

В.В. Ельчанинов

**Номенклатура и свойства
белков молока коровы (*Bos taurus*)**



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральный Алтайский научный центр агrobiотехнологий
Алтайский государственный университет

В.В. Ельчанинов

Номенклатура и свойства белков молока коровы (*Bos taurus*)

Монография



Барнаул

Издательство
Алтайского государственного
университета
2022

УДК 636.082.2
Е 59

Рецензенты

Ильичёв Александр Алексеевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора;

Мусина Ольга Николаевна – доктор технических наук, доцент, главный научный сотрудник, руководитель Сибирского научно-исследовательского института сыроделия Федерального Алтайского научного центра агробиотехнологий.

Ельчанинов, Вадим Валентинович

Е 59 **Номенклатура и свойства белков молока коровы (*Bos taurus*)** : монография / В.В. Ельчанинов; Министерство науки и высшего образования РФ, Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Алтайский государственный университет. – Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2022. 300 с.

ISBN 978-5-7904-2691-9.

Монография посвящена современной номенклатуре и биохимическим свойствам протеинов коровьего молока: казеинов, сывороточных белков, эндогенных ферментов и белков мембраны молочной жировой глобулы. Рассмотрен генезис представлений о структуре казеинаткальцийфосфатных комплексов молока, охарактеризованы современные модели казеиновой мицеллы.

Издание предназначено для специалистов молочной промышленности, преподавателей, аспирантов и студентов высших учебных заведений, занимающихся изучением физико-химических, биохимических и технологических свойств молока.

УДК 636.082.2

*Рекомендовано к опубликованию Ученым советом
Федерального Алтайского научного центра агробиотехнологий.
Протокол № 5 от 21.10.2022.*

ISBN 978-5-7904-2691-9

© Ельчанинов В.В., 2022
© Федеральный Алтайский научный центр
агробиотехнологий, 2022
© Оформление. Издательство Алтайского
государственного университета, 2022

Предисловие

Систематизация исследуемых объектов лежит в основе любой отрасли научного знания. В случае молочной науки это классификация, или номенклатура биомолекул, природная комбинация которых образует уникальный натуральный продукт – молоко. Создание современной номенклатуры протеинов коровьего молока позволяет глубже понять биологический смысл и функции индивидуальных белков и использовать эти знания на благо человека.

Монография посвящена номенклатуре и физико-химическим свойствам белков молока коровы (*Bos taurus*), которые можно разделить на 4 основные группы: казеины, сывороточные белки, эндогенные ферменты и белки мембраны молочной жировой глобулы. Фактически предлагаемая Вашему вниманию работа – это попытка, в рамках одной книги, систематизировать разрозненные литературные данные о классификации, структуре и свойствах белков коровьего молока. В некоторых случаях, когда речь идет о сравнительном анализе, предметом обсуждения являются также гомологичные белки молока не коровьего происхождения.

С момента опубликования в 1984 г. пятой Номенклатуры белков молока в значительной степени обновился арсенал методов, используемых для исследования физико-химических и биохимических свойств белков, в частности, протеинов молока. В результате изменилась сама идеология построения номенклатуры казеинов, сывороточных белков и белков мембраны молочной жировой глобулы, которая в настоящее время основывается на гомологии первичной структуры.

В основу материала, касающегося классификации казеинов и сывороточных белков, положена принятая в 2004 г. «Номенклатура белков коровьего молока (VI издание)» («Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk – Sixth Revision»), подготовленная авторским коллективом во главе с Харольдом М. Фарреллом (мл.) (H.M. Farrell, Jr.).

Раздел, посвященный обзору физико-химических свойств казеинов, истории развития представлений о молекулярной организации основных белков молока, а также моделям строения казеиновой мицеллы, невозможно представить без классических работ H.E. Swaisgood (1982), C. Holt и L. Sawyer (1993), D.S. Horne (1998–2002), D.G. McMahon и W.R. McManus (1998), D.J. McMahon и B.S. Oommen (2008).

Обсуждение структуры и свойств нативных ферментов коровьего молока базируется на ретроспективном обзоре «Эндогенные ферменты молока» («Indigenous enzymes in milk»), опубликованном в 2006 г. P.F. Fox и A.L. Kelly.

Наибольший прогресс в изучении физико-химических характеристик и функций белков мембраны молочной жировой глобулы достигнут на рубеже XX–XXI вв. Результатом интенсивных исследований в данном направлении, проводимых при участии Комитета по номенклатуре, классификации и методологии белков молока (Committee on the Nomenclature, Classification and Methodology of Milk Proteins) и Американской ассоциации исследований в области молочной промышленности (ADSA, American Dairy Science Association), стало опубликование в 2000 г. номенклатуры основных белков мембраны молочной жировой глобулы (автор I.H. Mather), которая нашла отражение в соответствующей главе этой книги.

Автор выражает глубокую признательность:

Белову Александру Николаевичу, взявшему на себя нелегкий труд прочтения чернового варианта рукописи и сделавшему массу ценных критических замечаний в процессе подготовки монографии к печати.

Щербакову Дмитрию Николаевичу, без которого публикация этой книги была бы невозможной.

Ковалю Анатолию Дмитриевичу за поддержку, а также за консультации и важные правки, многие из которых нашли отражение в данной работе.

Глава 1. Номенклатура и свойства казеинов

1.1. Общая характеристика казеинов

Данный раздел посвящен номенклатуре и основным биохимическим свойствам казеинов (CN) коровьего молока. Основное внимание уделено структурным характеристикам основных семейств CN, что является важным для понимания процессов самоорганизации казеиновой мицеллы, механизма сычужного свертывания, а также событий, происходящих после образования сгустка и в период созревания сыра.

Некоторые биохимические свойства CN приведены в таблице 1.

Таблица 1.1

Некоторые биохимические свойства казеинов коровьего молока [1–4]

Название белка (международная аббревиатура)	C ¹⁾ , (г/л)	Генетические варианты ²⁾	ММ ³⁾ , (кДа)	pI	Нф ⁴⁾
αs1-Казеин (αs1-CN)	12-15	B C	23,615 23,542	4,44-4,76 4,97 ⁵⁾	1170 1170
αs2-Казеин (αs2-CN)	3-4	A	25,226	5,23-5,45 ⁵⁾	1111
β-Казеин (β-CN)	9-11	A ¹ A ² B	24,023 23,983 24,092	5,22 ⁵⁾ 4,83-5,07 5,29 ⁵⁾	1322 1335 1326
κ-Казеин (κ-CN)	2-4	A B	19,037 19,006	5,45-5,77 5,30-5,80	1205 1224

1) Концентрация в обезжиренном молоке.

2) Представлены только основные генетические варианты.

3) Молекулярные массы. Получены методом сложения молекулярных масс входящих в состав белка аминокислот. При этом считали, что все кислотные группы протонированы, а все основные группы - не протонированы. Учитывались известные дисульфидные группы. В случае каппа-казеина учтена N-терминальная пироглютаминовая группа.

4) Средняя гидрофобность. Размерность – ккал/аминокислотный остаток. Вычислена на основе данных о свободной энергии переноса одного аминокислотного остатка из органического растворителя в воду [3].

5) По данным [4].

Первое определение казеинов рода *Bos* (настоящие быки – род полорогих парнокопытных, включающий в себя дикий и одомашненный рогатый скот) было дано в отчете Комитета по номенклатуре, классификации и методологии белков молока (Committee on the Nomenclature, Classification and Methodology of Milk Proteins) при Американской ассоциации молочной науки (ADSA, American Dairy Science Association), в 1956 г. [5].

Белки, которые в сыром обезжиренном молоке преципитируют при pH=4,6 и температуре 20 °C, были названы казеинами.

В последующих отчетах Комитета (Nomenclature of the proteins of cow's milk: Fourth revision) казеины классифицировали в соответствии с относительной электрофоретической подвижностью в щелочном полиакриламидном или крахмальном геле в присутствии мочевины и восстанавливающих агентов (например, β-меркаптоэтанола) [6].

Однако в 1984 г. специалисты Комитета рекомендовали отказаться от использования электрофоретических параметров и, положив в основу номенклатуры гомологию первичной структуры (аминокислотной последовательности), разделили эти белки на четыре основных семейства: αs1, αs2, β- и κ-казеины [2]. После того, как данная классификация была одобрена научным сообществом, исследователям рекомендовали воздержаться от присвоения буквенных обозначений специфическим генетическим вариантам казеинов до тех пор, пока не будет установлена их аминокислотная (а.к.) последовательность и степень гомологии с референтными белками семейств.

Основные группы казеинов, а также индивидуальные белки внутри четырех основных семейств могут идентифицироваться методами гель-электрофореза (рис. 1.1), наиболее эффективные из которых рассмотрены в специальной брошюре ADSA [7].

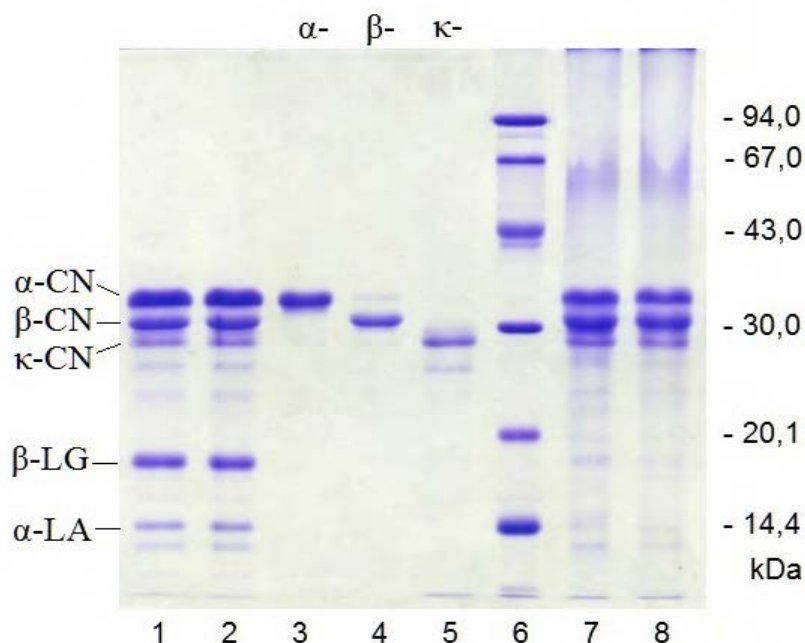


Рис. 1.1. Исследование полипептидного состава коровьего молока и различных фракций казеинов методом электрофореза в полиакриламидном геле, в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Электрофореграмма получена в лаборатории биохимии молока и молочных продуктов отдела СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА (В.В. Ельчанинов, неопубликованные данные). Условные обозначения: 1, 2 – сборное молоко коровы (*Bos taurus*); 3 – α -казеин коровы (Sigma, C6780); 4 – β -казеин коровы (Sigma, C6905); 5 – κ -казеин коровы (Sigma, C0406); 6 – маркеры молекулярных масс; 7 – казеинат-Na (Sigma, C8654); 8 – казеин по Гаммерстену (ч.д.а., РФ). Справа указаны значения молекулярных масс маркеров (LMW-SDS Marker Kit, GE Healthcare). Слева обозначены полосы α -казеина (α -CN), β -казеина (β -CN), κ -казеина (κ -CN), α -лактальбумина (α -LA) и β -лактоглобулина (β -LG)

1.2. α s1-Казеины (α s1-CN)

Семейство α s1-казеинов, на долю которых приходится до 40% от общего содержания фракции казеинов (CN) в коровьем молоке, включает в себя один основной – α s1-CN B-8P – и один минорный компонент – α s1-CN B-9P (расшифровка аббревиатуры: B – означает генетический вариант, индексы -8P и -9P указывают на количество фосфорилированных аминокислотных остатков). Оба белка состоят из одной полипептидной цепи, имеют идентичные аминокислотные последовательности и, как следует из аббревиатуры их названия, различаются только по степени фосфорилирования [8, 9]. Основной компонент имеет восемь фосфорилированных остатков серина в следующих положениях: 46, 48, 64, 66–68, 75, 115. Минорный компонент отличается от основного белка наличием дополнительного фосфорилированного остатка серина в положении 41 [1, 2].

Референтным белком семейства α s1-казеинов считается **α s1-CN B-8P**, – простой белок, не имеющий цистеиновых остатков. Зрелая форма белка состоит из одной полипептидной цепи и 199 а.к. остатков: Asp7, Asn8, Thr5, Ser8, Ser P8, Glu25, Gln14, Pro17, Gly9, Ala9, Val11, Met5, Ile11, Leu17, Tyr10, Phe8, Lys14, His5, Trp2, Arg6. Первичная структура α s1-CN B-8P первоначально была определена методом секвенирования аминокислотной (а.к.) последовательности [8, 9]. Позже первичная структура α s1-CN B-8P была подтверждена секвенированием комплементарной ДНК (кДНК) [10, 11] и геномной ДНК [12].

Большой массив информации о структуре и функциях α 1-CN коровы (*Bos taurus*) и других видов млекопитающих заинтересованный читатель найдет в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=Alpha-S1-casein&sort=score>). Идентификационный номер α 1-CN коровы – P02662 (CASA1_BOVIN) [13].

Референтный белок семейства синтезируется в виде предшественника (рис. 1.2.), который содержит сигнальный пептид, так называемый пре-фрагмент, необходимый для переноса синтезируемого секреторного белка на внутреннюю поверхность мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭР). Сигнальный пептид состоит из 15 аминокислотных (а.к.) остатков и обладает ярко выраженными гидрофобными свойствами, а белок-предшественник – пре- α 1-CN – содержит 214 аминокислот. Еще в процессе трансляции пре-фрагмент синтезируемого на рибосоме белка начинает проталкиваться через мембрану ЭР. После того, как С-конец синтезируемого белка отделяется от рибосомы и проникает внутрь ЭР, сигнальный пептид удаляется при участии специфической протеазы. Вычисленная молекулярная масса (ММ) пре- α 1-CN В-8Р и зрелого белка – α 1-CN В-8Р – составляет соответственно 24,529 и 23,615 кДа [8, 13].

10	20	30	40	50
MKLLILTCLV	AVALARPKHP	IKHQGLPQEV	LNENLLRFFV	APFPEVFGKE
60	70	80	90	100
KVNELSKDIG	SESTEDQAME	DIKQMEAESI	SSSEEIVPNS	VEQKHIQKED
110	120	130	140	150
VPSERYLGYL	EQLLRLKKYK	VPQLEIVPNS	AEERLHSMKE	GIHAQQKEPM
160	170	180	190	200
IGVNQELAYF	YPELFRQFYQ	LDAYPSGAWY	YVPLGTQYTD	APSFSDIPNP
210				
IGSENSEKTT	MPLW			

Рис. 1.2. Первичная структура **пре- α 1-CN В-8Р** [1, 13]. Зеленым фоном выделена последовательность (Met1-Ala15) сигнального пептида (пре-фрагмента), желтым фоном обозначена последовательность α 1-CN В. Бирюзовым цветом отмечены сайты посттрансляционного фосфорилирования (SeP). Остаток Ser41 (нумерация а.к. последовательности, без учета сигнального пептида), выделенный лиловым цветом, указывает локализацию дополнительного сайта фосфорилирования в минорном варианте референтного белка (α 1-CN В-9Р). Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Список идентифицированных генетических вариантов белков семейства α 1-казеинов выглядит следующим образом:

- вариант А выявлен у голштинской, красной голштинской и немецкой красной пород [14,15];
- вариант В – основной вариант *Bos taurus* [1,2];
- вариант С идентифицирован у *Bos indicus* и *Bos grunniens* [1,2];
- вариант D обнаруживается у коров различных генетических линий во Франции [16] и Италии [1], а также у животных джерсейской породы в Голландии [17];
- вариант Е выявлен у *Bos grunniens* [18];
- вариант F идентифицирован у коров немецкой черно-пестрой породы [1,14];
- вариант G, встречается в некоторых линиях итальянской коричневой породы [19,20];
- вариант Н обнаруживается в Африканской популяции *Bos taurus* и *Bos indicus* [21].

Делеции и замены в генетических вариантах семейства α 1-казеинов представлены в таблице 1.2.

Происхождение генетического варианта А является результатом пропуска одного экзона, что, в свою очередь, вызвано точечной мутацией и нарушением сплайсинга пре-мРНК [22]. Делеция аминокислотных остатков 14–26 в генетическом варианте А была установлена при секвенировании аминокислотной последовательности [23] и подтверждена после определе-

ния нуклеотидной последовательности кДНК [24]. Полные первичные последовательности генетических вариантов F и G не установлены.

Таблица 1.2

Различия генетических вариантов α 1-казеина [1]

Зрелый белок (число а.к. остатков)	Генетический вариант	Положение аминокислот					
		14–26	53	51–58	59	66	192
α 1-CN (199)	A	Делеция					Glu
	B*		<i>Ala</i>		<i>Gln</i>	<i>Ser P</i>	<i>Glu</i>
	C						Gly
	D		Thr P				Glu
	E				<i>Lys</i>		Gly
	F					Leu	Glu
	G						Glu
	H			Делеция			Glu

* Референтный белок семейства. Аминокислоты референтного белка выделены курсивом.

Аллель CSN1S1^G, кодирующий генетический вариант G (α 1-CN G), идентифицирован на уровне ДНК методом Саузерн-блота и выявляется с низкой частотой в нескольких итальянских породах крупного рогатого скота (около 0,003 – у коров породы Italian Red Pied, до 0,006 – у породы Reggiana, до 0,016 – у Italian Brown, до 0,055 – у коров породы Sarda и до 0,076 – у представителей породы Bruno Sarda). Этот аллель характеризуется вставкой участка ДНК из 371 пары оснований в 19-м экзоне гена. При электрофорезе в присутствии мочевины белок, экспрессируемый под контролем CSN1S1^G, демонстрирует ту же электрофоретическую подвижность и то же время удерживания (на обращенно-фазовых хроматографических сорбентах), что и референтный белок семейства (α 1-CN B), синтезируемый под контролем аллеля CSN1S1^B. Однако эффективность экспрессии белка под контролем гена CSN1S1^G значительно ниже, чем для аллелей CSN1S1^B и CSN1S1C [19, 20].

Вторичная структура α 1-CN исследована различными методами, включая спектроскопию кругового дихроизма, Раман-спектроскопию и компьютерное моделирование на основе данных о первичной последовательности белка [25]. Пространственная (третичная) структура α 1-казеинов остается изученной крайне поверхностно, так как эти белки не удается получить в кристаллической форме. Исследования методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) также представляются очень проблематичными из-за сильной склонности α 1-казеинов к самоагрегации. Тем не менее, предпринимаются попытки предсказать третичную структуру белков этого семейства на основе моделей вторичной структуры, экспериментальных данных о глобулярных свойствах α 1-казеинов в сочетании с методами математического предсказания, основанными на минимизации свободной энергии молекулы [26].

Необходимо четко представлять, что трехмерные структуры, полученные в результате такого подхода, должны рассматриваться исключительно как рабочие модели, которые хотя и коррелируют с основными физико-химическими свойствами α 1-казеинов, но представляют лишь возможные способы интерпретации их пространственной организации. Так, например, трехмерная модель полноразмерного α 1-казеина (214 а.к. остатков), построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. [27, 28] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P02662>), с достоверностью 70–90% предсказывает структуру только двух спирализованных участков: последовательности, входящей в состав сигнального пептида (Met1-Leu14) и отрезка Leu107-Arg115 (рис. 1.3). Согласно модели Alpha Fold, с учетом того, что последовательность

Met1-Leu14 удаляется вместе с сигнальным пептидом, молекула α s1-CN может содержать четыре коротких спирализованных участка: Glu29-Val40, Glu104-Leu124, Ser130-Ser137, Gln155-Tyr169. При этом основная часть молекулы представлена «неструктурированными» а.к. последовательностями.

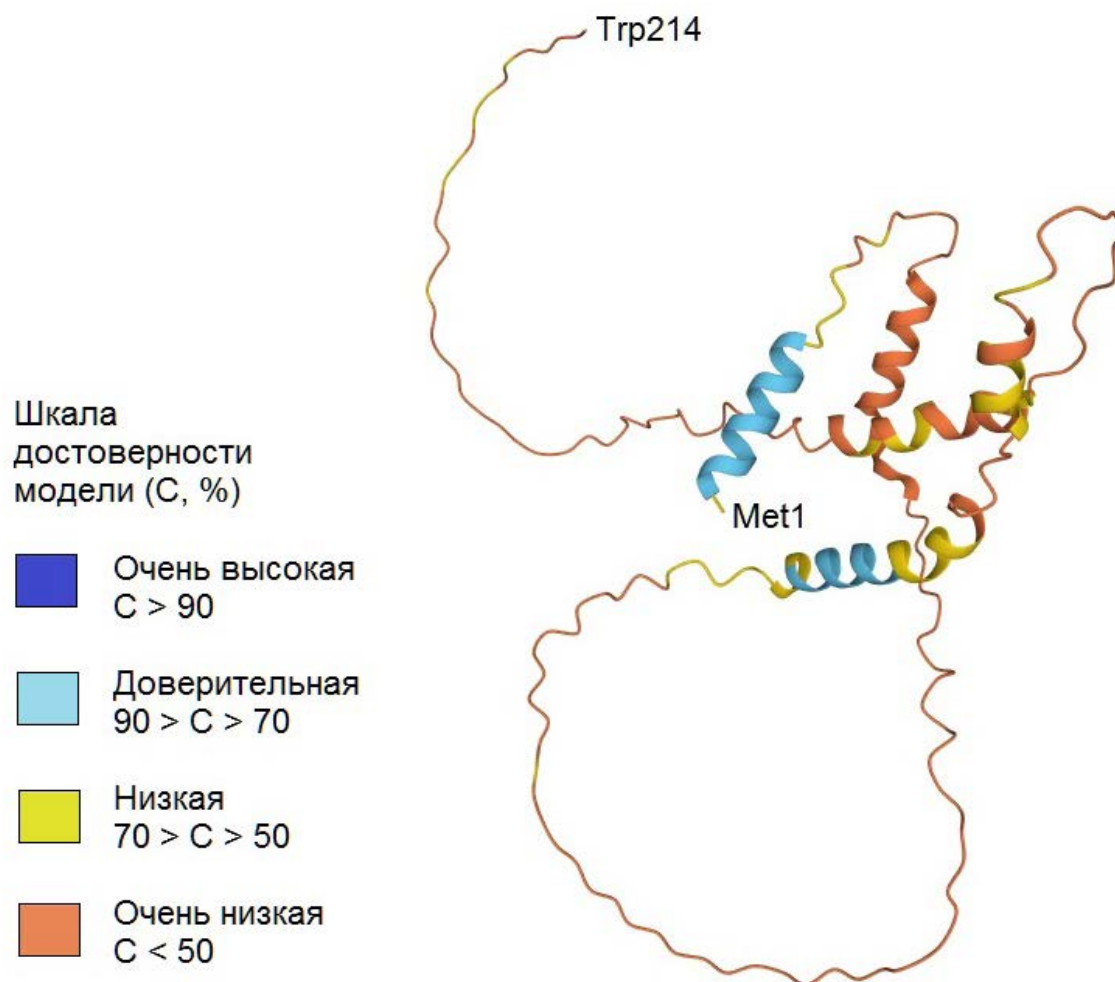


Рис. 1.3. Модель предполагаемой трехмерной структуры полноразмерного (включающего сигнальный пептид) α s1-казеина, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0 [27, 28] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P02662>)

Отсутствие стабильной компактной конформации, способность образовывать гомо- и гетеромерные белковые агрегаты и мицеллы позволяют отнести казеины и, в том числе α s1-казеин, к белкам с нативно-неупорядоченной (нативно-развернутой) структурой. Подробнее об этом – в главе 2 («Структура и свойства казеиновых мицелл»).

