

# Биоинформатический анализ изменений пептидного профиля молочных белков при хранении

Осама И.А. Солтан

Университет Мины,  
г. Мина, Египет

## АННОТАЦИЯ

**Введение:** Ферментативные процессы, происходящие в молочных продуктах при хранении, могут приводить к изменениям белкового состава, что влияет на их качество. Ключевую роль в этих изменениях играют как эндогенные ферменты, такие как плазмин, так и бактериальные протеазы. Применение биоинформатических методов позволяет моделировать гидролиз белков и прогнозировать образование пептидов со специфическими свойствами (с конкретными органолептическими характеристиками, биологической активностью, молекулярной массой, аминокислотной последовательностью и др.).

**Цель:** Оценить изменения пептидного профиля казеинов  $\beta$ -CN,  $\alpha$ s1-CN,  $\alpha$ s2-CN и  $\kappa$ -CN при моделировании их гидролиза плазмином и термостабильной бактериальной протеазой *Pseudomonas* LBSA1.

**Материалы и методы:** Анализ последовательностей казеинов проводили с использованием базы данных UniProt. Гидролиз моделировали в BIOPEP-UWM (для плазмينا) и с помощью регулярных выражений в RStudio (для *Pseudomonas* LBSA1). Степень гидролиза (DH) рассчитывали на основе количества разорванных пептидных связей в отношении к общему числу возможных связей в белковой молекуле. Для анализа пептидных последовательностей применяли библиотеку "stringr" в RStudio. Горькие и антиоксидантные пептиды выявляли с использованием базы данных BIOPEP-UWM. Данные о молекулярной массе и изоэлектрической точке полученных пептидов извлекали с помощью библиотеки "Peptides" в RStudio.

**Результаты:** Результаты 2D-диаграмм показали различия в распределении пептидов по молекулярной массе и изоэлектрической точке в зависимости от специфичности ферментов. В комбинированной модели гидролиза идентифицировано 4 горьких пептида и 3 вида горьких аминокислот, а также 6 антиоксидантных пептидов.

**Выводы:** Биоинформатическое моделирование позволяет прогнозировать ферментативные изменения белков в молочных продуктах, их влияние на качество, а также повышать эффективность проводимых в этом поле экспериментов. Полученные данные могут использоваться для разработки подходов к оценке хранения молочных продуктов и идентификации маркеров качества.

**Ключевые слова:** биоинформатика; молочные белки; пептидный профиль; хранение молочных продуктов; ферментативная порча

## Корреспонденция:

Осама И.А. Солтан

E-mail: usama.soultan@mu.edu.eg

## Конфликт интересов:

автор сообщает  
об отсутствии конфликта  
интересов.

**Поступила:** 09.10.2024

**Принята:** 15.03.2025

**Опубликована:** 31.03.2025

**Copyright:** © 2025 Автор



Для цитирования: Солтан, О.И. (2025). Биоинформатический анализ изменений пептидного профиля молочных белков при хранении. FOOD METAENGINEERING, 3(1), 17-32. <https://doi.org/10.37442/fme.2025.1.79>

# Bioinformatic Analysis of Changes in the Peptide Profile of Dairy Proteins During Storage

Osama I.A. Soltan

Minia University, Minia, Egypt

## ABSTRACT

**Introduction:** Enzymatic processes occurring in dairy products during storage can lead to changes in protein composition, affecting products' quality. Key players in these changes include endogenous enzymes, such as plasmin, and bacterial proteases like the heat stable protease from *Pseudomonas* LBSA1. The application of bioinformatic methods enables the modeling of protein hydrolysis and prediction of peptide formation with specific properties (e.g., organoleptic characteristics, bioactivity, molecular weight, amino acid sequence).

**Purpose:** To evaluate changes in the peptide profiles of  $\beta$ -CN,  $\alpha$ s1-CN,  $\alpha$ s2-CN, and  $\kappa$ -CN caseins during simulated hydrolysis by plasmin and the heat stable bacterial protease *Pseudomonas* LBSA1.

**Materials and Methods:** Casein sequences were analyzed using the UniProt database. Hydrolysis was modeled using BIOPEP-UWM (for plasmin) and regular expressions in RStudio (for *Pseudomonas* LBSA1). The degree of hydrolysis (DH) was calculated as the ratio of cleaved peptide bonds to the total possible bonds in the protein. Peptide sequences were analyzed using the "stringr" library in RStudio. Bitter and antioxidant peptides were identified using the BIOPEP-UWM database. Molecular weight and isoelectric point data were obtained via the "Peptides" library in RStudio.

**Results:** 2D diagrams revealed distinct distributions of peptides based on molecular weight and isoelectric point, dependent on enzyme specificity. In the combined hydrolysis model, 4 bitter peptides, 3 types of bitter amino acids, and 6 antioxidant peptides were identified.

**Conclusion:** Bioinformatic modeling enables the prediction of enzymatic changes in milk proteins during storage, their impact on quality, and enhances the efficiency of related experiments. These findings may support the development of approaches for assessing dairy product storage conditions and identifying quality markers.

**Keywords:** bioinformatics; milk proteins; peptide profile; storage of dairy products; enzymatic spoilage

## Correspondence:

Osama I.A. Soltan

E-mail: [usama.soultan@mu.edu.eg](mailto:usama.soultan@mu.edu.eg)

## Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

**Received:** 09.10.2024

**Accepted:** 15.03.2024

**Published:** 31.03.2025

**Copyright:** © 2025 The Author



**To cite:** Soltan, O.I. (2025). Bioinformatic analysis of changes in the peptide profile of dairy proteins during storage. *FOOD METAENGINEERING*, 3(1), 17-32. <https://doi.org/10.37442/fme.2025.1.79>

## ВВЕДЕНИЕ

Сохранение качества молочных продуктов в течение длительного срока остаётся актуальной задачей науки и промышленности (Muir, 2011; Fan et al., 2023). Различные факторы, такие как химические, биохимические и микробиологические процессы, могут приводить к деградации компонентов молочных продуктов и формированию пороков вкуса, консистенции и др. Так, Crudden et al. (2005) отмечают, что только активность плазмينا в молоке-сырье влияет на ухудшение последующей свертываемости сычужным ферментом при производстве сыра и творога; снижение выхода сыра; загустевание УВТ молока, что также подтверждается в исследовании Chavan et al., 2011. Химическая и биохимическая порча чаще всего активируется при повышенных температурах хранения, ускоряется окисление липидов, реакция Майяра и ферментативные процессы (Fox et al., 2015; Lu & Wang, 2017; Fan et al., 2023). Микробиологическая порча может быть инициирована даже при низких температурах, поскольку психротрофные микроорганизмы способны сохранять жизнедеятельность и продуцировать внеклеточные термостабильные ферменты. Эти ферменты, как и плазмин, остаются активными даже после пастеризации и ультрапастеризации, что делает их ключевым фактором порчи молока при хранении в результате протеолиза белков, в основном казеинов (Muir, 2011; Fox et al., 2015). При этом эндогенные ферменты, такие как плазмин, изначально присутствуют в молоке и их активность регулируется балансом активаторов (сериновые протеазы, такие как тканевой и урокиназный активаторы плазминогена) и ингибиторов (белки плазмы, такие как ингибиторы активаторов плазминогена PAI-1 и PAI-2, а также  $\alpha$ 2-антиплазмин, специфически связывающий плазмин), тогда как экзогенные ферменты, продуцируемые микроорганизмами, обладают большей устойчивостью к термической обработке и часто имеют более широкий спектр специфичности (Fox et al., 2015). В аспекте негативного действия плазмينا на качество молока Chavan et al. (2011) также подчеркнули, что температурная обработка изменяет баланс активаторов и ингибиторов фермента в пользу увеличения активаторов, инициируя деградационные процессы.

