

Ключевые слова. Сывороточные белки, ферменты, гидролиз, дипептидилпептидаза IV, противодиабетическая активность

Для цитирования: Агаркова, Е. Ю. Противодиабетическая активность белков молочной сыворотки / Е. Ю. Агаркова, К. А. Рязанцева, А. Г. Кручинин // Техника и технология пищевых производств. – 2020. – Т. 50, № 2. – С. 306–318. DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-2-306-318>.

Review article

Available online at <http://fptt.ru/eng>

Anti-Diabetic Activity of Whey Proteins

Е.Yu. Agarkova*^{ORCID}, K.A. Ryazantseva^{ORCID}, A.G. Kruchinin^{ORCID}

Received: April 24, 2020
Accepted: May 29, 2020

All-Russian Dairy Research Institute,
35, Lusinovskaya Str., Moscow, Russia, 115093

*e-mail: e_agarkova@vniimi.org



© E.Yu. Agarkova, K.A. Ryazantseva, A.G. Kruchinin, 2020

Absract.

Introduction. With the advent of membrane filtration technologies, milk whey stopped being a “by-product” of cheese, cottage cheese, and casein production. The combination of various whey-processing technologies, e.g. enzymatic hydrolysis and membrane

fractionation, made it possible to obtain concentrates, isolates, and hydrolysates of whey proteins with various biologically active effects.

Study objects and methods. The article features research results of Russian and foreign scientific teams in the development of functional antidiabetic ingredients from hydrolyzed proteins of milk and whey.

Results and discussion. According to foreign studies, Ile-Pro-Ile (diprotin A) with an IC_{50} value of 4.7 μM is one of the most effective low molecular mass peptides with an inhibitory potential against DPP-IV. Various studies of trypsin hydrolysis of β -lactoglobulin described the production of IPAVF peptide fragment with the most potent inhibitory activity of DPP-IV ($IC_{50} = 44.7 \mu\text{M}$). Other studies featured pepsin-treated lactoglobulin production of fragments LKPTPEGDL and LKPTPEGDLEIL with inhibitory activity DPP-IV $IC_{50} = 45$ and $57 \mu\text{M}$, respectively. A number of studies described similar fragments obtained by the sequential action of the enzyme preparation Neutrase 0.8 LTM on β -lactoglobulin, followed by pepsin hydrolysis. As for the hydrolysis of α -lactalbumin with pepsin, scientists identified peptides WLAHKALCSEKLDQ, LAHKALCSEKL, and TKCEVFRE. They revealed a high inhibitory potential against DPP-IV ($IC_{50} = 141, 165, \text{ and } 166 \mu\text{M}$, respectively). Tryptic hydrolysates of bovine β -lactoglobulin proved to be able to inhibit DPP-IV in vitro (IC_{50} of $210 \mu\text{M}$). Peptide VAGTWY was the major compound responsible for this effect, displaying an IC_{50} of $174 \mu\text{M}$. In other research, tryptic hydrolysate inhibited DPP-IV with an IC_{50} value of 1.6 mg/mL , also demonstrating antioxidant and ACE-inhibitory activities. This hydrolysate became source of VAGTWY, the most potent DPP-IV inhibitor (IC_{50} of $74.9 \mu\text{M}$).

Conclusion. An analysis of Russian and foreign studies proved that milk protein hydrolysis has a great potential for antidiabetic additives used in the treatment of type II diabetes. This requires further research in order to define the safety of biologically active peptides.

Keywords. Whey proteins, enzymes, hydrolysis, dipeptidylpeptidase IV, antidiabetic activity

For citation: Agarkova EYu, Ryazantseva KA, Kruchinin AG. Anti-Diabetic Activity of Whey Proteins. Food Processing: Techniques and Technology. 2020;50(2):306–318. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-2-306-318>.

Введение

Восприятие мировым научным сообществом молочной сыворотки как загрязняющего вещества изменилось с открытием ее функциональных и биологически активных свойств [1]. Молочные белки играют важную роль не только в качестве источника незаменимых аминокислот и азота, но и как богатый источник различных биологически активных пептидов [2]. Биоактивные пептиды, находясь в структуре белка, не проявляют своих функциональных свойств. Их высвобождение, а следовательно, и усиление биофункциональных свойств может происходить за счет расщепления структуры белка в результате гидролиза пищеварительными ферментами, протеолитическими микроорганизмами и действием растительных или микробных протеаз [3, 4]. Специфичность протеаз влияет на длину пептида, а также на состав, структурные свойства и последовательности аминокислот. Это влияет на биологическую активность гидролизатов [5, 6]. Обработка белкового субстрата различными протеазами с различными спектрами специфичности приводит к образованию гидролизатов, которые содержат смесь свободных аминокислот, олигопептидов с высокой и средней молекулярной массой и коротких пептидов с разными аминокислотными последовательностями. Биологическая активность гидролизатов обусловлена синергетическим действием различных биоактивных пептидов [5].

За последние два десятилетия были проведены многочисленные исследования антиоксидантных, АПФ-ингибирующих, антигипертензивных, иммуностимулирующих, антимикробных и других

биологических свойств пептидов, полученных в результате гидролиза казеиновых и сывороточных белков. Эти исследования подтверждают актуальность использования молочных белков в качестве источника биологически активных пептидов [2, 3]. Специфичность ферментов, используемых для протеолиза молочного белка, является важным фактором в получении биофункциональных белковых гидролизатов с желаемой биологической активностью [5, 7]. В данной работе представлена оценка специфичности различных ферментных препаратов, используемых для получения гидролизатов белков молочной сыворотки с противодиабетической активностью.

Диабет является одним из самых распространенных хронических заболеваний. По оценкам Международной федерации диабета, в настоящее время во всем мире страдают от диабета 415 миллионов человек, 91 % из которых имеют сахарный диабет 2 типа (СД-2) [8, 9]. СД-2 является метаболическим сбоем в организме, характеризующимся нарушением секреции инсулина β -клетками и резистентностью к инсулину в тканях. Такое состояние нередко связано с развитием ряда осложнений, включая гипертонию и сердечно-сосудистые заболевания [10].

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследований были определены сывороточные белки, белки молока, различные коммерческие ферментные препараты, а также процесс гидролиза белков, направленный на получение пептидов с противодиабетической активностью. Для написания обзора было

проанализировано 34 зарубежных и литературных источника, отражающих суть изложенной проблемы.

Результаты и их обсуждение

Множество работ посвящено изучению ингибирования дипептидилпептидазы IV (DPP-IV), метаболического фермента, различными пептидами, полученными из пищевых белков. Во время постпрандиальной фазы DPP-IV способен расщеплять инкретины – гормоны желудочно-кишечного тракта, которые вырабатываются в ответ на прием пищи и вызывают стимуляцию выработки инсулина. К инкретинам относятся два гормона: глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1) и глюкозозависимый инсулиноотропный полипептид (ГИП). Расщепление инкретина приводит к их инактивации, которая вызывает потерю их инсулиноотропной активности [11]. Ингибиторы DPP-IV и α -глюкозидазы, которые относятся к классу глиптинов, представляют собой два класса фармакотерапевтических агентов, используемых для лечения диабета 2 типа в качестве средства регулирования уровня глюкозы в сыворотке крови после приема пищи. Однако при использовании глиптинов для лечения диабета 2 типа проявляются побочные эффекты [12]. В данном контексте особый интерес может представлять поиск природных соединений, которые не связаны с какими-либо неблагоприятными побочными эффектами. Эффективность большинства пептидов, ингибирующих DPP-IV и полученных из пищевых белков, идентифицированных в литературе, в 1000 раз меньше, чем у глиптинов [13]. В настоящее время наиболее мощным пептидом, ингибирующим DPP-IV, идентифицированным в пищевых белках, является Пе-Pro-Ile (дипротин А) со значением IC_{50} 4,7 μ М, который присутствует в пищевых белках, таких как к-казеин или овотрансферрин из куриного яйца [12].

