

Ферментативный способ производства биоактивных пептидов из молочного сырья: обзор предметного поля

А. Г. Кручинин, Е. И. Большакова

Всероссийский
научно-исследовательский
институт молочной
промышленности, г. Москва,
Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: На протяжении 14 лет интерес к использованию молочного сырья для производства биологически активных пептидов (БАП) с антигипертензивным, антиоксидантным и антидиабетическим действием находился в фазе стремительного роста по причине необходимости профилактики различных заболеваний. На сегодняшний день особое внимание уделяется ферментативному способу производства, так как он позволяет направленно осуществлять процесс высвобождения БАП с заданными свойствами.

Целью данного обзора предметного поля являлось обобщение и систематизация опыта международных исследований за последние 14 лет в области ферментативного гидролиза как способа высвобождения БАП из молочного сырья.

Материалы и методы: Данный обзор предметного поля был выполнен в соответствии с руководством PRISMA-ScR. Поиск научных трудов был осуществлен в базе данных Google Scholar, так как она позволяет осуществлять поиск научных источников без ограничений по их формату и виду представления научных данных (книга, диссертация, статья), а также включает в себя научные источники из других баз данных и производит сортировку по релевантности.

Результаты: При поиске было выявлено 72 источника, опубликованных с 2007 по 2021 гг. на английском языке. Отобранные работы посвящены вопросам гидролиза микробными протеазами (МП) — 50 %, и коммерческими ферментными препаратами (КФП) — 50 %.

Выводы: Существует ряд задач, решение которых необходимо для повышения уровня коммерциализации научных данных о процессе производства БАП посредством направленного гидролиза. Создание новых баз данных; наращивание исследовательской базы по совместной ферментации микроорганизмами и коммерческими ферментами; определение генов протеаз методом ПЦР позволят повысить практическую применимость исследований и обоснованность проведения большего количества доказательных *in vivo* и клинических исследований.

Ключевые слова: АПФ-ингибирующие пептиды, ДПП-4 ингибирующие пептиды, антиоксидантные пептиды, биоактивные пептиды молочной сыворотки.

Корреспонденция:

Кручинин Александр
Геннадьевич,

E-mail: a_kruchinin@vniimi.org.

Конфликт интересов:

авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 13.09.2023

Принята: 15.11.2023

Опубликована: 30.11.2023

Copyright: © 2023 Авторы



Для цитирования: Кручинин, А.Г., & Большакова, Е.И. (2023). Ферментативный способ производства биоактивных пептидов из молочного белкового сырья: обзор предметного поля. *FOOD METAENGINEERING*, 1(3), 47-65. <https://doi.org/10.37442/fme.2023.3.24>

Enzymatic Method of Bioactive Peptides Production from Milk Protein Raw Materials: A Scoping Review

Alexandr G. Kruchinin, Ekaterina I. Bolshakova

All-Russian Dairy Research Institute,
Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: For 14 years, interest in the use of dairy raw materials for the production of bioactive peptides (BPs) with antihypertensive, antioxidant and antidiabetic effects has been in a phase of rapid growth because of the need to prevent different diseases. Particular attention is being paid to enzymatic production method, as it allows for a targeted process of BP extraction with specified properties.

Purpose of this scoping review: to summarize and systematize the experience of international research over the last 14 years in the field of FG as a method to extract BPs from milk protein substrates.

Materials and Methods: This scoping review was performed in accordance with the PRISMA-ScR guidelines. Scientific papers were searched in the Google Scholar database, because allows searching for scientific sources without restrictions on their format and type of scientific data presentation (book, dissertation, article), as well as includes scientific sources from other databases and performs relevance sorting.

Results: The search identified 72 sources published between 2007 and 2021 in English. Included sources are devoted to hydrolysis by starter bacteria enzymes (SBE) — 50 % and by commercial enzyme preparations (CEP) — 50 %.

Conclusion: There are a number of challenges that need to be addressed in order to increase the level of commercialization of BP production through directed hydrolysis. Creation of databases; building up the research base on co-fermentation by microorganisms and commercial enzymes; conducting PCR studies of microbial protease genes will increase the practical applicability of research and the validity of conducting more evidence-based in vivo and clinical studies.

Keywords: ACE-inhibitory peptides; DPP-IV-inhibitory peptides; antioxidative peptides; whey bioactive peptides

Correspondence:

Alexandr G. Kruchinin,
E-mail: a_kruchinin@vniimi.org

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 13.09.2023

Accepted: 15.11.2023

Published: 30.11.2023

Copyright: © 2023 The Authors



To cite: Kruchinin, A.G., & Bolshakova, E.I. (2023). Enzymatic Method of Bioactive Peptides Production from Milk Protein Raw Materials: A Scoping Review. *FOOD METAENGINEERING*, 1(3), 47-65. <https://doi.org/10.37442/fme.2023.3.24>

СОКРАЩЕНИЯ

КФП — коммерческие ферментные препараты

МП — микробные протеазы

ФГ — ферментативный гидролиз

БАП — биоактивные пептиды

МКМ — молочнокислые микроорганизмы

ВВЕДЕНИЕ

Молочное сырье, в том числе вторичное, обладает высоким биологически активным потенциалом (Mazorra-Manzano et al., 2020). Согласно Yadav и др. (2015) белки молока являются подходящим субстратом для получения биологически активных пептидов (БАП), которые характеризуются широким спектром функционального действия, в том числе антигипертензивного, антиоксидантного, антидиабетического и ряда других (Korhonen, 2009; Mohanty et al., 2016). Естественным образом БАП в организме человека высвобождаются в результате гидролиза белков пищеварительными ферментами в ЖКТ (Udenigwe et al., 2021). Наиболее распространенным способом получения БАП *in vitro* является ФГ, что обусловлено специфичностью коммерческих ферментных препаратов к разрыву конкретных пептидных связей и щадящими режимами их применения (Abd El-Fattah et al., 2017). Гидролиз коммерческими ферментными препаратами позволяет осуществить таргетированное производство БАП. Активное развитие высокопроизводительных технологий пептидомики и нарастающее из года в год количество исследований по данной тематике (Krushinin & Turovskaya, 2022) позволяет получать новые знания о производстве БАП и возможностях по оптимизации их производства, применения и коммерциализации. Согласно мониторинговым данным ВОЗ¹ в последние годы отмечается стремительный рост числа неинфекционных алиментарно-зависимых заболеваний (сердечно-сосудистые заболевания, раковые заболевания, диабет и т.д.). Исходя из этого, весьма перспективным является рассмотрение биоактивных пептидов в качестве естественных и эффективных стимуляторов защитных механизмов организма человека в составе лечебных и/или профилактических молочных продуктов.

Рассматривая исследования, посвященные высвобождению БАП из молочного сырья посредством фер-

ментативного расщепления, следует выделить два основных направления, наиболее встречающихся в литературе, а именно ферментация молочнокислыми микроорганизмами и гидролиз коммерческими или потенциально-коммерческими ферментными препаратами. В работе (López-Fandiño et al., 2006) отмечается, что высвобождение БАП из белков-предшественников естественным образом во время пищеварения является неэффективным методом ввиду непредсказуемости процесса. По этой причине, с целью повышения эффективности высвобождения БАП из структуры белка стали активно использоваться очищенные ферментные препараты животного происхождения (пепсин, трипсин, химотрипсин) для оптимизации гидролиза посредством изменения фермент-субстратного соотношения, pH, температуры и продолжительности процесса. Это способствовало регулированию процесса высвобождения БАП, однако не решило вопрос ограниченности гидролиза, связанного со специфичностью используемых ферментов. Так, в технологию высвобождения БАП были внедрены ферменты микробного (алкалаза, флавозим, проназа, термолизин и нейтраза) и растительного происхождения (папаин, фицин, бромелайн), что позволило извлекать из белка пептидные последовательности с другим количеством аминокислотных остатков, мотивами и биоактивным действием. Также отмечается целесообразность разработки новых ферментных композиций из различных источников, которые могут стать коммерческими, но пока еще находятся на стадии исследований. Согласно ряду исследователей (Gjorgievski et al., 2014; Gonzalez-Gonzalez et al., 2011; Subrota, 2014; Skrzypczak et al., 2017) существует потенциальный интерес к высвобождению БАП из белковой молекулы посредством гидролиза протеазами продуцируемыми различными молочнокислыми микроорганизмами (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactocaseibacillus casei*, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* и др.) при сквашивании молочного сырья. Отмечается способность отдельных видов и штаммов к высвобождению БАП с антигипертензивным, антиоксидантным, антидиабетическим и др. биологически активным действием из структуры белка (Mazorra-Manzano et al., 2020; Shi et al., 2016; Worsztynowicz et al., 2020; Hidalgo et al., 2015).