Современные методы протеомики и биоинформатики дают возможность эффективно моделировать протеолиз и анализировать его влияние на свойства белков. Такие инструменты как BIOPEP UWM, PeptideRanker,

AllerTOP, ToxinPred и др., используются для моделирования гидролиза белков различными ферментами, прогнозирования образования биологически активных пептидов, а также оценки их органолептических характеристик, аллергенности и токсичности (Pooja et al., 2017; Zhang et al., 2020; Kruchinin & Bolshakova, 2022). Эти методы оптимизируют планирование экспериментов и сокращают трудозатраты, что делает проверку гипотез более эффективной. Так, в работе Kruchinin et al., 2023 применение *in silico* подходов позволило спрогнозировать и оптимизировать процесс получения биоактивных пептидов из молочной сыворотки без необходимости проведения обширных лабораторных экспериментов на первоначальных этапах исследования. Схожее решение было реализовано и другими учеными для широкого круга субстратов получения биоактивных пептидов (Panjaitan et al., 2018; Kartal et al., 2020; Iram et al., 2022). В обзорном исследовании Barati et al. (2024) изучен вопрос применения *in silico* в качестве инструмента для решения задач, связанных с иммобилизацией ферментов, и отдельно выделены следующие биоинформатические приложения: ПО для моделирования молекулярной динамики, сервер предсказания сайтов связывания ионов металлов, метод анализа структуры и поверхности ферментов и др. При анализе литературы также выявлено, что *in silico* методы мало используются для прогнозирования порчи продуктов и оценки их безопасности. Выявленные немногочисленные исследования в данном аспекте были направлены на анализ бактериальных сообществ и их метаболической активности с использованием геномных и метабеномных данных *in silico* (Remenant et al., 2015); поиск ферментов, позволяющих разрушить афлатоксины в продуктах питания, являющихся угрозой безопасности продуктов питания и кормов (Dellaflora et al., 2017); оценку связывания веществ упаковки молока, способных к миграции, с пищеварительными ферментами (Xiong et al., 2024); изучение и прогнозирование механизмов бактериальной порчи молока *Pseudomonas* spp., а также на рассмотрение стратегий ее предотвращения с помощью ингибиторов кворум-сенсинга посредством *in silico* в том числе (Quintieri et al., 2021).

Сложность реализации *in silico* подхода в аспекте порчи молочных продуктов может быть связана с тем, что для оценки пептидного профиля после воздействия термостабильных ферментов психротрофных микроорганизмов требуется предварительная идентификация самих ферментов. Их включение в биоинформатические

базы данных или специализированное программное обеспечение затруднено из-за ограниченного количества данных о специфичности этих ферментов, что усложняет их классификацию и моделирование. Однако, некоторые исследования уже предпринимали попытки охарактеризовать эти ферменты. Так, согласно Yan et al. (1985), внеклеточные протеазы *Bacillus coagulans*, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* относились к металлопротеазам, причём фермент *Pseudomonas fluorescens* дополнительно проявлял трипсиноподобную активность. В свою очередь Baug et al. (2015) отметили, что по результатам их исследования, в котором они анализировали 231 выделенный штамм из сырого молока, ключевыми продуцентами термостабильных протеаз являются *Pseudomonas spp.* В работе Matéos et al. (2015) авторы идентифицировали и охарактеризовали внеклеточную протеазу, продуцированную *Pseudomonas* LBSA1, выделенного из сырого молока, которая относилась также к классу металлопротеаз, и семейству серрализинов. Данная протеаза была специфична только к казеинам ( $\alpha$ 1-,  $\beta$ - и  $\kappa$ -CN), при этом в P1-позиции (N-конце) она предпочтительно гидролизовала связь после аргинина, лизина, гистидина, тирозина, фенилаланина, триптофана, а в P1'-позиции (C-конце) перед валином, метионином, фенилаланином, тирозином, гистидином и глутамином.

Таким образом, целью данной работы стала разработка подхода, объединяющего *in silico* моделирование и экспериментальные данные в изучении процессов порчи молочных продуктов. В рамках исследования был реализован гидролиз казеинов ( $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ - и  $\kappa$ -CN) одной из идентифицированных протеаз с описанной специфичностью (*Pseudomonas* LBSA1), а также плазмином. Моделирование гидролиза казеинов плазмином проводилось с использованием BIOPEP-UWM, а гидролиз термостабильной протеазой *Pseudomonas* LBSA1 — с применением автоматизированного поиска подходящих аминокислотных сайтов в среде RStudio. В работе определены молекулярные массы, изоэлектрическая точка, а также горечь и антиоксидантная активность образовавшихся продуктов расщепления.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Исследуемые белки

Данные о последовательности белков были получены в базе данных UniProt. Номера доступа исследуемых белков в базе данных UniProt соответствуют для  $\alpha$ 1-CN — P02662; для  $\alpha$ 2-CN — P02663; для  $\beta$ -CN — P02666; для  $\kappa$ -CN — P02668. Для анализа были взяты данные о последовательности без сигнального пептида.

### Моделирование гидролиза

Моделирование гидролиза  $\beta$ -CN и  $\alpha$ 2-CN плазмином (EC 3.4.21.7) осуществляли с использованием аналитического инструмента базы данных BIOPEP-UWM “enzyme(s) action”;  $\beta$ -CN,  $\alpha$ 1-CN и  $\kappa$ -CN бактериальной протеазой *Pseudomonas* LBSA1 (Matéos et al., 2015) — с использованием регулярных выражений, учитывающих специфичность фермента к P1- и P1'-позициям, реализованных в среде RStudio. Для обработки последовательностей применяли библиотеку “stringr”.

### Расчет степени гидролиза (DH)

Степень гидролиза (DH) определяли на основе количества образованных пептидов и длины исходной белковой последовательности. Для расчёта использовали формулу:

$$DH = \frac{d}{N} \times 100\%, \quad (1)$$

где  $d$  — количество пептидных связей, расщеплённых ферментом, а  $N$  — общее количество аминокислотных остатков в исходном белке.

Анализ DH выполняли в RStudio, используя регулярные выражения для определения разрывов пептидных связей и последующее вычисление их числа. Обработка данных и расчёт DH проводились для каждого фермента и белка отдельно.

### Анализ характеристик и свойств пептидов

Выявление горьких и антиоксидантных пептидов в полученном списке пептидов в модели гидролиза осуществляли с использованием базы данных BIOPEP-UWM. Извлечение данных о молекулярной массе и изоэлектрической точке пептидов выполняли в RStudio с использованием библиотеки “Peptides”. Полный перечень

продуктов расщепления, полученных в результате моделирования, включая их молекулярные массы и изоэлектрические точки извлечен в отдельную таблицу и представлен в дополнительном материале к статье (Приложение 1).

## Визуализация данных

Для наглядного представления результатов гидролиза и характеристик пептидов использовали 2D-гистограммы ("heatmap") и диаграммы рассеяния ("scatter plot"), построенные в RStudio с использованием библиотеки ggplot2. 2D-гистограмма отображает распределение пептидов по молекулярной массе и изоэлектрической точке, основана на подсчёте количества пептидов в каждой ячейке гистограммы и реализована с использованием функции "geom\_hex".

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Моделирование гидролиза плазмином

В результате гидролиза плазмином большая часть продуктов расщепления сосредоточена в диапазоне изоэлектрических точек (pI) 9–11. Основные продукты имеют молекулярный вес до 2000 Да, однако также присутствуют фрагменты в диапазоне 2000–3000 Да и единичные продукты с молекулярной массой 5000–6500 Да (Рисунок 1).

В совокупной модели гидролиза  $\beta$ -CN и  $\alpha$ s2-CN было высвобождено 8 горьких пептидов и 2 вида аминокислот, 5 пептидов с аннотированной антиоксидантной активностью (Таблица 1). DH для  $\alpha$ s2-CN составила 14,6%, для  $\beta$ -CN — 7,2%.