Разнообразные белки рассматриваются как предшественники пептидов, ингибирующих DPP-IV [14]. В различных исследованиях подходы *in silico* выявили несколько пептидов, зашифрованных в аминокислотных последовательностях пищевых белков, которые могут действовать как ингибиторы DPP-IV, включая белки молочной сыворотки крупного рогатого скота [12, 13, 15, 16].

В работе А. В. Nongonierma с соавторами была исследована ингибирующая DPP-IV активность гидролизата сывороточного белка, полученного с использованием пищевого фермента Королаза РР при соотношении фермента к субстрату (Е:С) 1 % (вес/вес) при 50 °С в течение 240 мин. Гидролиз проводили при постоянном рН 7,0. Значение ингибирующей концентрации полученного гидролизата IC_{50} составляло $1,34 \pm 0,11$ мг/мл. Имитация переваривания гидролизата сывороточного белка

в желудочно-кишечном тракте увеличивала его ингибирующий потенциал DPP-IV ($IC_{50} = 1,02$ мг/мл). Фракционирование гидролизата сывороточных белков через мембрану с размером пор 5 кДа с последующим фракционированием полученного пермеата с использованием мембраны 2 кДа привело к обогащению конечного пермеата пептидами, ингибирующими DPP-IV. Значение IC_{50} пермеата 5 кДа ($0,95 \pm 0,16$ мг/мл) было значительно выше по сравнению с пермеатом 2 кДа ($0,48 \pm 0,11$ мг/мл). Пермеаты, генерируемые через УФ мембраны с размером пор 5 и 2 кДа, обладали более сильными ингибирующим DPP-IV эффектом, чем концентраты. Однако они были примерно в 500 раз менее эффективны, чем лекарственный препарат дипротин А ($IC_{50} = 0,001454 \pm 0,000218$ мг/мл) [16].

В последующих исследованиях А. В. Nongonierma с соавторами был изучен потенциал изолята молочных белков (ИМБ), гидролизованного Нейтразой 0.8 LTM, в качестве источника пептидов, ингибирующих DPP-IV [12]. Было показано, что изменение параметров гидролиза (времени и температуры) может влиять на ингибирующую активность DPP-IV у получающихся гидролизатов ИМБ. Стабильность ингибирующих DPP-IV свойств гидролизатов ИМБ после инкубации с пищеварительными ферментами авторы оценивали с использованием протокола искусственного желудочно-кишечного пищеварения (SGID) *in vitro* с применением пепсина. В отобранных гидролизатах ИМБ авторами были идентифицированы пептид LKPTPEGDLEIL f (46–57), полученный из β -лактоглобулина (табл. 1) и ингибирующий DPP-IV со значением IC_{50} 74 μ М. Пептид в ходе SGID распадался на более короткие фрагменты, такие как LKPTPEGDL f (46–54) и LKPTPEGDLE f (46–55), которые также проявляли высокие ингибирующие свойства к DPP-IV (значения IC_{50} для DPP-IV 45 и 42 μ М соответственно) (табл. 1) [12]. Данные последовательности пептидов были обнаружены ранее в работе I. M. E. Lacroix и E. C. Y. Li-Chan, где также сообщается об их ингибирующих DPP-IV свойствах [17]. Помимо пептидных последовательностей, описанных выше, другими авторами после исследования гидролизатов β -лактоглобулина на аналогичных моделях желудочно-кишечного тракта было идентифицировано 2 последовательности пептидов, ингибирующих DPP-IV: TPEVDDEALEK f (125–135) ($IC_{50} = 320$ μ М) и VLVLDTDYK f (92–100) ($IC_{50} = 424$ μ М). Ими же обнаружены противодиабетические пептиды из гидролизатов лактоферрина: WK f (268–269) ($IC_{50} = 41$ μ М) и WQ f (22–23) ($IC_{50} = 120$ μ М) [11].

В своих исследованиях О. Power с соавторами использовал коммерческий β -лактоглобулин в качестве субстрата для приготовления гидролизата с использованием фермента трипсина. Полученный

Таблица 1. Пептиды, полученные из сывороточных белков и обладающие ингибирующей активностью в отношении дипептидилпептидазы IV (DPP-IV)

Table 1. Peptides derived from whey proteins with inhibitory activity against dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV)

Исходный белок	Фермент	Аминокислотная последовательность	IC ₅₀ , μM	Ссылка
β-лактоглобулин	Нейтраза 0,8 LTM	LKPTPEGDLEIL f(46–57)	74,0	[11]
	Нейтраза 0,8 LTM, затем пепсин	LKPTPEGDL f(46–54)	45,0	
		LKPTPEGDLE f(46–55)	42,0	
	<i>In silico</i>	IPA f(78–80)	49,0	[21]
	Трипсин	VAGTWY f(15–20)	74,9	[22]
		IPAVF f(78–82)	44,7	[18]
		IPAVFK f(78–83)	149,1	[16]
		TPEVDDEALEK f(125–135)	578,7	[16]
		VLVLDTDYK f(92–100)	424,4	[18]
	Пепсин	LKPTPEGDL f(46–54)	45,0	[20]
LKPTPEGDLEIL f(46–57)		57,0	[20]	
α-лактальбумин	Пепсин	IPAVFKIDA f(78–86)	191,0	[20]
		WLANKAL f(104–110)	286,0	
		WLANKALCSEKLDQ f(104–117)	141,0	
		LANKALCSEKL f(105–115)	165,0	
		LCSEKLDQ f(110–117)	186,0	
		TKCEVFRE f(4–11)	166,0	
		IVQNNDSTEYGLF f(41–53)	337,0	
	Трипсин	EQLTKCEVFR f(1–10)	883,0	[8]
		KILDKVGINYWLANK f(94–108)	930,0	
		ILDKVGINYWLANK f(95–108)	456,0	
		VGINYWLANK f(99–108)	765,0	
		LDQWLCEKL f(115–123)	131,0	

гидролизат ингибировал DPP-IV со значением IC₅₀ 1,6 мг/мл, демонстрируя антиоксидантную и ингибирующую АПФ активность [18]. Гидролизат фракционировали через мембраны с размером пор 1, 2 и 5 кДа. Диафильтрационные пермеаты, последовательно пропущенные через мембраны с размером пор 5 и 2 кДа, показали повышенное ингибирование DPP-IV со значениями IC₅₀ 0,58 и 0,53 мг/мл соответственно. Концентраты после диафильтрации не оказывали существенного влияния на DPP-IV. Это подтверждает теорию, согласно которой за наблюдаемую биологическую активность ответственны пептиды с более низкой молекулярной массой. Из этого гидролизата авторы также идентифицировали пептид VAGTWY f(15–20) – наиболее сильный ингибитор DPP-IV (IC₅₀ = 74,9 μM). Также авторами была продемонстрирована ингибирующая активность DPP-IV фрагментов IPAVFK и TPEVDDEALEK (табл. 1) [18]. VAGTWY является многофункциональным биоактивным пептидом, поскольку он также проявлял значительную антиоксидантную и АПФ-ингибирующую активность [18, 19]. Кроме того, VAGTWY, IPAVFK и TPEVDDEALEK обладают антимикробными свойствами в отношении грамположительных бактерий [19].