¹ Invisible numbers: the true extent of noncommunicable diseases and what to do about them. Report of WHO. <https://www.who.int/publications/item/9789240057661>

В направлении исследований ферментации молочного сырья Gonzalez-Gonzalez и др. (2013); Skrzypczak и др. (2017); Ahn и др. (2007) изучили влияние отдельных молочнокислых микроорганизмов на высвобождение БАП *B. bifidum* MF 20/5, *Lb. helveticus*, *Lb. brevis*, соответственно. Quirós и др. (2007); Gútiez и др. (2013); Worsztynowicz и др. (2020) оценили потенциал высвобождения БАП из молочного сырья, ферментированного *Enterococcus faecalis*. Микроорганизмы, используемые для выработки кисломолочных продуктов, продуцируют протеазы, которые в процессе сквашивания способствуют трансформации белков и образованию сгустка. Этим обусловлены исследования, которые посвящены изучению свойств внеклеточных микробных протеаз (Hidalgo et al., 2015) или протеаз клеточной оболочки микроорганизмов, например, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* в работах Hebert и др., (2008) и Agyei и др., (2015). Так как каждый микроорганизм имеет свою протеолитическую систему, целесообразным представляется оценивать потенциал в высвобождении БАП различными микроорганизмами в компаративном исследовании, что было сделано Donkor и др. (2007) для 8 MKM, Pihlanto и др. (2010) для 9, Gonzalez-Gonzalez и др. (2011) для 8, а Daliri и др. (2018) для 34. Так как данный экспериментальный дизайн является эффективным в скрининге продуктивных микроорганизмов в аспекте высвобождения БАП с определенным биоактивным действием, он был также использован Miclo и др. (2012); Rodríguez-Figueroa и др. (2012); Gjorgievski и др. (2014); Rubak и др. (2020) и другими учеными.

Ферменты, сыграв ключевую роль в создании продуктов нового поколения (молоко A2, гипоаллергенные смеси, низколактозные и безлактозные продукты), еще несколько десятилетий назад стали предметом активных исследований. По этой причине, на сегодняшний день существует множество компаний, предлагающих к продаже коммерческие ферментные препараты, которые обладают специфическим действием и направлены на выполнение определенной пищевой задачи (разрушение аллергенных участков, высвобождение биоактивных пептидов, повышение эмульгирующих свойств, повышение растворимости и т.д.). Эти ферментные препараты могут характеризоваться включением одного или нескольких ферментов с одинаковым оптимумом действия. Написано множество работ по высвобождению БАП из молочного сырья посредством коммерческих ферментов, и анализ их содержания позволяет произвести их разделение на 4 основных направления.

Учеными Nongonierma и др. (2013); Fernández-Fernández и др. (2017); Agarkova и др. (2020) исследовано влияние факторов (температуры, экспозиции, фермент-субстратного соотношения, pH, субстрата, иммобилизации, концентрации Ca) на процесс высвобождения БАП из молочных белков для различных ферментов, что обоснованно является ключевым аспектом данного процесса, так как влияет на его эффективность. В свою очередь, Farrokhi и др. (2020); Bamdad и др. (2017); Fernández-Fernández и др. (2018); Monari и др. (2019) исследовали пути по повышению выхода БАП посредством совместного использования гидролиза с другими технологиями, а именно с микропартикуляцией, обработкой высоким давлением и мембранной обработкой. В вопросе повышения эффективности процесса высвобождения БАП существенную роль играет поиск новых специфических протеаз, некоторые из которых исследованы Mazorra-Manzano и др. (2020); Cimino и др. (2015); Villadóniga и др. (2018). Изучение потенциала различных ферментов в высвобождении БАП из молочного сырья обуславливают также необходимость проведения компаративных исследований, которые ранее уже были проведены к настоящему времени Lacroix & Li-Chan, (2012); Adjonu и др. (2013); Le Maux и др. (2016); Noren, (2015).

В упомянутых работах рассматриваются конкретные вопросы в производстве БАП с заданными свойствами посредством использования коммерческих и микробных протеаз. Все они предлагают перспективный путь к коммерциализации этого процесса, который позволит производить натуральные эффективные стимуляторы защитных механизмов организма человека. При этом, данное направление производства еще не масштабировано, а обогащение продуктов питания БАП широко не используется в производственной практике. На наш взгляд, глубокая систематизация научных результатов по ФГ с высвобождаемыми БАП, создание новых алгоритмов и стратегий исследований в данной области на основании продуктов такой систематизации (базы данных, инструменты для прогнозирования) позволят ускорить процесс коммерческой реализации научных данных. В связи с этим целью исследования было обобщение опыта международных исследований за последние 14 лет в области ФГ, как способа высвобождения БАП из молочных белковых субстратов, и классификация внутренних направлений для формирования обобщенной картины существующих пробелов в данной исследовательской нише. При этом, осуществление

категоризации данных по данному вопросу позволит разделить векторы дальнейших исследований и определить аспекты научных исследований по вопросу ферментативной обработки молочного сырья, используемого для высвобождения БАП с антигипертензивными, антиоксидантными и антидиабетическими свойствами, препятствующих коммерческой реализации данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Заявление о прозрачности исследования

Данный обзор предметного поля был выполнен в соответствии с руководством PRISMA-ScR (Tricco et al., 2018). Перед началом исследования авторами был составлен протокол, который был зарегистрирован на OpenScienceFramework (OSF) (<https://osf.io/zj6v7/>). Авторы подтверждают, что исследование соответствовало протоколу и стратегии поиска. Отличия в прописанном протоколе и совершенными авторами действиями отражены в отклонениях от протокола.

Таблица 1

Критерии включения и исключения источников в обзор предметного поля

Критерий	Включение	Исключение	Обоснование
География	Были включены все страны, исследователи из которых опубликовали статьи на английском языке.	Были исключены статьи тех стран, которые опубликованы не на английском языке.	Данное решение было принято с целью исключения упущенной опубликованной литературы с данными по тематике обзора.
Контекст	Были включены статьи, описывающие один из способов производства биоактивных пептидов с АПФ-ингибирующим, DPP-4-ингибирующим и антиоксидантным действием, а именно ФГ.	Были исключены статьи, не описывающие производство БАП ферментативным способом, а также статьи, в которых предметом исследования являлись иные способы производства БАП с указанными свойствами.	Ферментативный способ является основным и одним из самых эффективных в производстве БАП с заданными свойствами. В связи с этим только данный способ был рассмотрен в данном исследовании.
Концепция	В обзор были включены только работы, описывающие высвобождение биоактивных пептидов ферментативным способом только из молочного сырья, полученного только от коров.	При поиске исключались другие млекопитающие, которое могут быть продуцентами молока. (buallo, goat, camel, deer, donkey и другие животные, которые были обнаружены при поиске, как фактор, препятствующий направленному извлечению информации. Также были исключены другие белковые субстраты, которые могут стать сырьем для высвобождения биоактивных пептидов (peanut, seeds, alga, salmon, tuna, salamander, wheat и другие, препятствующие поиску) Биоактивные функции все кроме ACE-inhibitory; DPP4-inhibitory; antioxidative не рассматривались и статьи, в которых содержались данные по другим функциям БАП исключались.	Объектом исследования является именно коровье молоко. Целью исследования были изучить ФГ как способ производства БАП конкретно с АПФ-ингибирующим, DPP4-ингибирующим и антиоксидантным действием. Выделенные биоактивные свойства отвечают статистическим данным по высоким показателям заболеваемости и смертности соответствующими недугами, при этом молочное сырье обладает высоким потенциалом к высвобождению БАП с указанными свойствами.
Язык	Английский.	Все языки, кроме английского.	Международный язык, доступный исследователям и обычным читателям со всего мира.

Критерии отбора источников

Обзор включал эмпирические и обзорные научные статьи, а также главы из книг и диссертаций. По географическому признаку источники не были ограничены, но все публикации, включенные в исследование, были опубликованы на английском языке в полнотекстовом варианте. Отобранные источники обязательно отвечали исследовательским вопросам обзора и описывали ФГ молочного белкового сырья с целью высвобождения БАП с заданными свойствами. Исследования, включенные в обзор, также были ограничены выбором конкретных функциональных свойств, которыми могут обладать биоактивные пептиды из молочного белкового сырья (антидиабетическая, антиоксидантная и антигипертензивная), а также источником субстрата — молочное сырье, полученное от коров. Подробно критерии включения и исключения представлены в Таблице 1.

Критерий	Включение	Исключение	Обоснование
Типы источников	Обзорные и эмпирические статьи, книги и диссертации.	Короткие сообщения, тезисы.	Обзорные позволят изучить уже систематизированные данные и выявить пробелы в научном знании по тематике, эмпирические статьи позволят найти данные для закрытия этих пробелов. Короткие сообщения и тезисы не представляют достаточного количества информации для анализа.
Статус публикации	Опубликованные полнотекстовые публикации	Все источники, которые не были опубликованы в полнотекстовом варианте.	Данные статьи прошли рецензирование.