Рисунок 1

**Распределение продуктов расщепления, полученных в результате гидролиза плазмином  $\alpha$ s2-CN и  $\beta$ -CN**

Figure 1

**Distribution of Hydrolysis Products Generated from  $\alpha$ s2-CN and  $\beta$ -CN by Plasmin in the Model**

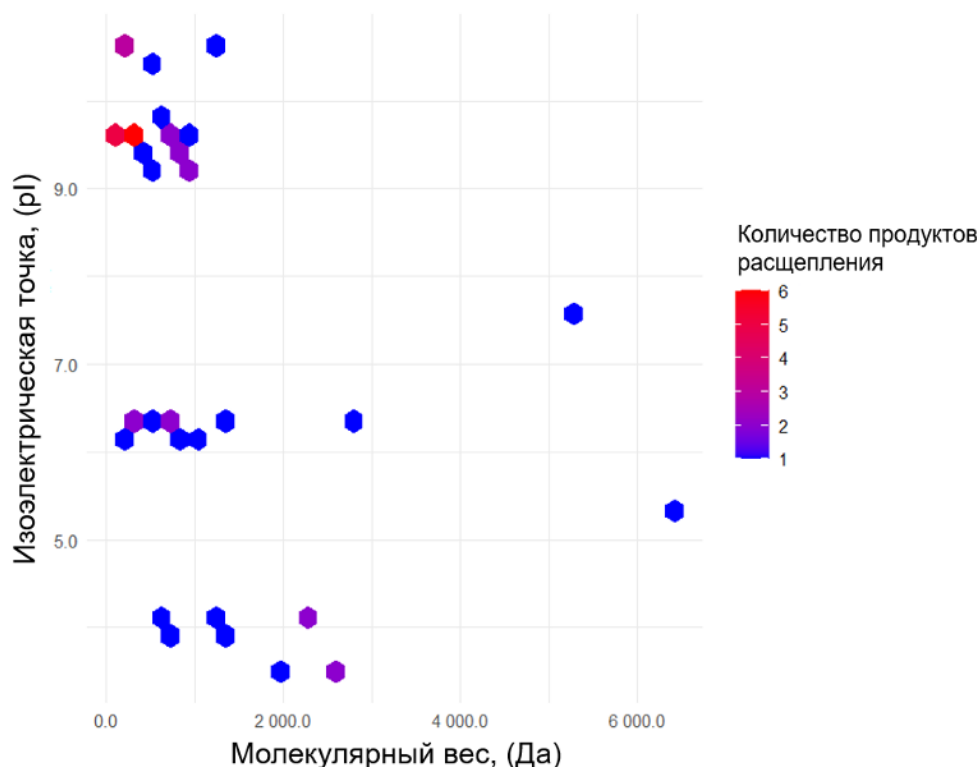


Таблица 1  
 Характеристика продуктов расщепления в модели гидролиза  $\alpha$ 2-CN,  $\beta$ -CN

Table 1

Properties of Hydrolysis Products Generated from  $\alpha$ 2-CN and  $\beta$ -CN by Plasmin in the Model

| Белок                      | Пептиды и аминокислоты | Горечь | Антиоксидантное свойство | Количество продуктов расщепления |
|----------------------------|------------------------|--------|--------------------------|----------------------------------|
| $\alpha$ 2-CN, $\beta$ -CN | K                      | +      |                          | 5                                |
|                            | R                      | +      |                          | 2                                |
| $\alpha$ 2-CN              | FALPQYLK               | +      | +                        | 1                                |
|                            | YL                     | +      | +                        | 1                                |
|                            | YQK                    |        | +                        | 1                                |
| $\beta$ -CN                | AVPYYPQR               |        | +                        | 1                                |
|                            | GPFPIIV                | +      |                          | 1                                |
|                            | VLPVPQK                |        | +                        | 1                                |
|                            |                        |        |                          |                                  |

Моделирование гидролиза бактериальной протеазой

По сравнению с плазмином, гидролиз бактериальной протеазой приводит к более равномерному распределению продуктов по pI (в диапазоне от 5 до 12, тогда как у плазмина основная масса сосредоточена около 9–11). Кроме того, большинство продуктов расщепления сосредоточено в диапазоне молекулярных масс до 2000 Да, с небольшим числом фрагментов в интервале 2000–3000 Да и единичными пептидами выше 5000 Да (Рисунок 2).

В совокупной модели гидролиза  $\alpha$ 1-CN,  $\beta$ -CN и  $\kappa$ -CN были высвобождены 1 пептид и 1 вид аминокислоты, обладающих горьким вкусом; 3 пептида с аннотированной антиоксидантной активностью (Таблица 2). DH для  $\alpha$ 1-CN составила 10,1%, для  $\beta$ -CN — 4,8%, для  $\kappa$ -CN — 6,6%.

Рисунок 2  
 Распределение продуктов расщепления, полученных в результате гидролиза бактериальной протеазой *Pseudomonas* LBSA1  $\alpha$ 1-CN,  $\beta$ -CN и  $\kappa$ -CN  
 Figure 2  
 Distribution of Hydrolysis Products Generated from  $\alpha$ 1-CN,  $\beta$ -CN, and  $\kappa$ -CN by Bacterial Protease in the Model

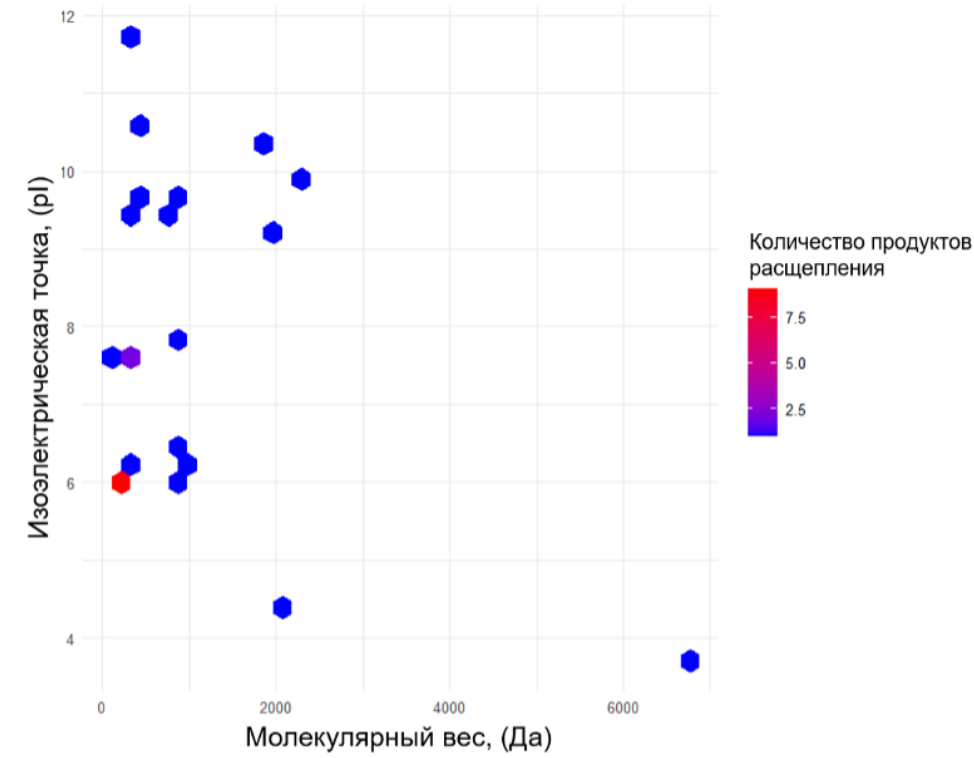


Таблица 2

Характеристика продуктов расщепления в модели гидролиза  $\alpha$ 1-CN,  $\beta$ -CN и  $\kappa$ -CN

Table 2

Properties of Hydrolysis Products Generated from  $\alpha$ 1-CN,  $\beta$ -CN, and  $\kappa$ -CN by Bacterial Protease in the Model

| Белок                                    | Пептиды и аминокислоты | Го-речь | Антиоксидантное свойство | Количество продуктов расщепления |
|------------------------------------------|------------------------|---------|--------------------------|----------------------------------|
| $\alpha$ 1-CN, $\beta$ -CN, $\kappa$ -CN | F                      | +       |                          | 5                                |
| $\alpha$ 1-CN                            | HIQKEDVPSEK            |         | +                        | 1                                |
| $\beta$ -CN                              | VKEAMARK               | +       | +                        | 1                                |
| $\kappa$ -CN                             | HRPHLSF                |         | +                        | 1                                |
|                                          | YIPIQY                 |         | +                        | 1                                |

Моделирование комбинированного гидролиза

Специфичность плазмина частично входит в специфичность бактериальной протеазы *Pseudomonas* LBSA1, поскольку обе ферментные системы разрезают пептидные связи после остатков аргинина (R) и лизина (K). Однако бактериальная протеаза накладывает дополнительные ограничения, требуя наличия специфичных аминокислот в P1>-позиции. Эти различия находят отражение в распределении пептидов по изоэлектрической точке и молекулярной массе (Рисунок 3).