В работе М. Uchida с соавторами сообщалось, что гидролизат β-лактоглобулина, полученный

с использованием фермента трипсина, снижал уровень глюкозы в крови у мышей, по сравнению с контрольной группой, после перорального теста на толерантность к глюкозе. Полученный гидролизат β-лактоглобулина обладал способностью ингибировать DPP-IV на уровне IC₅₀ = 210 μM. Авторы связывают такой уровень ингибирующей способности DPP-IV с присутствием в составе гидролизата пептида VAGTWY f(15–20), обладающего ингибирующей способностью на уровне IC₅₀ = 174 μM [20].

В работе Е. Mares-Mares с соавторами для поиска новых ингибиторов DPP-IV была получена первичная и вторичная сыворотка свежих (незрелых) сыров и сыров Оахака, которые традиционно потребляются в Мексике. Процесс получения вторичной сыворотки каждого продукта был основан на том, что каждую сыворотку подкисляли 0,5 % молочной кислотой и подвергали термической обработке при 95 °C в течение 30 мин. Для получения гидролизатов были использованы ферменты: пепсин (ЕС 3.4.23.1) из желудка свиньи, трипсин (ЕС 3.4.21) и химотрипсин (ЕС 3.4.21.1) из поджелудочной железы крупного рогатого скота.

При проведении гидролиза пепсином из выделенных сывороточных белков готовили водные растворы с концентрацией 100 мг белка/мл, pH раствора доводили до 2,0 с помощью 1 М HCl.

В случае протеолиза трипсином и химотрипсином концентрация белкового раствора составляла 50 мг белка/мл, величина активной кислотности дотитровывалась до 7,8 и 8,0 с помощью 1 М NaOH. Ферментативные реакции проводили при 37 °С в течение 24 ч. Полученные гидролизаты фракционировали через гидрофильную мембрану с размером пор 10 кДа. Исследование противодиабетической активности продуктов гидролиза показало, что наибольшее количество пептидов, ингибирующих DPP-IV, обнаружено в гидролизатах первичных сывороток из-под сыров Оахака, полученных при помощи пепсина и трипсина. Максимальная ингибирующая способность составила 92,86 мкг/мл [21].

В исследованиях, проводимых в испанском научно-исследовательском институте пищевой промышленности, показано, что гидролизат концентрата сывороточного белка, полученного с применением фермента трипсина, ингибирует активность DPP-IV со значением $IC_{50} = 1,51$ мг/мл.

Авторами из полученного гидролизата было идентифицировано шестнадцать пептидов из β -лактоглобулина. Из них пептиды IPAVF и IPAVFK показали наиболее высокое ингибирование DPP-IV [22]. Кроме того, было доказано, что пептид VLVLDTDYK из β -лактоглобулина ($IC_{50} = 424,4$ μ M) также обладает противомикробным действием [22].

В научных работах I. M. E. Lacroix и E. C. Y. Li-Chan была описана оценка ингибирующей активности DPP-IV молочных белков, полученных при гидролизе казеината натрия, изолята сывороточных белков (ИСБ), концентрата молочного белка и сухого обезжиренного молока с использованием 12 коммерческих протеаз [23]. Полученные гидролизаты были подвергнуты перевариванию в имитационном желудочно-кишечном тракте с использованием системы пепсин-панкреатин. Гидролизат ИСБ, полученный после 60 мин обработки пепсином, показал более высокое ингибирование DPP-IV ($IC_{50} = 0,075$ мг/мл). Дальнейший гидролиз панкреатином уменьшал ингибирующий потенциал DPP-IV. Помимо пепсина, проводились исследования и других коммерческих протеаз на предмет получения противодиабетических пептидов из изолята сывороточных белков. Процесс проводили также в течение 60 мин. Гидролизаты, полученные при помощи ферментных препаратов термолизина и Umamizyme K, проявили достаточно высокую способность ингибировать DPP-IV (63 и 61 % при 0,475 мг/мл). Однако гидролизаты, полученные при помощи пепсина, имели более сильную ингибирующую активность – 78 % ингибирования DPP-IV при 0,375 мг/мл [23].

Те же специалисты в другой работе гидролизали пепсином в течение 60 мин изолят сывороточного белка с получением гидролизатов α -лактальбумина,

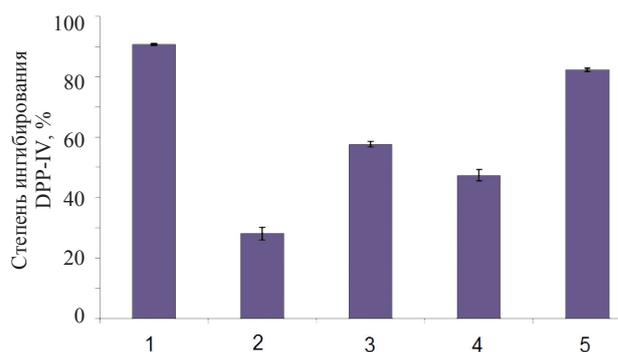


Рисунок 1. Степень ингибирования DPP-IV различных видов гидролизатов: 1 – гидролизат α -лактальбумина; 2 – гидролизат β -лактоглобулина; 3 – гидролизат лактоферрина; 4 – гидролизат бычьего сывороточного альбумина

Figure 1. Inhibition of DPP-IV in various types of hydrolysates: 1 – α -lactalbumin hydrolyzate; 2 – β -lactoglobulin hydrolyzate; 3 – lactoferrin hydrolyzate; 4 – bovine whey albumin hydrolyzate

β -лактоглобулина, сывороточного альбумина и лактоферрина [24]. Полученные гидролизаты были изучены на предмет их способности служить естественными источниками ингибиторов DPP-IV и α -глюкозидазы. Хотя ингибирование активности DPP-IV наблюдалось во всех гидролизованных пепсином сывороточных белках, гидролизат α -лактальбумина показал наибольшую эффективность со значением $IC_{50} = 0,036$ мг/мл. И наоборот, только изолят сывороточного белка, гидролизаты β -лактоглобулина и α -лактальбумина проявляли некоторую ингибирующую активность в отношении α -глюкозидазы (рис. 1).

На рисунке 1 представлена степень ингибирования DPP-IV различных гидролизатов молочных белков. Каждый столбец представляет среднее значение и стандартное отклонение трех определений. Данные, представленные на рисунке 1, коррелируют с данными, представленными выше, и наглядно демонстрируют высокую ингибирующую способность сывороточных белков, особенно α -лактальбумина. Гидролиз проводили при помощи пепсина, фермент-субстратное соотношение составило 4,0 %, температура инкубирования – 37 °С, продолжительность процесса при постоянном перемешивании – 60 мин.