С момента открытия генетических вариантов казеинов предпринимаются попытки установить зависимость между характеристиками молока или молочной продуктивностью и генотипом животного [29]. Однако полученные корреляции нельзя считать четкими отчасти потому, что разные авторы используют для этого различные параметры. Например, известно, что фенотип α s1-CN BV коррелирует с повышенной молочной продуктивностью и более высоким суммарным выходом белка в ходе лактации [15, 30, 31], но в то же время в молоке животных данного фенотипа общая концентрация протеинов понижена [32, 33].

Установлено, что в молоке коров, несущих аллель α s1-CN G, продукция α s1-казеинов снижена. Фактически, казеиновая фракция животных, гетерозиготных и гомозиготных по аллелю

CSN1S1G, содержит на $\approx 25\%$ и $\approx 50\%$ меньше $\alpha 1$ -казеина, чем у коров, гомозиготных по аллелям CSN1S1B или CSN1S1C соответственно. Кроме того, концентрация общего казеина в молоке животных, гетерозиготных по аллелю CSN1S1G, уменьшена приблизительно на 6% [19, 20].

Показано, что наличие аллеля CSN1S1G влияет на содержание основных минеральных компонентов молока итальянских коричневых коров из провинции Парма. У особей с генотипами CSN1S1B^{BG} и CSN1S1B^{CG} содержание фосфора в казеиновой фракции было достоверно ниже и составляло 17,6 мг% против 20,2 мг% у животных, несущих аллели CSN1S1^{BB} и CSN1S1BC [19].

Mariani и соавторы исследовали влияние генетического варианта G $\alpha 1$ -казеина на основные параметры сычужного свертывания [34]. В работе использовали индивидуальные образцы молока с пониженным содержанием $\alpha 1$ -CN от коров итальянской коричневой породы, гетерозиготных по аллели G $\alpha 1$ -CN (опытная группа включала 17 животных с генотипом $\alpha 1$ -CN (BG) и две особи с генотипом $\alpha 1$ -CN (CG)). Молоко коров контрольной группы той же породы (16 животных с генотипом $\alpha 1$ -CN (BB) и три – с генотипом $\alpha 1$ -CN (BC)) имело нормальную концентрацию $\alpha 1$ -казеина. Животные контрольной и опытной групп были отобраны из одного стада, содержались в одинаковых условиях, на одном и том же рационе. Молоко коров опытной группы характеризовалось пониженным содержанием общего казеина, пониженной титруемой кислотностью и более высоким относительным содержанием каппа-казеина. Продолжительность сычужного свертывания молока, полученного от коров с низким содержанием $\alpha 1$ -казеина, оказалась на 23% короче, чем в контроле. Плотность сгустка, измеренная через 30 минут после внесения в молоко сычужного фермента, оказалась примерно на 27% выше в опыте, чем в контроле. Проведенные исследования показали, что аллель G $\alpha 1$ -казеина влияет на коагуляционные свойства молока и реологические свойства сгустка [34].

Делеция 13 аминокислот (фрагмент (ф.) 14-26) в генетическом варианте А стала причиной его значительного отличия от остальных белков семейства $\alpha 1$ -казеинов [35], поскольку большинство гидрофобных остатков N-концевого участка молекулы оказались утраченными, включая трипептид Phe-Phe-Val (ф. 23–25), который обычно высвобождается под действием химозина на стадии созревания сыров [36]. Редуцированные гидрофобные свойства $\alpha 1$ -CN А делают его похожим на $\alpha 1$ -казеин, лишенный первых 24 аминокислот на N-концевом участке молекулы, – так называемый $\alpha 1$ -I CN (ф. 25-199), который характеризуется слабыми гидрофобными свойствами [37] и хуже агрегирует в присутствии ионов кальция по сравнению с другими генетическими вариантами семейства $\alpha 1$ -CN [38]. По этой причине при свертывании молока, содержащего вместо $\alpha 1$ -CN В генетический вариант А, наблюдается образование слабого сгустка [39].

Сравнение генетических вариантов В и С показывает, что последний в большей степени склонен к самоассоциации [40, 41], а при выработке сыров из молока, содержащего $\alpha 1$ -CN С, формируются более грубые сгустки [39]. Данный пример является иллюстрацией детерминированности первичной структуры казеинов и их технологических свойств. Из данных, представленных в таблице 2, следует, что единственное отличие первичной структуры вариантов В и С – это замена Glu $\rightarrow$ Gly в положении 192. Известно, что остатки Gly могут располагаться как в гидрофобном окружении, так и на поверхности белка. Кроме того, отсутствие у Gly R-группы делает полипептидную цепь более гибкой, так как наличие объемных боковых остатков мешает возникновению изгибов и складок [42, 43]. Таким образом, единственная замена в молекуле $\alpha 1$ -CN С глутаминовой аминокислоты с анионной R-группой на глицин, у которого R-группа отсутствует, существенно изменяет технологические свойства молока.

Здесь уместно вспомнить хрестоматийный пример с последствиями точечной мутации в молекуле гемоглобина. Единственная аминокислотная замена глутаминовой кислоты

на валин в шестом положении β -цепи гемоглобина приводит к тому, что на поверхности мутантного белка (гемоглобина S) вместо полярного отрицательно заряженного радикала (Glu) оказывается неполярный (гидрофобный) остаток (Val). В результате растворимость дезоксигенированного гемоглобина S значительно снижается. Этот факт лежит в основе всей клинической картины серповидноклеточной анемии, а также ряда физико-химических особенностей эритроцитов, характерных для признака серповидноклеточности [44].

Наблюдаемая обособленность анионных кластеров и гидрофобных участков позволяет предполагать наличие полярных (гидрофильных) и неполярных (гидрофобных) доменов в молекуле α s1-казеинов. Такое предположение хорошо согласуется с экспериментально доказанной зависимостью ассоциации молекул α s1-казеинов от концентрации, pH, ионной силы, а также с характером связывания ионов металлов [25, 45].

Гидрофобные N- и C-терминальные участки (ф. 1-23 и ф. 136-196) альфа-s1-казеина В исследованы в условиях, которые индуцировали или ингибировали образование гомогенных (α s1- α s1) и гетерогенных (α s1- β и α s1- κ) казеиновых самоассоциатов. В частности, изучено влияние широкого диапазона температур (10–70 °C) на конформационные свойства всей молекулы α s1-казеина В и её терминальных участков. Методом динамического молекулярного моделирования показано, что при повышении температуры, конформация C-терминального (ф. 136-196) пептида претерпевает значительные изменения, тогда как структура N-концевого участка (ф. 1-23) термостабильна. Температурная зависимость таких конформационных изменений предполагает возможную функцию альфа-s1-казеина в облегчении (ускорении) казеин-казеиновых взаимодействий в процессе формирования казеиновой мицеллы [46].

Фосфорилированные а.к. остатки α s1-казеинов взаимодействуют не только с ионами кальция. Установлено, что Ca^{2+} -связывающие сайты α s1-CN могут также связывать ионы цинка (Zn^{2+}) [47] и железа (Fe^{3+}) [48], однако влияние этих взаимодействий на структуру и стабильность казеиновой мицеллы не выяснено.

Во всех известных организмах обнаружены шапероны – протеины, способные связываться с другими белками, находящимися в неустойчивом, склонном к агрегации состоянии, и стабилизировать их, обеспечивая сворачивание (фолдинг) полипептидной цепи в «правильную», термодинамически выгодную пространственную структуру [49].

В экспериментах *in vitro* показано, что α s1-CN проявляет шаперонные свойства и предохраняет различные белки и ферменты от тепловой, химической и УФ-агрегации [50]. Отсутствие в молекуле α s1-казеина дисульфидных связей и свободных SH-групп играет важную роль в предотвращении термоагрегации сывороточных белков (α -лактальбумина, β -лактоглобулина и сывороточного альбумина), опосредуемой реакциями тиол-дисульфидного обмена. Альфа-s1-казеин способен взаимодействовать с частично денатурированными белками и предотвращать их агрегирование. Отличительной чертой α s1-CN является способность растворять белковые агрегаты, образовавшиеся за счет гидрофобных взаимодействий. Шаперонные свойства α s1-казеина усиливаются при понижении температуры, что позволяет сравнивать его с белками холодового шока [50].

Первичные последовательности многих белков молока, и в том числе казеинов, несут биологически активные пептиды, которые образуются в результате различных гидролитических реакций [51, 52]. Спектр биологической активности пептидов, освобождающихся при различных вариантах гидролиза казеинов, очень широк.

Пептид израцидин (α s1-CN (ф. 1-23)), образующийся при действии химозина и химотрипсина на α s1-CN, подавляет активность Грам+ бактерий (*Staphylococcus aureus*) и грибов (*Candida albicans*). Введение этого пептида в концентрациях, используемых при инъекциях

стандартных антибиотиков в молочные железы коров и овец, предотвращает заболевание животных маститом [53].

Фрагмент α s1-CN, высвобождаемый под действием пролиновой эндопептидазы, получил название α s1-казокинин-5 (α s1-CN (ф. 23-27)). Альфа-s1-казокинин-5 ингибирует активность фермента, превращающего ангиотензин I в ангиотензин II, и обладает антигипертензивным действием [54].

Фосфопептид α s1-CN (ф. 59-79), который высвобождается при действии трипсина на α s1-CN, «работает» как Ca^{2+} -связывающий и Ca^{2+} -транспортный агент, обладающий, как и фосфопептиды α s2- и β -казеинов, антикариесным действием [55].

Альфа-s1-CN является источником опиоидных пептидов. В отличие от «классических» опиоидных пептидов, таких как эндорфины, происходящих из проэнкефалина, пропиеомеланокортина и продинорфина, пептиды молочного происхождения называются атипичными, или экзоморфными [51]. Альфа-s1-CN экзорфины (фрагменты 90-95, 90-96, 91-96) относятся к опиоидным агонистам [56], а казоксин D (α s1-CN (ф. 158-164)) действует как антагонист «классических» опиоидных пептидов [57].

В сырах типа Cheddar, выработанных из коровьего молока с использованием культуры *Lactobacillus casei* ssp. *casei* 300, обнаружен пептид, идентифицированный как α s1-CN (ф. 80-90). Его синтетический аналог проявляет антиоксидантные свойства, сравнимые с коммерческими химическими антиоксидантами [58].

Из коровьего молозива (полученного сразу после отёла) и переходного молока (собранного через пять дней после родов) выделен пептид, идентифицированный как фрагмент N-терминального участка α s1-казеина – α s1-CN (ф. 16-23), который демонстрирует способность ингибировать апоптоз гранулёзных клеток коровы. В основе антиапоптозного действия α (s1)-CN (ф. 16-23) лежит дозозависимое подавление активности протеолитических ферментов, играющих ключевую роль в процессах воспаления, апоптоза и некроза – каспазы-9 и каспазы-3 [59].

Молоко – первый нутриент в рационе человека и первый источник аллергенов, которые вызывают IgE-опосредованные аллергии в детском возрасте, начиная от желудочно-кишечных, кожных и респираторных проявлений и заканчивая тяжелыми и опасными для жизни проявлениями, такими как анафилаксия. Показано, что IgE-реактивные участки интактного α s1-CN ответственны за IgE-опосредованные симптомы пищевой аллергии на молоко [60]. Аллергией на коровье молоко страдают примерно 2,5% детей в возрасте до двух лет, но в течение первых трех лет жизни около 80% из них становятся клинически толерантными [61].

Альфа-s1-казеин является одним из основных аллергенов молока коровы и, по-видимому, играет важную роль в устойчивой чувствительности к этому продукту. В молекуле α s1-CN были идентифицированы девять IgE-связывающих областей. Две области, связывающие IgE, с а.к. последовательностями 69-78 и 173-194, перекрестно реагировали с сывороткой крови пациентов старше девяти лет, у которых наблюдалась персистирующая аллергия на молоко коровы. Рекомбинантный α s1-CN и пептиды, полученные из натурального α s1-CN, могут быть использованы в клинических исследованиях для изучения механизмов пищевой аллергии, а также для разработки новых диагностических и терапевтических стратегий [60, 61].

Как уже обсуждалось, отсутствие стабильной третичной структуры, склонность к агрегации и мицеллообразованию предполагают связь α s1-CN с классом нативно-неупорядоченных белков. Эти протеины способны связывать биомолекулы за счет гидрофобных взаимодействий. В работе [62] показано, что α s1-казеин тормозит формирование амилоидных структур, связываясь с β -амилоидным пептидом 1-40, который принимает участие в патогенезе болезни Альцгеймера.

1.3. α 2-Казеины (α 2-CN)

Альфа2-казеины составляют до 10% от общей казеиновой фракции молока. Семейство состоит из двух основных и нескольких минорных компонентов, которые различаются по степени посттрансляционного фосфорилирования [25] и количеству внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей [63]. Доминирующие в коровьем молоке формы α 2-казеинов содержат один внутримолекулярный дисульфидный мостик и различаются только по степени фосфорилирования.

Референтным белком семейства является **α 2-CN A-11P**, состоящий из одной полипептидной цепи, с двумя остатками цистеинов и одной дисульфидной связью. Полипептидная цепь α 2-CN A-11P содержит 207 а.к. остатков: Asp4, Asn14, Thr15, Ser6, Ser P11, Glu24, Gln16, Pro10, Gly2, Ala8, Cys2, Val14, Met4, Ile11, Leu13, Tyr12, Phe6, Lys24, His3, Trp2, Arg6. Вычисленная (по а.к. последовательности) молекулярная масса зрелого α 2-CN A-11P составляет 25,226 кДа [1].

Открытая база данных UniProt содержит разнообразную информацию о структуре и функциях α 2-CN коровы и других видов млекопитающих (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=Alpha-S2-casein&sort=score>). Идентификационный номер коровьего α 2-CN – P02663 (CASA2_BOVIN) [64].

Первичная последовательность α 2-CN A-11P первоначально опубликованная G. Brignon и соавторами в 1977 г. [65], впоследствии была уточнена (Glu в положении 87 был заменен на Gln) после секвенирования кДНК [66] и геномной ДНК [67].

Так же, как и α 1-CN, референтный белок семейства синтезируется в виде предшественника – пре- α 2-CN (рис. 1.4). Сигнальный пептид *de novo* синтезированного α 2-CN обладает гидрофобными свойствами и состоит из 15 аминокислотных остатков. Таким образом, пре- α 2-CN содержит 222 аминокислоты, его вычисленная молекулярная масса составляет 26,019 кДа [64].

10	20	30	40	50
MKFFIFTCLL	AVALAKNTME	HVSSSEESII	SQETYKQEK	MAINPSKENL
60	70	80	90	100
CSTFCKEVVR	NANEEEEYSIG	SSSEESA EVA	TEEVKITVDD	KHYQKALNEI
110	120	130	140	150
NQFYQKFPQY	LQYLYQGPIV	LNPWDQVKRN	AVPITPTLNR	EQLSTSEENS
160	170	180	190	200
KKTVDMESTE	VFTKKTKLTE	EEKNRLNFLK	KISQRYQKFA	LPQYLKTVYQ
210	220			
HQKAMKPWIQ	PKTKVIPYVR	YL		

Рис. 1.4. Первичная структура **пре- α 2-CN A-11P** [1, 64]. Зеленым фоном выделена последовательность (Met1-Ala15) сигнального пептида (пре-фрагмента), желтым фоном обозначена последовательность α 2-CN A. Бирюзовым цветом отмечены сайты посттрансляционного фосфорилирования по остаткам серина (SeP). Лиловым цветом отмечен остаток Thr66 (нумерация белка без учета сигнальной последовательности), который фосфорилирован в генетическом варианте С. Остатки Thr, которые идентифицированы как частично фосфорилированные или потенциально могут быть фосфорилированы при участии специфичной CN-киназы, выделены полужирным шрифтом с подчеркиванием. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

В настоящее время идентифицированы четыре генетических варианта α 2-CN: А, В, С, D [1, 2, 5]. При щелочном электрофорезе эти белки мигрируют между α 1- и β -казеинами, а основной компонент – α 2-CN A-11P, – служит маркерной полосой для всех белков, относящихся к казеинам [5].

Различия в а.к. последовательности генетических вариантов α 2-казеинов приведены в таблице 1.3.

Таблица 1.3

Различия в аминокислотной последовательности генетических вариантов α 2-казеина

Зрелый белок (число а.к. остатков)	Генетический вариант	Положение аминокислот			
		33	47	51–59	130
α 2-CN (207)	A*	Glu	<i>Ala</i>		<i>Thr</i>
	B	а.к. последовательность не установлена			
	C	Gly	Thr		Ile
	D			Делеция	

* Референтный белок семейства. Положение аминокислот референтного белка выделено курсивом.

Генетический вариант α 2-CN A преобладает у западно-европейских пород. С частотой 0,01–0,09 ему сопутствует α 2-CN D, который обнаруживается у коров пород Vosgienne и Montbeliarde [68], а также некоторых испанских пород [69]. Вариант α 2-CN B с низкой частотой встречается у южноафриканских зебу, а генетический вариант α 2-CN C характерен для яков, обитающих на территории Непала и Монголии [18, 70].

Из данных, представленных в таблице 1.3, видно, что генетический вариант D отличается от референтного белка – α 2-CN A-11P – делецией 9 аминокислот на участке 51–59. Однако в последовательности геномной ДНК α 2-CN D делеция не выявлена, зато обнаружены нуклеотидные замены. Это позволяет предполагать, что делеция в генетическом варианте D является результатом «перепрыгивания» (skipping) экзона VIII, 27 нуклеотидных остатков которого кодируют аминокислоты в положении 51–59 [71].

Посттрансляционное фосфорилирование в первую очередь остатков серина приводит к включению в молекулы α 2-казеинов от 10 до 13 фосфатных групп. Казеинкиназа (CN-киназа), катализирующая фосфорилирование, специфична по отношению к Ser/Thr в последовательностях Ser/Thr-X-Glu/SerP/Asp, однако наиболее предпочтительной является последовательность Ser-X-Glu/SerP [72].

Другим посттрансляционным событием, характерным для α 2-казеинов, является образование дисульфидных связей. Два консервативных остатка цистеина в молекуле α 2-CN могут образовывать как внутри-, так и межмолекулярные дисульфидные мостики [73, 74]. Преимущественно α 2-казеины находятся в форме мономера (>85%) с внутримолекулярной дисульфидной связью Cys36–Cys40 [74], или образуют димеры как с параллельными, так и с антипараллельными –S–S–связями [73]. Следовательно, существует два варианта димеров: первый – Cys36 и Cys40 одной цепи связаны с одноименными остатками другой полипептидной цепи, второй – Cys36 и Cys40 одной молекулы α 2-казеина связаны, соответственно, с Cys40 и Cys36 другой молекулы. Видимо, для взаимодействия этих белков с другими казеинами способ образования межмолекулярных –S–S–связей не критичен [1].

Вторичная структура α 2-CN исследована методами спектроскопии кругового дихроизма и FTIR-спектроскопии [75]. Изучение третичной структуры α 2-CN сталкивается с теми же проблемами, что и в случае с α 1-CN. Данные компьютерного моделирования с помощью сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. дают лишь фрагментарные представления о пространственной структуре α 2-CN (рис. 1.5). С достоверностью >70% программа предсказывает α -спиральную структуру лишь трех а.к. последовательностей: Phe3-Ala13, Asp90-Phe107, Thr169-Arg185.

По сравнению с другими группами казеинов α 2-CN обладает наиболее сильно выраженными гидрофильными свойствами, которые определяются наличием трех анионных кластеров, образуемых остатками фосфосерила и глутамила. Даже несмотря на относительно

гидрофобные свойства С-терминального участка (а.к. последовательность 160–207) при рН молока он всё же несет положительный заряд (примерно +9,5) [25].

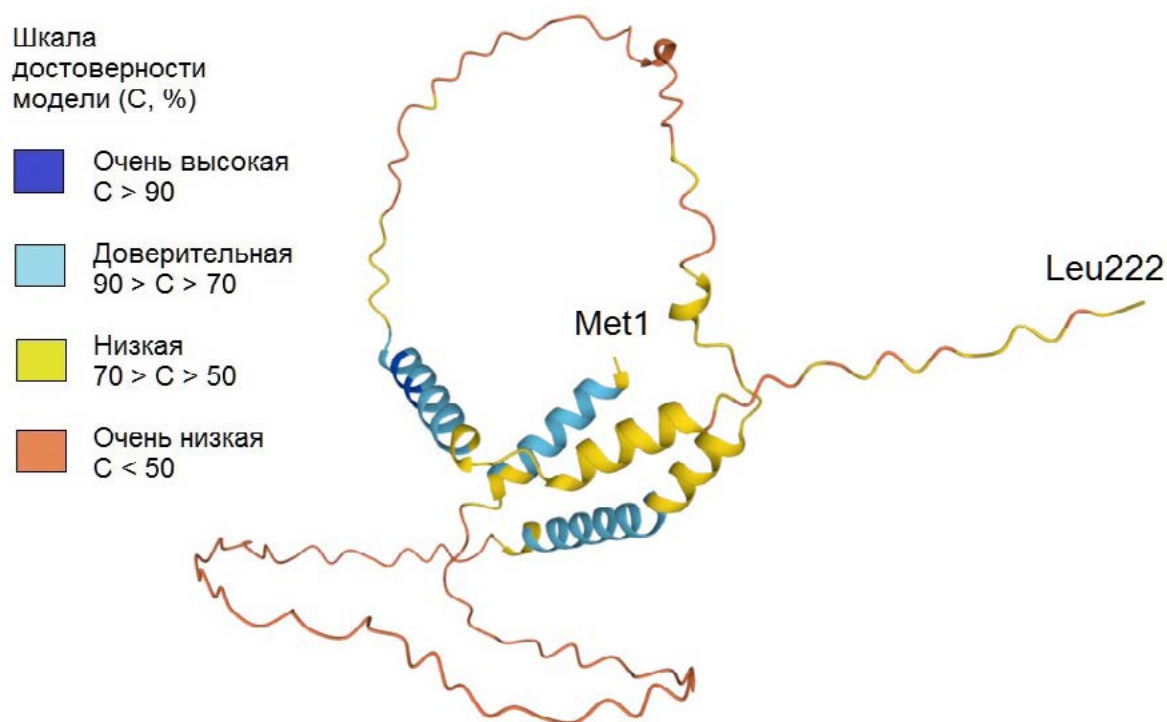


Рис. 1.5. Модель предполагаемой трехмерной структуры полноразмерного (включающего сигнальную последовательность) α 2-казеина, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. [27, 28] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P02663>)

Наиболее гидрофильная N-концевая часть молекулы α 2-CN (последовательность 1–68) содержит два анионных кластера и при физиологических значениях рН молока имеет сильный отрицательный заряд (примерно –21,0) [1]. Таким образом, первичная структура α 2-CN может быть представлена четырьмя доменами: N-терминальный гидрофильный участок с анионными кластерами (1), центральный гидрофобный домен (2), за которым следует гидрофильный отрезок с анионными кластерами (3) и, наконец, С-терминальный гидрофобный домен (4), несущий положительный заряд [25]. Эта структура хорошо согласуется с ассоциативными свойствами α 2-CN, которые сильно зависят от ионной силы [76].

Максимальная способность α 2-казеинов к ассоциации в присутствии NaCl с образованием надмолекулярных комплексов $(\alpha$ 2-CN)_n проявляется при рН 6,7 в растворах с ионной силой (I) около 0,2 М, содержащих 5 мМ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА). При ионной силе раствора ниже или выше этого значения комплексы α 2-CN диссоциируют. В первом случае (при I << 0,2 М) это происходит из-за доминирования сил электростатического отталкивания, а во втором (при I >> 0,2 М) – в силу подавления электростатического притяжения [1].