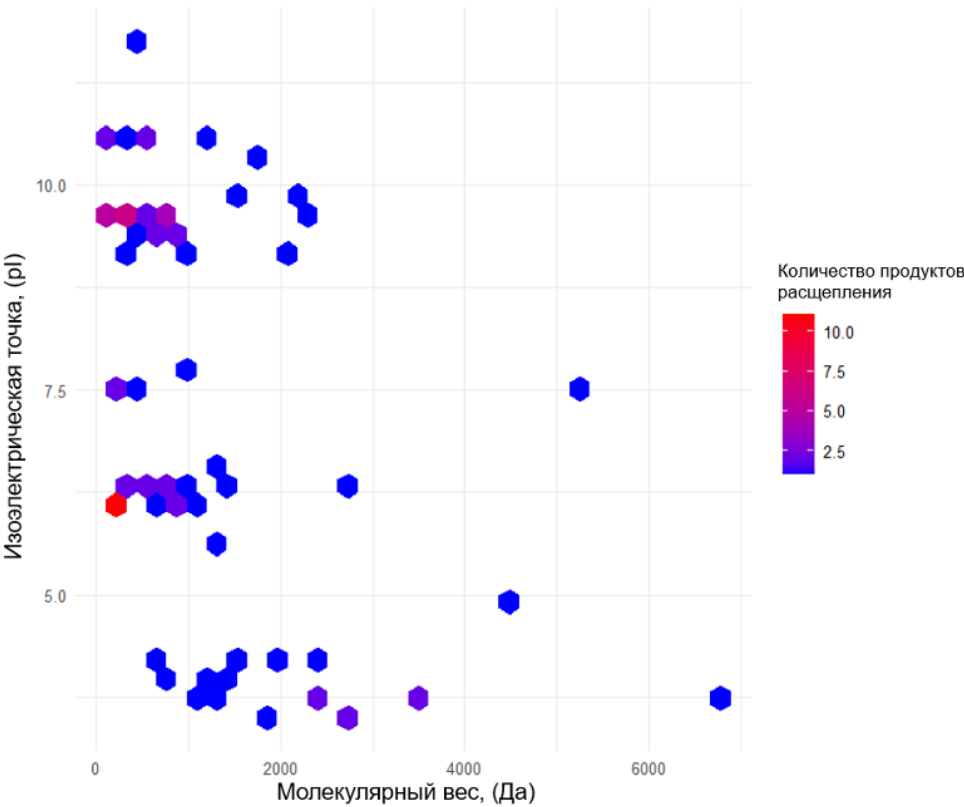
Комбинированный гидролиз плазмином и бактериальной протеазой обеспечивает образование максимального числа продуктов расщепления с наиболее

Рисунок 3

Распределение продуктов расщепления, полученных в результате комбинированного гидролиза плазмином  $\alpha$ 2-CN,  $\beta$ -CN и бактериальной протеазой *Pseudomonas* LBSA1  $\alpha$ 1-CN,  $\beta$ -CN и  $\kappa$ -CN

Figure 3

Distribution of Hydrolysis Products from Combined Action of Plasmin on  $\alpha$ 2-CN and  $\beta$ -CN, and Bacterial Protease from *Pseudomonas* LBSA1 on  $\alpha$ 1-CN,  $\beta$ -CN, and  $\kappa$ -CN





широким диапазоном изоэлектрических точек (pI от 2,5 до 12,5). При этом наблюдается наиболее варибельное распределение образовавшихся фрагментов по молекулярной массе, охватывающее диапазоны до 2000 Да, 2000–4000 Да и 5000–6500 Да. Полученные результаты демонстрируют, что совместное действие ферментов способствует формированию более сложного и разнообразного пептидного профиля, обусловленного различиями в субстратной специфичности ферментов и более глубоким уровнем гидролиза белков.

В комбинированной модели гидролиза всех четырех белков, включающей расщепление  $\alpha$ 2-CN и  $\beta$ -CN плазмином, а также  $\alpha$ 1-CN,  $\beta$ -CN и  $\kappa$ -CN бактериальной протеазой *Pseudomonas* LBSA1, были высвобождены 3 вида аминокислот и 4 пептида, обладающих горьким вкусом, а также 6 пептидов с аннотированной антиоксидантной активностью (Таблица 3).

Таблица 3

Характеристика продуктов расщепления в модели комбинированного гидролиза

Table 3

Properties of Hydrolysis Products Generated by Combined Plasmin and Bacterial Protease Action

| Белок                                    | Пептиды и аминокислоты | Горечь | Антиоксидантное свойство | Количество продуктов расщепления |
|------------------------------------------|------------------------|--------|--------------------------|----------------------------------|
| $\alpha$ 1-CN, $\beta$ -CN, $\kappa$ -CN | F                      | +      |                          | 5                                |
| $\alpha$ 2-CN, $\beta$ -CN               | K                      | +      |                          | 5                                |
|                                          | R                      | +      |                          | 2                                |
| $\alpha$ 1-CN                            | HIQKEDVPSE             |        | +                        | 1                                |
| $\alpha$ 2-CN                            | FALPQYLK               | +      | +                        | 1                                |
|                                          | YL                     | +      | +                        | 1                                |
| $\beta$ -CN                              | VKEAMAPK               | +      | +                        | 1                                |
|                                          | GPFPPIV                | +      |                          | 1                                |
| $\kappa$ -CN                             | HRPHLSF                |        | +                        | 1                                |
|                                          | YIPIQY                 |        | +                        | 1                                |

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прогнозирование изменений молочных белков при хранении является важной задачей пищевой науки, поскольку их деградация влияет на текстуру, вкус и питательную ценность продуктов. В ранних исследованиях Chavan et al. (2011), Dalabasmaz et al. (2019), Class et al. (2024) отмечено, что плазмин и бактериальные

протеазы играют ключевую роль в этих процессах, однако большинство работ основываются на экспериментальных данных, тогда как биоинформатические методы остаются менее изученными в этом контексте.

Результаты проведенного в данной работе моделирования коррелируют с ранее проведенными эмпирическими исследованиями, что свидетельствует о целесообразности применения биоинформатического подхода в вопросе прогнозирования и анализа ферментативной порчи пищевых продуктов. Так, пептиды FALPQYLK и AVPYYPQR, обнаруженные в модели гидролиза  $\alpha$ 2-CN и  $\beta$ -CN плазмином были описан в работе Nath et al. (2022) в аспекте расщепления казеина трипсином со схожей специфичностью. Авторы также подчеркнули наличие горечи и антиоксидантные свойства пептидов, которые были выявлены в том числе при моделировании в настоящем исследовании. Согласно Nath et al. (2022), горечь, как и антиоксидантные свойства пептидов в основном связаны с гидрофобностью концевых аминокислот. Другие пептиды (EAMAPK, EMPFPK) и антиоксидантный пептид AVPYYPQR, выявленные в модели гидролиза плазмином, были также представлены в работе Sedaghati et al. (2016). Для AVPYYPQR авторы также определили антибактериальную активность со значением минимальной ингибирующей концентрации (MIC) против *Escherichia coli* 40 мг/мл, которая в настоящем исследовании не оценивалась.