Это исследование показывает, что пептиды, вырабатываемые из сывороточных белков, могут использоваться в качестве функциональных пищевых ингредиентов в специализированных продуктах противодиабетической терапии [17]. В следующей работе I. M. E. Lacroix и E. C. Y. Li-Chan последовательно фракционировали гидролизованный пепсином изолят сывороточного белка и α -лактальбумин, проявляющие ингибирующую активность DPP-IV. Затем анализировали пептидный

состав полученных активных фракций. В результате установлено, что две фракции из полученных имели наиболее высокую ингибирующую активность DPP-IV со значениями IC_{50} 0,216 и 0,081 мг/мл соответственно по сравнению с полным (нефракционированным) гидролизатом изолята сывороточного белка ($IC_{50} = 0,075$ мг/мл) [24]. Эти эксперименты также продемонстрировали высокое ингибирование DPP-IV фракциями гидролизата, содержащего большое количество неполярных пептидов. Среди идентифицированных последовательностей было определено 24 пептида, полученных из α -лактальбумина, и 11 из β -лактоглобулина и проанализировано их влияние на активность DPP-IV. Среди синтезированных пептидов LKPTPEGDL и LKPTPEGDLEIL из β -лактоглобулина ($IC_{50} = 45$ и 57 μ M соответственно) и WLNKALCSEKLDQ из α -лактальбумина ($IC_{50} = 141$ μ M) показали более высокий ингибирующий потенциал к DPP-IV (табл. 1) [20]. Однако эти пептиды были примерно в 10 раз менее эффективны, чем эталонный ингибитор дипротин А ($IC_{50} = 4,7$ μ M) [24].

В работе S. Маух с соавторами гидролизаты β -лактоглобулина были получены с использованием фермента эластаза при фермент-субстратном отношении (E:S) 0,5, 1,0 и 1,5 % до достижения требуемых значений степени гидролиза 9 и 13 % [25]. Авторы сравнивали значения ингибирования DPP-IV в гидролизатах β -лактоглобулина в условиях снижения фермент-субстратного отношения при достижении одинакового уровня степени гидролиза путем увеличения времени гидролиза. Образцы с одинаковой степенью гидролиза, полученные с различными фермент-субстратными отношениями, показали сравнимые профили молекулярно-массового распределения и ингибирующую

DPP-IV активность ($P > 0,05$). Анализ методом tandemной масс-спектрометрии с жидкостной хроматографией (ВЭЖХ МС/МС) показал, что 62 и 84 % идентифицированных пептидов были общими в гидролизатах, имеющих степень гидролиза 9 или 13 % соответственно (рис. 2). Были отмечены различия в пептидах, идентифицированных в гидролизатах, имеющих сходные степени гидролиза. Эти различия могут быть связаны с изменениями кинетики, селективности и активности фермента, которые могут зависеть от используемой концентрации фермента [25].

Количество идентифицированных пептидов, являющихся общими или специфичными для каждого образца, было представлено с использованием диаграмм Венна для каждого значения степени гидролиза (DH) (рис. 2). Образцы со степенью гидролиза 9 % (DH9) имели 109 идентичных пептидов, тогда как образцы со степенью гидролиза 13 % (DH13) имели 105 одинаковых пептидов. Образцы, полученные с использованием одного и того же фермент-субстратного отношения, но разных значений степени гидролиза, имели несколько общих пептидных последовательностей. Например, 104, 120 и 106 общих пептидов присутствовали в образцах со значениями E:S 0,5, 1,0 и 1,5 % соответственно. Это исследование показало, что снижение фермент-субстратного отношения может быть использовано для снижения стоимости производства гидролизата без отрицательного влияния на изучаемую биологическую активность и физико-химические свойства [25].

В одной из работ С. Ја с соавторами описано, что концентрат сывороточного белка, дополнительно обогащенный α -лактальбумином, был подвергнут гидролизу белка трипсином. Затем образцы полученных гидролизатов фракционировались в

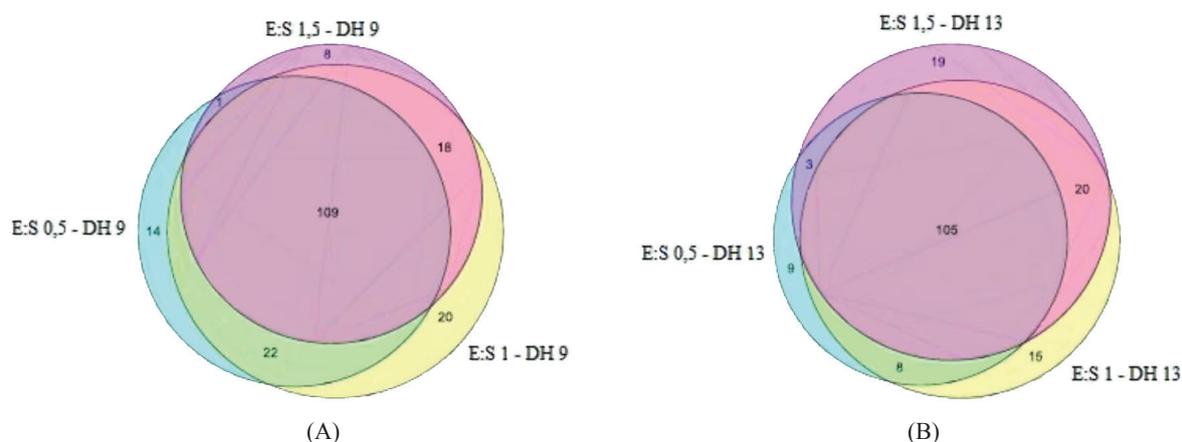


Рисунок 2. Диаграмма идентифицированных пептидов, которые были общими или специфичными для гидролизованного β -лактоглобулина до степени гидролиза (DH) 9 % (A), 13 % (B) при фермент-субстратном отношении (E:S) 0,5 % (синий), 1,0 % (желтый), 1,5% (вес/вес) сиреневый

Figure 2. Identified peptides, common or specific for hydrolyzed β -lactoglobulin to a degree of hydrolysis (DH) of 9% (A), 13% (B) with an enzyme-substrate ratio (E:S) of 0.5% (blue), 1.0% (yellow), 1.5% (weight/weight, violet)

полупрепаративном масштабе с использованием гель-фильтрационной хроматографии [8]. Ингибирующие DPP-IV пептиды из гидролизатов отделяли ультрафильтрацией с мембранными пакетами с отсеками молекулярной массы 10 кДа, 5 кДа и 3 кДа. Пептиды анализировали с использованием ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (RP-HPLC-MS/MS). Их ингибирующую активность в отношении DPP-IV определяли ферментативным анализом. Из всех идентифицированных пептидов 6 были получены из α -лактальбумина. За исключением пептидного фрагмента LDQWLCEK f (115–122), который не обладал ингибирующей активностью, все идентифицированные пептиды EQLTKCEVFR f (1–10), KILDKVGINYWLANK f (94–108), ILDKVGINYWLANK f (95–108), VGINYWLANK f (99–108) и LDQWLCEKL f (115–123) имели ингибирующую DPP-IV активность со значением IC_{50} $883 \pm 36,8 \mu\text{M}$, $930 \pm 35,7 \mu\text{M}$, $456 \pm 43,5 \mu\text{M}$, $765 \pm 23,9 \mu\text{M}$ и $131 \pm 33,9 \mu\text{M}$ соответственно (табл. 1). Наибольшую ингибирующую активность проявлял LDQWLCEKL f (115–123) с IC_{50} $131 \pm 33,9 \mu\text{M}$. Кроме того, LDQWLCEKL проявлял типичный неконкурентный способ ингибирования. Результаты работы авторов показывают, что α -лактальбумин содержит активные пептиды с ингибирующей активностью DPP-IV, которые можно использовать для профилактики и лечения СД-2 [8].