Стратегия поиска

Нами был проведен поиск в базе данных Google Academy, чтобы найти документы, опубликованные в период с 2007 по 2021 год. 2007 год является годом начала активного роста публикаций по теме «Биоактивные пептиды из молочного сырья», что подтверждается данными ряда обзорных работ, описывающих те или иные аспекты данной тематики. В список источников для обзора после поиска по составленным критериям были включены статьи, отвечающие ключевым запросам и исследовательским вопросам, найденные в результате сканирования списков ссылок и работ исследователей в области пептидомиики в молочной промышленности. При поиске были использованы следующие запросы:

- (1) enzymatic fermentation “milk OR whey protein hydrolysis AND bioactive peptides”
- (2) bioactive peptides “milk OR whey protein enzymatic hydrolysis”
- (3) “fermented milk OR whey” hydrolysis “bioactive peptides”
- (4) “bioactive peptides production” AND “milk OR whey”
- (5) “bioactive peptides production” optimization “milk OR whey”

Таблица 2

Таблица для извлечения данных

Авторы	Год	Название на русском языке	Основные вопросы	Основные результаты	Ключевые слова
E. Agarkova, A. Kruchinin, N. Zolotaryov, N. Pryanichnikova, Z. Belyakova, T. Fedorova	2020	Переработка компонентов творожной сыворотки для производства функциональных продуктов питания	Оптимизация переработки творожной сыворотки и использованию ее в качестве высокопитательного функционального ингредиента в производстве продуктов питания.	Оптимальные параметры для гидролиза творожной сыворотки с помощью протеазы <i>Aspergillus oryzae</i> : температура — 46,4 °C; продолжительность — 180 мин., количество ферментного препарата — 9,5 % от содержания белка. Антиоксидантная активность полученных гидролизата составила 7,51 ТЕ ммоль/л, а степень гидролиза — 17,96 %.	Cottage cheese whey, protein, enzymatic hydrolysis, functional ingredient, <i>Aspergillus oryzae</i> , concentration factor

дователей в каждом из направлений, отличалось. При этом по результатам сбора данных в таблицы такого вида после анализа полнотекстовых публикаций было обнаружено, что существуют пересекающиеся поля в двух направлениях, а именно исследования, описывающие совместное использование КФП и МП и обзорные статьи, включающие данные как по гидролизу КФП, так и МП. Так как в таблице для извлечения данных были предусмотрены графы “основные вопросы” и “основные результаты”, сложностей в выявлении и вычленении пересекающихся полей выявлено не было. Поэтому авторами было решено оптимальным оставить структуру для извлечения данных в таком виде.

Отклонения от протокола

Несмотря на то, что в ограничения поиска входило исключение субстратов, отличных от сырья, полученного от коровы, представленного словами “beef”, “deer”, “goat”, “camel” и др., при поиске источников для обзора в них была включена статья, в которой встречается “beef” в анализируемых текстовых фрагментах. Авторы приняли решение включить статью в обзор, так как она отвечала основным исследовательским вопросам, так как “beef” в данном случае являлось характеристикой не субстрата, а объектом, который обогащали антиоксидантными БАП, полученными из казеина.

РЕЗУЛЬТАТЫ

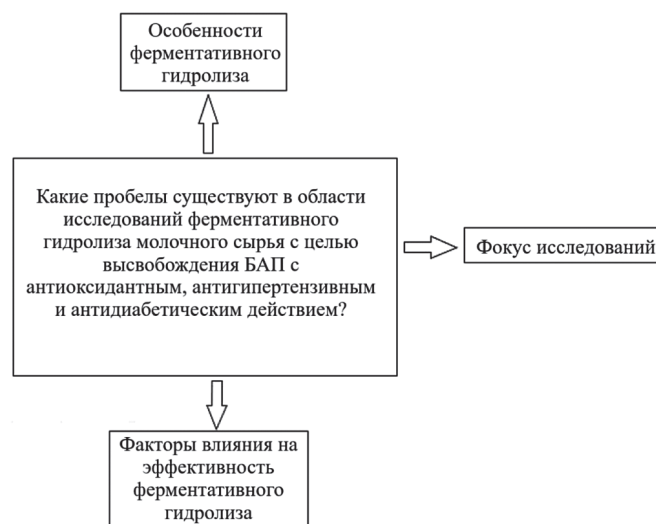
Результаты поиска и процесс отбора

Предлагаемый обзор предметного поля направлен на обобщение существующих в литературе данных об актуальных вопросах о ферментативном способе производства биоактивных пептидов с АПФ-ингибирующими, ДПП4-ингибирующими и антиоксидантными свойствами, которые можно высвободить из структуры молочных белков, определяющих настоящий и будущий потенциал использования молочной сыворотки в качестве субстрата для их получения. Результаты данного обзора представлены в соответствии с ментальной картой, представленной на Рисунке 1.

В результате поиска было первично отобрано 229 источников, из которых по критерию отбора “дубликаты” было исключено 9 источников. 74 статьи были исключены, так как в них исследование вопросов ферментативного способа производства БАП с задан-

Рисунок 1

Ментальная карта исследования



ными свойствами из молочного сырья являлось не основным предметом изучения и только фрагментарно были представлены данные о ФГ. Также 3 статьи были исключены по причине несоответствия требуемому языку статей по критериям отбора. 15 публикаций было исключено, так как не было найдено полнотекстовых статей. Анализ текста 137 публикаций по критерию приемлемости позволил исключить 62 источника как несоответствующие исследовательским вопросам. Позже при составлении таблиц было исключено еще 7 источников по этому же критерию и добавлено 3, на которые были представлены ссылки в исключенных материалах, так как они включали в себя информацию, соответствующую исследовательским вопросам. В результате обзор включил в себя обобщение данных 72 источников, которые могут быть найдены в полнотекстовом варианте и удовлетворяют всем критериям отбора и задачам исследования. Диаграмма отбора источников для обзора предметного поля по PRISMA-ScR представлена на Рисунке 2.

Информация об отобранных работах была выгружена из программного обеспечения “Mendeley”, где производился отбор, в виде файла формата .ris. Полученный файл был загружен в программу “VOSViewer”. С помощью этой программы из 72 работы всего было извлечено 187 ключевых слов, из которых для графического представления было отобрано 25 ключевых слов, встречающихся ≥ 2 раз (Рисунки 3,4).

Рисунок 2

Диаграмма процесса отбора источников для обзора предметного поля по PRISMA-ScR

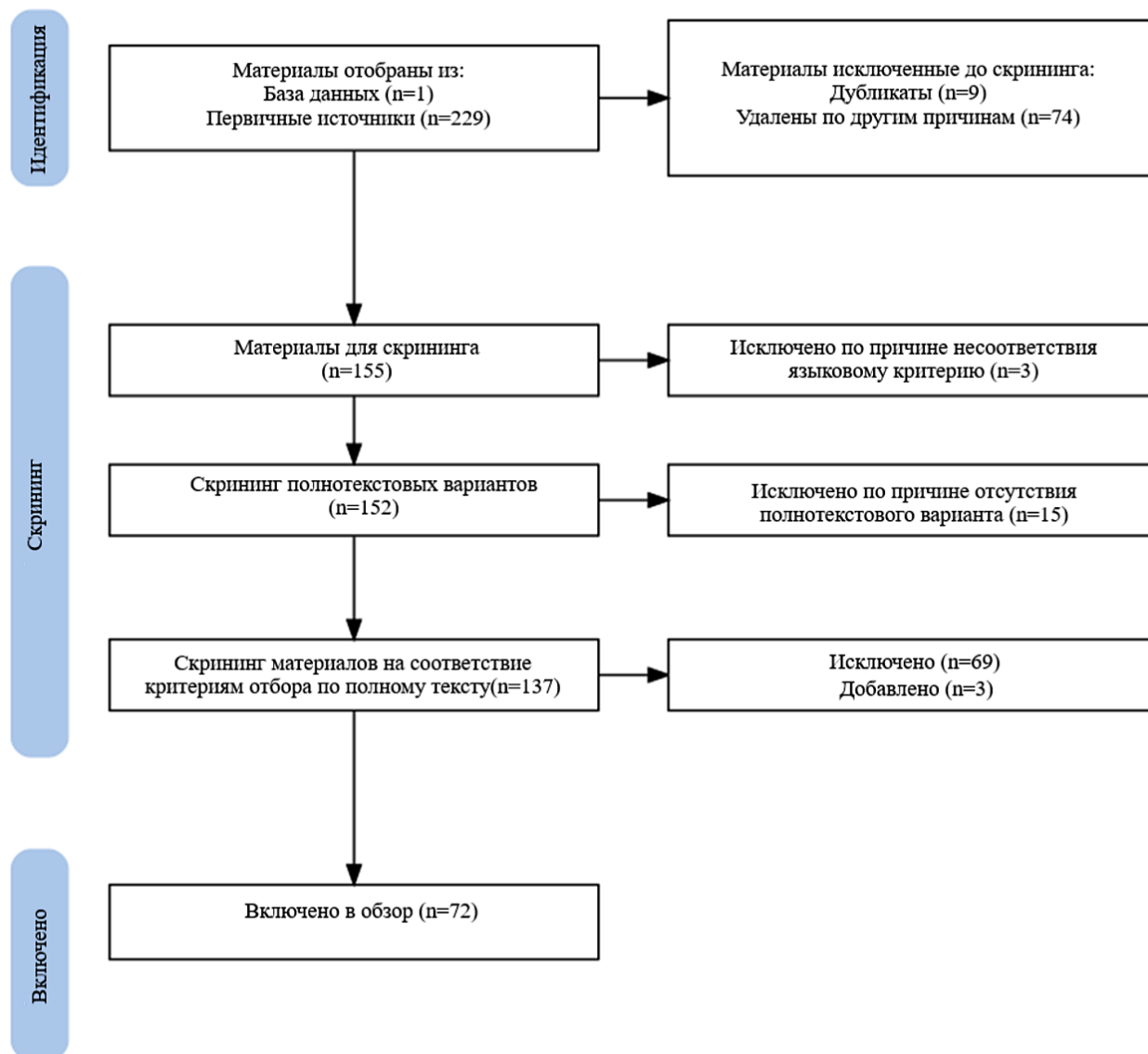


Рисунок 3 представляет карту визуализации частоты встречаемости ключевых слов, который дополняет рисунок 4, представляющий полное картирование ключевых слов с включением их взаимосвязей. По карте ключевых слов видно, что все статьи связаны основным ключевым понятием “bioactive peptides”, а сформированные группы образуют область основных направлений (субстраты: “whey protein”, “casein”; функции пептидов: “antihypertensive” или “ace-inhibitory”, “antioxidant”, “dpp-4-inhibition”; микроорганизмы для ферментации: “lactobacillus helveticus”, “probiotics”, “enterococcus faecalis”; предварительная обработка: “ultrafiltration”),

которые также можно найти на карте (“enzymatic hydrolysis”, “fermentation”).