Продукты гидролиза, обнаруженные при моделировании бактериальной протеазой *Pseudomonas* LBSA1, а именно HIQKEDVPSE, HPIK также пересекаются с данными других работ (Gupta et al., 2010; Stuknytė et al., 2016; Nath et al., 2022). При этом, в работе Stuknytė et al. (2016) изучали протеолитическую активность термостабильных ферментов *Pseudomonas fluorescens* PS19, а в исследовании Gupta et al. (2010) анализировали антиоксидантные пептиды сыра. Verhegghe et al. (2021) изучали гидролиз молока шестью бактериальными штаммами *Pseudomonas fluorescens* MB4999, *Pseudomonas* sp. MB4988, *Pseudomonas fluorescens* MB5000, *Pseudomonas* sp. MB4996, *Pseudomonas lundensis* MB4984 и *Pseudomonas fragi* MB4972, в результате чего выявили пептиды EPVLGPVR, VSKVKEAM и GPFPPIV. В то же время несмотря на то, что протеаза *Pseudomonas* LBSA1 в исследовании Mateos et al. (2015) показала значительное сходство по аминокислотной последовательности с протеазой штамма *P. fluorescens* F (93%), при проведении нашего эксперимента по гидролизу белков про-



тезой *Pseudomonas* LBSA1 перечисленные выше маркерные пептиды выявлены не были. Данный факт может указывать на наличие различий в субстратной специфичности или механизме протеолитического действия между близкородственными штаммами, что требует дальнейших исследований для более глубокого понимания протеолитического потенциала отдельных представителей рода *Pseudomonas*.

В качестве маркеров порчи молока Class et al. (2024) были выявлены пептиды PLW и FSDIPNPIGSENSEK из  $\alpha$ 1-CN, которые в рамках настоящего исследования детектированы не были. Так как авторы ссылаются на возможное совокупное влияние эндогенных ферментов (плазмина, катепсина D) и бактериальных протеаз, различие их результатов от продуктов гидролиза в данной работе вероятно связано с большим разнообразием ферментного комплекса, находящегося в молоке, содержащего не только плазмин и, протеазу *Pseudomonas* LBSA1, а и другие бактериальные протеазы. В исследовании Verhegghe et al. (2021), посвящённом разработке быстрого метода выявления бактериальной протеолитической активности в сыром молоке, среди шести пептидов-маркеров был выделен пептид  $\beta$ -казеина с последовательностью GPFPIIV, также идентифицированный в нашей модели, однако образованный под действием плазмينا. Авторы установили, что в образцах с высоким уровнем термоустойчивых бактериальных протеаз содержание этого и некоторых других пептидов значительно возросло (Verhegghe et al., 2021). Напротив, при моделировании гидролиза протеазой штамма *Pseudomonas* LBSA1 в текущей работе данный пептид не был обнаружен, что может объясняться особенностями субстратной специфичности протеаз различных штаммов *Pseudomonas*, в частности предпочтением глицина в P1-позиции (C-конец) или аргинина в P1-позиции (N-конец), а также возможной последующей активацией плазминогена.

Несмотря на то, что в эксперименте Verhegghe et al. (2021) проводилась тепловая обработка (95°C, 8 мин 45 сек) с целью исключения влияния плазмينا, дополнительные исследования, подтверждающие полную инактивацию плазминовой системы, авторами не проводились. Между тем, согласно данным Van Asselt et al. (2008), даже экстремальные условия тепловой обработки (180°C, 0,2 сек), предшествующие нагреванию при 80°C до 4 минут, не гарантируют полной инактивации плазминовой активности в молоке.

Кроме того, France et al. (2021) отмечают возможность сохранения активаторов плазминогена после термической обработки, способных запускать гидролиз белков при последующем хранении молока, при этом D-значение инактивации таких активаторов составляет 16 секунд при 140°C. Совокупность приведенных данных указывает на сложность исследования воздействия отдельных факторов на пептидный профиль молока, требуя учёта комплексных взаимодействий и известной специфичности протеолитических систем. В этой связи при изучении протеолиза молочных белков необходимо оценивать совокупный характер происходящих изменений и проводить дополнительные эксперименты для количественного определения вклада вторичных факторов, таких как активность плазминовой системы.

Полученные в ходе моделирования в настоящей работе 2D-диаграммы могут быть использованы в качестве инструмента для сопоставления результатов реальных экспериментов, что позволит быстрее выявлять закономерности, повышать эффективность работы с экспериментальными данными и создания «отпечатков» (fingerprints), характеризующих состояние и качество молочных продуктов. Подход, основанный на анализе пептидных и белковых «отпечатков», уже применялся в ряде исследований, включая изучение влияния термообработки и хранения на пептидный профиль молока (Meltretter и др., 2008), выявление фальсификации цельного молока добавлением сухого молока (Du et al., 2020) и анализ динамики белковых изменений в грудном молоке (Thesbjerg et al., 2023). Использование таких визуальных инструментов может облегчить интерпретацию протеомных данных, а также ускорить идентификацию ключевых пептидов, что в свою очередь усилит синергию между *in silico* моделированием и лабораторными исследованиями.

## Ограничения исследования

Моделирование в настоящем исследовании не учитывает всех факторов хранения, включая температурные колебания, белок-белковые и белок-жировые взаимодействия. Важно учитывать влияние плазминовой системы и других эндогенных ферментов, концентрация и активность которых зависят от зоотехнических факторов (породы, возраста коровы, стадии лактации и др.), а также условий технологической обработки. Представленные модели ограничены выбором протеаз, наличие данных о специфичности большего количества бакте-

риальных ферментов, вызывающих порчу в молоке, позволит сделать биоинформатический анализ более эффективным, а порчу молочных продуктов впоследствии более прогнозируемой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение биоинформатического моделирования позволило спрогнозировать гидролиз казеинов  $\beta$ -CN,  $\alpha$ s1-CN,  $\alpha$ s2-CN и  $\kappa$ -CN под действием плазмина и термостабильной бактериальной протеазы *Pseudomonas* LBSA1, что дало возможность оценить потенциальные изменения пептидного профиля молока при хранении. Полученные данные подтвердили, что данные белки являются источниками пептидов с горьким вкусом и антиоксидантной активностью, что может служить основой для разработки новых подходов к оценке качества молочных продуктов. В частности, это может включать анализ горечи и антиоксидантных свойств пептидов как индикаторов изменений, происходящих в молоке при хранении. Для проверки работоспособности этих подходов необходимы дальнейшие исследования, направленные на разработку и адаптацию чувствительных методов анализа, которые

позволят объективно оценивать влияние ферментативных процессов на органолептические и функциональные свойства молочных белков.

Частичное совпадение полученных *in silico* данных с экспериментальными результатами подтверждает перспективность этого подхода для предсказания ключевых пептидов, однако различия в специфичности ферментов требуют дополнительной валидации.

Будущие исследования могут быть направлены на идентификацию ферментных систем микроорганизмов сырого молока, расширение биоинформатических баз данных и верификацию предсказаний с использованием масс-спектрометрии. Совмещение биоинформатического моделирования с лабораторными исследованиями обеспечит более точное прогнозирование изменений белкового состава и позволит оптимизировать контроль качества молочных продуктов. Проведение обзора предметного поля по применению биоинформатики в оценке порчи пищевых продуктов позволит систематизировать существующие подходы и определить ключевые направления их дальнейшего развития.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Barati, F., Hosseini, F., Vafaei, R., Sabouri, Z., Ghadam, P., Arab, S. S., Shadfar, N., & Piroozmand, F. (2024). *In silico* approaches to investigate enzyme immobilization: A comprehensive systematic review. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 26(7), 5744–5761. <https://doi.org/10.1039/D3CP03989G>
- Baur, C., Krewinkel, M., Kranz, B., Von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J., Stressler, T., & Fischer, L. (2015). Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 49, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.005>
- Chavan, R. S., Chavan, S. R., Khedkar, C. D., & Jana, A. H. (2011). UHT milk processing and effect of plasmin activity on shelf life: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(5), 251–268. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00157.x>
- Class, L.-C., Kuhnen, G., Schmid, J., Rohn, S., & Kuballa, J. (2024). Marker peptides for indicating the spoilage of milk - Sample preparation and chemometric approaches for yielding potential peptides in a raw milk model. *Foods*, 13(20), 3315. <https://doi.org/10.3390/foods13203315>
- Crudden, A., Afoufa-Bastien, D., Fox, P. F., Brisson, G., & Kelly, A. L. (2005). Effect of hydrolysis of casein by plasmin on the heat stability of milk. *International Dairy Journal*, 15(10), 1017–1025. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.11.001>
- Dalabasmaz, S., Dittrich, D., Kellner, I., Drewello, T., & Pischetsrieder, M. (2019). Identification of peptides reflecting the storage of UHT milk by MALDI-TOF-MS peptide profiling. *Journal of Proteomics*, 207, 103444. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103444>
- Dellaflora, L., Galaverna, G., Reverberi, M., & Dall'Asta, C. (2017). Degradation of aflatoxins by means of laccases from *trametes versicolor*: An *in silico* Insight. *Toxins*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.3390/toxins9010017>