Дипротин А (IPI) и дипротин В (VPL) являются мощными ингибиторами DPP-IV, проявляющими явное конкурентное поведение, действуя в качестве ферментных субстратов. В работе G. Tulipano с соавторами, используя *in vitro* оценки для выявления противодиабетических пептидов, было показано, что пептид IPA, полученный из β -лактоглобулина путем расщепления *in silico* на базе BioPer и впоследствии синтезированный, является конкурентным ингибитором DPP-IV со значением $IC_{50} = 49 \mu\text{M}$ [26]. Конкурентное ингибирование DPP-IV выявлено для пептида IPAVFKIDA (из β -лактоглобулина), что может быть следствием его субстратоподобной структуры [24].

В одной из исследовательских работ А. В. Nongonierma с соавторами для изучения пептидных аналогов Дипротина А (Ile-Pro-Ile) был использован метод *in silico*. Было исследовано 25 пептидных последовательностей, наиболее часто встречающихся в молочных белках. Значения IC_{50} в отношении ингибирования DPP-IV варьировались от $3,9 \pm 1,0 \mu\text{M}$ (Ile-Pro-Ile) до $247,0 \pm 32,7 \mu\text{M}$ (Phe-Pro-Phe). Большинство исследованных пептидов сохраняли пептидную структуру в течение 30 мин протеолиза. Несмотря на то что были выявлены пептиды, ингибирующие DPP-IV, их активность не была столь сильной, как активность Дипротина А. Авторы работы отмечают, что наличие Pro в центре трипептидной цепи является необходимым

условием для достижения максимально высокого ингибирования DPP-IV. Молекулярная стыковка показала похожие взаимодействия между Ile-Pro-Ile и его ассоциированными пептидными аналогами. Этот результат вместе с высокой стабильностью дипротина А и его связанных пептидных аналогов с гидролитическим действием DPP-IV позволяет предположить, что в ингибирование DPP-IV этими пептидами вовлечены сложные механизмы. Пептиды, описанные в этом исследовании, могут найти потенциальное применение для управления гликемией и энергетического гомеостаза у людей [27].

Как правило, гидролизат белков содержит смесь биологически активных и неактивных пептидов в дополнение к негидролизованному белку. Мембранная обработка может быть решением данной проблемы, поскольку короткие пептиды с требуемой биологической активностью могут быть получены в пермеате ультрафильтрационной установки, в то время как пептиды с высокой молекулярной массой останутся в концентрате. Мембранная фильтрация поможет избежать чрезмерного гидролиза, т. к. он приводит к высокому содержанию свободных аминокислот, которые негативно влияют на сенсорные свойства конечного продукта и обеспечивают высокую осмоляльность. Следовательно, гидролитическая реакция должна строго контролироваться [28].

Мембранные биореакторы – одна из наиболее перспективных и динамически развивающихся областей промышленной технологии. Данная технология представляет собой комбинирование различных биохимических (под действием катализатора биологического происхождения, т. е. фермента) и мембранных процессов разделения. Ферментативные мембранные реакторы работают, удерживая фермент и питающий субстрат на стороне ретентата, в то же время позволяя вновь образованным биопептидам проникать через мембрану, создавая поток продукта с повышенной биологической активностью [29, 30].

Непрерывная обработка в производстве пептидов представляет собой область повышенного интереса. В исследовании J. O'Halloran с соавторами был разработан ферментативный мембранный реактор, в котором изолят сывороточного белка подвергали ферментативному гидролизу для получения ингибирующих DPP-IV пептидов [31]. Авторами были испытаны два отдельных фермента Королаза 2TS и Протамекс в обычных периодических процессах ультрафильтрации и ферментативном мембранном реакторе непрерывного действия (рис. 3). Каждый фермент вводили в реакционный сосуд и удерживали на стороне ретентата, оставляя его свободным и не связанным с мембраной. Авторами было отмечено, что

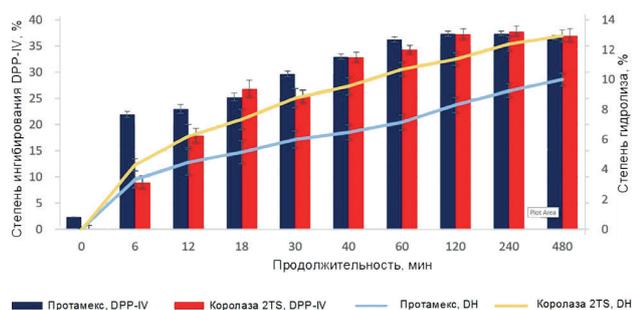


Рисунок 3. Зависимость степени ингибирования DPP-IV от режимов проведения гидролиза ферментами Протамексом и Королазой 2TS

Figure 3. Effect of the modes of hydrolysis by the enzymes Protamex and Corolase 2TS on the DPP-IV inhibition

производительность ферментативного мембранного реактора непрерывного действия, по сравнению со стандартным способом периодической обработки, возросла на 7,2 % и 8,7 % при использовании Протамекса и Королазы соответственно [31].

При этом пермеат, полученный с использованием Протамекса, показал на 33,7 % выше значение ингибирующей DPP-IV активности по сравнению с пермеатом, полученным с использованием Королазы 2TS. Из данных рисунка видно, что существует четко прослеживаемая взаимосвязь между степенью гидролиза и степенью ингибирования DPP-IV. Положительную корреляцию между степенью гидролиза и степенью ингибирования DPP-IV можно проследить до достижения 120 мин эксперимента, после чего биологическая активность выравнивается, оставаясь на данном этапе на уровне 37 % как в случае использования Протамекса, так и Королазы 2TS. Наиболее сильные различия в степени ингибирования отмечены на ранних стадиях гидролиза – по истечении 6 и 12 мин. При этом гидролизаты, полученные с помощью Протамекса, через 6 мин проявили способность ингибировать DPP-IV более чем в два раза, чем гидролизаты, полученные с помощью Королазы 2TS. Это подчеркивает тот факт, что степень гидролиза не обязательно является основным маркером биологической активности. В первую очередь тип и специфичность фермента могут оказывать большее влияние на активность гидролизата. В данной работе авторы доказали возможность использования разработанного ими мембранного реактора для получения противодиабетических пептидов при вышеописанных условиях [31].