Гидрофильные свойства и наличие анионных кластеров отражаются и на Ca^{2+} -связывающих свойствах α 2-CN [77]. Так, например, при нейтральном значении рН, α 2-CN полностью преципитирует при 2 мМ Ca^{2+} , тогда как для полного осаждения α 1-CN, при тех же условиях, необходима концентрация Ca^{2+} равная 6 мМ [78]. С учетом этих свойств H.G. Vreeman и J.A.M. van Riel [79] разработали способ отделения α 2-CN от других казеинов методом преципитации из пропанола при низких концентрациях Ca^{2+} . Растворимость в пропанолe зависит от электростатических взаимодействий, которые преобладают в случае α 2-CN.

Альфа-s2-казеины коровьего молока подвергаются протеолизу под действием химозина и плазмина. Химозин наиболее активно гидролизует связь Phe88-Tyr89, но может также атаковать α 2-CN на участке 88–98, который находится в начале центрального гидрофобного домена, и последовательность 164–180, локализованную в первой половине С-терминального домена, обладающего катионными свойствами [80]. Плазмин, проявляющий специфичность к пептидным связям лизина (-Lys-X-), с различной скоростью гидролизует полипептидную цепь α 2-CN в положениях: Lys21, Lys24, Lys149, Lys150, Lys181, Lys188 и Lys 197 [1]. Наиболее активно гидролизуются пептидные связи N-терминального гидрофильного домена – Lys21-Gln22 и Lys24-Asn25. В результате освобождаются пептиды α 2-CN (ф. 1-24) и α 2-CN (ф. 1-21), обладающие сильными анионными свойствами, что определяется наличием последовательности SeP8–SeP9–SeP10 [81, 82]. Кроме того, действие плазмина может приводить к образованию крупных пептидов, таких как α 2-CN (ф. 51–207) [81].

Продукты протеолитической деградации α 2-CN обладают биологической активностью [52]. Так, например, выделенный из молока пептид α 2-CN (ф. 165-203, или казоцидин-I) характеризуется повышенным содержанием основных аминокислотных остатков (10 из 39) и эффективно ингибирует рост *Escherichia coli* и *Staphylococcus carnosus* [83].

1.4. β -Казеины (β -CN)

Бэта-казеины составляют от 38 до 45% от общих казеинов молока [1, 84]. Состав семейства β -CN очень разнороден, что объясняется активностью плазмина в нативном молоке [2]. Протеолитическое действие плазмина приводит к образованию γ_1 - γ_2 - и γ_3 -казеинов, которые являются фрагментами 29–209, 106–209, 108–209 β -CN. Кроме того, полипептиды, ранее называвшиеся протеозо-пептонными компонентами «5», «8-быстрый» и «8-медленный», также являются фрагментами бэта-казеина, – а именно последовательностями: 1–105 или 1–107 («5»), 1–28 («8-быстрый»), 29–105 («8-медленный») [1].

Референтным белком семейства бэта-казеинов считается β -CN A²-5P, состоящий из одной полипептидной цепи, которая не содержит остатков цистеина. Полипептидная цепь β -CN A²-5P состоит из 209 а.к. остатков: Asp4, Asn5, Thr9, Ser11, Ser P5, Glu19, Gln20, Pro35, Gly5, Ala5, Val19, Met6, Ile10, Leu22, Tyr4, Phe9, Lys11, His5, Trp1, Arg4. Вычисленная молекулярная масса составляет 23,983 кДа [1].

В базе данных UniProt размещена информация о первичной последовательности β -CN коровы и других видов млекопитающих (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=beta-casein&sort=score>), а также разнообразные данные о структуре и свойствах этого белка. Идентификационный номер β -CN *Bos taurus* – P02666 (CASP_BOVIN) [88].

Аминокислотная последовательность β -CN A²-5P была установлена в результате секвенирования полипептидной цепи [85], комплементарной ДНК [86,66] и геномной ДНК [87]. Сигнальный пептид состоит из 15 остатков. Полипептидная цепь пре- β -CN состоит из 224 аминокислотных остатков, его ММ составляет 25,107 кДа [88]. Аминокислотная последовательность β -CN A²-5P, принятая VI Номенклатурой белков молока, приведена на рисунке 1.6.

В V Номенклатуре белков молока (1984 г.) было охарактеризовано семь генетических вариантов β -казеина [2]. В дальнейшем были идентифицированы еще три варианта: β -CN F (прежнее название β -CN X) [89], β -CN G [90] и β -CN H [91].

Различия в а.к. последовательности генетических вариантов β -казеинов, входящих в официальную номенклатуру, приведены в таблице 1.4.

Генетический вариант β -CN F, выделенный методом обращенно-фазной высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ), отличается от референтного белка семейства двумя замена-

ми: Pro67→His и Pro152→Leu [89]. В соответствии с международными правилами номенклатуры белков молока варианту F присвоено название β-CN F-5P.

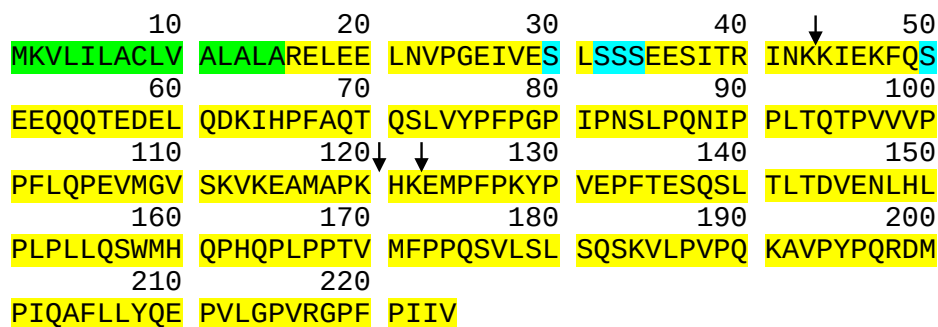


Рис. 1.6. Первичная структура **пре-β-CN A²-5P** [1, 88]. Зеленым фоном выделена последовательность (Met1-Ala15) сигнального пептида (пре-фрагмента), желтым фоном обозначена последовательность β-CN A². Бирюзовым цветом отмечены сайты посттрансляционного фосфорилирования (SeP). Стрелками отмечены пептидные связи гидролизующие плазмином, с образованием фрагментов (γ-казеинов или протеозо-пептонов), обнаруживаемых в нативном молоке животных рода *Bos*. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Аналогично официальное название β-CN G-5P получил охарактеризованный в 1998 г. генетический вариант G, а.к. последовательность которого идентична вариантам A¹ и F, за исключением одной замены, – Pro138→Leu [90].

Таблица 1.4

Различия в аминокислотной последовательности генетических вариантов β-казеина

Положение аминокислот	Генетические варианты β-CN (209)											
	A ¹	A ^{2*}	A ³	B	C	D	E	F	G	H ¹	H ²	I
18		<i>SerP</i>				Lys						
25		<i>Arg</i>								Cys		
35		<i>SerP</i>			Ser							
36		<i>Glu</i>					Lys					
37		<i>Glu</i>			Lys							
67	His	<i>Pro</i>		His	His			His	His			
72		<i>Gln</i>									Glu	
88		<i>Leu</i>								Ile		
93		<i>Met</i>									Leu	Leu
106		<i>His</i>	Gln									
122		<i>Ser</i>		Arg								
137		<i>Leu</i>										
138		<i>Pro</i>							Leu			
152		<i>Pro</i>						Leu				
γ**		<i>Gln</i>									Glu	

* Референтный белок семейства. Положение аминокислот референтного белка выделено курсивом.

** Замена Gln→Glu на участке 114–169.

В 2000 г. S.K. Нап и соавторы [91] дали характеристику генетического варианта H, который по сравнению с референтным белком имеет две аминокислотные замены: Arg25→Cys, Leu88→Ile. По странному стечению обстоятельств открытый двумя годами позже группой D. Senosq и соавторов очередной генетически вариант β-CN также получил название H; его

отличие от референтного β -CN A²-5P: Gln72→Glu, Met93→Leu, а также Gln→Glu на участке 114–169 [92]. Чтобы разрешить это противоречие, белок, открытый группой Han и соавторов, получил название H¹, а вариант, охарактеризованный группой D. Senosq и соавторов – H² [1].

Последний генетический вариант этой группы – β -CN I, обнаруженный в 2002 г. у европейских пород коров, имеет, по сравнению с референтным белком, одну аминокислотную замену – Met93→Leu [93].

Кроме того, E.R. Chung и соавторы в 1995 г. [94], используя только метод электрофореза, обнаружили в молоке коров, распространенных на территории Кореи, генетический вариант A⁴; отличие его аминокислотной последовательности от референтного белка не определено [1], поэтому данный белок не входит в официальную номенклатуру.

Бэта-казеины проявляют наиболее сильные гидрофобные свойства по сравнению со всеми другими белками молока [1]. N-терминальный отрезок молекулы β -CN богат заряженными аминокислотными остатками, он же несет четыре фосфорилированных кластера, расположенных почти друг за другом. Напротив, вторая половина первичной последовательности β -CN изобилует нейтральными и гидрофобными R-группами (см. рис. 1.6). Такое распределение гидрофильных и гидрофобных остатков придает молекуле амфипатичные (амфифильные) свойства [84]. Расчеты показывают, что при pH 6,6 фрагмент 1–21 β -казеина должен иметь отрицательный заряд, около –11,5, тогда как при этих же условиях C-терминальный участок 190–209 – электронейтрален [1]. Таким образом, распределение электрического заряда в молекуле β -CN носит необычный характер: на 21 аминокислотном остатке N-терминального участка сосредоточено примерно 30% суммарного заряда белка, а 19 остатков на C-терминальном отрезке (190–209) на 75% состоит из гидрофобных R-групп.

В растворе молекулы бэта-казеина агрегируют с образованием мицелл (радиус вращения 7,3–13,5 нм), в состав которых может входить от 15 до 60 молекул белка [95]. Критическая концентрация мицеллообразования β -CN, в зависимости от температуры, pH и ионной силы раствора, составляет 0,5–2,0 мг/мл. При низких температурах β -CN находится в форме мономеров с радиусом Стокса 3,7 нм и радиусом вращения 4,6 нм [84].

По данным K. Kajiwaга и соавторов, бэта-казеин существует в мономерной форме только при температуре +5 °C [96], что также может быть связано с насыщенностью C-терминального участка молекулы гидрофобными аминокислотными остатками. Сильными гидрофобными свойствами можно объяснить и такое явление, как высвобождение β -CN из казеиновых мицелл при снижении температуры [97]. Физико-химические параметры бэта-казеина позволяют предполагать, что его молекула гидратирована (6–8 г H₂O/г белка), имеет вытянутую форму и очень подвижную структуру [84].

Исследование трехмерной структуры β -CN методом рентгеновской кристаллографии на сегодняшний день представляется проблематичным из-за сильной и малоизученной зависимости от микроокружения, а также ярко выраженного стремления этих белков к самоассоциации, не позволяющего получить пригодные для исследования кристаллы [1]. Бэта-казеины – яркий пример белков, которые не только не поддаются кристаллизации [98], но и не могут быть отнесены к какой-либо группе гомологичных кристаллизуемых белков [99]. Тем не менее предпринимаются усилия по созданию компьютерных трехмерных моделей β -CN с использованием метода минимизации свободной энергии [100].

Даже попытки установления вторичной структуры β -CN на основании Фурье-преобразований данных различных спектроскопических методов (инфракрасной спектроскопии, Раман-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма) дают слишком противоречивые результаты. По данным разных авторов, вторичная структура β -CN может содержать 7–29%

α -спирали, 0–34% β -структур и 4–80% нерегулярных структур [101–106]. Необходимо также учитывать, что около 17% аминокислот β -CN составляет пролин (Pro) [84], который полностью исключает образование в своём локусе как α -спирали, так и β -структуры [107] и способствует формированию открытой (не компактной) вторичной и, следовательно, более рыхлой третичной структуры [108]. В пользу некомпактной третичной организации говорит и отсутствие в β -CN внутримолекулярных дисульфидных связей, стабилизирующих пространственную структуру белков.

Возможная модель пространственной структуры β -CN, построенная при помощи сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. [27, 28] представлена на рисунке 1.7.

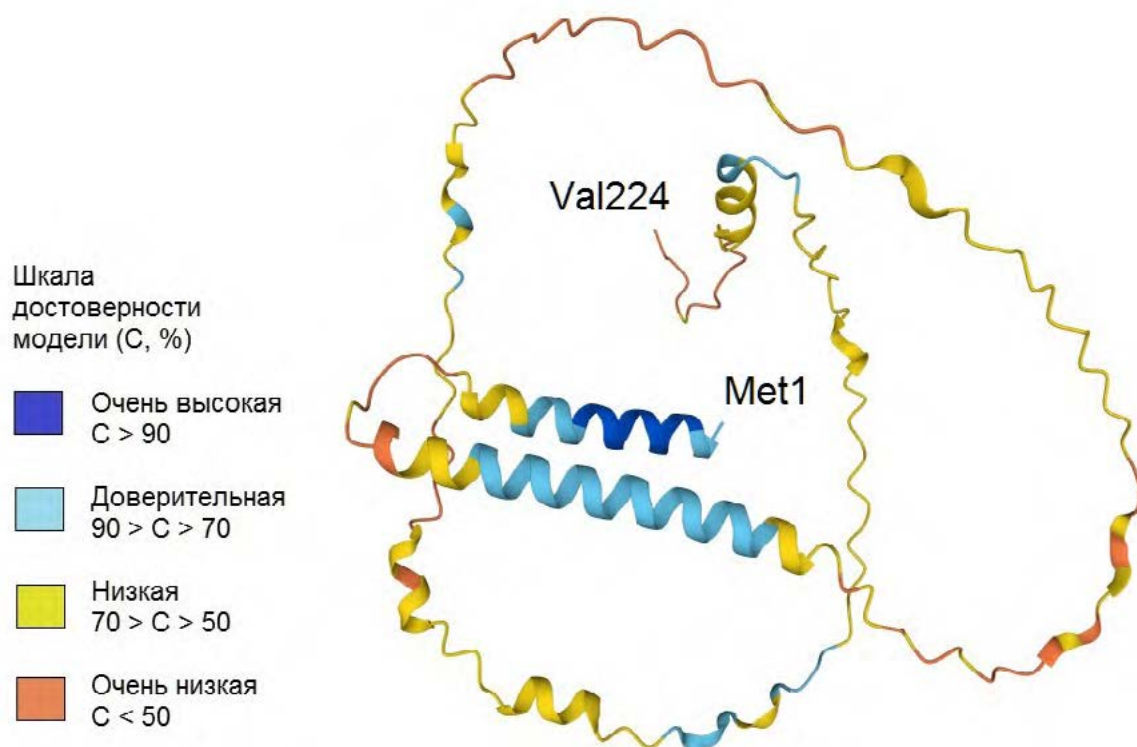


Рис. 1.7. Модель предполагаемой трехмерной структуры полноразмерного (включающего сигнальную последовательность) β -CN, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. [27, 28] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P02666>)

Сервис уверенно предсказывает спиральную структуру двух фрагментов N-концевого участка молекулы: Met1-Leu21, включающего в себя сигнальный пептид (Met1-Ala15), достаточно протяженной последовательности Leu31-Asp62. Достоверность структуры остальных участков β -CN низка и не превышает 70%.

Высказывалось предположение, что трехмерная организация казеинов молока представляет собой «расплавленную глобулу» (molten globule) – состояние, при котором вторичная структура полностью сформирована а полипептидная цепь свернута в глобулу, но компактная третичная организация при этом отсутствует [101].

Поскольку в случае β -CN мы имеем дело с более жесткой, но менее компактной структурой, чем «расплавленная глобула», уместнее говорить о реоморфных (греч. *rheos* – поток, *morphe* – форма) свойствах этого белка [109–111].

Реоморфными называются белки, полипептидная цепь которых в нативном состоянии представлена чередующимися отрезками небольшой протяженности с жесткими элементами вторичной структуры (например, спираль типа поли (L-пролин) II [110]) и более подвижными,

гибкими участками, что позволяет молекуле легко трансформироваться, «перетекая» из одного энергетически выгодного состояния в другое, в зависимости от микроокружения и под влиянием внешних воздействий [95].

Как и большинство секреторных белков, синтезируемых рибосомами, связанными с ЭР, бэта-казеины могут быть гликозилированы. Обычно гликопротеины содержат одну или несколько олигосахаридных групп, присоединенных к аспарагину (Asn), серину (Ser) треонину (Thr) O- или N-гликозидными связями [112].

В 1996 г. с использованием методов сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР) была получена молекула β -CN с аминокислотной заменой Pro67→Ser67 [113]. Полученный белок стал первым искусственным генетическим вариантом β -CN. Аминокислотная замена получила название «сигнал гликозилирования», а Ser67 обозначили как сайт потенциального гликозилирования. Несмотря на то, что новый белок не существует в природе, а является результатом вмешательства человека, принципы номенклатуры казеинов распространяются и на него. В соответствии с этими принципами искусственный генетический вариант получил название β -CN A¹ Pro67Ser67.

Бэта-казеин является источником пептидов, обладающих различными биологическими свойствами [52]. Пептид β -казокинин-7 (β -CN (ф. 177-183)) ингибирует ангиотензин-преобразующий фермент и наряду с антигипертензивным пептидом (β -CN (ф. 169-174)) обладает гипотензивным действием [54, 114]. Синтетический пептид β -казокинин-10 (β -CN (ф. 193-202)) проявляет антимикробные и иммуномодулирующие (+/-) свойства [115].

Из водных экстрактов сыра типа Чеддар выделен и очищен от примесей (чистота > 98%) фрагмент 193–209 бэта-казеина (β -CN (ф. 193-209)) [116, 117]. Описательный органолептический анализ установил, что этот пептид имеет горький вкус, и не ассоциируется с другими вкусовыми оттенками; при увеличении концентрации β -CN (ф. 193-209) горький вкус усиливается. Молекулярная масса пептида – 1882,5 Да. Относительное содержание β -CN (ф. 193-209) в молоке и сыре составило 0,06 и 0,63% соответственно. Предполагается, что такой порок сыра, как горький вкус, возникающий, в частности, при использовании молокосвертывающего препарата с высокой неспецифической протеолитической активностью, обусловлен накоплением β -CN (ф. 193-209) [116]. Не исключено, что β -CN (ф. 193-209) может использоваться в качестве молекулярного маркера для оценки степени деградации β -CN при контроле качества молочной продукции, исследовании динамики процессов «протеолитического созревания» сыров и изучении неспецифической протеолитической активности молокосвертывающих ферментов для сыроделия.

1.5. κ -Казеины (κ -CN)

Семейство каппа-казеинов состоит из одного основного, не гликозилированного компонента, и по меньшей мере шести минорных белков, которые различаются по степени фосфорилирования и гликозилирования [118–122].

Выделенный из коровьего молока κ -CN представляет собой смесь дисульфидно-связанных полипептидов, от димеров до октамеров и выше [123]. При гель-фильтрации на Superdex 75 каппа-казеин, даже при очень низких концентрациях (около 0,1 мг/мл), ведет себя как агрегированный белок с молекулярной массой > 100 кДа [124]. Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН), а также исследования с использованием различных физических методов, позволяют говорить о том, что в нативном виде κ -CN существует в форме белковых ассоциатов, стабилизированных за счет ковалентных и нековалентных связей [123, 125]. Нагревание препаратов нативного κ -CN вызывает его агрегацию за счет реакций обмена между свободными сульфгид-

дрильными группами и дисульфидными связями [126]. Восстановление SH-групп и S-карбоксии метилирование к-CN приводит к образованию амилоидных (фибриллярных) структур [101].

Референтным белком семейства считается к-CN A-1P, состоящий из одной полипептидной цепи (рис. 1.8). Полипептидная цепь к-CN A-1P состоит из 169 а.к. остатков: Asp4, Asn8, Thr15, Ser12, Ser P1, PyroGlu1, Glu12, Gln14, Pro20, Gly2, Ala14, Cys2, Val11, Met2, Ile12, Leu8, Tyr9, Phe4, Lys9, His3, Trp1, Arg5. Вычисленная молекулярная масса составляет 19,037 кДа [1, 127].

10	20	*	30	40	50
MMKSFFLVVT	ILALTLPLFLG	AQEQNQEPI	RCEKDERFFS	DKIAKYIPIQ	
60	70	80	90	100	
YVLSRYPSYG	LNYYQQKPVA	LINNQFLPYP	YYAKPAAVRS	PAQILQWQVL	
110	120	↓ 130	140	150	
SNTVPAKSCQ	AQPTTMAHP	HPHLSFMAIP	PKKNQDKTEI	PTINTIASGE	
160	170	180	190		
PTSTPTTEAV	ESTVATLEDS	PEVIESPPEI	NTVQVTSTAV		

Рис. 1.8. Первичная структура **пре-к-CN A-1P** [1, 127, 128]. Зеленым фоном выделена последовательность сигнального пептида (Met1-Ala21), желтым фоном обозначена последовательность к-CN A-1P. Бирюзовым цветом отмечен сайт посттрансляционного фосфорилирования (SeP). Гликозилируемые в минорных вариантах к-CN а.к. остатки Thr121, Thr131, Thr133, Thr135, Thr136, Thr142, Thr165 и сайт потенциального гликозилирования – Ser141 (нумерация последовательности зрелого к-CN) – обозначены лиловым цветом. Остаток пироглютамата в положении 22 отмечен звездочкой (*). Стрелкой указана пептидная связь Phe-Met, гидролизруемая химозином. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

На сайте открытой базы данных UniProt размещена информация о первичной последовательности к-CN коровы и других видов млекопитающих (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=kappa-casein&sort=score>), а также данные о структуре и свойствах этого белка. Идентификационный номер к-CN коровы – P02668 (CASK_BOVIN) [128].

Существование N-терминального пироглютамилового остатка в зрелом нативном белке является спорным, так как циклизация может происходить в процессе его выделения и очистки [129]. Первичная последовательность к-CN A-1P подтверждена определением белковой аминокислотной последовательности, а также секвенированием кДНК и геномной ДНК [10, 130]. Сигнальный пептид референтного белка состоит из 21 аминокислотного остатка, полная последовательность пре-к-CN A-1P включает 190 а.к. остатков, его молекулярная масса составляет 21,269 кДа [128].

Основной, *de novo* синтезированный компонент всех генетических вариантов к-CN (около 50% всех вариантов данного протеина) не несет карбогидратных остатков, но его посттрансляционная модификация приводит к образованию множества минорных разновидностей, которые являются мультигликозилированными и/или мультифосфорилированными формами основного белка [1].

Методом хроматографии на DEAE-целлюлозе H.J. Vreeman и соавторы разделили к-CN на семь фракций: основную – не гликозилированную, содержащую один остаток фосфорной кислоты на молекулу белка, и шесть минорных компонентов, различающихся по степени гликозилирования и фосфорилирования [121, 131]. Другая группа исследователей, также на DEAE-целлюлозе, получила четыре основных и два минорных компонента к-CN. Все шесть фракций содержали по одному остатку фосфата на молекулу белка и различались по степени гликозилирования, самая большая из полученных фракций была лишена карбогидратов [122].

Различия в аминокислотной последовательности генетических вариантов к-казеинов приведены в таблице 1.5.