- Du, L., Lu, W., Zhang, Y., Gao, B., & Yu, L. (2020). Detection of milk powder in liquid whole milk using hydrolyzed peptide and intact protein mass spectral fingerprints coupled with data fusion technologies. *Food Science & Nutrition*, 8(3), 1471–1479. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1430>
- Fan, X., Wang, C., Cheng, M., Wei, H., Gao, X., Ma, M., Wang, X., & Li, Z. (2023). Markers and mechanisms of deterioration reactions in dairy products. *Food Engineering Reviews*, 15(2), 230–241. <https://doi.org/10.1007/s12393-023-09331-9>
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). Heat-Induced Changes in Milk. In P. F. Fox, T. Uniacke-Lowe, P. L. H. McSweeney, & J. A. O'Mahony (Eds.), *Dairy chemistry and biochemistry* (pp. 345–375). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2_9)
- France, T. C., O'Mahony, J. A., & Kelly, A. L. (2021). The plasmin system in milk and dairy products. B. A. L. Kelly & L. B. Larsen (Ред.), *Agents of change* (pp. 11–55). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_2)
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., & Sangwan, R. B. (2010). Identification of antioxidant peptides in cheddar cheese made with adjunct culture *Lactobacillus casei ssp. casei* 300. *Milchwissenschaft*, 65(4), 396–399.
- Iram, D., Sansi, M. S., Zangab, S., Vij, S., Ashutosh, & Meena, S. (2022). In silico identification of antidiabetic and hypotensive potential bioactive peptides from the sheep milk proteins - A molecular docking study. *Journal of Food Biochemistry*, 46(11). <https://doi.org/10.1111/jfbc.14137>
- Kartal, C., Kaplan Türköz, B., & Otles, S. (2020). Prediction, identification and evaluation of bioactive peptides from tomato seed proteins using *in silico* approach. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 1865–1883. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00434-z>
- Kruchinin, A., & Bolshakova, E. (2022). Hybrid strategy of bioinformatics modeling (*in silico*): Biologically active peptides of milk protein. *Food Processing: Techniques and Technology*, 52(1), 46–57. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-1-46-57>
- Kruchinin, A. G., Bolshakova, E. I., & Barkovskaya, I. A. (2023). Bioinformatic modeling (In Silico) of obtaining bioactive peptides from the protein matrix of various types of milk whey. *Fermentation*, 9(4), 380. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040380>
- Lu, M., & Wang, N. S. (2017). Spoilage of milk and dairy products. *The Microbiological Quality of Food* (pp. 151–178). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00010-8>
- Matéos, A., Guyard-Nicodème, M., Baglinière, F., Jardin, J., Gaucheron, F., Dary, A., Humbert, G., & Gaillard, J.-L. (2015). Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *International Dairy Journal*, 49, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.008>
- Meltretter, J., Schmidt, A., Humeny, A., Becker, C.-M., & Pischetsrieder, M. (2008). Analysis of the peptide profile of milk and its changes during thermal treatment and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 2899–2906. <https://doi.org/10.1021/jf073479o>
- Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
- Muir, D. D. (2011). The stability and shelf life of milk and milk products. In *Food and beverage stability and shelf life* (pp. 755–778). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857092540.3.755>
- Nath, A., Eren, B. A., Zinia Zaukuu, J.-L., Koris, A., Pásztoré-Huszár, K., Szerdahelyi, E., & Kovacs, Z. (2022). Detecting the bitterness of milk-protein-derived peptides using an electronic tongue. *Chemosensors*, 10(6), 215. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10060215>
- Panjaitan, F. C. A., Gomez, H. L. R., & Chang, Y.-W. (2018). Silico analysis of bioactive peptides released from giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) roe proteins identified by proteomics approach. *Molecules*, 23(11), 2910. <https://doi.org/10.3390/molecules23112910>
- Pooja, K., Rani, S., Kanwate, B., & Pal, G. K. (2017). Physico-chemical, sensory and toxicity characteristics of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from rice bran-derived globulin using computational approaches. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 23(4), 519–529. <https://doi.org/10.1007/s10989-017-9586-4>

- Quintieri, L., Caputo, L., Brasca, M., & Fanelli, F. (2021). Recent advances in the mechanisms and regulation of QS in dairy spoilage by *Pseudomonas spp.* *Foods*, 10(12), 3088. <https://doi.org/10.3390/foods10123088>
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M.-F., & Zagorec, M. (2015). Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*, 45, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.009>
- Sedaghati, M., Ezzatpanah, H., Mashhadi Akbar Boojar, M., Tajabadi Ebrahimi, M., & Kobarfard, F. (2016). Isolation and identification of some antibacterial peptides in the plasmin-digest of  $\beta$ -casein. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.019>
- Stuknytė, M., Decimo, M., Colzani, M., Silvetti, T., Brasca, M., Cattaneo, S., Aldini, G., & De Noni, I. (2016). Extracellular thermostable proteolytic activity of the milk spoilage bacterium *Pseudomonas fluorescens* PS19 on bovine caseins. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4188–4195. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10894>
- Thesbjerg, M. N., Nielsen, S. D.-H., Sundekilde, U. K., Poulsen, N. A., & Larsen, L. B. (2023). Fingerprinting of proteases, protease inhibitors and indigenous peptides in human milk. *Nutrients*, 15(19), 4169. <https://doi.org/10.3390/nu15194169>
- Van Asselt, A. J., Sweere, A. P. J., Rollema, H. S., & De Jong, P. (2008). Extreme high-temperature treatment of milk with respect to plasmin inactivation. *International Dairy Journal*, 18(5), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.019>
- Verhegghe, M., De Block, J., Heyndrickx, M., Van Coillie, E., Van Poucke, C., & Duquenne, B. (2021). Application of LC-HRMS identified marker peptides in an LC-MS/MS method for detection and quantification of heat-resistant proteolytic activity in raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, 74(2), 286–296. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12754>
- Xiong, Z., He, Y., Guan, W., Lv, X., Chen, J., & Ma, D. (2024). Investigating the impact of common migration substances found in milk packaging on proteases: A multispectral and molecular docking approach. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 318, 124517. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124517>
- Yan, L., Langlois, B. E., O'Leary, J., & Hicks, C. L. (1985). Purification and characterization of four extracellular proteases isolated from raw milk psychrotrophs. *Journal of Dairy Science*, 68(6), 1323–1336. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80968-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80968-1)
- Zhang, Y., Aryee, A. N., & Simpson, B. K. (2020). Current role of in silico approaches for food enzymes. *Current Opinion in Food Science*, 31, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.11.003>