Преобладающее количество исследователей по результатам данного обзора оказались учеными из Австралии и заняли 10,5% от общего распределения. По 7% пришлось на Ирландию и Бразилию, 5,8% на Великобританию, 4,7% на Мексику, Испанию, Индию, Канаду и Корею, 3,5% на Китай, Аргентину, Италию, Уругвай и Францию, 2,3% и менее на другие страны, представленные в Таблице 3. Стоит отметить, что афiliation авторов из одной статьи в некоторых случаях отличалась, поэтому ссылки, представленные в таблице, могут повторяться.

Рисунок 3

Частота встречаемости ключевых слов

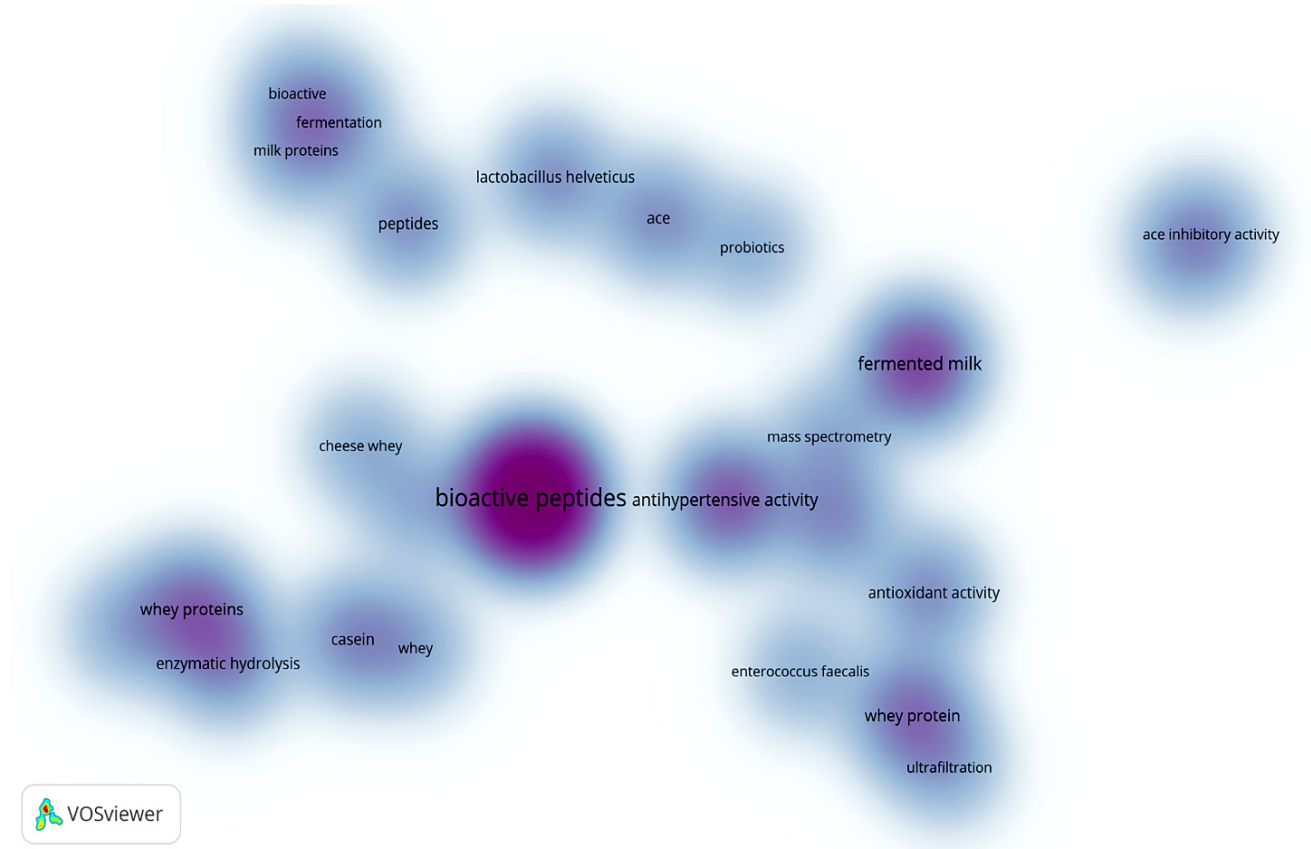


Рисунок 4

Карта взаимосвязи ключевых слов

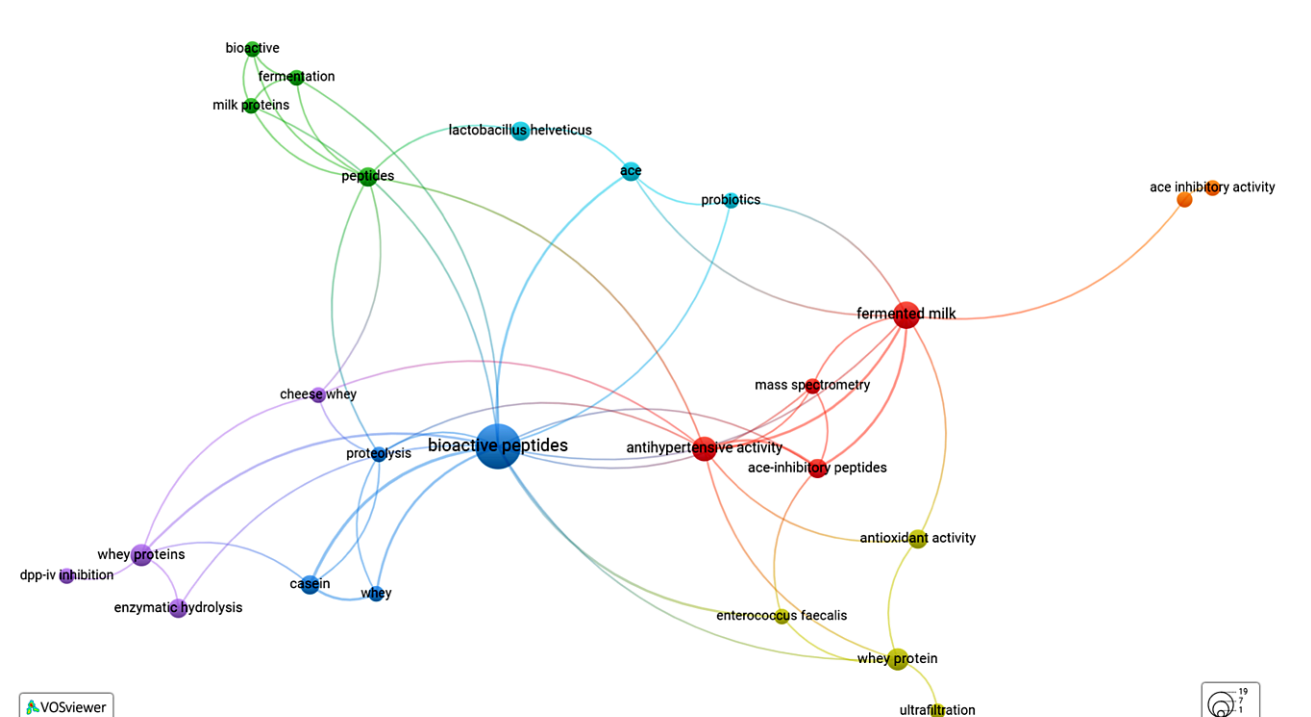


Таблица 3

Распределение статей по географическому признаку

Страна	Количество статей	Ссылки
Австралия	9	(Donkor et al., 2007) (Augustin and Udabage, 2007) (Adjonu et al., 2013) (Agyei et al., 2013) (Agyei & He, 2015) (Shi et al., 2017) (Ahtesh, Stojanovska & Apostolopoulos, 2017) (Sultan et al., 2017) (Nongonierma et al., 2013)
Ирландия	6	(Hayes et al., 2007) (Nongonierma et al., 2013) (O'Keeffe & Fitzgerald, 2015) (Le Maux et al., 2015) (Le Maux et al., 2016) (Le Maux, Nongonierma & FitzGerald, 2017)
Бразилия	6	(Rocha, 2008) (Rossini et al., 2009) (De Castro and Sato, 2014) (Morais et al., 2015) (Lorenzetti et al., 2020) (Hidalgo et al., 2015)
Великобритания	5	(Ortiz-Chao et al., 2009) (Gonzalez-Gonzalez, Tuohy & Jauregi, 2011) (Gonzalez-Gonzalez, Gibson & Jauregi, 2013) (Raikos & Dassios, 2014) (Pa'Ee et al., 2015)
Мексика	4	(Rodríguez-Figueroa et al., 2012) (Venegas-Ortega et al., 2019) (Mazorra-Manzano, Robles-Porchas, et al., 2020) (Mazorra-Manzano, Mora-Cortes, et al., 2020)
Испания	4	(Quirós et al., 2009) (Quirós et al., 2007) (Gútiéz et al., 2013) (Tavares et al., 2011)
Индия	4	(Naik et al., 2013) (Mann et al., 2019) (Subrota et al., 2015)
Канада	4	(Lacroix & Li-Chan, 2012) (Noren, 2015) (Bamdad et al., 2017) (Daliri et al., 2018)
Китай	3	(Li-jun, Chuan-he & Zheng, 2008) (Tu et al., 2018) (Kamau et al., 2010)
Корея	4	(Ahn et al., 2007) (Bamdad et al., 2017) (Daliri et al., 2018) (Oh et al., 2016)
Аргентина	3	(Hebert, Saavedra & Ferranti, 2010) (Hidalgo et al., 2015) (Cimino et al., 2015)
Италия	3	(Hebert, Saavedra & Ferranti, 2010) (Gonzalez-Gonzalez, Tuohy & Jauregi, 2011) (Monari et al., 2019)
Уругвай	3	(Fernández-Fernández, López-Pedemonte & Medrano-Fernandez, 2017) (Villadóniga, Macció & Cantera, 2018) (Fernández-Fernández et al., 2018)
Франция	3	(Miclo et al., 2012) (Hafeez et al., 2013) (Raveschot et al., 2018)
Германия	2	(Cheison et al., 2012) (Sultan et al., 2017)
Индонезия	2	(Rubak et al., 2019) (Rubak et al., 2020)
Иран	2	(Gjorgievski et al., 2014) (Farrokhi et al., 2020)
Кения	2	(Cheison et al., 2012) (Kamau et al., 2010)
Польша	2	(Skrzypczak et al., 2017) (Worsztynowicz et al., 2020)
США	2	(Guo, 2019) (Robinson et al., 2021)
Финляндия	2	(Korhonen, 2009) (Pihlato et al., 2010)
Япония	2	(Rasika et al., 2015) (Wakai et al., 2012)