Таблица 1.5

Различия в аминокислотной последовательности генетических вариантов κ-казеина

Белок (число а.к. остатков)	Генетический вариант	Положение аминокислот						
		10	97	104	135	136	148	155
κ-CN (169)	A*	<i>Arg</i>	<i>Arg</i>	<i>Ser</i>	<i>Thr</i>	<i>Thr</i>	<i>Asp</i>	<i>Ser</i>
	B					Ile	Ala	
	C		His					
	E							Gly
	F¹						Val	
	F²	His				Ile	Ala	
	G¹		Cys			Ile	Ala	
	G²						Ala	
	H					Ile		
	I			Ala				
	J					Ile	Ala	Arg

* Референтный белок семейства. Положение аминокислот референтного белка выделено курсивом.

Два основных генетических варианта κ-CN – А и В – идентифицированы в 1964 году [132, 133]. Каппа-казеин В отличается от варианта А двумя заменами: Thr136→Ile и Asp148→Ala [127]. Генетический вариант А является основным для всех пород коров, кроме джерсийской [134–136]. При щелочном электрофорезе в присутствии β-меркаптоэтанола и мочевины оба варианта образуют несколько полос, при этом вариант А демонстрирует более высокую электрофоретическую подвижность [87, 95].

Кроме κ-CN А-1Р и В-1Р, известно еще девять генетических вариантов (табл. 1.5). Варианты С и Е охарактеризованы после расщепления пептидных связей метионина (Met) с помощью бромциана и последующего автоматического секвенирования полученных полипептидов [137]. Вариант С отличается от референтного белка А-1Р одной заменой: Arg97→His, а вариант Е – заменой Ser155→Glu [1]. Первичная структура генетического варианта С подтверждена методом ПЦР [138].

Первоначально литера D была присвоена варианту κ-CN, охарактеризованному лишь методом электрофореза в полиакриламидном геле, но вскоре выяснилось, что он идентичен варианту С [139]. Неправильная идентификация κ-CN D в очередной раз подчеркнула необходимость обязательного установления аминокислотной последовательности при описании нового генетического варианта.

Каппа-казеин F найден в молоке зебу, черной и гибридной белой пород коров [140].

Методом ПЦР была выявлена замена одного нуклеотида в последовательности, кодирующей Thr145, что не приводило к изменению аминокислотной последовательности, в силу вырожденности генетического кода, а вот замена одного нуклеотида, кодирующего Asp148, приводила к включению вместо Asp в положении 148 – валина (Val). Генетический вариант с заменой Asp148→Val получил номенклатурное название F¹, так как в 1996 г. Е. М. Prinzenberg и соавторы [141] описали аналогичный F¹ и варианту В белок, но с аминокислотной заменой Arg10→His, который назвали генетическим вариантом F².

Следующему генетическому варианту κ-CN, выявленному с использованием метода изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) у коров альпийской породы, была присвоена литера G [142]. Наличие в κ-CN G точечной мутации, которая вызывала замену Arg97→Cys, подтвержде-

на ПЦР [1]. Однако и этот вариант пришлось переименовать в G¹, так как почти одновременно в молоке яков (*Bos grunniens*) был идентифицирован генетический вариант κ-CN, который также обозначили как вариант G. Этот белок отличался от референтного κ-CN A-1P заменой Asp148→Ala и был назван генетическим вариантом G².

Основанием для присвоения верхних индексов вариантам каппа-казеинов стало открытие в 1999 г. у коров породы Принзгауэр очередного генетического варианта – κ-CN H [144]. Вариант H – это результат мутации генетического варианта A, которая привела к замене Thr135→Ile. Так совпало, что первичная структура κ-CN H оказалась идентичной генетическому варианту κ-CN, обнаруженному группой F. Grosclaude и соавторов еще в 1974 г. в молоке зебу (прежнее название κ-CN A-Zebu) [145].

Группа под руководством Е.М. Prinzenberg охарактеризовала вариант κ-CN I, который отличается от референтного белка (κ-CN A) заменой Ser104→Ala [144].

И, наконец, из молока *Bos taurus* был выделен и охарактеризован вариант κ-CN J, который появился в результате мутации варианта κ-CN B, путем замены Ser155→Arg [21].

Пептидная связь Phe105-Met106 в молекуле каппа-казеина с высокой скоростью и специфичностью гидролизуется химозином – аспартатной гастричной эндопептидазой (EC 3.4.23.4) [1]. Продуктами гидролиза являются пара-κ-CN (ф. 1-105, нумерация зрелого белка) и CN-макропептид (ф. 106-169, нумерация зрелого белка) или гликомакропептид.

В литературе имеются сообщения о том, что пара-κ-CN обнаруживается в препаратах очищенного каппа-казеина [121, 122, 131]. Это может быть следствием ограниченного посттрансляционного протеолиза. Однако для того, чтобы сделать окончательный вывод о том, что пара-κ-CN является естественным компонентом молока, а не появляется в результате хранения или в ходе выделения κ-CN, необходимы дополнительные исследования [1].

Интересно отметить, что аминокислотные замены в восьми генетических вариантах из одиннадцати локализованы на участке гликомакропептида, относительно удаленном от пептидной связи, гидролизуемой химозином. Эти мутации расположены на отрезке последовательности 136–155 (нумерация зрелого белка) и приходятся на вытянутую C-концевую часть молекулы, которая до момента атаки химозина (или другого молокозвертывающего фермента), выступает в роли физического препятствия для сближения казеиновых мицелл. Небольшие, относительно нейтральные изменения в этой части последовательности не вносят заметного вклада в процесс сычужного свертывания молока.

В этом аспекте также интересны изменения, которые приходятся на участок пара-κ-CN в генетических вариантах C, F² и G¹. Так, замена основной, несущей положительный заряд, аминокислоты на аналогичную (Arg10→His) в варианте F² не приводит к изменению заряда, следовательно, почти не влияет на функциональные свойства молекулы.

S. Visser и соавторы [146] показали, что последовательность His98-Lys111 в молекуле каппа-казеина отвечает за способность химозина гидролизовать пептидную связь Phe105-Met106. G.L. Gilliland и соавторы подтверждают эти данные и указывают, что положительно заряженные остатки His98, His100 и His102 взаимодействуют с отрицательно заряженными остатками Glu288, Asp279 и Asp280 химозина, расположенными на расстоянии 20–25 аминокислотных остатков от активного центра фермента [147]. Считается, что Arg97 за счет протонируемой R-группы также влияет на эффективность связывания химозина с мицеллой казеина [1]. По аналогии с вариантом F² замена Arg97→His в варианте κ-CN C почти не меняет его физико-химические свойства.

Гораздо серьезнее выглядит замена Arg97 на Cys в генетическом варианте G¹. Во-первых, сайт теряет положительный заряд, что может сказаться на эффективности связывания хими-

зина. Во-вторых, несущий свободную SH-группу цистеин может влиять на структуру казеиновой мицеллы за счет формирования необычных дисульфидных связей, расположенных вблизи места гидролитической атаки химозина. Логично было бы предположить, что изменения свойств мицеллы казеина или скорости сычужной коагуляции в результате замены Arg97→Cys в генетическом варианте G¹ могли бы быть компенсированы наличием у той же породы коров генетического варианта химозина, толерантного к данной замене. Однако автору данной монографии не удалось обнаружить информацию о генетических вариантах химозина у коров альпийских пород, несущих вариант κ-CN G¹.

Главной функцией каппа-казеина является стабилизация казеиновой мицеллы. Выполнению этой функции способствует то, что гидрофобные участки κ-казеина погружены во внешний слой мицеллы, а гидрофильные экспонированы наружу [111, 148–150], создавая электростатический и стерический барьерный слой на самой поверхности мицеллы. Кроме того, что κ-CN играет роль интерфейса между гидрофобными и Ca²⁺-чувствительными участками α- и β-казеинов и водным (сывороточным) окружением казеиновой мицеллы, он также участвует в реакциях тиол-дисульфидного обмена с сывороточными белками в процессе тепловой обработки молока [148, 150].

Приобретение предками млекопитающих способности вырабатывать молоко лежит в основе эволюции этой группы животных. Казеиновые мицеллы молока являются первичным источником аминокислот и фосфата кальция – важнейших компонентов питания новорожденных особей. Исследования последних лет показывают, что каппа-казеин играет существенную роль в физиологии репродукции, лактации и вскармливания млекопитающих. Для изучения роли каппа-казеина в процессе лактации была создана и исследована линия мышей, лишенная гена каппа-казеина (Csnk(-/-)). Мутация не влияла на способность самок продуцировать другие группы казеинов. Самки мышей (Csnk(-/-)) не вскармливали детенышей, так как оказались не способными к лактации из-за дестабилизации мицелл казеина в протоках молочных желез [151].

Традиционные методы исследования трехмерной структуры (рентгеноструктурный анализ) не применимы к каппа-казеину из-за невозможности получить ни сам белок, ни его фрагменты в кристаллической форме [152]. Поэтому для характеристики пространственной организации κ-казеина используются такие методы, как спектроскопия кругового дихроизма [152–155] и ЯМР [152, 156] в сочетании с приемами математического моделирования и предсказания третичной структуры белков [153, 155].

В частности, установлено, что структура гликомакропептидного участка не изменяется после гидролиза связи Phe105-Met106 [156]. На основе анализа первичной структуры и данных, полученных спектральными методами, предсказывается, что α-спирализованные участки в молекуле κ-CN составляют 10–14%, бэта-складки – 30–31%, а неупорядоченные (хаотично упакованные) – около 33% аминокислотной последовательности [153–155, 105]. При этом предполагается, что спиральные участки ассоциированы с гликомакропептидной последовательностью, а складчатые структуры характерны для пара-κ-казеина [152, 155, 157]. Более поздние данные указывают на то, что основными элементами структуры κ-казеина являются спираль типа поли(L-пролин) II (PPII) и β-складчатая структура, характерная для фибриллярных белков, что придает ему реоморфные свойства [110].

Предполагаемая пространственная структура каппа-казеина, смоделированная при помощи сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. [27, 28], представлена на рисунке 1.9. Как и в случае с другими казеинами, фактически Alpha Fold Monomer достаточно уверенно предсказывает только спиральную структуру сигнального пептида (Met1-Ala21), а также трех коротких последовательностей: Pro91-Gln98, His121-His123, Glu175-Pro177.

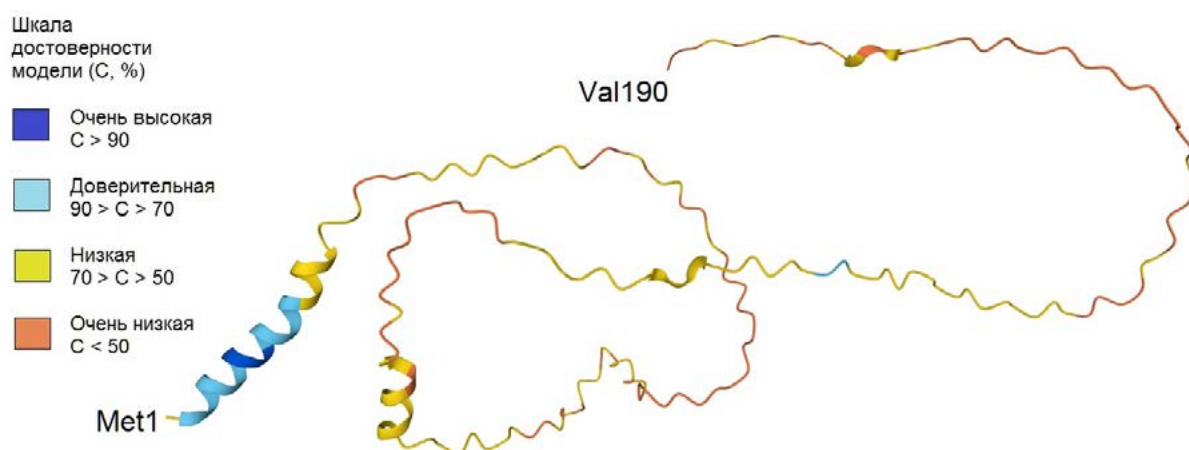


Рис. 1.9. Модель предполагаемой трехмерной структуры полноразмерного (включающего пре-пептид) κ-CN, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0 [27, 28] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P02668>)

Наряду с другими белками молока, каппа-казеин служит источником биологически активных пептидов [52]. Пептид казоплателин (κ-CN (ф. 106-116)) проявляет антитромботические свойства, ингибируя АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов и связывание λ-цепи фибриногена человека со специфическим рецептором на поверхности тромбоцитов [158]. Агрегационные свойства тромбоцитов подавляют казопиастрин (κ-CN (ф. 106-110)), казеинмакропептид (κ-CN (ф. 106-169)) и κ-CN (ф. 103-111) [158-160]. При обработке трипсином из κ-казеина высвобождается казоксин С (κ-CN (ф. 25-34)), подавляющий функцию эндорфинов [161].

Сразу несколько научных коллективов исследовали структуру карбогидратных остатков (мотивов) CN-макропептида (κ-CN (ф. 106-169) [162-169]. В результате охарактеризовано пять вариантов гликозильных остатков (табл. 1.6). Из представленных данных можно сделать вывод о том, что структуры №3, №4, №5 являются преобладающими. D. Molle' и J. Le'onil [170] охарактеризовали распределение сахаридных остатков в молекуле κ-CN А методом ВЭЖХ в сочетании с одним из вариантов масс-спектрометрии (Electrospray Ionization Mass Spectrometry – EIMS). Они обнаружили смесь гликозилированных и нефосфорилированных форм, а также мультифосфорилированных форм (1P – 78%, 2P – 20%, 3P – 2%) – всего 18 компонентов, являющихся результатом посттрансляционной модификации κ-CN А. Было подтверждено наличие всех вариантов полисахаридных остатков, охарактеризованных ранее T. Saito и T. Itoh [169], кроме моносахарида №1 (табл. 1.6).

Таблица 1.6

Структура, содержание и молекулярная масса
карбогидратных остатков CN-макропептида [162-169]

Номер варианта	Структура карбогидратного остатка	Относительное содержание (%)	Молекулярная масса (Да)
1	GalNAc	0,8	221,2
2	Gal β (1→3) GalNAc	6,3	383,3
3	NeuAc α(2→3) Gal β(1→3)	18,4	674,6
4	NeuAc α ↓(2→6) Gal β (1→3) GalNAc	18,5	674,6
5	NeuAc α ↓(2→6) NeuAc α(2→3) Gal β (1→3) GalNAc	56,0	965,6

Основными сайтами гликозилирования κ-CN являются остатки треонина (табл. 1.7). Первыми были идентифицированными Thr131, Thr133 и Thr135, связанные с олигосахаридами через О-гликозидные связи [163, 164, 166, 171]. Очевидно, что на степень гликозилирования генетических вариантов будут влиять аминокислотные замены. Если олигосахарид присоединен к Thr135 в молекуле κ-CN А-1Р, то в генетическом варианте В этот сайт не будет гликозилирован в силу замены Thr135→Ile.

Таблица 1.7

Результаты исследования сайтов
потенциального О-гликозилирования CN-макропептида

Сайт потенциального гликозилирования	Средняя степень гликозилирования (расчеты взяты из работы [121])	Литературный источник
Thr121	≤ 10%	174
Thr131	от 40 до 100%	164–166, 171, 174, 175
Thr133	от 10 до 80%	164, 167, 171, 174, 175
Thr135	Нет данных	171, 175
Thr136	≤ 10%	171, 174
Thr142	от 50 до 100%	174, 175
Thr165	От 0 до 100%	174
Ser141	Остатки сахаров не обнаружены	175

Имеющиеся данные о том, что пара-κ-CN несет остатки моносахаридов [172, 173] являются объектом дискуссии, так как моногликозилированные формы белков могут быть артефактами [170, 174].

По сравнению с молоком карбогидраты каппа-казеинов, выделенных из молозива, имеют более сложное строение и варибельный состав [2]. Однако и в каппа-казеинах молозива основными сайтами гликозилирования являются Thr131, Thr133 и Thr135 [119, 127, 174, 176].

Еще раз отметим, что основной компонент любого генетического варианта κ-CN не гликозилирован; следовательно, различия между минорными компонентами могут отражать специфику конкретного образца молока, и не последнюю роль в этом играет генетическая вариация [170, 174].

Высокая степень гетерогенности минорных компонентов κ-CN не позволяет считать классификацию этого семейства законченной. Поэтому авторы VI Номенклатуры белков молока (2004) предлагают использовать комбинированный подход при дальнейшей классификации κ-CN. Идентификацию основных (не гликозилированных) генетических вариантов предлагается по-прежнему проводить на основе гомологии первичной аминокислотной последовательности, а минорным, посттрансляционно-модифицированным фракциям присваивать порядковые номера либо на основании их электрофоретической подвижности (щелочные гели, в присутствии мочевины), либо в зависимости от степени их связывания с анионообменными хроматографическими носителями в присутствии β-меркапто этанола [1]. Например, обозначив не гликозилированный, основной генетический вариант κ-CN А-1Р как κ-1, все последующие электрофоретические полосы (или хроматографические фракции) обозначать, соответственно, как κ-1, κ-2, κ-3 и т.д. Именно такой подход наметился в настоящее время при формировании номенклатуры κ-CN.

Библиографический список к главе 1

1. Farrell, Jr., H.M. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk – Sixth Revision / H.M. Farrell Jr., R. Jimenes-Flores, G.T. Bleck, E.M. Brown, J.E. Butler, L.K. Creamer, C.L. Hicks, C.M. Hollar, K.F. Ng-Kwai-Hang, H.E. Swaisgood // J. Dairy Sci. – 2004. – V. 87. – P. 1641–1674.

2. Eigel, W.N. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision / W.N. Eigel, J.E. Butler, C.A. Ernstrom, H.M. Farrell, Jr., V.R. Harwalkar, R. Jenness, R.M. Whitney // J. Dairy Sci. – 1984. – V. 67. – P. 1599–1631.
3. Bigelow, C.C. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure / C.C. Bigelow // J. Theoret. Biol. – 1967. – V. 16. – P. 187–211.
4. Swaisgood, H.E. SYMPOSIUM: GENETIC PERSPECTIVES ON MILK PROTEINS: COMPARATIVE STUDIES AND NOMENCLATURE. Review and Update of Casein Chemistry / H.E. Swaisgood // J. Dairy Sci. – 1993. – V. 76. – P. 3054–3061.
5. Jenness, R. Nomenclature of the proteins of bovine milk / R. Jenness, B.L. Larson, T.L. McMeekin, A.M. Swanson, C.H. Whitnah, R.M. Whitney // J. Dairy Sci. – 1956. – V. 39. – P. 536–541.
6. Whitney, R.M. Nomenclature of the proteins of cow's milk: Fourth revision / R.M. Whitney, J.R. Brunner, K.E. Ebner, H.M. Farrell, Jr., R.V. Josephson, C.V. Morr, H.E. Swaisgood // J. Dairy Sci. – 1976. – V. 59. – P. 795–815.
7. Methods of Gel Electrophoresis of Milk Proteins / H.E. Swaisgood, B.L. Larson, E.B. Kalan et. al.; Am. Dairy Sci. Assoc., Champaign, IL, 1975. – 122 p.
8. Mercier, J.-C. Structure primaire de la caseine α 1 bovine. Sequence complete / J.-C. Mercier, F. Grosclaude, B. Ribadeau-Dumas // Eur. J. Biochem. – 1971. – V. 23. – P. 41–51.
9. Grosclaude, F. Structure primaire de la caseine α 1- et de la caseine β -bovine / F. Grosclaude, M.F. Mahe, B. Ribadeau-Dumas // Eur. J. Biochem. – 1973. – V. 40. – P. 323–324.
10. Stewart, A.F. Neucleotide sequence of bovine α 1- and κ -casein cDNA's / A.F. Stewart, M. Wills, A. G. Mackinlay // Nucleic Acid Res. – 1984. – V. 12. – P. 3895–3907.
11. Nagao, M. Isolation and sequence analysis of bovine α 1 - casein cDNA clone / M. Nagao, M. Maki, R. Sasaki, H. Chiba // Agric. Biol. Chem. – 1984. – V. 48. – P. 1663–1667.
12. Koczan, D. Genomic organization of the bovine α 1 -casein gene / D. Koczan, G. Hobom, H.-M. Seyfert // Nucleic Acids Res. – 1991. – V. 19. – P. 5591–5596.
13. UniProt KB – P02662 (CASA1_BOVIN) – открытая база данных последовательностей белков. Alpha-S1-casein. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02662> (дата обращения: 16.01.2022).
14. Erhardt, G. A new α 1-casein allele in bovine milk and its occurrence in different breeds / G. Erhardt // Anim. Genet. – 1993. – V. 24. – P. 65–66.
15. Ng-Kwai-Hang, K. F. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle / K.F. Ng-Kwai-Hang, J.F. Hayes, J.E. Moxley, H.G. Monardes // J. Dairy Sci. – 1984. – V. 67. – P. 835–840.
16. Grosclaude, F. Le polymorphisme genetique des principales lactoproteines bovines. Relations avec la quantite, la composition et les aptitudes fromageres du lait / F. Grosclaude // INRA Prod. Anim. – 1988. – V. 1. – P. 5–17.
17. Corradini, C. Distribution of the genetic variants α 1-, β -, and κ -caseins in milk from Jersey cows in The Netherlands / C. Corradini // Neth. Milk Dairy J. – 1969. – N 23. – P. 79–82.
18. Grosclaude, F. Polymorphisme des lactoproteines de bovines Nepalais. Polymorphisme des caseine α 2-mineurs / F. Grosclaude, M.F. Mahe., J.-C. Mercier, J. Bonnemaire, J.H. Teissier // Ann. Genet. Sel. Evol. – 1976. – N 8. – P. 461–479.
19. Malacarne, M. Effect of the CSN1S1G allele on milk mineral composition in Italian Brown dairy cows / M. Malacarne, A. Summer, P. Franceschi, A. Sabbioni, A. Rando, P. Mariani // Milchwissenschaft. – 2004. – №9/10. – P. 467–470.
20. Mariani, P. Effects of the α 1-CN G allele on the percentage distribution of caseins α 1-, α 2-, β -, and κ - in Italian Brown cows / P. Mariani, A. Summer, A. Anghinetti, C. Senese, P. Di Gregorio, P. Rando, P. Serventi // Ind. Latte. – 1995. – V. 31. – P. 3–13.