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Полный перечень продуктов расщепления

| Белок                      | Продукт расщепления                             | Молекулярный вес, Да | Изоэлектрическая точка (pI) |
|----------------------------|-------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| Модель гидролиза плазмином |                                                 |                      |                             |
| αs2-CN                     | ALNEINQFYQK                                     | 1367,52              | 6,40                        |
| αs2-CN                     | AMK                                             | 348,46               | 9,70                        |
| αs2-CN                     | ENLCSTFCK                                       | 1044,21              | 6,14                        |
| αs2-CN                     | EQLSTSEENSK                                     | 1251,27              | 3,98                        |
| αs2-CN                     | EVVR                                            | 501,58               | 6,41                        |
| αs2-CN                     | FALPQYLK                                        | 979,19               | 9,30                        |
| αs2-CN                     | FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK                          | 2710,13              | 6,32                        |
| αs2-CN                     | HYQK                                            | 574,64               | 9,30                        |
| αs2-CN                     | ISQR                                            | 502,57               | 10,55                       |
| αs2-CN                     | ITVDDK                                          | 689,76               | 4,11                        |
| αs2-CN                     | K                                               | 146,19               | 9,70                        |
| αs2-CN                     | K                                               | 146,19               | 9,70                        |
| αs2-CN                     | K                                               | 146,19               | 9,70                        |
| αs2-CN                     | K                                               | 146,19               | 9,70                        |
| αs2-CN                     | LNFLK                                           | 633,79               | 9,70                        |
| αs2-CN                     | LTEEEK                                          | 747,80               | 3,98                        |
| αs2-CN                     | NANEEEYSIGSSSESAEVATEEVK                        | 2688,71              | 3,49                        |
| αs2-CN                     | NAVPIPTLNR                                      | 1195,38              | 10,55                       |
| αs2-CN                     | NMAINPSK                                        | 874,02               | 9,70                        |
| αs2-CN                     | NR                                              | 288,31               | 10,55                       |
| αs2-CN                     | NTMEHVSSSEESIISQETVK                            | 2299,45              | 4,19                        |
| αs2-CN                     | PWIQPK                                          | 767,93               | 9,70                        |
| αs2-CN                     | QEK                                             | 403,44               | 6,41                        |
| αs2-CN                     | R                                               | 174,20               | 10,55                       |
| αs2-CN                     | TK                                              | 247,29               | 9,70                        |
| αs2-CN                     | TK                                              | 247,29               | 9,70                        |
| αs2-CN                     | TVDMESTEVFTK                                    | 1386,54              | 3,93                        |
| αs2-CN                     | TVYQHQK                                         | 903,01               | 9,30                        |
| αs2-CN                     | VIPYVR                                          | 745,92               | 9,35                        |
| αs2-CN                     | YL                                              | 294,35               | 6,09                        |
| αs2-CN                     | YQK                                             | 437,50               | 9,30                        |
| β-CN                       | AVYPQR                                          | 829,95               | 9,35                        |
| β-CN                       | DMPIQAFLLYQEPVLGPVR                             | 2186,60              | 4,18                        |
| β-CN                       | EAMAPK                                          | 645,77               | 6,41                        |
| β-CN                       | ELEELNVPGEIVESLSSEESITR                         | 2646,84              | 3,55                        |
| β-CN                       | EMPFPK                                          | 747,91               | 6,41                        |
| β-CN                       | FQSEEQQQTEDELQDK                                | 1982,00              | 3,56                        |
| β-CN                       | GPFPIIV                                         | 741,93               | 6,10                        |
| β-CN                       | HK                                              | 283,33               | 9,70                        |
| β-CN                       | IEK                                             | 388,46               | 6,41                        |
| β-CN                       | IHPFAQTQSLVYPFGPIPNSLPQNIPPLTQTPVWPPFLQPEVMGVSK | 5319,25              | 7,54                        |
| β-CN                       | INK                                             | 373,45               | 9,70                        |
| β-CN                       | K                                               | 146,19               | 9,70                        |

| Белок                                    |                                                                  | Продукт расщепления | Молекулярный вес, Да | Изоэлектрическая точка (pI) |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|
| β-CN                                     | R                                                                |                     | 174,20               | 10,55                       |
| β-CN                                     | VK                                                               |                     | 245,32               | 9,70                        |
| β-CN                                     | VLPVPQK                                                          |                     | 779,98               | 9,70                        |
| β-CN                                     | YPVEPFTEQSRLTLDVENLHPLPLLSQSWMHQPHQLPPTVMFPPQSVLSLSQSK           |                     | 6362,32              | 5,36                        |
| Модель гидролиза бактериальной протеазой |                                                                  |                     |                      |                             |
| αs1-CN                                   | F                                                                |                     | 165,19               | 6,10                        |
| αs1-CN                                   | F                                                                |                     | 165,19               | 6,10                        |
| αs1-CN                                   | F                                                                |                     | 165,19               | 6,10                        |
| αs1-CN                                   | H                                                                |                     | 155,16               | 7,55                        |
| αs1-CN                                   | HIQKEDVPSEK                                                      |                     | 1 337,46             | 5,55                        |
| αs1-CN                                   | HPIK                                                             |                     | 493,61               | 9,70                        |
| αs1-CN                                   | QF                                                               |                     | 293,32               | 6,10                        |
| αs1-CN                                   | QGLPQEVNENLLR                                                    |                     | 1 622,84             | 4,26                        |
| αs1-CN                                   | QLDAYPSGAW                                                       |                     | 1 107,19             | 3,75                        |
| αs1-CN                                   | QMEAESISSSEIVPNSVEQK                                             |                     | 2 321,50             | 3,71                        |
| αs1-CN                                   | RPK                                                              |                     | 399,49               | 11,65                       |
| αs1-CN                                   | VAPFPEVFGKEK                                                     |                     | 1 347,58             | 6,53                        |
| αs1-CN                                   | VNELSKDIGSESTEDQAMEDIK                                           |                     | 2 438,60             | 3,73                        |
| αs1-CN                                   | VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW                                |                     | 3 593,96             | 3,74                        |
| αs1-CN                                   | VPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVGNQELAY                         |                     | 4 415,02             | 4,81                        |
| αs1-CN                                   | Y                                                                |                     | 181,19               | 6,09                        |
| αs1-CN                                   | Y                                                                |                     | 181,19               | 6,09                        |
| αs1-CN                                   | Y                                                                |                     | 181,19               | 6,09                        |
| αs1-CN                                   | YK                                                               |                     | 309,37               | 9,30                        |
| αs1-CN                                   | YLGYLEQLRLKK                                                     |                     | 1 637,00             | 9,93                        |
| αs1-CN                                   | YPELFR                                                           |                     | 823,95               | 6,40                        |
| β-CN                                     | F                                                                |                     | 165,19               | 6,10                        |
| β-CN                                     | HKEMPFPK                                                         |                     | 1 013,22             | 9,54                        |
| β-CN                                     | MH                                                               |                     | 286,35               | 7,55                        |
| β-CN                                     | QEPVLGPVRGPFPIIV                                                 |                     | 1 718,07             | 6,41                        |
| β-CN                                     | QPH                                                              |                     | 380,40               | 7,55                        |
| β-CN                                     | QPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK                                            |                     | 2 281,70             | 9,70                        |
| β-CN                                     | QSEEQQQTEDELQDKIHQPAQTQSLVYPFGPIPNLSLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK   |                     | 7 136,06             | 3,99                        |
| β-CN                                     | RELEELNVPGEIVESLSSEESITRINKKIEK                                  |                     | 3 657,09             | 4,36                        |
| β-CN                                     | VKEAMAPK                                                         |                     | 873,08               | 9,54                        |
| β-CN                                     | VLPVPQKAVPYQRDMPIQAFLLY                                          |                     | 2 784,36             | 9,15                        |
| β-CN                                     | YPVEPFTEQSRLTLDVENLHPLPLLSQSW                                    |                     | 3 467,92             | 3,78                        |
| κ-CN                                     | F                                                                |                     | 165,19               | 6,10                        |
| κ-CN                                     | FSDKIAK                                                          |                     | 807,95               | 9,54                        |
| κ-CN                                     | HPHPHLSF                                                         |                     | 971,09               | 7,81                        |
| κ-CN                                     | MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV |                     | 6707,43              | 3,77                        |
| κ-CN                                     | QEQNQEQPIRCEKDER                                                 |                     | 2030,16              | 4,30                        |
| κ-CN                                     | QQKPVALINNQLFPYPY                                                |                     | 2033,36              | 9,15                        |
| κ-CN                                     | QVLSNTVPAKSCQAQPTTMAR                                            |                     | 2231,57              | 9,83                        |
| κ-CN                                     | VLSR                                                             |                     | 473,57               | 10,55                       |