Болгария	1	(Panayotova, Pashova-Baltova, Dimitrov, 2018)
Дания	1	(Robinson et al., 2021)
Египет	1	(Abd El-Salam, El-Shibiny, 2017)
Колумбия	1	(Morales García et al., 2021)
Нидерланды	1	(Schalk, 2009)
Пакистан	1	(Sultan et al., 2017)
Португалия	1	(Tavares et al., 2011)
Россия	1	(Agarkova, Kruchinin. et al., 2020)
Шри-Ланка	1	(Rasika et al., 2015)

Наибольшее количество статей по тематике (13%), было опубликовано в 2015 году. 2013, 2018, 2020 года также характеризовались достаточно высоким количеством публикаций — по 9,7% от общего распределения. Полное распределение по годам представлено на Рисунке 5.

Анализ полнотекстовых источников позволил подтвердить наличие двух основных направлений в исследованиях по ФГ молочного белкового сырья с целью высвобождения БАП с заданными свойствами, а также разделить данные направления на подтемы (Рисунок 6), которые отвечали исследовательским вопросам, про-

Рисунок 5

Распределение публикаций по годам

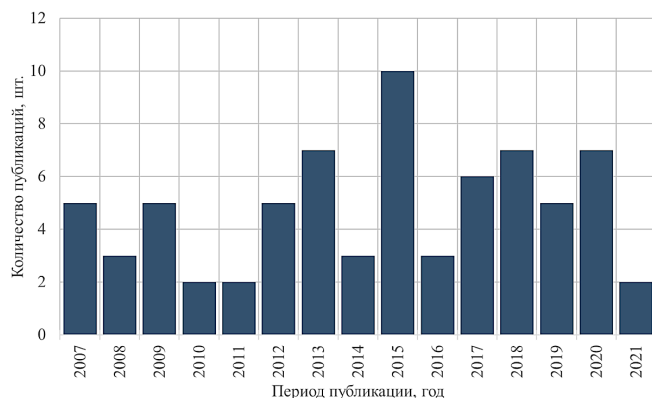
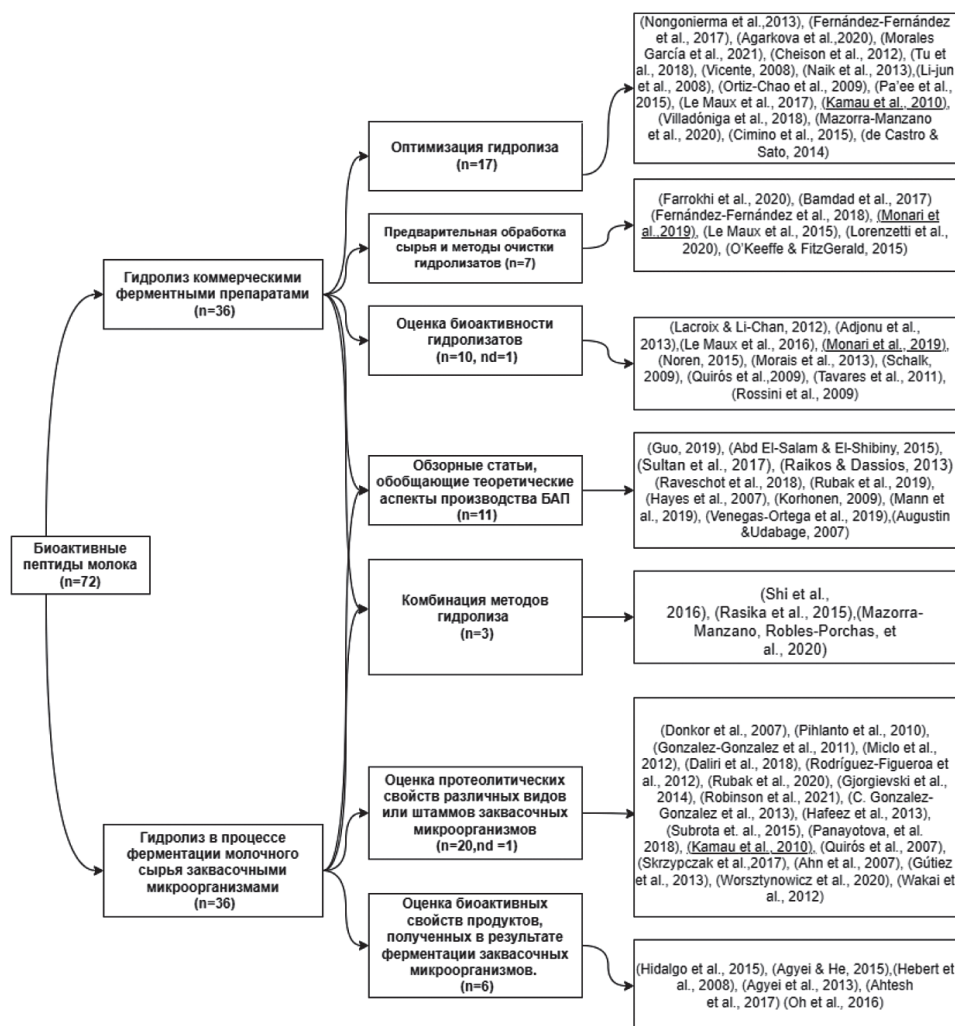


Рисунок 6

Категоризация статей, включенных в окончательный обзор



Примечание. n — количество источников, nd — количество источников, уже ранее включенных в другой блок, — — подчеркнутый стиль для визуализации статей, которые включены в несколько блоков.

личных заквасочных микроорганизмов, а 8,3% — оценку биоактивных свойств продуктов, полученных в результате ферментации МП. Также для обоих направлений было сформировано два общих блока: обзорные статьи, обобщающие теоретические аспекты производства БАП путем ФГ (15,3%), и комбинация методов гидролиза КФП и МП (4,2%).

Ферментативный гидролиз КФП

Основными вопросами в исследовании гидролиза молочного белкового сырья посредством КФП являлись оптимизация процесса высвобождения БАП с заданными свойствами, повышение его эффективности, а также влияние различных КФП на биоактивное действие гидролизатов. Авторами было представлено совокупное влияние pH, фермент-субстратного соотношения, температуры гидролиза и его экспозиции (Cheison et al., 2012; Agarkova et al., 2020; Schalk, 2009 и др.), концентрации кальция (Pa'Ee et al., 2015) и других факторов (субстрата, фермент-субстратной специфичности), влияющих на эффективность ферментативной обработки и биоактивность гидролизатов (Noren, 2015; Adjonu et al., 2013). В вопросе повышения эффективности гидролиза Vicente (2008) в своем исследовании показал, что иммобилизация трипсина повышает его термостабильность и позволяет использовать в более широких температурных диапазонах гидролиза; Farrokhi и др. (2020) отметили повышение антиоксидантной активности гидролизата при предварительном нанофибрировании сывороточного белка, а Bamdad и др. (2017) представили способ увеличения выхода биоактивных пептидов посредством обработки высоким давлением. Каждое из представленных исследований можно обоснованно назвать прорывным, так как они предлагают доказанные технологические алгоритмы, способные качественно и/или количественно улучшить готовый продукт.