21. Mahe, M.F. Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations characterization of variants α s1-Cn H and κ -Cn J / M. F. Mahe, G. Miranda, R. Queral, A. Bado, P. Souvenir-Zafidrajaona, F. Grosclaude // Genet. Sel. Evol.– 1999. – V. 31. – P. 239–253.
22. Mohr, U. A single point mutation results in A allele-specific exon skipping in the bovine α s1-casein mRNA / U. Mohr, D. Koczan, D. Linder, G. Hobom, G. Erhardt // Gene. – 1994. – V. 143. – P. 187–192.
23. Grosclaude, F. The localization of a deletion of 13 amino acids differentiating variant A from variants B and C of bovine α s1-casein in the N-terminal part / F. Grosclaude, M.F. Mahe., J.-C. Mercier, B. Ribadeau-Dumas // FEBS Lett. – 1970. – V. 11. – P. 109–112.
24. McKnight, R.A. Cloning and sequencing of a complimentary deoxyribonucleic acid coding for a bovine α s1-casein A from mammary tissue of a homozygous B variant cow / R.A. McKnight, R. Jimenez-Flores, Y. Kang, L.K. Creamer, T. Richardson // J. Dairy Sci. – 1989. – V. 72. – P. 2464–2473.
25. Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins. Chemistry of the caseins / H.E. Swaisgood.; P.F. Fox, ed. – New York, NY: Elsevier Applied Science, 1992. – P. 63–110.
26. Kumosinski, T.F. An energy minimized three dimensional working model for casein submicelles / T.F. Kumosinski, G. King, H.M. Farrell, Jr. // J. Prot. Chem. – 1994. – V. 13. – P. 681–700.
27. Varadi, M. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models / M. Varadi, S. Anyango, M. Deshpande, S. Nair, C. Natassia, G. Yordanova, D. Yuan, O. Stroe, G. Wood, A. Laydon, A. Židek, T. Green, K. Tunyasuvunakool, S. Petersen, J. Jumper, E. Clancy, R. Green, A.Vora, M. Lutfi, M. Figurnov, A. Cowie, N. Hobbs, P. Kohli, G. Kleywegt, E. Birney, D. Hassabis, S. Velankar // Nucleic Acids Research. – 2022. – V. 50. – Iss. D1. – P. D439–D444;
28. Jumper, J. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis // Nature. – 2021. – V. 596. – P. 583–589
29. Ilkonen, T. Genetic and Phenotypic Correlations Between Milk Coagulation Properties, Milk Production Traits, Somatic Cell Count, Casein Content, and pH of Milk / T. Ilkonen, S. Morri, A.-M. Tyriseva, O. Ruottinen, M. Ojala // J. Dairy Sci. – 2004. – V. 87. – P. 458–467.
30. Aleandri, R. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability / R. Aleandri, L.G. Buttazzoni, J.C. Schneider, A. Caroli, R. Davoli // J. Dairy Sci. – 1990. – V. 73. – P. 241–255.
31. Sang, B.C. Association of genetic variants of milk proteins with lactation traits in Holstein cows / B.C. Sang, B.S. Ahn, B.D. Sang, Y.Y. Cho, A. Djajanegara // 7th AAAP Anim. Sci. Congr. Proc. – 1994. – P. 217–211.
32. Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins. Genetic polymorphism of milk proteins / K.F. Ng-Kwai-Hang, F. Grosclaude.; P.F. Fox, ed. – New York, NY: Elsevier Applied Science, 1992. – P. 405–455.
33. Ng-Kwai-Hang, K.F. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Hoistein-Friesian cows / K.F. Ng-Kwai-Hang, J.F. Hayes, J.E. Moxley, H.G. Monardes // J. Dairy Sci. – 1986. – V. 69. – P. 22–26.
34. Mariani, B.P. Effects of the CSN1A(G) allele on the clotting time of cow milk and on the rheological properties of rennet-curd. / B.P. Mariani, A.Summer, P.D. Di Gregorio, A. Randoe, E. Fossa, M.J. Pecorari // J. Dairy Res. – 2001. – V. 68. – N 1. – P. 63–70.

35. Farrell, H. M., Jr. Calcium-induced associations of the caseins: A thermodynamic linkage approach to precipitation and resolubilization / H.M. Farrell, Jr., T.F. Kumonsinski, P. Pulaski, M.P. Thompson // Arch. Biochem. Biophys. – 1988. – V. 265. – P. 146–158.
36. Mulvihill, D.M., Proteolytic specificity of chymosin on bovine α s1-I casein / D.M. Mulvihill, P. F. Fox // J. Dairy Res. – 1979. – V. 46. – P. 641–651.
37. Creamer, L. K. Surface hydrophobicity of α s1-I, α s1- casein A and B and its implications in cheese structure / L.K. Creamer, H.F. Zoerb, N.F. Olson, T. Richardson // J. Dairy Sci. – 1982. – V. 65. – P. 902–906.
38. Kaminogawa, S. Calcium insensitivity and other properties of α s1-I casein / S. Kaminogawa, K. Yamauchi, C.-H. Yoon // J. Dairy Sci. – 1980. – V. 63. – P. 223–227.
39. Sadler, A. Acid production and curd toughness in milks of different α s1-casein types / A.M. Sadler, C.A. Kiddy, R.E. McCann, W.A. Mattingly // J. Dairy Sci. – 1968. – V. 51. – P. 28–35.
40. Schmidt, D.G. Differences between the association of the genetic variants B, C and D of α s1-casein / D.G. Schmidt // Biochim. Biophys. Acta. – 1970. – V. 221. – P. 140–142.
41. Swaisgood, H.E. The caseins / H.E. Swaisgood // CRC Crit. Rev. Food Technol. – 1973. – N3. – P. 375–414.
42. Уайт, А. Основы биохимии : в 3 т. Т 1 / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман. – М. : Мир, 1981. – С. 101–110.
43. Practical handbook of biochemistry and molecular biology: Handbook, manual; G.D. Fasman, ed. – Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc, 1990. – P. 4–68.
44. Страйер, Л. Биохимия. В 3 т. Т 1./ Л. Страйер. – М. : Мир, 1984. – С. 93–100.
45. Developments in Dairy Chemistry-1: Proteins. Chemistry of milk proteins / H.E. Swaisgood.; P.F. Fox, ed. – New York, NY: Applied Science Publishers, 1982. P. 1–59.
46. Malin, E.L. Contributions of terminal peptides to the associative behavior of alpha s1-casein / E.L. Malin, E.M. Brown, E.D. Wickham, H.M. Farrell, Jr // J. Dairy Sci. 2005. – V. 88(7). – P. 2318–2328.
47. Singh, H. Binding of zinc to bovine and human milk proteins / H. Singh, A. Flynn, P.F. Fox // J. Dairy Res. – 1989. – V. 56. – P. 235–248.
48. Reddy, M.I. Binding of Fe(III) to bovine α s1-casein (Abstr.) / M.I. Reddy, A.W. Mahoney // J. Dairy Sci. – 1991. – V. 74 (Suppl. 1): D58.
49. Биохимия: учебник / Т.Л. Алейникова, Л.В. Авдеева, Л.Е. Андрианова и др.; под ред. С.Е. Северина. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 784 с.
50. Bhattacharyya, J. Molecular Chaperone-like Properties of an Unfolded Protein, α _s-Casein / J. Bhattacharyya, K.P. Das // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – N 22. – P. 15505–15509.
51. Clare, D.A. Bioactive milk peptides: A Prospectus / D.A. Clare, H.E. Swaisgood // J. Dairy Sci. – 2000. – V. 83. – P. 1187–1195.
52. Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides / R.J. FitzGerald, H. Meisel.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney. ed. – New York / Boston / Dordrecht / London / Moscow: KLUWER ACADEMIC / PLENUM PUBLISHERS, 2003. – P. 675–698.
53. Lahov, E. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides / E. Lahov, W. Regelson // Food Chem. Toxicol. – 1996. – V. 34. – P. 131–145.
54. Maruyama, S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats / S. Maryuama, K. Nakagomi, N. Tomizuka, H. Suzuki // Agric. Biol. Chem. – 1985. – V. 49. – P. 1405–1409.
55. Reynolds, E. The prevention of sub-surface demineralization of bovine enamel and change in plaque composition by casein in an intra-oral model / E. Reynolds // J. Dental Res. – 1987. – V. 66. – P. 1120–1127.

56. Loukas, L. Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins / L. Loukas, D. Varoucha, C. Zioudrou, R.A. Straty, W.A. Klee // *Biochemistry*. – 1983. – V. 22. – P. 4567–4573.
57. β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments. Casoxin D, an opioid antagonist ileum-contracting/vasorelaxing peptide derived from human α s1-casein / Yoshikawa, M., F. Tani, H. Shiota, H. Suganuma, H. Usui, K. Kurahashi, H. Chiba; V. Brantl, H. Teschemacher, eds. – Germany: VCH-Weinheim, 1994. – P. 43–48.
58. Gupta, A. Identification of antioxidant peptides in Cheddar cheese made with adjunct culture *Lactobacillus casei* ssp. *Casei* 300 / A. Gupta, B. Mann, R. Kumar, R. Sangwan // *Milchwissenschaft*. – 2010. – V. 65(4). – P. 396–399.
59. Shimizu, T. A naturally occurring α (s1)-casein-derived peptide in bovine milk inhibits apoptosis of granulosa cells induced by serum-free conditions / T. Shimizu, K. Ganzorig, A. Miyamoto, T. Ishii, T. Urashima, K. Fukuda // *J. Pept. Sci.* – 2014. – V. 20(3). – P. 229–234.
60. Schulmeister, U. Cloning, expression, and mapping of allergenic determinants of alphaS1-casein, a major cow's milk allergen / U. Schulmeister, H. Hochwallner, I. Swoboda, M. Focke-Tejkl, B. Geller, M. Nystrand, A. Härlin, J. Thalhamer, S. Scheiblhofer, W. Keller, B. Niggemann, S. Quirce, C. Ebner, A. Mari, G. Pauli, U. Herz, R. Valenta, S. Spitzauer // *J. Immunol.* – 2009. – V. 182(11). – P. 7019–7029.
61. Chatchatee, P. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy / P. Chatchatee, K.M. Järvinen, L. Bardina, K. Beyer, H.A. Sampson // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2001. – V. 107(2). – P. 379–383.
62. Carrotta, R. Inhibiting effect of α (s1)-casein on A β (1–40) fibrillogenesis / R. Carrotta, C. Canale, A. Diaspro, A. Trapani, P.L. San Biagio, D. Bulone // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2012. – V. 1820(2). – P. 124–32.
63. Rasmussen, L.K. Localization of two interchain disulfide bridges in dimers of bovine α s2-casein / L.K. Rasmussen, P. Hojrup, T.E. Petersen // *Eur. J. Biochem.* – 1992. – V. 203. – P. 381–386.
64. UniProt KB – P02663 (CASA2_BOVIN) – открытая база данных последовательностей белков. Alpha-S2-casein. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02663> (дата обращения: 28.01.2022).
65. Brignon, G. The complete amino acid sequence of bovine α s2-casein / G. Brignon, B. Ribadeau-Dumas, J.-C. Mercier, J.-P. Pelissier, B.C. Das // *FEBS Lett.* – 1977. – N 76. – P. 274–279.
66. Stewart, A.F. Complete nucleotide sequences of bovine α s2- and β -casein cDNAs: Comparisons with related sequences in other species / A.F. Stewart, J. Bonsing, C.W. Beattie, F. Shah, I.M. Willis, A.G. Mackinlay // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – V. 4. – P. 231–241.
67. Groenen, M.A. M. The complete sequence of the gene encoding bovine α s2-casein / M.A.M. Groenen, R. E. M. Dijkhof, A. J. M. Verstege, J.J. van der Poel // *Gene*. – 1993. – V. 123. – P. 187–193.
68. Grosclaude, F. Polymorphisme de la caseine α s2 bovine: Etroite liaison du locus α s2-Cn avec les loci α s1-Cn, β -Cn et κ -Cn; mise en évidence d'une deletion dans le variant α s2-Cn D / F. Grosclaude, P. Joudrier, M.F. Mahe // *Ann. Genet. Sel. Anim.* – 1978. – V. 10. – P. 313–327.
69. Osta, R.A. MnlI polymorphism at the bovine α s2-casein gene / R. Osta, S. Marcos, C. Rodellar // *Anim. Genet.* – 1995. – V. 26. – P. 213.
70. Grosclaude, F. Note sur le polymorphisme genetique des lactoproteines de bovins et de yaks Mongols / F. Grosclaude, M.F. Mahe, J.P. Accolas // *Ann. Genet. Sel. Anim.* – 1982. – V. 14. – P. 545–550.
71. Bouniol, C. Bovine α s2-casein D is generated by exon VIII skipping / C. Bouniol, C. Printz, J.-C. Mercier // *Gene*. – 1993. – V. 128. – P. 289–293.
72. Mercier, J.-C. Phosphorylation of the caseins, present evidence for an amino acid triplet code post-translationally recognized by specific kinases / J.-C. Mercier // *Biochimie*. – 1981. – V. 63. – P. 1–17.

73. Rasmussen, L.K. Localization of two interchain disulfide bridges in dimers of bovine α 2-casein / L.K. Rasmussen, P. Hojrup, T.E. Petersen // *Eur. J. Biochem.* – 1992. – V. 203. – P. 381–386.
74. Rasmussen, L.K. Disulphide arrangement in bovine caseins: Localization of intrachain disulphide bridges in monomers of κ - and α 2-casein from bovine milk / L.K. Rasmussen, P. Hojrup, T.E. Petersen // *J. Dairy Res.* – 1994. – V. 61. – P. 485–493.
75. Hoagland, P.D. Secondary structure of bovine α 2-casein: Theoretical and experimental approaches / P.D. Hoagland, J. Unruh, E.D. Wickham, H.M. Farrell, Jr. // *J. Dairy Sci.* – 2001. – V. 84. – P. 1944–1949.
76. Snoeren, T.H.M. Some physicochemical properties of bovine α 2-casein / T.H.M. Snoeren, B. van Markwijk, R. van Montfort // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – V. 622. – P. 268–276.
77. Toma, S.J. Calcium sensitivity and molecular weight of α 2-casein / S.J. Toma, S. Nakai // *J. Dairy Sci.* – 1973. – V. 56. – P. 1559–1562.
78. Aoki, T. Role of phosphate groups in the calcium sensitivity of α 2-casein / T. Aoki, K. Toyooka, Y. Kako // *J. Dairy Sci.* – 1985. – V. 68. – P. 1624–1629.
79. Vreeman, H.J. The large-scale isolation of α 2-casein from bovine casein / H.J. Vreeman, J.A.M. van Riel // *Neth Milk Dairy J.* – 1990. – V. 44. – P. 43–48.
80. McSweeney, P.L.H. Proteolysis of bovine α 2-casein by chymosin / P.L.H. McSweeney, N.F. Olson, P.F. Fox, A. Healy // *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* – 1994. – V. 119. – P. 429–432.
81. Le Bars, D. Specificity of plasmin towards bovine α 2-casein / D. Le Bars, J.-C. Gripon // *J. Dairy Res.* – 1989. – V. 56. – P. 817–821.
82. Visser, S. Specificity of bovine plasmin in its action on bovine α 2-casein / S. Visser, C. J. Slangen, A.C. Alting, H.J. Vreeman // *Milchwissenschaft.* – 1989. – V. 44. – P. 335–339.
83. Zucht, H.D. Casocidin-I: a casein- α 2 derived peptide exhibits antibacterial activity / H.D. Zucht, M. Raida, K. Adermann, H.J. Magert, W.G. Forssmann // *FEBS Lett.* – 1995. – V. 372. – P. 185–188.
84. *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, part A, Proteins. 3rd ed. Chemistry of the caseins.* / H.E. Swaisgood; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. – New York, NY: Kluwer Academic/Plenum, 2003. – P. 139–202.
85. Ribadeau Dumas, B. Structure primaire de la casein β bovine / B. Ribadeau-Dumas, G. Brignon, F. Grosclaude, J.-C. Mercier // *Eur. J. Biochem.* – 1972. – V. 25. – P. 505–514.
86. Jimenez-Flores, R. Cloning and sequence analysis of bovine β -casein cDNA / R. Jimenez-Flores, Y.C. Kang, T. Richardson // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1987. – V. 142. – P. 617–621.
87. Bonsing, J. Complete nucleotide sequence of the bovine β -casein gene / J. Bonsing, J.M. Ring, A.F. Stewart, A.G. Mackinlay // *Aust. J. Biol. Sci.* – 1988. – V. 41. – P. 527–537.
88. UniProt KB – P02666 (CASB_BOVIN) – открытая база данных последовательностей белков. Beta-casein. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02666> (дата обращения: 31.01.2022).
89. Visser, S. Identification of a new genetic variant of bovine β -casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis / S. Visser, C.J. Slangen, F.M. Lagerwerf, W.D. Vandongen, J. Haverkamp // *J. Chromat. A.* – 1995. – V. 711. – P. 141–150.
90. Dong, C. Characterization of a nonelectrophoretic genetic variant of β -casein by peptide mapping and mass spectroscopic analysis / C. Dong, K.F. Ng-Kwai-Hang // *Int. Dairy J.* – 1998. – V. 8. – P. 967–972.
91. Han, S.K. Biochemical, molecular and physiological characterization of a new β -casein variant detected in Korean cattle / S.K. Han, Y.C. Shin, H.D. Byun // *Anim. Gent.* – 2000. – V. 31. – P. 49–51.
92. Senocq, D. A new bovine β -casein genetic variant characterized by a Met93→Leu93 substitution in the sequence A2 / D. Senocq, D. Molle, S. Pochet, J. Le. onil, D. Dupont, D. Levieux // *Lait.* – 2002. – V. 82. – P. 171–180.

93. Jann, O. A new variant in exon VII of the bovine β -casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds / O. Jann, G. Ceriotti, A. Caroli, G. Erhardt // *J. Anim. Breed. Genet.* – 2002. – V. 119. – P. 65–68.
94. Chung, E.R. Milk protein polymorphisms as genetic markers in Korean native cattle / E.R. Chung, S.K. Han, T.J. Rhim // *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* – 1995. – V. 8. – P. 187–194.
95. Livney, Y.D. A study of β -casein tertiary structure by intramolecular crosslinking and mass spectrometry / Y.D. Livney, A.L. Schwan, D.G. Dalgleish // *J. Dairy Sci.* – 2004. – V. 87. – P. 3638–3647.
96. Kajiwara, K. Micellar structure of β -casein observed by smallangle x-ray scattering. / K. Kajiwara, R. Niki, H. Urakawa, Y. Hiragi, N. Donkai, M. Nagura // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – V. 955. – P. 128–134.
97. Aoki, T. Relation between colloidal calcium phosphate cross-linkage and release of β -casein from bovine casein micelles on cooling / T. Aoki, N. Yamada, Y. Kako // *Agric. Biol. Chem.* – 1990. – V. 54. – P. 2287–2292.
98. Food Proteins and Their Applications. Structure-function relationships of caseins / D.G. Dalgleish; S. Damodaran, A. Paraf, ed. – New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 1997. – P. 199–223.
99. Farrell, H.M., Jr., Bovine caseins: Three-dimensional molecular modeling / H.M. Farrell, Jr., E.M. Brown, T.F. Kumosinski // *Proc. 23rd Int. Dairy Congr.*, Montreal, Quebec, Canada. – 1990. – V. 2. – P. 1526–1533.
100. Kumosinski, T.F. Three dimensional molecular modeling of bovine caseins: an energy minimized β -casein structure / T.F. Kumosinski, E.M. Brown, H.M. Farrell, Jr. // *J. Dairy Sci.* – 1993. – V. 76. – P. 931–945.
101. Farrell, H.M., Jr. Molten globule structures in milk proteins: Implications for potential new structure-function relationships / H.M. Farrell, Jr., P.X. Qi, E.M. Brown, P.H. Cooke, M.H. Tunick, E.D. Wickham, J.J. Unruh // *J. Dairy Sci.* – 2002. – V. 85. – P. 459–471.
102. Creamer, L.K. Secondary structure of α 1- and β -caseins in solution / L.K. Creamer, T. Richardson, D.A.D. Parry // *Arch. Biochem. Biophys.* S1. – 1981. – V. 211. – P. 689–696.
103. Farrell, Jr, H.M. Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of (casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization / H.M. Farrell, Jr., E.D. Wickham, J.J. Unruh, P.X. Qi, P.D. Hoagland // *Food Hydrocolloids.* – 2001. – V. 15. – P. 341–354.
104. Graham, E.R.B. On the isolation and conformation of bovine β -casein A1 / E.R.B. Graham, G.M. Malcolm, H.A. McKenzie // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1984. – V. 6. – P. 155–161.
105. Byler, D.M. Raman spectroscopic study of casein structure / D.M. Byler, H.M. Farrell Jr., H. Susi // *J. Dairy Sci.* – 1988. – V. 71. – P. 2622–2629.
106. Caessens, P.W.J.R. The adsorption-induced secondary structure of β -casein and of distinct parts of its sequence / P.W.J.R. Caessens, H.H.J. DeJongh, W. Norde, H. Gruppen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – V. 1430. – P. 73–83.
107. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология: учебное пособие для студентов медицинских вузов / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М. : Медицинское информационное агентство, 2003. – 544 с.
108. Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins Part A. 3rd ed. Casein micelle structure, functions and interactions / C.G. DeKruif, C. Holt; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. – New York, NY: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2003. – P. 233–276.
109. Horne, D.S. Casein structure, self-assembly and gelation / D.S. Horne // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2002. – V. 7. – P. 456–461.
110. Syme, C.D. A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau.

- New insight into the structure and behavior of natively unfolded proteins / C.D. Syme, E.W. Blanch, C. Holt, R. Jakes, M. Goedert, L. Hecht, L.D. Barron // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – V. 269. – P. 148–156.
111. Holt, C. Caseins as rheomorphic proteins: Interpretation of primary and secondary structures of the α_{s1} -, β - and κ -caseins / C. Holt, L. Sawyer // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* – 1993. – V. 89. – P. 2683–2692.
 112. Розов, С.М. Основные стратегии гликоинженерии растительных систем экспрессии для получения гуманизированных рекомбинантных фармацевтических белков. Обзор / С.М. Розов, Н.В. Пермякова, Е.В. Дейнеко // *Биохимия.* – 2018. – Т 83. – №. 3. – С. 328–348.
 113. Choi, B.K. Study of putative glycosylation sites in bovine β -casein introduced by PCR-based site-directed mutagenesis / B.K. Choi, R. Jimenez-Flores // *J. Agric. Food Chem.* – 1996. – V. 44. – P. 358–364.
 114. Maeno, M. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790 / M. Maeno, N. Yamamoto, T. Takano // *J. Dairy Sci.* – 1996. – V. 79. – P. 1316–1321.
 115. β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments. Inhibitors of angiotensin I converting enzyme derived from bovine casein (casokinins) / M. Meisel, E. Schlimme; V. Brantl, H. Teschemacher, eds. – Germany: VCH-Weinheim, 1994. – P. 27–33.
 116. Singh, T.K. Production and sensory characterization of a bitter peptide from beta-casein / T.K. Singh, N.D. Young, M. Drake, K.R. Cadwallader // *J. Agric. Food. Chem.* – 2005. – V. 53(4). – P. 1185–1189.
 117. Soeryapranata, E. Relationship between MALDI-TOF analysis of beta-CN f193–209 concentration and sensory evaluation of bitterness intensity of aged cheddar cheese / E. Soeryapranata, J.R. Powers, F. Fajarrini, K.M. Weller, H.H. Hill Jr., W.F. Siems 3rd. // *J. Agric. Food. Chem.* – 2002. – V. 50 (17). – P. 4900–4905.
 118. Mackinlay, A.G. Fractionation of S-carboxymethyl- κ -casein and characterization of the components / A.G. Mackinlay, R.G. Wake // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1965. – V. 104. – P. 167–180.
 119. Pujolle, J. A study of κ -casein components. I. Preparation. Evidence for a common C-terminal sequence / J. Pujolle, B. Ribadeau-Dumas, J. Garnier, R. Pion // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1966. – V. 25. – P. 285–290.
 120. Woychik, J.H. Chromatographic isolation and partial characterization of reduced κ -casein components / J.H. Woychik, E.B. Kalan, M.E. Noelken // *Biochemistry.* – 1966. – V. 5. – P. 2276–2282.
 121. Vreeman, H.J. Purification and some physicochemical properties of bovine κ -casein / H.J. Vreeman, P. Both, J.A. Brinkhuis, C. Van der Spek // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1977. – V. 491. – P. 93–103.
 122. Doi, H. Heterogeneity of reduced bovine κ -casein / H. Doi, F. Ibuki, M. Kanamori // *J. Dairy Sci.* – 1979. – V. 62. – P. 195–203.
 123. Groves, M.L. Reexamination of the polymeric distributions of κ -casein isolated from bovine milk / M.L. Groves, H.J. Dower, H.M. Farrell, Jr. // *J. Prot. Chem.* – 1992. – V. 11. – P. 21–28.
 124. Marchesseau, S. Casein interactions studied by the surface plasmon resonance technique / S. Marchesseau, J-C. Mani, P. Martineau, F. Roquet, J-L. Cuq, M. Pugniere // *J. Dairy Sci.* – 2002. – V. 85. – P. 2711–2721.
 125. Farrell, H. M., Jr. Particle sizes of purified κ -casein: Metall effect and correspondence with predicted three-dimensional structures / H.M. Farrell, Jr., T.F. Kumosinski, P.H. Cooke, G. King, P.D. Hoagland, E.D. Wickham, H.J. Dower, M.L. Groves // *J. Prot. Chem.* – 1996. – V. 15. – P. 435–445.