В работе А. В. Nongonierma с соавторами для оптимизации условий ферментативного гидролиза изолята молочного белка ферментом трипсин для высвобождения пептидов, ингибирующих DPP-IV, был проведен полнофакторный эксперимент с тремя переменными параметрами, включая температуру

(40, 50 и 60 °C), отношение фермента к субстрату (E:S 0,50, 1,25 и 2,00 % (вес/вес)) и время гидролиза (60, 150 и 240 мин). Полученные результаты многофакторных экспериментов были подвергнуты статистической обработке с использованием блока DOE. Всего в исследовании было использовано 15 гидролизатов (H1–H15). Степень гидролиза (СГ) варьировалась от $6,98 \pm 0,31$ % (H8) до $12,75 \pm 0,62$ % (H10). Полумаксимальная ингибирующая концентрация DPP-IV (IC_{50}) варьировалась от $0,68 \pm 0,06$ мг/мл (H11) / $0,68 \pm 0,10$ мг/мл (H4) до $1,59 \pm 0,11$ мг/мл (H8). Температура не влияла ($P > 0,05$) на значение IC_{50} DPP-IV. Однако увеличение E:S или времени значительно снижало IC_{50} DPP-IV ($P < 0,05$). Значение IC_{50} для DPP-IV, равное 0,69 мг/мл и рассчитанное с помощью методологии поверхности отклика для гидролизата, полученного при 50,5 °C, 2 % ES и 231 мин (H16), было аналогично экспериментально полученному значению (DPP-IV $IC_{50} = 0,66 \pm 0,10$ мг/мл, $P > 0,05$, $n = 3$). После исследования на имитационной модели желудочно-кишечного тракта образца H16 значение IC_{50} DPP-IV увеличилось ($P < 0,05$) до $0,90 \pm 0,07$ мг/мл. Потенциально известные пептидные последовательности, ингибирующие DPP-IV, были идентифицированы в H16 с помощью жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS), источниками которых был как казеин, так и их сывороточные белки. Некоторые пептиды также присутствовали в образце H16, подвергнутого искусственному перевариванию. Это говорит о том, что они были устойчивы к желудочно-кишечным ферментам. Гидролизаты изолятов молочного белка могут представлять интерес для регуляции уровня глюкозы в сыворотке крови у людей [32].

Выводы

Учитывая разнообразие пептидов и способы их действия, гидролизаты сывороточного белка или смеси в них пептидов могут действовать синергетически, приводя к большему ингибированию DPP-IV по сравнению с отдельными пептидами [24]. В исследованных работах показано, что стратегии фракционирования являются актуальными и осуществимыми методами, направленными на избирательное обогащение ингибирующей активности DPP-IV гидролизатов. Однако обычные лекарственные средства, используемые в качестве ингибиторов DPP-IV, такие как ситаглиптин, являются более сильнодействующими (IC_{50} в наномолярном диапазоне), чем гидролизаты и пептиды сывороточного белка.

Из исследований, приведенных выше, можно сделать вывод, что пептиды, ингибирующие DPP-IV и идентифицированные из гидролизатов, обычно имеют молекулярные массы ниже 2 кДа и большинство из них содержат пролиновые

и/или гидрофобные аминокислотные остатки в своей последовательности [15]. Длина, суммарный заряд и полярность полученных из сыворотки пептидов сами по себе не оказывают предсказуемого влияния на ингибирующее действие или активность. Для ингибирования DPP-IV наиболее важную роль играет аминокислотная последовательность пептидов [24]. Исходя из результатов описанных выше исследований, можно заключить, что ферментные препараты нейтраза и трипсин продемонстрировали наилучшую специфичность по отношению к расщепляемой пептидной связи сывороточных белков и получение гидролизатов с высокой ингибирующей активностью в отношении DPP-IV.

Несмотря на большое количество опубликованных результатов исследований по выделению, характеристике и биологической активности пептидов, полученных из пищевых белков, на рынке наблюдается ограниченное количество коммерческих продуктов, содержащих биопептиды. Поэтому необходимы дальнейшие исследования в этой области, чтобы установить, что белковые гидролизаты, которые считаются безопасными, не проявляют побочных эффектов (особенно в высоких дозах), включая токсичность и аллергенность. Гидролизаты сывороточных белков в 104 раза менее эффективны, чем глиптины. Тем не менее, при лечении диабета 2 типа комбинации глиптинов и гидролизатов могут оказывать аддитивное действие

с точки зрения их способности ингибировать DPP-IV [30].

Представленные в обзоре данные показывают высокий потенциал сывороточных и молочных белков в качестве источников противодиабетических пептидов. Дополнительное вовлечение сыворотки в производственный цикл позволит не только сэкономить дорогостоящее сырье и расширить ассортиментный ряд функциональных молочных продуктов, но и значительно снизить затраты при ее утилизации [33, 34].

Критерии авторства

Е. Ю. Агаркова руководила проектом. К. А. Рязанцева и А. Г. Кручинин проводили теоретические исследования, участвовали в написании и корректировке статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

E.Yu. Agarkova supervised the project. K.A. Ryazantseva and A.G. Kruchinin conducted the theoretical research, processed the data, and prepared the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы

1. Харитонов, В. Д. Глубокая переработка молочного сырья и вторичных ресурсов / В. Д. Харитонов // Молочная промышленность. – 2018. – № 6. – С. 30–31.
2. Низкоаллергенные молочные продукты / В. Д. Харитонов, Н. В. Пономарева, Е. И. Мельникова [и др.]. – СПб. : Профессия, 2019. – 108 с.
3. Рациональный дизайн ферментной композиции для получения функциональных гидролизатов сывороточных белков / А. А. Торкова, К. А. Рязанцева, Е. Ю. Агаркова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53, № 6. – С. 580–591. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0555109917060137>.
4. Биосинтез антимикробных бактериоциноподобных соединений штаммом *Lactobacillus reuteri* LR1: оптимизация условий культивирования / А. В. Бегунова, И. В. Рожкова, Т. И. Ширшова [и др.] // Биотехнология. – 2019. – Т. 35, № 5. – С. 58–69. DOI: <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-58-69>.
5. Korhonen, H. Bioactive peptides: Production and functionality / H. Korhonen, A. Pihlanto // International Dairy Journal. – 2006. – Vol. 16, № 9. – P. 945–960. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>.
6. Nasri, M. Protein hydrolysates and biopeptides: production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review / M. Nasri // Advances in Food and Nutrition Research. – 2017. – Vol. 81. – P. 109–159. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>.
7. Асафов, В. А. Функциональный высокобелковый напиток с гидролизатом казеина и белковыми фракциями молозива / В. А. Асафов, Н. Л. Танькова, Е. Л. Искакова // Инновации и продовольственная безопасность. – 2018. – Т. 20, № 2. – С. 51–54.
8. Generation and characterization of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from trypsin-hydrolyzed α -lactalbumin-rich whey proteins / C.-L. Jia, N. Hussain, O. J. Ujirohene [et al.] // Food Chemistry. – 2020. – Vol. 318. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126333>.
9. Танирбергенова, А. А. Распространение сахарного диабета в современном мире / А. А. Танирбергенова, К. А. Тулебаев, Ж. А. Аканов // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2017. – № 2. – С. 386–388.