Ферментативный гидролиз МП

Daliri и др. (2018) произвели сравнительную оценку протеолитической активности 34-х штаммов молочнокислых бактерий и их потенциала к высвобождению БАП из молочного сырья. Так как данный экспериментальный дизайн представляется эффективным, ранее Donkor и др. (2007) сравнили в своей работе 8 видов МКМ, Pihlanto и др. (2010) — 25 МКМ, а Miclo

и др. (2012) исследовали 10 штаммов вида *Streptococcus thermophilus*. На основании таких работ формируются обзоры, систематизирующие данные по ФГ МКМ (Raveschot et al., 2018), (Rubak et al., 2019) и играющие значимую роль в формировании вектора дальнейших исследований. Влиянию различных таксонов на производство БАП учеными также было уделено достаточно внимания. Так, Gonzalez-Gonzalez et al., (2013) описали субстрат-ферментную специфичность протеаз штамма *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5 к высвобождению антигипертензивных пептидов из структуры белков, что Quirós и др. (2007) ранее сделали для *Enterococcus faecalis*. В свою очередь, Shi и др. (2016) исследовали совокупное влияние заквасочного микроорганизма *Lb. helveticus* и коммерческого фермента Flavorzyme® на высвобождение БАП с АПФ-ингибирующим действием, Rasika и др. (2015) описали синергетический эффект *Saccharomyces cerevisiae* K7 и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007 в данном процессе, а как на него влияет нативная микрофлора подсырной сыворотки оценили Mazorra-Manzano & Robles-Porchas и др. (2020).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то, что высвобождение БАП с антиоксидантным, антигипертензивным и антидиабетическим действием из молочного сырья, является актуальным вопросом, научные труды в данном поле до сих пор не находят эффективного практического применения. В связи с этим данное исследование было направлено на выявление аспектов, препятствующих коммерческой реализации результатов проведенных исследований. За период с 2007–2022 гг. было задокументировано большое количество статей, посвященных вопросам производства биоактивных пептидов с заданными свойствами ферментативным способом. При подготовке данного обзора предметного поля было проанализировано 229 научных источников (статей, глав книг, диссертаций) и отобрано 72 статьи для полнотекстового изучения, которые отвечали запросам исследования, из которых 36 статей были посвящены гидролизу молочных белков коммерческими ферментными препаратами, а 36 — протеазами заквасочной микрофлоры. Несмотря на большое количество статей, затрагивающих процесс производства БАП, существенным ограничением к систематизации исследований являлось отсутствие единого методологического подхода. Поэтому при систематизации исследований отобранные статьи были

подразделены на 2 основные категории производства БАП: гидролиз белков МП и КФП. В поле исследования гидролиза молочного белкового сырья КФП было идентифицировано 3 подтемы, а именно оптимизация гидролиза, предварительная обработка сырья и очистка гидролизатов в технологии высвобождения БАП, а также оценка биоактивности гидролизатов. В свою очередь, научные работы по ФГ МП представляли данные по оценке протеолитической активности заквасочной микрофлоры и оценке биоактивных свойств в продуктах, полученных таким методом. При этом, для основных двух категорий было выделено 2 общих подраздела, обобщающих теоретические и практические результаты исследований, затрагивающие производство БАП методами КФП и МП. На основании результатов отобранных научных работ нами были определены основные векторы исследований в поле ФГ молочного белкового сырья с целью производства БАП с заданными свойствами, которые требуют внимания со стороны ученых, так как, по нашему мнению, они способны повысить эффективность извлекаемых данных.

Обзор включенных источников

Авторами отмечается, что при наличии высокого потенциала использования ценных результатов научных работ, описывающих особенности различных протеолитических систем КФП и МП, их влияние на биоактивность гидролизатов, конкретные режимы оптимизации процесса ФГ, способы повышения эффективности процесса посредством слияния нескольких подходов, в вопросе их коммерческой реализации они являются лишь отдельными фрагментами в большой системе данных, что препятствует их широкому использованию.

Высокий потенциал использования научных трудов в данном поле подтверждается разнообразием их результатов и конкретной направленностью. Так, например, в рамках направления исследования ФГ МП, Hayes и др. (2007) последовательно описали процесс гидролиза протеолитической системой молочнокислых микроорганизмов, протеиназами клеточной оболочки и внутриклеточными пептидазами, Venegas Ortega и др. (2019) рассмотрели МКМ как клеточную фабрику, а Mann и др. (2019) охарактеризовали потенциал сывороточных белков к высвобождению БАП с различным биоактивным действием (антигипертензивным, антиоксидантным, антидиабетическим и др.). В производстве БАП ферментативным гидролизом КФП на основании,

исследованных источником основными задачи являются повышение выхода БАП с заданными свойствами и степенью гидролиза (DH), а также получение новых пептидов. И здесь ученые находят различные подходы, Mazorra-Manzano и др. (2020); Tavares и др. (2011); Le Mauх и др. (2016,2017) и др. исследуют параметры гидролиза с применением конкретных КФП или потенциальных КФП и формируют рекомендации для определенной цели, Cheison и др., (2012) для гидролиза используют стеклянный реактор периодического действия, а Bamdad и др. (2017); O'Keeffe & Fitzgerald, (2015); de Castro, (2014); Lorenzetti и др. (2020) внедряют дополнительные стадии в этот процесс в виде воздействия ультразвуком, высоким давлением и последующей обработкой на мембранных установках. Важные аспекты производства БАП как посредством микробной ферментации, так и гидролиза коммерческими ферментными препаратами, были затронуты также в работе Korhonen, (2009), который обобщил данные, опубликованные к 2009 году, о ряде МКМ и отдельных ферментов, в частности об их влиянии на высвобождение БАП, протеолитической активности, потенциале использования в производстве БАП и их сравнительной оценке. Рядом других ученых (Abd El-Salam & El-Shibiny, 2015; Sultan et al., 2017; Augustin & Udabage, 2007 и др.) также были проведены исследования по обобщению и систематизации данных в области ферментативной обработки молочного белкового сырья с целью высвобождения БАП.

Все перечисленные в обзоре исследования характеризуются глубиной и высокой ценностью с точки зрения практической применимости, но при этом как и в случае с работами по ФГ КФП, они полезны каждый по отдельности, но в вопросе масштабирования процесса высвобождения БАП из молочного сырья имеют мало веса, так как описывают частные случаи.

По нашему мнению, целесообразным в данном вопросе является создание баз данных, в которые будут внесены результаты скринингов микроорганизмов на их способность к продуцированию протеаз с указанием штамма, условий культивирования и других значимых параметров. Наличие таких баз данных даст наглядное представление о имеющихся пробелах в исследованиях по данной теме и сможет стать основой для разработки новых кисломолочных продуктов с биоактивными свойствами и дизайнов экспериментов, направленных на коммерциализацию БАП. При этом, бесспорно полезным будет наработка научно-практической базы исследова-

дований по совместному применению коммерческих ферментных препаратов и микроорганизмов, так как каждый из этих инструментов для проведения гидролиза имеет свои преимущества и недостатки. Также, определение генов протеаз различных микроорганизмов методом ПЦР с опорой на сформированную базу будет расширять знание о возможностях нативных ферментных системах микроорганизмов и представлять основу для новых решений в вопросе высвобождения БАП.

Сильные стороны и ограничения обзора

Данный обзор предметного поля является первым в заявленной тематике. Однако ранее исследователями было представлено достаточное количество ценных обзоров, касающихся БАП из молочного белкового сырья с заданными свойствами, полученных посредством ФГ. В настоящем обзоре отмечено, что молочное сырье, полученное от коров, обладает высоким потенциалом к высвобождению биоактивных пептидов, что подтверждается результатами обзорных работ Sz wajkowska и др. (2011); Park & Nam (2015). По нашему мнению, данный факт является значимым основанием для повышения эффективности исследований в данной тематике, что подчеркивается в обзоре Nongonierma & FitzGerald (2017), описывающих недостатки различных инструментов *in silico* в вопросе прогнозирования процесса высвобождения БАП. С этой целью исследования направлены на обсуждение и обобщение данных по методам высвобождения БАП, их механизмам действия. Madureira и др. (2010) в своей обзорной работе в результате описания биоактивного потенциала различной функциональной направленности для конкретных белков молочной сыворотки (α -LA, β -LG, BSA, k-CN, LF) и представления характеристики механизмов действия БАП с антигипертензивной, антитромботической, опиоидной, иммуномодулирующей функциями, обратили внимание на различие в характере сырья, модельных системах и, что более значимо, методологиях, используемых для проведения научных работ, что также было выявлено и в нашей работе. В связи с этим, актуальным является категоризация ключевых вопросов в различных направлениях исследований ФГ с целью высвобождения БАП из молочного белкового сырья с заданными функциями, которая была проведена нами в данной работе с точки зрения основных подходов к ФГ. Так, несмотря на то, что обзоры, описывающие общие аспекты производства БАП (Korhonen, 2009; Sultan et al., 2017;

Guo, 2019), играют важную роль в повышении заинтересованности и осведомленности научного сообщества о состоянии вопроса в определенный момент времени, для создания эффективных дизайнов экспериментов требуется конкретизация векторов дальнейших исследований в каждой подтеме сформированных направлений. Последнее также было реализовано в рамках данного обзора.

В рамках этого обзора не проводилась методологическая оценка качества работ по тематике ФГ молочного белкового сырья с целью высвобождения БАП с заданными свойствами. Его целью являлось выявить аспекты научных исследований в данном поле с точки зрения постановки эксперимента и наличия связей между работами, препятствующие коммерческой реализации извлекаемых учеными данных и внедрению технологии производства БАП посредством ФГ в широкое направление. Данный обзор не учитывал работы по оценке биоактивности гидролизатов методами *ex vivo*, *in vivo*, а также клинические исследования, которые играют значимую роль в доказательстве функционального действия БАП, так как это масштабный блок данных, для которых требуется проведение отдельной работы. По этой же причине не учитывались возможные неблагоприятные эффекты (токсичность, аллергенность и сенсорика) гидролизатов с БАП, которые являются весомыми в продвижении данной технологии.

Тема высвобождения БАП с заданными свойствами из молочного сырья посредством ФГ является очень обширной и требует разделения на блоки и подтемы, которые каждый по отдельности нуждаются в оценке их положения на сегодняшний день для определения дальнейшего вектора развития.