126. Groves, M.L. Environmental effects on disulfide bonding patterns of bovine κ -casein / M.L. Groves, E.D. Wickham, H.M. Farrell, Jr. // J. Prot. Chem. – 1998. – V. 17. – P. 73–84.
127. Mercier, J.-C. Structure primaire de la caseine κ -bovine B. Sequence complete / J.-C. Mercier, G. Brignon, B. Ribadeau-Dumas // Eur. J. Biochem. – 1973. – V. 35. – P. 222–235.
128. UniProt KB – P02668 (CASK_BOVIN) – открытая база данных последовательностей белков. Kappa-casein. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02668> (дата обращения: 16.01.2022).
129. Swaisgood, H.E. Primary sequence of kappa-casein / H.E. Swaisgood // J. Dairy Sci. – 1975. – V. 58. – P. 583–592.
130. Alexander, L.J. Isolation and characterization of the bovine κ -casein gene / L.J. Alexander, A.F. Stewart, A.G. Mackinlay, T.V. Kapelinskaya, T.M. Tkach, S.I. Gorodetsky // Eur. J. Biochem. – 1988. – V. 178. – P. 395–401.
131. Vreeman, H.J. Characterization of bovine κ -casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography / H.J. Vreeman, S. Visser, C.J. Slangen, J.A.M. van Riel // Biochem. J. – 1986. – V. 240. – P. 87–97.
132. Neelin, J.M. Variants of κ -casein revealed by improved starch gel electrophoresis / J.M. Neelin // J. Dairy Sci. – 1964. – V. 47. – P. 506–509.
133. Woychik, J.H. Polymorphism in κ -casein of cow's milk / J.H. Woychik // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1964. – V. 16. – P. 267–271.
134. Lactation, vol. III. Genetic variants of the milk proteins / Thompson, M.P., and H.M. Farrell, Jr.; B.L. Larson and V.R. Smith, ed. – New York, NY: Academic Press, 1974. – P. 109–134.
135. Bech, A.M. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield / A.M. Bech, K.R. Kristiansen // J. Dairy Res. – 1990. – V. 57. – P. 53–62.
136. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, part B, Proteins. 3rd ed. Genetic polymorphism of milk proteins. / Ng-Kwai-Hang, K.F., and F. Grosclaude; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. – New York, NY: Kluwer Academic/Plenum, 2003. – P. 739–816.
137. Miranda, G. Biochemical characterization of the bovin genetic kappa-casein C and E variants / G. Miranda, P. Anglade, M.F. Mahe, G. Erhardt // Anim. Genet. – 1993. – V. 4. – P. 27–31.
138. Schlee, P. Identification of bovine κ -casein C using the polymerase chain reaction / P. Schlee, O. Rottman // J. Anim. Breed. Genet. – 1992. – V. 109. – P. 153–155.
139. Erhardt, G. κ -Kasein in rindermilch-nachweis weiterer alleles (κ -CN E) in verschiedener rassen / G. Erhardt // J. Anim. Breed. Gen. – 1989. – V. 106. – P. 225–231.
140. Sulimova, G.E. Analysis of DNA polymorphisms of clustered genes in cattle: casein genes and genes of the major histocompatibility complex (BOLA) / G.E. Sulimova, S.S. Sokolova, O.P. Semikozova, L.M. Nguet, E.M. Berbero V. // Tsitol. I Genetika. – 1992. – V. 26. – P. 18–26.
141. Prinzenberg, E.-M. Molecular genetic characterization of new bovine κ -casein alleles CSN3-F and CSN3-G and genotyping by PCR-RFLP / E.-M. Prinzenberg, S. Hiendleder, T. Ikonen, G. Erhardt // Anim. Gen. – 1996. – V. 27. – P. 347–349.
142. Erhardt, G. Detection of a new κ -casein variant in the milk of pinzgauer cattle // G. Erhardt // Anim. Gen. – 1996. – V. 27. – P. 105–107.
143. Sulimova, G.E. Polymorphism of the κ -casein gene in subfamilies of the Bovidae // G.E. Sulimova, I.N. Badageeva, I.G. Udina // Genetika (Moskva). – 1996. – V. 32. – P. 1576–1582.
144. Prinzenberg, E.M. SCCP analysis of the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphism (H, I, A1) / E.M. Prinzenberg, I. Krause, G. Erhardt // Anim. Biotechnol. – 1999. – V. 10. – P. 49–62.

145. Grosclaude, F. Comparaison du polymorphisme genetique des Lactoproteins du Zebu et des bovines / F.Grosclaude, M.F. Mahe', J.-C. Mercier // *Ann Ge'net. Se'l Anim.* – 1974. – V. 6. – P. 305–329.
146. Visser, S. Peptide substrates for chymosin (rennin). Isolation and substrate behaviour of two tryptic fragments of bovine κ -casein / S. Visser, P.J. van Rooijen, C.J. Slangen // *Eur. J. Biochem.* – 1980. – N108. – P. 415–421.
147. Gilliland, G.L. Functional implications of the three dimensional structure of bovine chymosin / G.L. Gilliland, M.T. Oliva, J. Dill // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1991. – N 306. – P. 23–37.
148. Holt, C. Structure and stability of casein micelles / C. Holt // *Adv. Prot. Chem.* – 1992. – V. 43. – P. 63–151.
149. Holt, C. Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions / C. Holt, L. Sawyer // *Prot. Eng.* – 1988. – V. 2. – P. 251–259.
150. Walstra, P. On the stability of casein micelles / P. Walstra // *J. Dairy Sci.* – 1990. – V. 73. – P.1965–1979.
151. Shekar, P.C. $\{\kappa\}$ -Casein-deficient mice fail to lactate / P.C. Shekar, S. Goel, S.D. Rani, D.P. Sarathi, J.L. Alex, S. Singh, S.Kumar // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103. – N 21. – P. 8000–8005.
152. Creamer, L.K. Micelle Stability: k-Casein Structure and Function / L.K. Creamer, J.E. Plowman, M.J. Liddell, M.K. Smith, J.P. Hill // *J Dairy Sci.* – 1998. – V. 81. – N 11. – P. 3004–3012.
153. Kumosinski, T.F. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: a refined, energy-minimized k-casein structure / T.F. Kumosinski, E.M. Brown, H.M. Farrell, Jr. // *J. Dairy Sci.* – 1993. – V. 76. – P. 2507–2520.
154. Loucheux-Lefebvre, M.-H. Prediction of the conformation of the cow and sheep k-caseins / M.-H. Loucheux-Lefebvre, J.-P. Aubert, P. Jolle's // *Biophys. J.* – 1978. – V. 23. – P. 323–336.
155. Ono, T. Comparison of conformations of k-casein, para-k-casein and glycomacropeptide / T. Ono, R. Yada, K. Yutani, S. Nakai // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1987. – V. 911. – P. 318–325.
156. Griffin, M.C.A. A ^1H -n.m.r. study of casein micelles / M.C.A. Griffin, G.C.K. Roberts // *Biochem. J.* – 1985. – V. 228. – P. 273–276.
157. Griffin, M.C.A. Effect of alcohols on the structure of caseins: circular dichroism studies of k-casein A / M.C.A. Griffin, J. C. Price, S.R. Martin // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1986. – V. 8. – P. 367–371.
158. Jolles, P. Analogy between fibrinogen and casein: effect of an undecaepptide isolated from κ -casein on platelet function / P. Jolles, S. Levy-Toledano, A.M. Fiat, C. Soria, D. Gillesen, A. Thomaidis, F.W. Dunn, J. Caen // *Eur. J. Biochem.* – 1986. – V. 158. – P. 379–384.
159. Chabance, B. Binding of the bovine caseinoglycopeptide to the platelet membrane glycoprotein GPIb α / B. Chabance, Z.Y. Qian, D. Migliore-Samour, P. Jolles, A.M. Fiat // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1997. – V. 42. – P. 77–84.
160. Fiat, A.M. Biologically active peptides from milk with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities / A.M. Fiat, D. Migliore-Samour, P. Jolles, L. Drouet, C. B. Sollier, J. Caen // *J Dairy Sci.* – 1993. – V. 76. – P. 301–310.
161. Chiba, H. Opioid antagonist peptides derived from κ -casein / H. Chiba, F. Tani, M. Yoshikawa // *J. Dairy Res.* – 1989. – V. 56. – P. 363–366.
162. Tran, V.D. Casein. IX. Carbohydrate moiety of k-casein / V.D. Tran, B.E. Baker // *J. Dairy Sci.* – 1970. – V. 53. – P. 1009–1021.
163. Fiat, A.-M. The amino-acid and carbohydrate sequences of a short glycopeptide isolated from bovine κ -casein // A.-M. Fiat, C. Alais, P. Jolles // *Eur. J. Biochem.* – 1972. – V. 27. – P. 408–412.
164. Jolle's, J. Comparative study of cow and sheep κ -caseino-glycopeptides: Determination of the N-tenninal sequences with a sequencer and the location of the sugars / J. Jolle's, A.-M. Fiat, C. Alais, P. Jolle's // *FEBS Lett.* – 1973. – V. 30. – P. 173–176.

165. Jolle's, J. Studies on the primary structure of cow κ -casein. Structural features of para- κ -casein: N-terminal sequence of κ -caseino-glycopeptide studied with a sequencer / J. Jolle's, F. Schoentgen, C. Alais, A.-M. Fiat, P. Jolle's // *Helv. Chim. Acta.* – 1972. – V. 55. – P. 2872–2883.
166. Fournet, B. The sugar part of κ -caseins from cow milk and colostrum and its microheterogeneity / B. Fournet, A.-M. Fiat, J. Montreuil, P. Jolle's // *Biochimie.* – 1975. – V. 57. – P. 161–165.
167. Fournet, B. Cow κ -casein: Structure of the carbohydrate portion / B. Fournet, A.-M Fiat, C. Alais, P. Jolle's // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – V. 576. – P. 339–346.
168. Jolle's, P. Structural relatedness of κ -casein and fibrinogen γ -chain // P. Jolle's, M.H. Loucheux-Le-febvre, A. Henschen // *J. Mol. Evol.* – 1978. – V. 11. – P. 271–277.
169. Saito, T. Variation and distributions of O-glycosidically linked sugar chains in bovine κ -casein / T. Saito, T. Itoh // *J. Dairy Sci.* – 1992. – V. 75. – P. 1768–1774.
170. Molle', D. Heterogeneity of the bovine κ -casein caseino-macropeptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry / D. Molle, J. Le'onil // *J. Chromatogr (A).* – 1995. – V. 708. – P. 223–230.
171. Kanamori, M. Attachment sites of carbohydrate moieties to peptide chain of bovine κ -casein from normal milk / M. Kanamori, N. Kawaguchi, F. Ibuki, H. Doi // *Agric. Biol. Chem.* – 1980. – V. 44. – P. 1855–1861.
172. Wheelock, J.V. Identification of 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose in bovine κ -casein / J.V. Wheelock, G. Sinskinson // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1969. – V. 194. – P. 597–599.
173. Wheelock, J.V. Carbohydrates of bovine κ -casein / J.V. Wheelock, G. Sinskinson // *J. Dairy Res.* – 1973. – V. 40. – P. 413–420.
174. Pisano, A. Characterization of O-linked glycosylation motifs in the glycopeptide domain of bovine κ -casein / A. Pisano, N.H. Packer, J.W. Redmond, K.L. Williams, A.A. Gooley // *Glycobiology.* – 1994. – V. 4. – P. 837–844.
175. Zevaco, C. A study on the carbohydrate binding sites of bovine κ -casein using high performance liquid chromatography / C. Zevaco, B. Ribadeau-Dumas // *Milchwissenschaft.* – 1984. – V. 39. – P. 206–210.
176. Doi, H. Attachment sites of carbohydrate portions to peptide chain of κ -casein from bovine colostrums / H. Doi, H. Kobatake, F. Ibuki, M. Kanamori // *Agric. Biol. Chem.* – 1980. – V. 44. – P. 2605–2611.

Глава 2. Структура и свойства казеиновых мицелл

2.1. Особенности структуры казеинов и некоторые свойства казеиновых мицелл

Около 80% белков молока коровы составляют $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β - и κ -казеины, синтез которых контролируется четырьмя индивидуальными генами [1].

Основные посттрансляционные модификации казеинов. Синтезированные *de novo* казеины претерпевают два типа посттрансляционных модификаций (ПТМ) – фосфорилирование и гликозилирование. Обе модификации исключительно важны с точки зрения физико-химических свойств и самоассоциации этих белков.

Среди казеинов коровьего молока гликозилирован только κ -казеин (κ -CN). Гликозилируемые аминокислотные остатки Thr121, Thr131, Thr133, Thr135, Thr136, Thr142, Thr165 (здесь и далее – нумерация аминокислот зрелого белка) и, возможно Ser141, расположены на гидрофильном С-терминальном участке молекулы κ -CN и несут короткие цепи карбогидратов [1–4]. Синтезированный *de novo* основной компонент всех генетических вариантов κ -CN не несет карбогидратных остатков, но ПТМ приводит к образованию множества минорных мультигликозилированных форм этого белка [4]. Олигосахаридные цепи включают в себя отрицательно заряженные остатки сиаловой кислоты, что в целом усиливает гидрофильный характер и гидродинамический объем, экспонированного на поверхности казеиновой мицеллы (КМ), С-терминального участка каппа-казеина [5].

Второй важной посттрансляционной модификацией казеинов является фосфорилирование. Все казеины в фосфорилируются различной степени, в основном, по остатку Ser и лишь в редких случаях по остатку Thr. Реакция присоединения остатков фосфорной кислоты осуществляется на участке аминокислотной (а.к.) последовательности, имеющем структуру: -Ser-X-A-, где X – любая аминокислота, A – Glu, фосфорилированный остаток Ser (SeP) и, реже, Asp [6]. Фосфорилированные остатки серина $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -казеинов образуют кластеры (группы, скопления). В молекуле β -казеина (β -CN) имеется один фосфосериловый кластер, в $\alpha 1$ -казеине ($\alpha 1$ -CN) – два, в $\alpha 2$ -казеине ($\alpha 2$ -CN) – три [7]. Каппа-казеин, в отличие от $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -CN, не содержит фосфосериловых кластеров. Большинство молекул κ -CN содержит только один фосфорилированный остаток серина в положении 149 [1]. Сайты потенциального посттрансляционного фосфорилирования в казеинах коровьего молока почти всегда модифицированы. Например, одна молекула $\alpha 2$ -CN может нести от 10 до 13 остатков фосфорной кислоты. По одному потенциальному остатку серина не фосфорилировано в молекулах $\alpha 1$ - и β -CN [8].

Взаимодействие казеинов с ионами кальция. Влияние степени фосфорилирования различных групп казеинов отражается на их способности к кальций-индуцированной преципитации. В отличие от κ -CN, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -CN агрегируют в растворах при миллимолярных концентрациях ионов кальция. Наиболее кальций-чувствительным белком является $\alpha 2$ -CN, который преципитирует в присутствии 2 mM Ca^{2+} [9]. Преципитация $\alpha 1$ -CN происходит в диапазоне 3–8 mM Ca^{2+} [9–11], а β -CN – при концентрации ионов кальция 8–15 mM [10, 11]. Каппа-казеин при этих же концентрациях кальция (2–15 mM), остается в растворимой форме, а в смеси с любым другим казеином ($\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -) предотвращает его преципитацию, образуя стабильный коллоидный раствор [5, 12].

Казеиновые мицеллы. При pH молока смесь $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β - и κ -казеинов образует стабильную коллоидную систему [12]. В молоке (при pH $\approx$ 6,7) взаимодействие всех групп казеинов и коллоидного фосфата кальция (КФК) приводит к формированию стабильных агрегатов, которые называются казеинаткальцийфосфатными комплексами [13,14] или казеиновыми мицеллами [15,16]. Казеиновые мицеллы – это надмолекулярные (супермолекулярные) структуры, которые состоят из множества организованных молекулярных объектов, связанных и удерживаемых

друг с другом нековалентными взаимодействиями [17]. Термин «казеиновые мицеллы» начали использовать для обозначения этих супермолекулярных образований задолго до того, как стало понятно, что на самом деле они не имеют классической мицеллярной структуры.

Основная биологическая роль КМ – обеспечение новорожденных млекопитающих энергией минералами (прежде всего кальцием и фосфором) и аминокислотами, необходимыми для роста и развития. Структура и биологические функции мицеллярного казеина тесно связаны. По мнению Holt с соавторами, биологический смысл организации казеинов в мицеллы заключается в выполнении трех основных функций:

1) безопасная секреция высоких концентраций солей кальция и фосфорной кислоты и предотвращение кальцинирования протоков молочной железы;

2) безопасная секреция высоких концентраций казеинов, которые являются потенциально фибриллогенными белками;

3) удержание казеинаткальцийфосфатных комплексов в желудке новорожденного, чтобы питательные вещества могли эффективно перевариваться и усваиваться [18].

Форма мицеллы казеина близка к сферической, её диаметр, в зависимости от микроокружения, варьирует от 40 до 300 нм. Поскольку КМ имеют размеры, характерные для коллоидных частиц, они способны рассеивать свет. Белый цвет молока во многом обусловлен рассеянием света мицеллами казеина. Этот цвет теряется, если нарушается структура мицеллы и происходит уменьшение её размеров, например, при растворении КФК в результате добавления цитрата, ЭДТА, оксалата или при увеличении pH, а также при высоких концентрациях мочевины (>5 М) или этанола (≈35% при 70 °C).

Около 95% казеинов молока входит в состав КМ [12]. Молярное соотношение казеинов в мицелле, по данным разных авторов, составляет: $\alpha s1 : \alpha s2 : \beta : \kappa = 4 : 1 : 4 : 1,3$ или $3 : 1 : 3 : 1$. Мицеллы казеина представляют собою высокогидратированные «губкоподобные» коллоидные частицы, которые содержат ≈3,7 гр. H_2O /гр. белка. Структура мицелл не «жесткая» (фиксированная), но «динамичная», способная изменяться в зависимости от различных физико-химических параметров [5, 19–22].

Усредненные физико-химические характеристики казеиновых мицелл представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1

Физико-химические характеристики казеиновых мицелл [12]

Характеристика	Усредненное значение
Диаметр	130–160 нм
Площадь поверхности	$8,0 \times 10^{-10} \text{ см}^2$
Объем	$2,1 \times 10^{-15} \text{ см}^3$
Плотность (гидратированных мицелл)	$1,0632 \text{ г / см}^3$
Масса	$2,2 \times 10^{-15} \text{ г}$
Содержание воды	63%
Гидратация	3,7 г H_2O / г белка
Удельный объем	$4,4 \text{ см}^3 / \text{г}$
Молекулярная масса (гидратированная мицелла)	$1,3 \times 10^9 \text{ Да}$
Молекулярная масса (дегидратированная мицелла)	$5,0 \times 10^4 \text{ Да}$
Количество полипептидов с ММ 30000 Да	10^4
Количество частиц в 1 мл молока	$10^{14} - 10^{16}$
Площадь поверхности частиц	$5,0 \times 10^4 \text{ см}^2 / \text{мл молока}$
Расстояние между частицами	240 нм

Казеины составляют примерно 91% сухого веса мицеллы, а остающиеся 9% приходятся на минорные белки (2,3%), неорганический кальций (2,9%), фосфаты (2,9%), цитраты (0,4%), сиаловые кислоты (0,3%), галактозу (0,2%), галактозамин (0,2%) и небольшие количества магния, натрия и калия [20].

Почти все казеины молока, вместе со значительными количествами кальция и неорганического фосфата интегрированы в мицеллы. Молоко коровы содержит примерно 30 mM кальция и 22 mM неорганического фосфата, при этом большая часть кальция (~68%) и около половины фосфатов (~47%) связаны с α 1-, α 2-, β - и κ -казеинами мицелл [23]. В экспериментах по хелатированию ионов кальция с использованием этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) установлено, что соотношение кальция и фосфата (Ph) в молоке составляет $\approx 1,61$ (примерно такое же соотношение в зубной эмали). Молочные комплексы фосфата кальция также содержат небольшие примеси цитрата и магния (цитрат/Ph $\approx 0,097$; Mg/Ph $\approx 0,044$) [24].

Частичная холодовая и химическая дезинтеграция мицелл казеина. По данным D.G. Dalgleish и A.J.R. Law, охлаждение нативного (pH $\approx 6,7$) молока с 30 °C до 4 °C приводит к примерно трехкратному увеличению растворимости β -CN. В результате при понижении температуры молока β -CN «выходят» (диссоциируют) из мицелл в молочную сыворотку. При тех же условиях растворимость κ - и α 1-CN практически не изменяется, эти белки преимущественно остаются интегрированными в мицеллы. Процесс диссоциации обратим, и при повышении температуры растворенные в сыворотке β -CN вновь встраиваются в мицеллы [25]. Как указывает P.F. Fox, при холодной дезинтеграции, в зависимости от используемого метода регистрации, мицеллы могут терять от 10 до 50% бэта-казеина [12].

Процесс частичной холодной дезинтеграции КМ зависит от pH. Если одновременно снижать pH с 6,8 до 5,0 и температуру с 30 до 4 °C, то диссоциация наблюдается как для β -, так и для α 1- и κ -CN. В общем случае при охлаждении молока сдвиг pH в кислую область усиливает выход белков из мицеллы, но для β -CN этот процесс происходит намного интенсивнее, чем для α 1- и κ -CN [25].

Наиболее глубокой дезинтеграции мицелл можно добиться, обрабатывая их сильным хелатирующим агентом, например, ЭДТА [26], ионными детергентами (додецилсульфат натрия) [12] или внесением мочевины до концентрации >5 M [27]. Но даже при таком воздействии КМ диссоциируют не до молекулярного уровня, а до частиц со средним диаметром 10–15 нм, которые, как и нативные мицеллы, имеют гетерогенный белковый состав [9].

Систему КМ молока следует рассматривать как коллоидную дисперсию. Стабильность такой системы обеспечивается силами электростатического отталкивания за счет отрицательно заряженной поверхности мицелл. Наличие отрицательного заряда формирует на поверхности мицелл дзэта-потенциал (ζ -потенциал) порядка -20 мВ, который снижается примерно на половину при обработке химозином или другим молокосвертывающим ферментом [28].

Предпринимались попытки объяснить устойчивость молочных дисперсий, используя теорию DLVO (названа по именам разработчиков – B. Derjaguin, L. Landau, E. Verwey, T. Overbeek) или теорию стабильности лиофобных коллоидов [5, 29]. Согласно этой теории, стабильность систем типа казеиновых мицелл в молоке связана с наличием энергетического барьера между частицами, препятствующими их сближению и агрегации. Сила отталкивания мицелл друг от друга определяется как разность между силами притяжения Ван дер Ваальса и силами электростатического отталкивания. Коагуляция коллоида происходит в случае, когда энергия притяжения частиц превышает энергию отталкивания.