| Белок                            |                                         | Продукт расщепления | Молекулярный вес, Да | Изоэлектрическая точка (pI) |
|----------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|
| κ-CN                             | Y                                       |                     | 181,19               | 6,09                        |
| κ-CN                             | YAKPAAVRSPAQILQW                        |                     | 1799,11              | 10,45                       |
| κ-CN                             | YIPIQY                                  |                     | 795,93               | 6,09                        |
| κ-CN                             | YPSYGLNY                                |                     | 976,05               | 6,08                        |
| Комбинированная модель гидролиза |                                         |                     |                      |                             |
| αs1-CN                           | F                                       |                     | 165,19               | 6,10                        |
| αs1-CN                           | F                                       |                     | 165,19               | 6,10                        |
| αs1-CN                           | F                                       |                     | 165,19               | 6,10                        |
| αs1-CN                           | H                                       |                     | 155,16               | 7,55                        |
| αs1-CN                           | HIQKEDVPSEK                             |                     | 1337,46              | 5,55                        |
| αs1-CN                           | HPIK                                    |                     | 493,61               | 9,70                        |
| αs1-CN                           | QF                                      |                     | 293,32               | 6,10                        |
| αs1-CN                           | QGLPQEVNENLLR                           |                     | 1622,84              | 4,26                        |
| αs1-CN                           | QLDAYPSGAW                              |                     | 1107,19              | 3,75                        |
| αs1-CN                           | QMEAEISSSEEIVPNSVEQK                    |                     | 2321,50              | 3,71                        |
| αs1-CN                           | RPK                                     |                     | 399,49               | 11,65                       |
| αs1-CN                           | VAPFPEVFGKEK                            |                     | 1347,58              | 6,53                        |
| αs1-CN                           | VNELSKDIGSESTEDQAMEDIK                  |                     | 2438,60              | 3,73                        |
| αs1-CN                           | VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW       |                     | 3593,96              | 3,74                        |
| αs1-CN                           | VPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAY |                     | 4415,02              | 4,81                        |
| αs1-CN                           | Y                                       |                     | 181,19               | 6,09                        |
| αs1-CN                           | Y                                       |                     | 181,19               | 6,09                        |
| αs1-CN                           | Y                                       |                     | 181,19               | 6,09                        |
| αs1-CN                           | YK                                      |                     | 309,37               | 9,30                        |
| αs1-CN                           | YLGYLEQLRLKK                            |                     | 1637,00              | 9,93                        |
| αs1-CN                           | YPELFR                                  |                     | 823,95               | 6,40                        |
| αs2-CN                           | ALNEINQFYQK                             |                     | 1367,52              | 6,40                        |
| αs2-CN                           | AMK                                     |                     | 348,46               | 9,70                        |
| αs2-CN                           | ENLCSTFK                                |                     | 1044,21              | 6,14                        |
| αs2-CN                           | EQLSTSEENSK                             |                     | 1251,27              | 3,98                        |
| αs2-CN                           | EVVR                                    |                     | 501,58               | 6,41                        |
| αs2-CN                           | FALPQYLK                                |                     | 979,19               | 9,30                        |
| αs2-CN                           | FPQYLQYLYQGPIVLPWDQVK                   |                     | 2710,13              | 6,32                        |
| αs2-CN                           | HYQK                                    |                     | 574,64               | 9,30                        |
| αs2-CN                           | ISQR                                    |                     | 502,57               | 10,55                       |
| αs2-CN                           | ITVDDK                                  |                     | 689,76               | 4,11                        |
| αs2-CN                           | K                                       |                     | 146,19               | 9,70                        |
| αs2-CN                           | K                                       |                     | 146,19               | 9,70                        |
| αs2-CN                           | K                                       |                     | 146,19               | 9,70                        |
| αs2-CN                           | K                                       |                     | 146,19               | 9,70                        |
| αs2-CN                           | LNFLK                                   |                     | 633,79               | 9,70                        |
| αs2-CN                           | LTEEEK                                  |                     | 747,80               | 3,98                        |
| αs2-CN                           | NANEEEYSIGSSSESAEVATEEVK                |                     | 2688,71              | 3,49                        |
| αs2-CN                           | NAVPIPTLNR                              |                     | 1195,38              | 10,55                       |
| αs2-CN                           | NMAINPSK                                |                     | 874,02               | 9,70                        |

| Белок  | Продукт расщепления                                              | Молекулярный вес, Да | Изоэлектрическая точка (pI) |
|--------|------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| αs2-CN | NR                                                               | 288,31               | 10,55                       |
| αs2-CN | NTMEHVSSSEESIISQETVK                                             | 2299,45              | 4,19                        |
| αs2-CN | PWIQPK                                                           | 767,93               | 9,70                        |
| αs2-CN | QEK                                                              | 403,44               | 6,41                        |
| αs2-CN | R                                                                | 174,20               | 10,55                       |
| αs2-CN | TK                                                               | 247,29               | 9,70                        |
| αs2-CN | TK                                                               | 247,29               | 9,70                        |
| αs2-CN | TVDMESTEFTK                                                      | 1386,54              | 3,93                        |
| αs2-CN | TVYQHVK                                                          | 903,01               | 9,30                        |
| αs2-CN | VIPYVR                                                           | 745,92               | 9,35                        |
| αs2-CN | YL                                                               | 294,35               | 6,09                        |
| αs2-CN | YQK                                                              | 437,50               | 9,30                        |
| κ-CN   | F                                                                | 165,19               | 6,10                        |
| κ-CN   | FSDKIAK                                                          | 807,95               | 9,54                        |
| κ-CN   | HPHPHLSF                                                         | 971,09               | 7,81                        |
| κ-CN   | MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV | 6707,43              | 3,77                        |
| κ-CN   | QEQNQEQPIRCEKDER                                                 | 2030,16              | 4,30                        |
| κ-CN   | QQKPVALINNQLPYPY                                                 | 2033,36              | 9,15                        |
| κ-CN   | QVLSNTVPAKSCQAQPTTMAR                                            | 2231,57              | 9,83                        |
| κ-CN   | VLSR                                                             | 473,57               | 10,55                       |
| κ-CN   | Y                                                                | 181,19               | 6,09                        |
| κ-CN   | YAKPAAVRSPAQLQW                                                  | 1799,11              | 10,45                       |
| κ-CN   | YIPIQY                                                           | 795,93               | 6,09                        |
| κ-CN   | YPSYGLNY                                                         | 976,05               | 6,08                        |
| β-CN   | AVPYPQR                                                          | 829,95               | 9,35                        |
| β-CN   | DMPIQAFLLY                                                       | 1210,45              | 3,75                        |
| β-CN   | EAMAPK                                                           | 645,77               | 6,41                        |
| β-CN   | ELEELNVPGEIVESLSSEESITR                                          | 2646,84              | 3,55                        |
| β-CN   | EMPFPK                                                           | 747,91               | 6,41                        |
| β-CN   | F                                                                | 165,19               | 6,10                        |
| β-CN   | GPFPIIV                                                          | 741,93               | 6,10                        |
| β-CN   | HK                                                               | 283,33               | 9,70                        |
| β-CN   | IEK                                                              | 388,46               | 6,41                        |
| β-CN   | IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNSLPQNIPPLTQTPVWVPFLQPEVMGVSK                 | 5319,25              | 7,54                        |
| β-CN   | INK                                                              | 373,45               | 9,70                        |
| β-CN   | K                                                                | 146,19               | 9,70                        |
| β-CN   | MH                                                               | 286,35               | 7,55                        |
| β-CN   | QEPVLGPVR                                                        | 994,16               | 6,41                        |
| β-CN   | QPH                                                              | 380,40               | 7,55                        |
| β-CN   | QPLPPTVMFPQSVLSLSQSK                                             | 2281,70              | 9,70                        |
| β-CN   | QSEEQQTDELQDK                                                    | 1834,82              | 3,56                        |
| β-CN   | R                                                                | 174,20               | 10,55                       |
| β-CN   | VK                                                               | 245,32               | 9,70                        |
| β-CN   | VLPVPQK                                                          | 779,98               | 9,70                        |
| β-CN   | YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSW                                    | 3467,92              | 3,78                        |