Выводы

Данный обзор предметного поля представляет собой структурный анализ и обсуждение исследований за последние 14 лет, связанных с вопросами ФГ молочного белкового сырья с целью высвобождения антиоксидантных, АПФ- и ДПП-IV-ингибирующих пептидов. В работе представлена четкая категоризация исследований по подтемам, что позволяет более направленно определить векторы дальнейших исследований, нацеленных на повышение эффективности применения извлекаемых данных. Вместе с тем, был выявлен ряд пробелов, связанных с обобщением и систематизацией данных

в области ФГ МП в базы данных и созданием на их основе инструментов для прогнозирования, а также формированием мотивированных алгоритмов совместного гидролиза МП и КФП с использованием различных способов предварительной обработки субстрата и очистки готовых гидролизатов. Также, стоит обратить внимание на пополнение и/или формирование баз данных с информацией о свойствах и субстратной специфичности МП, а также на проведение работ в поле заквашивания продуктов, обогащенных БАП МКБ с дальнейшим анализом свойств. Полученные в данном обзоре данные могут быть использованы в качестве рекомендаций для дизайна экспериментов по ФГ белкового молочного

сырья, а также для создания пакетов программ с целью повышения эффективности использования извлекаемых данных.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Александр Геннадьевич Кручинин: концепция / идея; методология; администрирование проекта, вычитывание рукописи.

Екатерина Ивановна Большакова: исследование / сбор данных; валидация; создание черновика рукописи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S. (2015). Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1119–1132. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.899200>
- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., Agboola, S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food Chemistry*, 136(3–4), 1435–1443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.053>
- Agarkova, E., Kruchinin, A., Zolotaryov, N., Pryanichnikova, N., Belyakova, Z., Fedorova, T. (2020). Processing cottage cheese whey components for functional food production. *Foods and Raw Materials*, 8(1), 52–59. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-52-59>
- Agyei, D., He, L. (2015). Evaluation of cross-linked enzyme aggregates of Lactobacillus cell-envelope proteinases, for protein degradation. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.01.004>
- Agyei, D., Lim, W., Zass, M., Tan, D., Danquah, M. K. (2013). Bioanalytical evaluation of Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis 313 cell-envelope proteinase extraction. *Chemical Engineering Science*, 95, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.03.049>
- Ahn, J.E., Park, S.Y., Lee, B.H. (2007) Optimization of Whey-Based Medium for Growth and ACE-Inhibitory Activity of Lactobacillus brevis. *Korean Journal of Dairy Science and Biotechnology*, 25(1), 1–7.
- Ahtesh, F. B., Stojanovska, L., Apostolopoulos, V. (2017). Processing and sensory characteristics of a fermented low-fat skim milk drink containing bioactive antihypertensive peptides, a functional milk product. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 230–239. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12479>
- Augustin, M. A., Udabage, P. (2007). Influence of processing on functionality of milk and dairy proteins. In *Advances in Food and Nutrition Research* (pp. 1–38). Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1043-4526\(07\)53001-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1043-4526(07)53001-9)
- Bamdad, F., Bark, S., Kwon, C. H., Suh, J.-W., Sunwoo, H. (2017). Anti-inflammatory and antioxidant properties of peptides released from β -Lactoglobulin by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis. *Molecules*, 22(6), 949. <https://doi.org/10.3390/molecules22060949>
- Cheison, S. C., Bor, E. K., Faraj, A. K., Kulozik, U. (2012). Selective hydrolysis of α -lactalbumin by Acid Protease A offers potential for β -lactoglobulin purification in whey proteins. *LWT*, 49(1), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.022>
- Cimino, C.V., Colombo, M. L., Liggieri, C., Bruno, M., Vairo-Cavalli, S. (2015). Partial Molecular Characterization of Arctium minus Aspartyl Endopeptidase and Preparation of Bioactive Peptides by Whey Protein Hydrolysis. *Journal of Medicinal Food*, 18(8), 856–864. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0101>
- Daliri, E. B.-M., Lee, B. H., Park, B.-J., Kim, S.-H., Oh, D.-H. (2018). Antihypertensive peptides from whey proteins fermented by lactic acid bacteria. *Food Science and Biotechnology*, 27(6), 1781–1789. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0423-0>
- de Castro, R.J.S., & Sato, H.H. (2014). Advantages of an acid protease from Aspergillus oryzae over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.012>
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N. P. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics

- as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait*, 87(1), 21–38. <https://doi.org/10.1051/laite:2006023>
- Farrokhi, F., Badii, F., Ehsani, M. R., & Hashemi, M. (2020). Effect of pH-dependent fibrillar structure on enzymatic hydrolysis and bioactivity of nanofibrillated whey protein. *LWT*, 131, 109709. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109709>
- Fernández-Fernández, A. M., Dumay, E., López-Pedemonte, T., Medrano-Fernandez, A. (2018). Bioaccessibility and cell metabolic activity studies of antioxidant low molecular weight peptides obtained by ultrafiltration of lactalbumin enzymatic hydrolysates. *Food and Nutrition Sciences*, 09(09), 1047–1065. <https://doi.org/10.4236/fns.2018.99077>
- Fernández-Fernández, A. M., López-Pedemonte, T., Medrano-Fernandez, A. (2017). Evaluation of Antioxidant, Antiglycant and ACE-Inhibitory Activity in Enzymatic Hydrolysates of α -Lactalbumin. *Food and Nutrition Sciences*, 08(01), 84–98. <https://doi.org/10.4236/fns.2017.81006>
- Gjorgievski, N., Tomovska, J., Dimitrovska, G., Makarjovski, B., Shariati, M.A. (2014). Determination of the antioxidant activity in yogurt. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 8, 67–73.
- Gonzalez-Gonzalez, C., Gibson, T., Jauregi, P. (2013). Novel probiotic-fermented milk with angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced by *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.002>
- Gonzalez-Gonzalez, C. R., Tuohy, K. M., Jauregi, P. (2011). Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 21(9), 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.04.001>
- Guo, M. (Ed.) (2019). *Whey protein production, chemistry, functionality, and applications*. John Wiley & Sons Ltd.
- Gutiérrez, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L. M., Herranz, C., Hernández, P. E. (2013). Enterococcus faecalis strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.019>
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Girardet, J.-M., Jardin, J., Perrin, C., Dary, A., Miclo, L. (2013). Hydrolysis of milk-derived bioactive peptides by cell-associated extracellular peptidases of *Streptococcus thermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22), 9787–9799. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5245-7>
- Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2007). Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview. *Biotechnology Journal*, 2(4), 426–434. <https://doi.org/10.1002/biot.200600246>
- Hebert, E. M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R. R., Savoy, G., Ferranti, P., Addeo, F. (2008). Characterization of the Pattern of α s1 — And β -Casein Breakdown and Release of a Bioactive Peptide by a Cell Envelope Proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3682–3689. <https://doi.org/10.1128/aem.00247-08>
- Hidalgo, M. E., Folmer Côrrea, A. P., Mancilla Canales, M., Joner Daroit, D., Brandelli, A., Risso, P. (2015). Biological and physicochemical properties of bovine sodium caseinate hydrolysates obtained by a bacterial protease preparation. *Food Hydrocolloids*, 43, 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.009>
- Kamau, S. M., Lu, R.-R., Chen, W., Liu, X.-M., Tian, F.-W., Shen, Y., Gao, T. (2010). Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Reviews International*, 26(4), 386–401. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.496025>
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007>
- Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. (2012). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 25(2), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.003>
- Le Maux, S., Nongonierma, A. B., Barre, C., FitzGerald, R. J. (2016). Enzymatic generation of whey protein hydrolysates under pH-controlled and non pH-controlled conditions: Impact on physicochemical and bioactive properties. *Food Chemistry*, 199, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.021>
- Le Maux, S., Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J. (2017). 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*, 99, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.012>
- Le Maux, S., Nongonierma, A. B., Murray, B., Kelly, P. M., FitzGerald, R. J. (2015). Identification of short peptide sequences in the nanofiltration permeate of a bioactive whey protein hydrolysate. *Food Research International*, 77, 534–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.012>
- Li-jun, L., Chuan-he, Z., & Zheng, Z. (2008). Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food and Bioproducts Processing*, 86(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2007.10.007>
- López-Fandiño R., Otte J., Camp J. van (2006). Physiological, chemical and techno-logical aspects of milk-protein-derived

- peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 11 (16), 1277–1293.
- Lorenzetti, A., Penha, F. M., Cunha Petrus, J. C., Rezzadori, K. (2020). Low purity enzymes and ultrasound pretreatment applied to partially hydrolyze whey protein. *Food Bioscience*, 38, 100784. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100784>
- Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2010). Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 437–455. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2566>
- Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R., Sarkar, P. (2019). Bioactive peptides from whey proteins. In *Whey Proteins* (pp. 519–547). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-812124-5.00015-1>
- Mazorra-Manzano, M. A., Mora-Cortes, W. G., Leandro-Roldan, M. M., González-Velázquez, D. A., Torres-Llanez, M. J., Ramírez-Suarez, J. C., González-Córdova, A. F., Vallejo-Córdova, B. (2020). Production of whey protein hydrolysates with angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity using three new sources of plant proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101724. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101724>
- Mazorra-Manzano, M. A., Robles-Porchas, G. R., González-Velázquez, D. A., Torres-Llanez, M. J., Martínez-Porchas, M., García-Sifuentes, C. O., González-Córdova, A. F., Vallejo-Córdova, B. (2020). Cheese whey fermentation by its native microbiota: Proteolysis and bioactive peptides release with ace-inhibitory activity. *Fermentation*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010019>
- Miclo, L., Roux, É., Genay, M., Brusseau, É., Poirson, C., Jameh, N., Perrin, C., & Dary, A. (2012). Variability of Hydrolysis of β -, α s1-, and α s2-Caseins by 10 Strains of *Streptococcus thermophilus* and Resulting Bioactive Peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(2), 554–565. <https://doi.org/10.1021/jf202176d>
- Monari, S., Ferri, M., Russo, C., Prandi, B., Tedeschi, T., Bellucci, P., Zambrini, A. V., Donati, E., Tassoni, A. (2019). Enzymatic production of bioactive peptides from scotta, an exhausted by-product of ricotta cheese processing. *PLOS ONE*, 14(12), e0226834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226834>
- Morais, H. A., Silvestre, M. P. C., Silva, M. R., Silva, V. D. M., Batista, M. A., Simões e Silva, A. C., Silveira, J. N. (2013). Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate: Effect of enzyme type and enzyme:substrate Ratio on peptide profile. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 201–210. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1005-z>
- Morales García, J., Herrera-Rocha, F., Cavajalino, A. S., Duran Baron, R., González Barrios, A. F., Udenigwe, C. C. (2021). Effects of processing conditions on hydrolysates of proteins from whole whey and formation of Maillard reaction products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(9). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15469>
- Naik, L., Mann, B., Bajaj, R., Sangwan, R. B., Sharma, R. (2013). Process optimization for the production of bio-functional whey protein hydrolysates: Adopting response surface methodology. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 19(3), 231–237. <https://doi.org/10.1007/s10989-012-9340-x>
- Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J. (2017). Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(15), 3407–3423. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0793-9>
- Nongonierma, A. B., Gaudel, C., Murray, B. A., Flynn, S., Kelly, P. M., Newsholme, P., FitzGerald, R. J. (2013). Insulinotropic properties of whey protein hydrolysates and impact of peptide fractionation on insulinotropic response. *International Dairy Journal*, 32(2), 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.05.014>
- Noren, N.E. (2015). Creation of a sticky coating of dairy proteins containing bioactive peptides to reduce dental caries [Unpublished doctoral dissertation]. The University of Manitoba.
- Oh, N. S., Lee, J. Y., Oh, S., Joung, J. Y., Kim, S. G., Shin, Y. K., Lee, K.-W., Kim, S. H., Kim, Y. (2016). Improved functionality of fermented milk is mediated by the synbiotic interaction between *Cudrania tricuspidata* leaf extract and *Lactobacillus gasseri* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(13), 5919–5932. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7414-y>
- O’Keeffe, M. B., FitzGerald, R. J. (2015). Identification of short peptide sequences in complex milk protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 184, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.077>
- Ortiz-Chao, P., Gómez-Ruiz, J. A., Rastall, R. A., Mills, D., Cramer, R., Pihlanto, A., Korhonen, H., Jauregi, P. (2009). Production of novel ACE inhibitory peptides from β -lactoglobulin using Protease N Amano. *International Dairy Journal*, 19(2), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.07.011>
- Pa’ee, K. F., Gibson, T., Marakilova, B., Jauregi, P. (2015). Production of acid whey hydrolysates applying an integrative process: Effect of calcium on process performance. *Process Biochemistry*, 50(2), 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.11.011>
- Panayotova, T., Pashova-Baltova, K., Dimitrov, Z. (2018). Production of ACE-inhibitory peptides in milk fermented with selected lactic acid bacteria. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 7(1), 31–37.

- Park, Y. W., Nam, M. S. (2015). Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean journal for food science of animal resources*, 35(6), 831–840. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831>
- Pihlanto, A., Virtanen, T., Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.07.003>
- Quirós, A., Ramos, M., Muguera, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.011>
- Quirós, A., Contreras, M. del M., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure–activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides*, 30(10), 1848–1853. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.06.031>
- Raikos, V., Dassios, T. (2013). Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: A review. *Dairy Science Technology*, 94(2), 91–101. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0152-3>
- Rasika, D., Ueda, T., Jayakody, L., Suriyagoda, L., Silva, K., Ando, S., Vidanarachchi, J. (2015). ACE-inhibitory activity of milk fermented with *Saccharomyces cerevisiae* K7 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 43(2), 141. <https://doi.org/10.4038/jnsfsv.43i2.7942>
- Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D., Dhulster, P. (2018). Production of bioactive peptides by *Lactobacillus* species: From gene to application. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02354>
- Robinson, R. C., Nielsen, S. D., Dallas, D. C., Barile, D. (2021). Can cheese mites, maggots and molds enhance bioactivity? Peptidomic investigation of functional peptides in four traditional cheeses. *Food & Function*, 12(2), 633–645. <https://doi.org/10.1039/d0fo02439b>
- Rodríguez-Figueroa, J. C., González-Córdova, A. F., Torres-Llanez, M. J., García, H. S., Vallejo-Cordoba, B. (2012). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5536–5543. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5186>
- Rossini, K., Noreña, C. P. Z., Cladera-Olivera, F., Brandelli, A. (2009). Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. *LWT — Food Science and Technology*, 42(4), 862–867. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.11.002>
- Rubak, Y. T., Nuraida, L., Iswantini, D., Prangdimurti, E. (2020). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in milk fermented by indigenous lactic acid bacteria. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 13(2), 345–353. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.345-353>
- Rubak, Y. T., Nuraida, L., Iswantini, D., Prangdimurti, E. (2019). Production of antihypertensive bioactive peptides in fermented food by lactic acid bacteria — A review. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 11(4), 29–44. <https://doi.org/10.34302/2019.11.4.3>
- Schalk, J. (2009). Optimization of the bioconversion of the Angiotensin I Converting Enzyme inhibitors IPP and VPP. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 275–276). Springer. http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-73657-0_123
- Shi, M., Ahtesh, F., Mathai, M., McAinch, A. J., Su, X. Q. (2016). Effects of fermentation conditions on the potential antihypertensive peptides released from yogurt fermented by *Lactobacillus helveticus* and Flavourzyme®. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(1), 137–145. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13253>
- Skrzypczak, K., Gustaw, W., Szwajgier, D., Fornal, E., Waśko, A. (2017). κ -Casein as a source of short-chain bioactive peptides generated by *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3679–3688. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2830-2>
- Subrota, H., Sreeja, V., Solanki, J., Prajapati, J. B. (2015). Significance of proteolytic microorganisms on ACE-inhibitory activity and release of bioactive peptides during fermentation of milk. *Indian Journal of Dairy Science*, 68(6), 584–591.
- Sultan, S., Huma, N., Butt, M. S., Aleem, M., Abbas, M. (2017). Therapeutic potential of dairy bioactive peptides: A contemporary perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 105–115. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1136590>
- Szwajkowska, M., Wolanciuk, A., Bałowska, J., Król, J., Litwińczuk, Z. (2011). Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system — A review. *Animal Science Papers and Reports*, 29(4), 269–280
- Tavares, T., Contreras, M. del M., Amorim, M., Pintado, M., Recio, I., Malcata, F. X. (2011). Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides*, 32(5), 1013–1019. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.02.005>
- Tricco, A. C., Lillie, E., Zarin, W., O'Brien, K. K., Colquhoun, H., Levac, D., Moher, D., Peters, M. D. J., Horsley, T., Weeks, L., Hempel, S., Akl, E. A., Chang, C., McGowan, J., Stewart, L., Hartling, L., Aldcroft, A., Wilson, M. G., Garritty, C., Straus, S. E. (2018). PRISMA extension for scoping reviews (prisma-scr): Checklist

- and explanation. *Annals of Internal Medicine*, 169(7), 467–473. <https://doi.org/10.7326/m18-0850>
- Tu, M., Liu, H., Zhang, R., Chen, H., Fan, F., Shi, P., Xu, X., Lu, W., Du, M. (2018). Bioactive hydrolysates from casein: Generation, identification, and in silico toxicity and allergenicity prediction of peptides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(9), 3416–3426. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8854>
- Udenigwe, C., Abioye, R., Okagu, I.U., Joy, O.N. (2021). Bioaccessibility of bioactive peptides: recent advances and perspectives. *Current Opinion in Food Science*, 39, 182–189.
- Ulug, S. K., Jahandidfh, F., Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science*, 108, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002>
- Venegas-Ortega, M. G., Flores-Gallegos, A. C., Martínez-Hernández, J. L., Aguilar, C. N., Nevárez-Moorillón, G. V. (2019). Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: A sustainable approach for healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12455>
- Villadóniga, C., Macció, L., Cantera, A. M. B. (2018). Acid whey proteolysis to produce angiotensin-I converting enzyme inhibitory hydrolyzate. *Environmental Sustainability*, 1(3), 267–278. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0027-x>
- Vicente, C.M.R.R.S. (2008). *Valorisation of the peptidic fraction of cheese whey* [Unpublished doctoral dissertation]. Universidade do Minho.
- Wakai, T., Yamaguchi, N., Hatanaka, M., Nakamura, Y., Yamamoto, N. (2012). Repressive processing of antihypertensive peptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in *Lactobacillus helveticus* fermented milk by added peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(2), 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.jbbiosc.2012.03.015>
- Worsztynowicz, P., Białas, W., & Grajek, W. (2020). Integrated approach for obtaining bioactive peptides from whey proteins hydrolysed using a new proteolytic lactic acid bacterium. *Food Chemistry*, 312, 126035. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126035>