Однако расчеты, произведенные T.A.J. Paeyens, показали, что такой энергетический барьер действует на очень коротких расстояниях, порядка 0,1 нм, и является физически бессмысленным,

поскольку располагается внутри шероховатостей, образуемых петлями и «хвостами» белковых молекул на поверхности мицеллы [30]. Хотя в целом теория DLVO не подходит для всеобъемлющего объяснения стабильности интактных КМ, сформулированная в её рамках концепция отталкивающего энергетического барьера оказалась правильной и получила дальнейшее развитие.

По современным представлениям, стабильность коллоидной дисперсии молока обеспечивается расположенными на поверхности мицелл молекулами к-CN, С-терминальные (гликомакропептидные) участки которых выдвинуты (ориентированы, простираются) в сторону растворителя и образуют стерический стабилизирующий поверхностный слой (так называемый «волоосковый слой»). Эффект взаимного отталкивания проявляется когда «волоосковые слои» разных мицелл вступают в контакт друг с другом [5, 31, 32].

Устойчивость казеиновых мицелл к физико-химическим воздействиям. Мицеллы достаточно устойчивы к основным физико-химическим воздействиям, которым нередко подвергается молоко при промышленной обработке [12]:

- КМ исключительно стабильны при высоких температурах, коагулируя только после нагревания при 140 °С в течение 15–20 мин, при нормальном рН молока. Термокоагуляция КМ является результатом серьезных изменений, которые происходят в молочной системе в ответ на интенсивную тепловую обработку, а именно: снижения рН из-за пироллиза лактозы до различных кислот, дефосфорилирования казеинов, разрушения гликозилированных участков к-CN, денатурации и осаждения сывороточных белков на мицеллах казеина;
- КМ устойчивы к уплотнению: их можно осадить ультрацентрифугированием, а после этого повторно диспергировать при умеренном перемешивании;
- КМ выдерживают режимы гомогенизации, используемой для коммерческой обработки молока;
- КМ сохраняют устойчивость при повышении концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]$) вплоть до 200 mM при температурах до 50 °С;
- КМ выпадают в осадок при снижении рН до значений изоэлектрических точек казеинов (в среднем при рН $\approx 4,6$). Изоэлектрическое осаждение не происходит при температуре ниже 5–8 °С. При более высоких температурах изоэлектрическое осаждение наблюдается в широком диапазоне рН 3,0–5,5. Предполагается, что КМ не существуют при $< \text{pH } 5$ из-за растворения КФК;
- Высокоспецифичный гидролиз к-CN, катализируемый некоторыми протеиназами (химозин, пепсином и другими молокозвертывающими протеиназами), в присутствии Ca^{2+} и некоторых других двухвалентных катионов приводит к дестабилизации и агрегации КМ с образованием молочного сгустка. Это ключевой этап в производстве большинства видов сыра;
- КМ осаждаются 40% этанолом при рН 6,7. Однако если полученную смесь нагреть до 60–70 °С, преципитат растворяется, а система становится прозрачной. При её охлаждении восстанавливается молочный цвет, а при температуре 4 °С смесь спирта и молока образует гель. Если этанол удалить выпариванием, то образуются очень крупные белковые агрегаты (со средним диаметром ≈ 3000 нм), свойства которых существенно отличаются от свойств нативных КМ;
- Этиловый спирт в концентрации 35% вызывает диссоциацию КМ при рН 7,3 и температуре 20 °С. Добавление NaCl усиливает этот процесс;
- Структура КМ нарушается при замораживании (криодестабилизация) из-за снижения рН и увеличения $[Ca^{2+}]$ в фазе глубоко охлажденного, но не замороженного молока. Концентрирование молока повышает чувствительность КМ к криодестабилизации. Криодестабилизированный казеин может быть диспергирован в воде с образованием частиц, которые обладают мицеллоподобными свойствами.

Антигенные свойства казеинов. Антигенные свойства свободных и мицеллярных казеинов имеют существенные различия. А. Johansson с соавторами использовали нативные КМ

свежего обезжиренного молока для получения более чем 100 вариантов моноклональных антител (mAt). Специфичность полученных mAt определяли с применением библиотек синтетических пептидов и пептидов, выделенных из триптических гидролизатов очищенных α s1-, α s2-, β - и κ -CN. Несмотря на то, что α s2- и κ -CN являются минорными мицеллярными белками (соотношение α s2 : κ : β : α s1 $\approx$ 1 : 1 : 4 : 4), для каждого из них было получено наибольшее количество mAt – по 32, в то время как для α s1- и β -CN – по 9 и 29 соответственно. Связывание mAt с фосфосериновыми кластерами Ca^{2+} -чувствительных казеинов (α s1-, α s2- и β -) было слабым или пренебрежимо малым, вероятно, из-за того, что они скрыты в толще мицеллы. С-терминальный гликомакропептид κ -CN и С-терминальный домен β -CN экспонированы и хорошо доступны, что приводит к выработке mAt, специфичных к этим участкам. Два основных антигенных участка α s2-CN идентифицированы как фрагменты 96-114 и 16-35. Перекрестные реакции mAt- α s2-CN с α s1-CN свидетельствуют о существовании похожих антигенных детерминант в структуре этих белков. Большинство эпитопов β - и κ -CN было идентифицировано. Поскольку $\approx 50\%$ mAt- α s1-CN и mAt- α s2-CN не связывались с пептидами, полученными из индивидуальных α s1- и α s2-казеинов, был сделан вывод о том, что они реагируют на конформационно-линейные или прерывистые эпитопы, специфичные именно для супермолекулярной структуры КМ [33].

2.2. Модели структуры казеиновой мицеллы. Ретроспектива

Структура и свойства казеиновой мицеллы молока, а также природа движущих сил, обеспечивающих её самоорганизацию и стабилизацию, были и являются предметом дискуссий и многочисленных исследований. За более чем 50-летнюю историю научных изысканий в этой области было предложено несколько десятков моделей структуры мицеллы казеина [12, 13, 15, 18–20, 22, 31, 32, 34–54]. Модели различных авторов имеют много общего и зачастую, фактически являются различными вариантами интерпретации физико-химических свойств мицелл, их поведения при действии молокосвертывающих ферментов и варьировании pH, ионной силы, температуры и других параметров [13, 14, 22]. Различные модели КМ создаются по мере накопления новых экспериментальных данных и отражают генезис наших представлений о структуре и функциях казеинаткальцийфосфатных комплексов молока.

Любая модель КМ призвана дать ответы на следующие основные вопросы [12]:

1. Как в мицелле должен располагаться каппа-казеин (составляет $\approx 15\%$ от общего казеина), чтобы стабилизировать Ca^{2+} -чувствительные α s1-, α s2- и β -CN (которые составляют $\approx 85\%$ от общего казеина)?
2. Что позволяет молокосвертывающим ферментам (МФ) с молекулярной массой (ММ) ≈ 35 кДа быстро и высокоспецифично гидролизовать ≈ 50 – 70% молекул κ -CN и вызывать сычужное свертывание молока? Каков механизм образования молочного сгустка?
3. Почему при нагревании образуются комплексы κ -CN и β -лактоглобулина (ММ в молоке ≈ 36 кДа)? Как они влияют на коагуляционные свойства нормального молока?
4. Каковы движущие силы формирования и стабилизации гетерогенных казеиновых комплексов, несущих частицы коллоидного фосфата кальция?
5. Каков механизм диссоциирующего и дезинтегрирующего воздействия на мицеллу анионных детергентов, хелатирующих, хаотропных и денатурирующих агентов?

Предлагаемые модели условно можно разделить на четыре основные группы. Первая группа – модели покрытого ядра и разветвленных сополимеров, вторая – субмицеллярные модели, третья – модели нанокластерной внутренней субструктуры и четвертая – поликонденсационные модели.

К первой, исторически наиболее ранней, группе относятся различные варианты модели покрытого ядра, основы которой заложены в 1958 г. D.F. Waugh [52]. Согласно этим моделям, мицеллы состоят из молекул разных групп казеинов, образующих гетерогенные белковые ассоциаты. Центральную часть КМ занимают преимущественно α S- и β -CN, а периферическую – κ -CN (рис. 2.1А). Гетерополимеры α S- и β -CN образуют структуры розеточного типа, похожие на классические мицеллы амфифильных молекул. В присутствии Ca^{2+} эти гетерополимеры агрегируют и выпадают в осадок. Внесение в систему κ -CN приводит к образованию стабильной коллоидной системы. Данная модель предсказывает, что весь κ -CN должен находиться на поверхности КМ. В далеком 1965 г. D.F. Waugh и R.W. Noble [43] указывали, что гидрофильные участки молекулы κ -CN, несущие карбогидраты, локализованы вблизи поверхности мицеллы, стабилизируют её и легко доступны для протеолитической атаки химозина. Цитата из работы [43]: *“There is a feature of this model which has additional meaning: κ -casein is placed at the surface where it can be attacked easily and quantitatively by rennin. Since carbohydrate is released into solution by rennin action, the carbohydrate substituent of κ -casein would be placed near the micelle surface and might on account of its solvation characteristics be responsible for the stability of micelles to close approach”*.

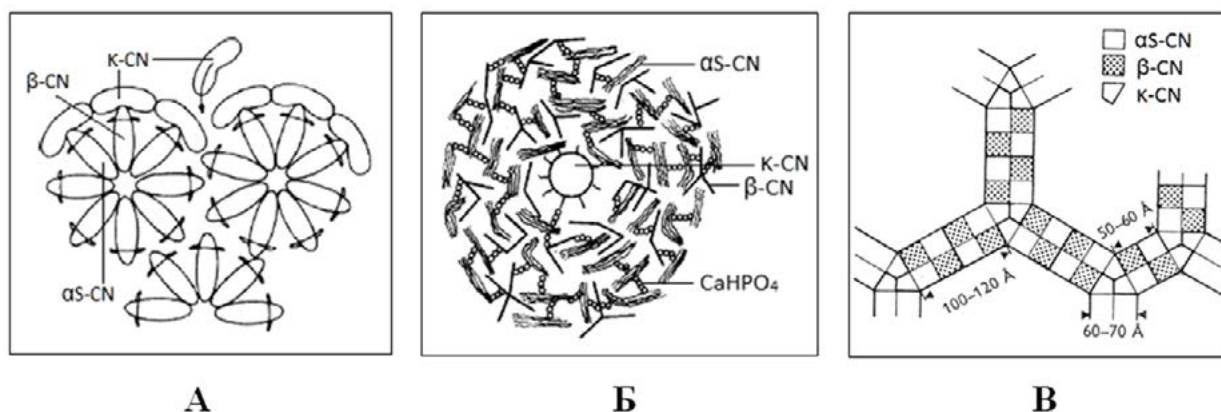


Рис. 2.1. Ранние модели структуры казеиновой мицеллы:

А. Модель покрытого ядра по D.F. Waugh (по данным [33, 49]);

Б. Модель R.M. Parry и R.J. Carroll (по данным [53]);

В. Модель структуры разветвленных сополимеров по J. Garnier и B. Ribadeau-Dumas (по данным [54])

В модели Т.А.Дж. Рауэнса предполагалось, что β - и α S-CN образуют ядро, окруженное слоем κ -CN, а стабильность мицеллы поддерживается за счет белок-белковых гидрофобных взаимодействий и Ca^{2+} -мостиков, образующихся при участии карбоксильных и фосфатных групп аминокислот [44]. Модели этой группы не учитывали роль коллоидного фосфата кальция в механизме организации различных групп казеинов в сложные супермолекулярные комплексы [13].

В рамках модели покрытого ядра предлагались и контраверсивные варианты структуры КМ. Так, согласно модели, предложенной R.M. Parry и R.J. Carroll в 1969 г. [53], κ -CN находится в центре мицеллы и окружен ассоциатами α S- (α S1- и α S2-) и β -CN, которые стабилизируются гидрофобными связями и фосфатом кальция (рис. 2.1Б). В данном случае сложно объяснить, как молокозвертывающему ферменту с ММ ≈ 35 кДа (например, химозину или пепсину) удастся быстро и высокоспецифично гидролизовать κ -CN и вызывать сычужное свертывание.

В модели разветвленных сополимеров, разработанной J. Garnier и B. Ribadeau-Dumas в 1970 г. [54], структура КМ представляет собой трехмерную сеть, которая формируется за счет полимеризации казеинов. Предполагалось, что в узлах сети находятся тримеры κ -CN, каждый мономер которого связывает один блок, состоящий из четырех молекул: двух α S1- и двух β -CN. Блоки α S1- и β -CN, могут связываться между собой, образуя ветви, соединяющие узлы. Длина

ветвей варьирует в зависимости от количества образующих её молекул α s1- и β -CN. Благодаря этому мицелла имеет губчатое строение с множеством каналов и полостей, размеры которых позволяют проникать в них различным реагентам, в том числе сывороточным белкам молока и протеолитическим ферментам с ММ ≈ 36 кДа (рис. 2.1В). Модель не объясняет, каким образом рост полимерной сетчатой структуры ограничивается (терминируется) на стадии образования надмолекулярных белковых комплексов, имеющих размер коллоидных частиц. Кроме того, в модели разветвленных сополимеров не отводится никакой роли фосфату кальция.

Вторая группа – субмицеллярные модели. В очень упрощенной форме суть этих моделей сводится к следующему. Структурную основу казеиновой мицеллы составляют субъединицы – субмицеллы (рис. 2.2). При этом предполагалось, что субмицеллы, формирующие центральную часть КМ, отличаются по составу и физико-химическим свойствам от субмицелл, которые образуют внешний (поверхностный) слой [19, 22, 35–39, 48, 55–59].

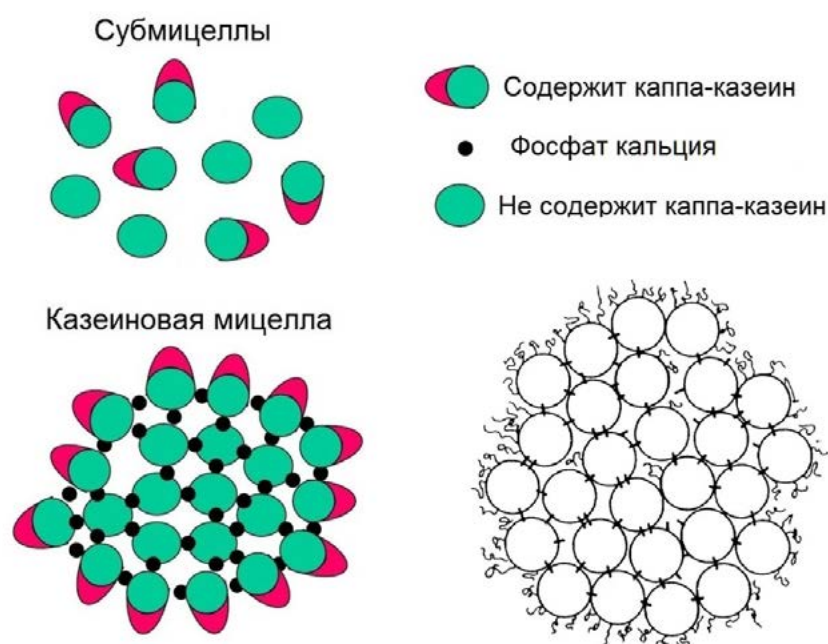


Рис. 2.2. Субмицеллярная модель структуры казеиновой мицеллы (по данным [8, 48])

По данным различных авторов, диаметр одной субъединицы (субмицеллы) составляет 10–15 нм, в её состав входит 15–25 молекул казеинов, которые связаны друг с другом гидрофобными и электростатическими связями [19, 22, 48]. Основным стабилизирующим фактором считаются микрочастицы аморфного фосфата кальция, которые жестко связывают субмицеллы друг с другом. Модель предполагает наличие двух типов субмицелл – содержащих и не содержащих каппа-казеин [48]. Субмицеллы, состоящие из α s- и β -CN, формируют центральную (ядерную) часть КМ, которая сверху покрыта субмицеллами, несущими κ -CN. О преимущественном расположении κ -CN в корковом слое свидетельствовали данные электронной микроскопии с использованием меченого белка [55], а также расчеты соотношения концентрации κ -CN в молоке и площади поверхности мицеллы [56, 57]. Считалось, что гидрофобная N-терминальная последовательность κ -CN погружена в центральную часть поверхностных субмицелл и не контактирует с водной фазой. Отрицательно заряженные гликомакропептидные (C-терминальные) участки локализованы на наружной поверхности мицеллы, образуя гидрофильный «волосковый» слой высотой ≈ 7 нм, который обеспечивает стерическую стабилизацию мицелл [58, 59]. Напомним, что термин «стерическая стабилизация» использует-

ся для описания того, как лиофильное вещество, расположенное на поверхности лиофобного коллоида, может предотвращать агрегацию дисперсии [15].

Экспонированный наружу С-концевой участок молекулы к-CN начинается с последовательности 86–96, следовательно, сайт гидролитической атаки химозина – Phe105-Met106 – также находится в «волосковом» слое. В нативном молоке агрегационная устойчивость мицелл обеспечивается силами электростатического отталкивания за счет значительного отрицательного заряда экспонированных гликомакропептидных участков каппа-казеина. Гидролизуя пептидную связь Phe105-Met106 в молекуле к-CN, молокосвертывающие ферменты выступают в роли «депилятора», удаляя с поверхности мицеллы стабилизирующий «волосковый» слой. Теряя гидрофильный «волосковый» слой, КМ теряют и гидратную оболочку. С потерей гликомакропептидных участков, поверхностный отрицательный заряд мицелл уменьшается, а вместе с ним становятся меньше силы кулоновского отталкивания одноименных зарядов. В результате происходит сближение и агрегация мицелл за счет гидрофобных взаимодействий с образованием пространственной сетчатой структуры – молочного сгустка [22, 59, 61].

Узким местом моделей данной группы является то, что они не могут объяснить механизм образования субмицелл двух разных видов – содержащих и не содержащих к-CN. Не понятно, как ассоциация субмицелл разных видов приводит к тому, что к-CN-несущие субмицеллы оказываются в поверхностном слое, а к-CN-дефицитные – в подповерхностной части казеиновой мицеллы [48]. По мнению D.G. Schmidt [62], связывание («цементирование») фосфатом кальция гидрофильных участков α s- и β -казеинов происходит после образования субмицелл. Но разделение во времени этих процессов невозможно, так как фосфорилирование казеинов начинается непосредственно после трансляции, т.е. до того, как эти белки начинают объединяться в субмицеллы [15, 63, 64].

Одним из доказательств субмицеллярной структуры КМ долгое время считались результаты ранних электронно-микроскопических исследований и данные рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей [65]. На микрофотографиях мицеллы выглядели как глобулярные структуры с электронно плотными участками (похожие на ягоды малины), что интерпретировалось в пользу субмицеллярной структуры [55, 65–68]. Однако, по мнению скептиков, эти данные свидетельствовали лишь о том, что внутренняя структура мицелл гетерогенна и состоит из зон с различной рассеивающей способностью, которая может быть обусловлена присутствием КФК [15, 69].

Действительно, исследование мицелл казеина методами сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, в сочетании с криогенной фиксацией образцов и стереофотографией, выполненное D.G. McMahon и W.R. McManus, не подтвердило существование субмицелл [70]. Авторы использовали различные варианты подготовки образцов и сделали вывод о том, что этот процесс в значительной степени влияет на получаемое изображение. Процедуры фиксации, замены воды на этанол, высушивания и напыления металлов (например, иридия (Ir)) могут приводить к появлению участков большой электронной плотности, похожих на субмицеллы (рис. 2.3–2.4).

При анализе микрофотографий образцов КМ, полученных с использованием технологий криогенной фиксации (рис. 2.3Б), установлено, что большая часть электронно плотных участков имеет размеры около 2–3 нм. Эти участки в большей степени соответствуют индивидуальным молекулам белка, а не субмицеллам, размеры которых должны составлять около 20 нм [70].

В 2004 г. группа, возглавляемая D.G. Dalgleish, опубликовала результаты работ по изучению поверхностной структуры мицелл казеина методом поле-эмиссионной сканирующей электронной микроскопии (Field Emission Scanning Electron Microscopy = FESEM) высокого разрешения, которые не подтвердили наличие субмицелл [71]. Результаты исследования, вы-

полненные с разрешением порядка 2–3 нм, настолько интересны, что мы позволим себе остановиться на них подробнее.

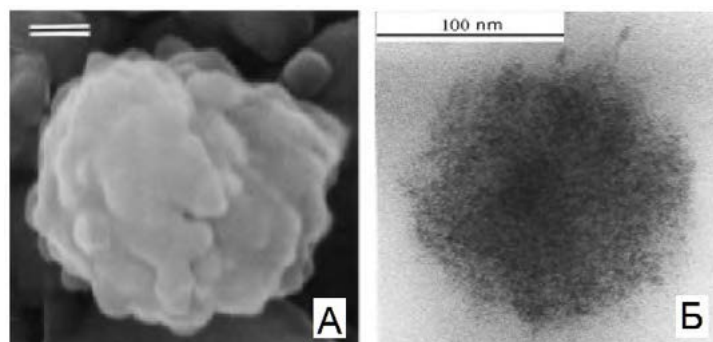


Рис. 2.3. Микрофотографии казеиновых мицелл сырого молока, полученные методами сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии [70]. А. Изображение казеиновой мицеллы, адсорбированной на керамической мембране, полученное методом сканирующей электронной микроскопии. Увеличение 70000 раз. Препарат покрыт слоем Ig толщиной 2 нм, маркер на микрофотографии соответствует 100 нм. Б. Изображение казеиновой мицеллы, полученное методом трансмиссионной электронной микроскопии. Увеличение 250000 раз

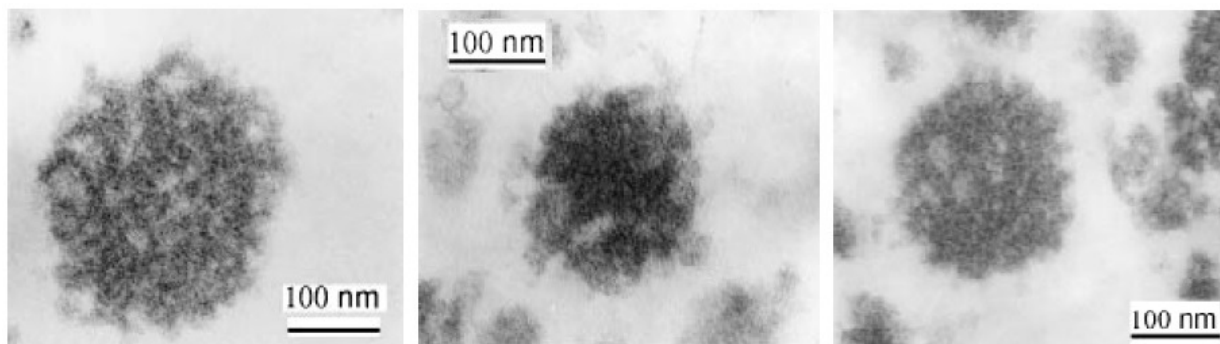


Рис. 2.4. Микрофотографии казеиновых мицелл сырого молока [70], полученные методом трансмиссионной электронной микроскопии. Увеличение 85000 раз

Микрофотографии, представленные на рисунках 2.5 и 2.6, изображают КМ как глобулярные структуры, на поверхности которых видны сложные переплетения волокон или микротрубочек (tubules) цилиндрической формы, диаметром 10–20 нм.