10. Kahn, S. E. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future / S. E. Kahn, M. E. Cooper, S. Del Prato // *Lancet*. – 2014. – Vol. 383, № 9922. – P. 1068–1083. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6).
11. Juillerat-Jeanneret, L. Dipeptidyl peptidase IV and its inhibitors: Therapeutics for type 2 diabetes and what else? / L. Juillerat-Jeanneret // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2013. – Vol. 57, № 6. – P. 2197–2212. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm400658e>.
12. Milk protein isolate (MPI) as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides / A. B. Nongonierma, M. Lalmahomed, S. Paoletta [et al.] // *Food Chemistry*. – 2017. – Vol. 231. – P. 202–211. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.123>.
13. Nongonierma, A. B. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides / A. B. Nongonierma, R. J. FitzGerald // *Journal of Functional Foods*. – 2013. – Vol. 5, № 4. – P. 1909–1917. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.012>.
14. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes / O. Power, A. B. Nongonierma, P. Jakeman [et al.] // *Proceedings of the Nutrition Society*. – 2014. – Vol. 73, № 1. – P. 34–46. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0029665113003601>.
15. Lacroix, I. M. E. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates / I. M. E. Lacroix, E. C. Y. Li-Chan // *International Dairy Journal*. – 2012. – Vol. 25, № 2. – P. 97–102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.003>.
16. Nongonierma, A. B. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: Influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food–drug interaction / A. B. Nongonierma, R. J. FitzGerald // *International Dairy Journal*. – 2013. – Vol. 32, № 1. – P. 33–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.03.005>.
17. Lacroix, I. M. E. Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and α -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins / I. M. E. Lacroix, E. C. Y. Li-Chan // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61, № 31. – P. 7500–7506. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf401000s>.
18. Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β -lactoglobulin / O. Power, A. Fernández, R. Norris [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2014. – Vol. 9. – P. 38–47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.002>.
19. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin / A. Pellegrini, C. Dettling, U. Thomas [et al.] // *Biochemical et Biophysical Acta (BBA) – General Subjects*. – 2001. – Vol. 1526, № 2. – P. 131–140. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00116-7).
20. Uchida, M. Novel dipeptidyl peptidase-4-inhibiting peptide derived from β -lactoglobulin / M. Uchida, Y. Ohshiba, O. Mogami // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2011. – Vol. 117, № 1. – P. 63–66. DOI: <https://doi.org/10.1254/jphs.11089SC>.
21. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV by enzymatic hydrolysates derived from primary and secondary whey of fresh and Oaxaca cheeses / E. Mares-Mares, J. E. Barboza-Corona, M. E. Sosa-Morales [et al.] // *International Journal of Dairy Technology*. – 2019. – Vol. 72, № 4. – P. 626–632. DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12623>.
22. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin / S. T. Silveira, D. Martinez-Maqueda, I. Recio [et al.] // *Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 141, № 2. – P. 1072–1077. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.056>.
23. Lacroix, I. M. E. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates / I. M. E. Lacroix, E. C. Y. Li-Chan // *International Dairy Journal*. – 2012. – Vol. 25, № 2. – P. 97–102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.003>.
24. Lacroix, I. M. E. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins / I. M. E. Lacroix, E. C. Y. Li-Chan // *Peptides*. – 2014. – Vol. 54. – P. 39–48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.002>.
25. Le Maux, S. Peptide composition and dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of β -lactoglobulin hydrolysates having similar extents of hydrolysis while generated using different enzyme-to-substrate ratios / S. Le Maux, A. B. Nongonierma, R. J. FitzGerald // *Food Research International*. – 2017. – Vol. 99. – P. 84–90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.012>.
26. Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors / G. Tulipano, V. Sibilia, A. M. Caroli [et al.] // *Peptides*. – 2011. – Vol. 32, № 4. – P. 835–838. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.002>.
27. *In silico* approaches applied to the study of peptide analogs of ile-pro-ile in relation to their dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties / A. B. Nongonierma, L. Dellafiara, S. Paoletta [et al.] // *Frontiers in Endocrinology*. – 2018. – Vol. 9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00329>.
28. Abd El-Salam, M. H. Separation of bioactive whey proteins and peptides / M. H. Abd El-Salam, S. El-Shibiny // *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food* / A. M. Grumezescu, A. M. Holban. – Academic Press, 2017. – P. 463–494. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811521-3.00012-0>.
29. Membrane reactors for low temperature applications: An overview / A. Brunetti, P. F. Zito, L. Giorno [et al.] // *Chemical Engineering and Processing – Process Intensification*. – 2018. – Vol. 124. – P. 282–307. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.05.002>.

30. Guadix, A. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor / A. Guadix, F. Camacho, E. M. Guadix // *Journal of Food Engineering*. – 2006. – Vol. 72, № 4. – P. 398–405. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.12.022>.
31. O'Halloran, J. Production of whey-derived DPP-IV inhibitory peptides using an enzymatic membrane reactor / J. O'Halloran, M. O'Sullivan, E. Casey // *Food and Bioprocess Technology*. – 2019. – Vol. 12, № 5. – P. 799–808. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02253-7>.
32. Release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from milk protein isolate (MPI) during enzymatic hydrolysis / A. B. Nongonierma, C. Mazzocchi, S. Paoletta [et al.] // *Food Research International*. – 2017. – Vol. 94. – P. 79–89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.004>.
33. Донская, Г. А. Напитки кисломолочные с повышенным содержанием сывороточных белков и водорастворимых антиоксидантов / Г. А. Донская, В. М. Дрожжин, В. В. Брызгалова // *Вестник Мурманского государственного технического университета*. – 2018. – Т. 21, № 3. – С. 471–480. DOI: <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2018-21-3-471-480>.
34. Выбор источников биологически активных веществ для функциональных кисломолочных продуктов / З. С. Зобкова, Т. П. Фурсова, Д. В. Зенина [и др.] // *Молочная промышленность*. – 2018. – № 3. – С. 59–62. DOI: <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2018-3-59-62>.

References

1. Haritonov VD. Deep processing of raw milk materials and secondary resources. *Dairy Industry*. 2018;(6):30–31. (In Russ.).
2. Kharitonov VD, Ponomareva NV, Mel'nikova EI, Bogdanova EV. Nizkoallergennye molochnye produkty [Low-allergenic dairy products]. St. Petersburg: Professiya; 2019. 108 p. (In Russ.).
3. Torkova AA, Ryazantseva KA, Agarkova EYu, Kruchinin AG, Tsentalovich MYu, Fedorova TV. Rational design of enzyme compositions for the production of functional hydrolysates of cow milk whey proteins. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53(6):580–591. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.7868/S0555109917060137>.
4. Begunova AV, Rozhkova IV, Shirshova TI, Glazunova OA., Fedorova TV. Optimization of conditions for *Lactobacillus reuteri* LR1 strain cultivation to improve the biosynthesis of bacteriocin-like substances. *Biotechnology*. 2019;35(5):58–69. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-58-69>.
5. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 2006;16(9):945–960. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>.
6. Nasri M. Protein hydrolysates and biopeptides: production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2017;81:109–159. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>.
7. Asafov VA, Tankova HL, Iskakova EL. Functional high protein drink with casein hydrolysate and protein fractions of colostrum. *Innovations and Food Safety*. 2018;20(2):51–54. (In Russ.).
8. Jia C-L, Hussain N, Ujiroghene OJ, Pang XY, Zhang SW, Lu J, et al. Generation and characterization of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from trypsin-hydrolyzed α -lactalbumin-rich whey proteins. *Food Chemistry*. 2020;318. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126333>.
9. Tanirbergenova AA, Tulebayev KA, Akanov ZhA. The spread of diabetes in the modern world. *Vestnik KazNMU*. 2017;(2):386–388. (In Russ.).
10. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future. *Lancet*. 2014;383(9922):1068–1083. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6).
11. Juillerat-Jeanneret L. Dipeptidyl peptidase IV and its inhibitors: Therapeutics for type 2 diabetes and what else? *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;57(6):2197–2212. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm400658e>.
12. Nongonierma AB, Lalmahomed M, Paoletta S, FitzGerald RJ. Milk protein isolate (MPI) as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Chemistry*. 2017;231:202–211. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.123>.
13. Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides. *Journal of Functional Foods*. 2013;5(4):1909–1917. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.012>.
14. Power O, Nongonierma AB, Jakeman P, FitzGerald RJ. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2014;73(1):34–46. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0029665113003601>.
15. Lacroix IME, Li-Chan ECY. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*. 2012;25(2):97–102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.003>.
16. Nongonierma AB, FitzGerald RJ. 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;32(1):33–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.03.005>.
17. Lacroix IME, Li-Chan ECY. Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and α -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(31):7500–7506. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf401000s>.

18. Power O, Fernández A, Norris R, Riera FA, FitzGerald RJ. Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β -lactoglobulin. *Journal of Functional Foods*. 2014;9:38–47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.002>.
19. Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochemical et Biophysical Acta (BBA) – General Subjects*. 2001;1526(2):131–140. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00116-7).
20. Uchida, M, Ohshiba Y, Mogami O. Novel dipeptidyl peptidase-4-inhibiting peptide derived from β -lactoglobulin. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2011;117(1):63–66. DOI: <https://doi.org/10.1254/jphs.11089SC>.
21. Mares-Mares E, Barboza-Corona JE, Sosa-Morales ME, Gutierrez-Chavez AJ, Gutierrez-Vargas S, Leon-Galvan MF. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV by enzymatic hydrolysates derived from primary and secondary whey of fresh and Oaxaca cheeses. *International Journal of Dairy Technology*. 2019;72(4):626–632. DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12623>.
22. Silveira ST, Martínez-Maqueda D, Recio I, Hernandez-Ledesma B. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin. *Food Chemistry*. 2013;141(2):1072–1077. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.056>.
23. Lacroix IME, Li-Chan ECY. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*. 2012;25(2):97–102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.003>.
24. Lacroix IME, Li-Chan ECY. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides*. 2014;54:39–48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.002>.
25. Le Maux S, Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Peptide composition and dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of β -lactoglobulin hydrolysates having similar extents of hydrolysis while generated using different enzyme-to-substrate ratios. *Food Research International*. 2017;99:84–90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.012>.
26. Tulipano G, Sibilia V, Caroli AM, Cocchi D. Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides*. 2011;32(4):835–838. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.002>.
27. Nongonierma AB, Dellafiara L, Paoletta S, Galaverna G, Cozzini P, FitzGerald RJ. *In silico* approaches applied to the study of peptide analogs of ile-pro-ile in relation to their dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00329>.
28. Abd El-Salam MH, El-Shibiny S. Separation of bioactive whey proteins and peptides. In: Grumezescu AM, Holban AM, editors. *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food*. Academic Press; 2017. pp. 463–494. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811521-3.00012-0>.
29. Brunetti A, Zito PF, Giorno L, Drioli E, Barbieri G. Membrane reactors for low temperature applications: An overview. *Chemical Engineering and Processing – Process Intensification*. 2018;124:282–307. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2017.05.002>.
30. Guadix A, Camacho F, Guadix EM. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. *Journal of Food Engineering*. 2006;72(4):398–405. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.12.022>.
31. O'Halloran J, O'Sullivan M, Casey E. Production of whey-derived DPP-IV inhibitory peptides using an enzymatic membrane reactor. *Food and Bioprocess Technology*. 2019;12(5):799–808. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02253-7>.
32. Nongonierma AB, Mazzocchi C, Paoletta S, FitzGerald RJ. Release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from milk protein isolate (MPI) during enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 2017;94:79–89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.004>.
33. Donskaya GA, Drozhzhin VM, Bryzgalina VV. Fermented drinks supplemented with whey proteins and water-soluble antioxidants. *Vestnik of MSTU*. 2018;21(3):471–480. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2018-21-3-471-480>.
34. Zobkova ZS, Fursova TP, Zenina DV, Gavrilina AD, Shelaginova IR, Drozhzhin VM. Selection of the sources of biologically active substances for functional fermented milk products. *Dairy Industry*. 2018;(3):59–62. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2018-3-59-62>.

Сведения об авторах

Агаркова Евгения Юрьевна

канд. техн. наук, заведующая лабораторией технологии молочно-белковых концентратов, пищевых добавок и продуктов на их основе, ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, тел.: +7 (499) 237-04-02, e-mail: e_agarkova@vnimi.org
 <https://orcid.org/0000-0001-8967-7074>

Information about the authors

Eugeniya Yu. Agarkova

Cand.Sci.(Eng.), Head of the Laboratory of Technology for Milk Protein Concentrates, Food Additives and Products Based on them, All-Russian Dairy Research Institute, 35, Lusinovskaya Str., Moscow, Russia, 115093, phone: +7 (499) 237-04-02, e-mail: e_agarkova@vnimi.org
 <https://orcid.org/0000-0001-8967-7074>

Рязанцева Ксения Александровна

канд. техн. наук, научный сотрудник лаборатории технологии молочно-белковых концентратов, пищевых добавок и продуктов на их основе, ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, тел.: +7 (499) 237-04-02, e-mail: k_riazantseva@vnimi.org
 <https://orcid.org/0000-0003-3207-2837>

Кручинин Александр Геннадьевич

канд. техн. наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией молочных консервов, ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, тел.: +7 (499) 236-02-36, e-mail: a_kruchinin@vnimi.org
 <https://orcid.org/0000-0002-3227-8133>

Ksenia A. Ryazantseva

Cand.Sci.(Eng.), Research of the Laboratory of Technology for Milk Protein Concentrates, Food Additives and Products Based on them, All-Russian Dairy Research Institute, 35, Lusinovskaya Str., Moscow, Russia, 115093, phone: +7 (499) 237-04-02, e-mail: k_riazantseva@vnimi.org
 <https://orcid.org/0000-0003-3207-2837>

Alexander G. Kruchinin

Cand.Sci.(Eng.), Senior Research, Head of the Laboratory of Canned Milk, All-Russian Dairy Research Institute, 35, Lusinovskaya Str., Moscow, Russia, 115093, phone: +7 (499) 236-02-36, e-mail: a_kruchinin@vnimi.org
 <https://orcid.org/0000-0002-3227-8133>