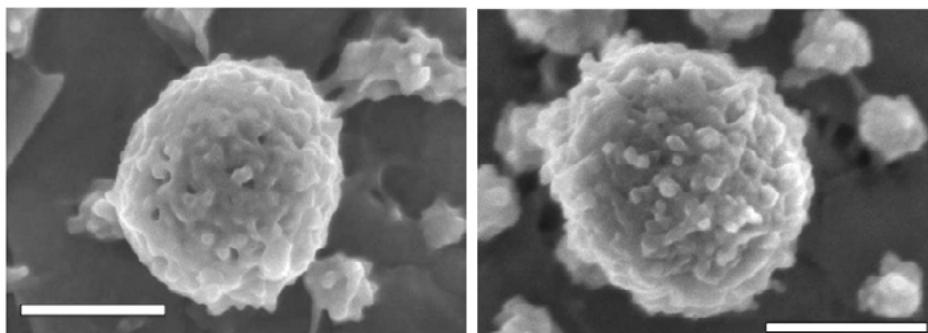


Рис. 2.5. Микрофотографии казеиновых мицелл, полученные методом поле-эмиссионной сканирующей электронной микроскопии (FESEM) без использования технологии напыления металла [71]. Образец зафиксирован на гидрофобной углеродной подложке. Видна связь между мицеллами и объектами меньшего размера, которые могут быть участками мицеллы, плотно связавшимися с подложкой за счет гидрофобных взаимодействий в процессе подготовки препарата. Масштабный отрезок равен 200 нм

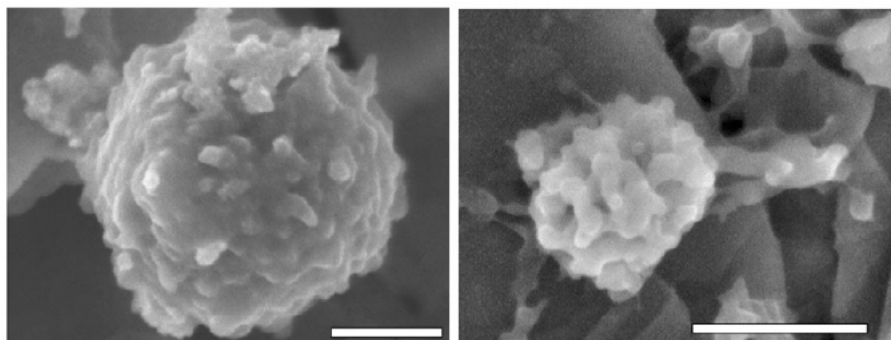


Рис. 2.6. Микрофотографии казеиновых мицелл, полученные методом поле-эмиссионной сканирующей электронной микроскопии (FESEM) без использования технологии напыления металла [71]. Масштабный отрезок на левой микрофотографии равен 100 нм, на правой – 200 нм

Площадь поверхности мицеллы, имеющей такую структуру, значительно больше, чем у гладкой сферы такого же диаметра. Концевые части микротрубочек выступают за пределы основной глобулы, образуя своеобразные «протуберанцы» высотой около 40 нм, что намного больше предполагавшейся высоты «волоскового» слоя [58, 59, 71].

Окончания «протуберанцев», которые физически могут препятствовать непосредственному контакту мицелл между собой, имеют форму полусферы. Авторы исследования отметили, что такая шероховатая поверхность может дать эффект «бугристости» (субмицеллярной структуры) при электронно-микроскопическом исследовании образцов мицелл, приготовленных традиционным методом замораживания-травления с последующим напылением металла [41, 71, 72] (сравните с изображением мицеллы на рисунке 2.3А, полученным после напыления слоя иридия).

Пространство между трубочками образует полости или лакуны, которые достаточно велики для проникновения в них таких больших молекул, как, например, κ -каррагинаны [71]. На препаратах казеиновых мицелл (рис. 2.5– 2.6) видны небольшие частицы, имеющие сходную структуру, но меньшие размеры (около 75 нм). Происхождение этих структур может быть вызвано взаимодействием внутренних участков мицеллы с крайне гидрофобной карбоновой подложкой, на которую «сажают» мицеллы перед процедурой фиксации образца (чтобы наглядно представить, как образуются такие частицы, мысленно прокрутите в обратную сторону процесс образования снежного кома). На микрофотографиях отчетливо видно, что некоторые частицы меньшего размера связаны с мицеллой микротрубочками, имеющими ту же структуру и размеры, что и «протуберанцы». Это позволяет предполагать, что внутренняя часть мицеллы, так же, как и её поверхность, имеет микротрубочатую (микроволоконную) структуру [71].

Основываясь на полученных результатах, исследователи предположили, что каппа-казеины расположены на оконечностях «протуберанцев» в виде «пучка» («букета», «связки»), состоящего из 30–40 молекул [71], и привели ряд следующих фактов в поддержку такого предположения:

1. Расчеты показывают, что количество κ -CN в молоке недостаточно для того, чтобы покрыть ими всю поверхность мицелл (даже при условии, что мицеллы – это сферы с гладкой поверхностью) [40]. Однако, принимая во внимание данные D.S. Horne [12, 31], утверждающего, что κ -CN терминируют цепи, состоящие из α s1-, α s2- и β -CN, нет необходимости полностью покрывать расчетную «сферическую» поверхность мицелл, поскольку суммарная поверхность окончаний «протуберанцев» намного меньше.

2. В случае предполагаемого расположения κ -CN на концах «протуберанцев», гликомакропептидный участок становится легко доступным для гидролитической атаки химозина, тогда как при наличии равномерно распределенного по поверхности мицеллы «волоскового» слоя,

протеолитическому ферменту гораздо сложнее добраться до ключевой связи Phe105-Met106. Аналогично, не возникает стерических препятствий для связывания с к-CN сывороточных белков, наблюдаемого при нагревании (пастеризации) молока [73].

3. Каппа-казеин выделяется из молока в виде агрегатов [74], состоящих из 30–40 индивидуальных молекул, соединенных дисульфидными мостиками [75]. Предполагаемое расположение к-казеинов в виде «пучка» легко объясняет их ограниченную агрегацию за счет образования -S-S- связей. Площадь, занимаемая одной молекулой к-CN, составляет примерно 13 нм². В случае если окончание «протуберанца» имеет форму полусферы, на нем может уместиться около 30–40 молекул к-CN [71].

Группой S. Marchin с соавторами методами малоуглового и ультрамалоуглового рассеивания рентгеновских лучей, а также методом криотрансмиссионной электронной микроскопии (Cryo Transmission Electron Microscopy = Cryo-TEM) исследована тонкая структура мицелл казеина, полученных из коровьего молока [76]. Показано, что мицелла имеет структуру «клубка ниток», в котором полипептидные цепи казеинов («нити») образуют гомогенную трехмерную сеть, с равномерно распределенными в ней нанокластерами коллоидного фосфата кальция, которые имеют средний диаметр около 2,5 нм (рис. 2.7).

Именно нанокластеры ответственны за неоднородную электронную плотность мицеллы и «гранулярность» её структуры, трактовавшуюся ранними исследованиями как доказательство существования субмицелл. Специфическая деминерализация мицелл казеина путем понижения pH от 6,7 до 5,2 приводит к уменьшению «гранулярной» структуры мицелл.

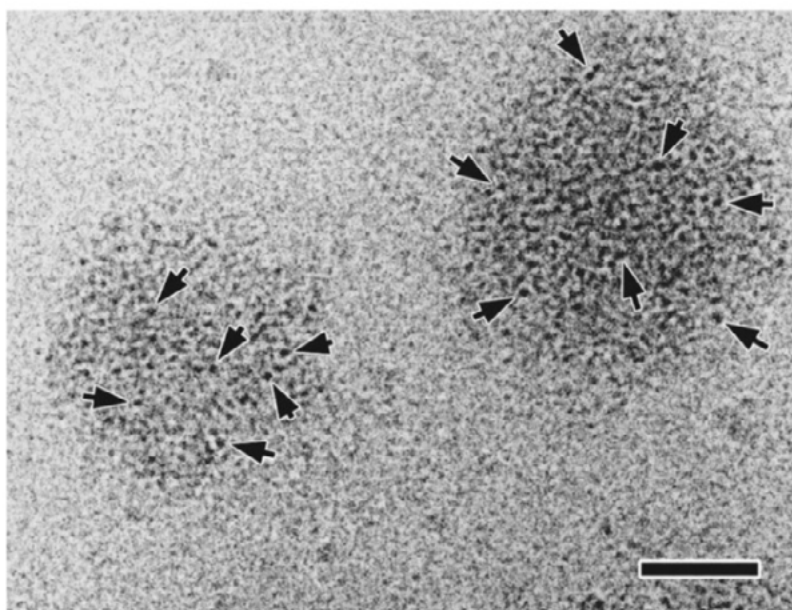


Рис 2.7. Микрофотография мицеллы казеина коровьего молока, полученная методом криотрансмиссионной электронной микроскопии (Cryo-TEM) [76]. Стрелками обозначены равномерно распределенные по глобуле мицеллы темные частицы диаметром 2–3 нм, которые могут соответствовать нанокластерам фосфата кальция. Длина масштабного отрезка равна 50 нм

Полученные данные подтверждают предположение о том, что небольшие субструктуры, обнаруживаемые в КМ методом малоуглового рассеивания рентгеновских лучей, являются именно нанокластерами коллоидного фосфата кальция, а не субмицеллами [76].

Некоторые ранние модели предполагали, что только кальций-фосфатные мостики связывают друг с другом полипептидные цепи казеинов и субмицеллы [38, 55]. Однако по мере накопления экспериментальных данных становилось ясно, что кроме коллоидного фосфата кальция

в стабилизации мицеллы участвуют и другие факторы. В частности, было установлено, что удаление КФК из состава мицеллы при кислых значениях pH и температуре ниже 20 °C не приводит к её разрушению (диссоциации) [16, 25, 77]. Это указывает на то, что важный вклад в поддержание целостности КМ могут вносить гидрофобные взаимодействия и водородные связи [27].

Включение КФК в состав мицелл можно рассматривать как эффективную форму хранения и транспорта значительных количеств кальция и фосфора, – важнейших компонентов рациона растущего теленка. В период лактации, через 1 см³ ткани молочной железы переносится ≈15 мкм кальция в час. Известно, что ткани, связанные с транспортом кальция, подвержены патологии (кальцификации), которая проявляется в отложении кальциевых солей. Исходя из этого С. Holt предположил, что первичной функцией КМ является защита ткани молочной железы от патологического кальцифицирования и интенсивная секреция фосфатов кальция в составе мицелл казеина является наиболее физиологичным способом его транспорта в процессе лактации [78, 79].

Способность казеиновых мицелл поддерживать кальций и фосфор в растворимом и биодоступном состоянии определяется мультифосфорилированными участками α s1-, α s2- и β -CN. Эти участки могут быть получены при гидролизе казеинов трипсином в виде казеинфосфопептидов. Все основные казеинфосфопептиды (β -CN (ф. 1-25), α s1-CN (ф. 59-79), α s2-CN (ф. 46-70), α s2-CN (ф. 1-21)), содержат кластерную последовательность Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu (Ser(P)₃-Glu₂), ответственную за связывание кальция и фосфата кальция [23].

В 1992 г. С. Holt предложил модель, в которой мицелла рассматривается как минерализованная сетчатая глобула, состоящая из полипептидных цепей казеинов, сшитых микрогранулами фосфата кальция (рис. 2.8А) [15]. Позднее С. Holt с соавторами показали, что в отсутствие фосфопептидов кальций-фосфатные комплексы растут случайным образом, агрегируют и выпадают в осадок. Взаимодействие фосфорилированных пептидов β -CN с кальций-фосфатными комплексами стабилизирует их и приводит к образованию нанокластеров дискретного размера и состава [69, 80, 81]. Основываясь на этих данных С.Г. De Kruif и С. Holt предложили модель нанокластерной внутренней субструктуры [42].

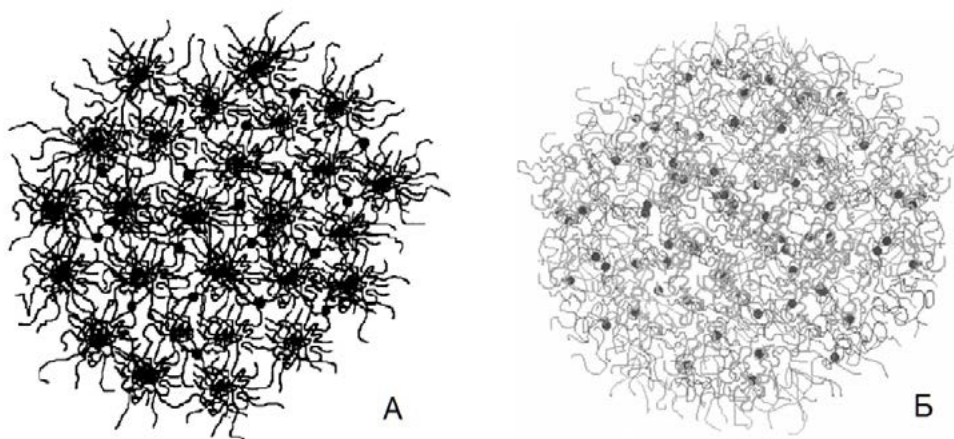


Рис. 2.8. Модели нанокластерной внутренней субструктуры казеиновой мицеллы. А. Ранний вариант С. Holt. Структура мицеллы представляет собой рыхлую белковую матрицу, в которую инкорпорированы микрогранулы фосфата кальция (●). Форма мицеллы близка к сферической, её внешняя область содержит лиофильный «волосковый» слой, придающий гидрофобной частице стерическую стабильность (по данным [15]). Б. Поздний вариант С.Г. de Kruif и С. Holt. Структуру мицеллы образует хаотичная белковая сеть, содержащая нанокластеры фосфата кальция (●). Отчетливого «волоскового» слоя нет, но реоморфные полипептидные цепи на внешних границах мицеллы обеспечивают её стерическую стабилизацию (по данным [42])

Согласно модели С.Г. е Kruif и С. Holt нанокластеры являются центральным элементом структуры КМ. Образование нанокластеров фосфата кальция способствует формированию мицелл путем случайного «сшивания» кальций-чувствительных α s1-, α s2- и β -CN, несущих мультифосфорилированные участки. Поскольку β -CN содержит единственный фосфорилированный участок, который может связываться с одним нанокластером, этот белок считается монофункциональным. В отличие от β -CN, α s1- и α s2-CN – полифункциональны, поскольку несут две или три фосфорилированные последовательности, которые способны взаимодействовать с несколькими нанокластерами и таким образом «сшивать» их друг с другом с образованием трехмерной сетчатой структуры (рис. 2.8Б). Полифункциональные казеины образуют петли нефосфорилированных последовательностей, которые могут ограничивать рост мицеллы.

Модель нанокластерной субструктуры КМ связана с представлениями о реоморфной природе казеинов (подробно рассматривается в разделе 2.7) [82], которая идеально адаптирована для изолирования и стабилизации кальцийфосфатных комплексов и предотвращения кальцификации ткани молочной железы [18].

Основным недостатком нанокластерной модели является то, что она основана исключительно на взаимодействиях между казеинами и фосфатом кальция и совершенно не учитывает роль гидрофобных белок-белковых связей в формировании КМ. Кроме того, модель не может объяснить, каким образом к-CN оказывается на периферии мицеллы, чтобы выполнять роль её стерического стабилизатора [48].

Модели покрытого ядра, разветвленных сополимеров, нанокластерной внутренней субструктуры и субмицеллярные модели не могли удовлетворительно объяснить такие процессы, как самосборка, рост и, что самое главное, механизм терминирования роста мицеллы. Этих недостатков лишена модель КМ, предложенная D.S. Horne в 1998–2002 гг. – модель двойного связывания, или поликонденсационная модель [12, 31]. Но прежде чем перейти к её рассмотрению, задержимся на особенностях структуры индивидуальных казеинов и характере их взаимодействий в растворах.

2.3. Самоассоциация казеинов в растворе

Ассоциативные и гидрофобные свойства модельной смеси α s- (α s1- и α s2-CN в соотношении 4:1), β - и к-CN исследованы методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR – Surface Plasmon Resonance; *плазмонами* называются свободно осциллирующие электроны) с использованием гидрофобного сенсорного чипа и сенсора с ковалентно-иммобилизованными индивидуальными казеинами [74]. Степень связывания казеинов с неполярной матрицей зависит от их концентрации и температуры системы (рис. 2.9). Зависимость степени связывания от температуры указывает на участие в этом процессе гидрофобных взаимодействий (при повышении T °C гидрофобные взаимодействия усиливаются).

Все казеины являются относительно небольшими (ММ ~19-25 кДа) фосфопротеинами, обладающими выраженными гидрофобными свойствами, которые убывают в ряду: β - > к- > α s1- > α s2-CN, что определяется относительным содержанием гидрофобных аминокислот: (34,4% для β -CN, 31,9% для к-CN, 31,6% для α s1-CN и 28,0% для α s2-CN) [83]. Наряду с выраженной аффинностью к двух- и трехзарядным катионам [84, 85] казеины обладают амфифильными свойствами, которые обусловлены характером группирования гидрофобных (неполярных) и гидрофильных (анионных) кластеров внутри первичной структуры [1]. Механизмы самоассоциации и межмолекулярной ассоциации различных семейств казеинов играют важную роль в формировании и поддержании интегральной целостности мицелл.

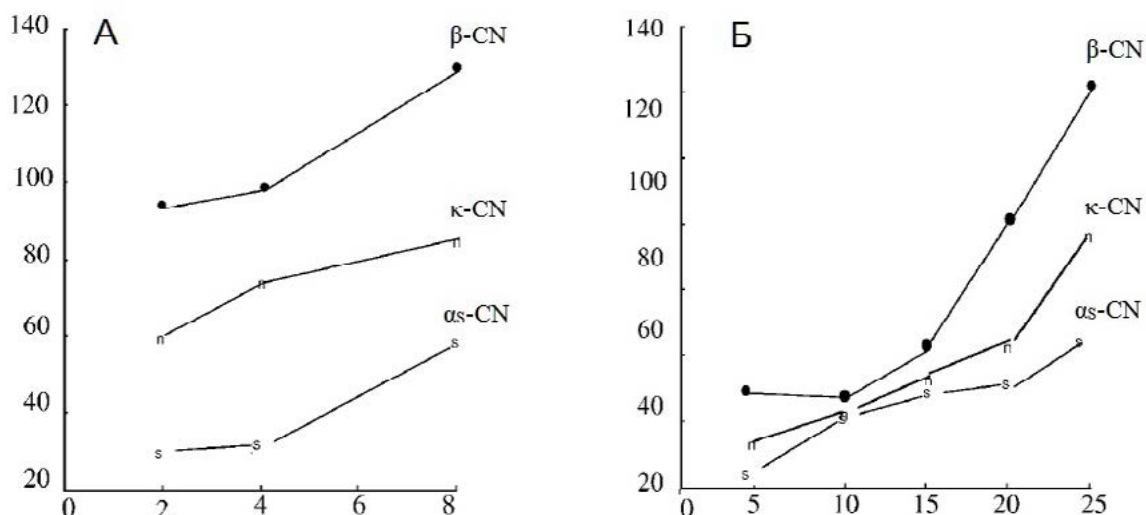


Рис. 2.9. Влияние концентрации белков (А) и температуры (Б) на степень связывание α s-, β - и κ -казеинов с гидрофобной поверхностью [74]. Условные обозначения: (А) ось X – концентрация казеинов в мкМ; ось Y – степень связывания в условных единицах, измерения выполнены при температуре 25°C; (Б) ось X – температура (°C), ось Y – степень связывания в условных единицах, измерения выполнены при концентрации казеинов 8 мкМ

Е. Dickinson с соавторами [86], исследуя конформацию α s1- и β -CN, адсорбированных на плоской гидрофобной поверхности, предсказали, что в этих условиях β -CN образует структуру, обозначенную как «последовательность-хвост» (tail-train), а α s1-казеин – «последовательность-петля-последовательность» (train-loop-train) (рис. 2.10). Под термином «последовательность» подразумевается «липкий» гидрофобный участок молекулы казеинов, который прочно связывается с гидрофобной поверхностью. Терминами «хвост» и «петля» обозначали контактирующие с водной фазой гидрофильные участки полипептидной цепи, несущие заряженные фосфосериловые остатки [31, 87].



Рис. 2.10. Схематические диаграммы структур α s1-казеина (А) и β -казеина (Б), образуемых при контакте с плоской гидрофобной поверхностью [31]. Прямоугольные участки и изогнутые линии на схемах казеинов соответствуют гидрофобным и гидрофильным последовательностям полипептидной цепи

Исходя из этих представлений самоассоциация молекул β -казеина в растворе может приводить к образованию агрегатов, имеющих своеобразную структуру (типа «дикобраз»), в которых гидрофобные последовательности собраны параллельным или антипараллельным способом (рис. 2.11А).

Такой способ самосборки β -CN предполагает определенный уровень кооперативности и сопровождается установлением равновесия мономеры $\leftrightarrow$ мицеллы, что подтверждается экспериментальными данными [88]. Гидрофобные участки бэта-казеинов образуют плотное ядро, окруженное диффузным слоем гидрофильных хвостов, а сама мицелла имеет эллипсоидную форму и значительный гидродинамический объем [89]. В случае α s1-CN маловероят-

но, чтобы гидрофобные участки одной молекулы формировали кольцевую структуру («змея, кусающая свой хвост»). Действительно, в растворе гидрофобные участки $\alpha 1$ -CN образуют не внутри-, а межмолекулярные ассоциаты, что приводит к образованию длинных («червеобразных») полимерных цепей (рис. 2.11Б), существование которых также подтверждено экспериментально [90, 91].

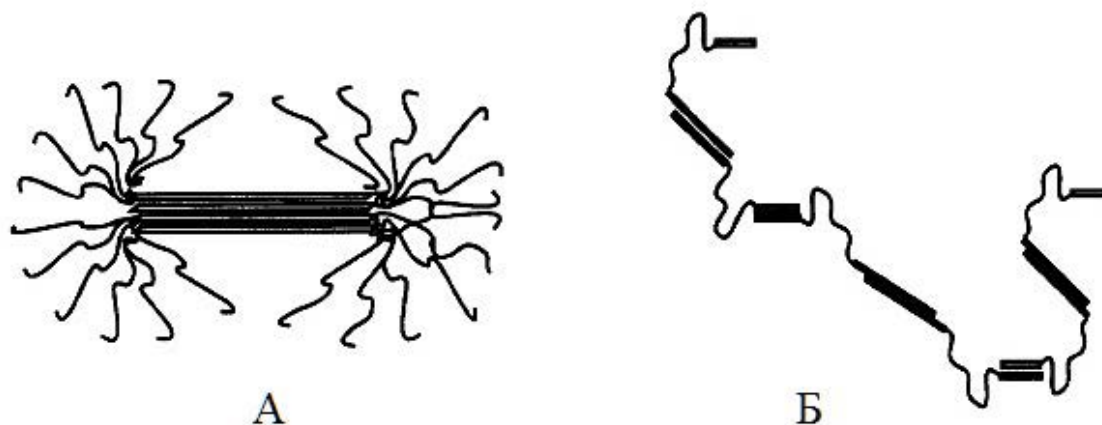


Рис. 2.11. Схемы полимерных структур, формируемых в растворе молекулами $\alpha 1$ -казеина (А) и β -казеина (Б) [31]. Прямоугольные участки и изогнутые линии на схемах казеинов соответствуют гидрофобным и гидрофильным последовательностям полипептидной цепи. Существование таких структур подтверждено экспериментально [88–91]

Альфа- $\alpha 2$ -казеин имеет примерно одинаковое с $\alpha 1$ -CN распределение заряженных (гидрофильных) и гидрофобных последовательностей, но содержит дополнительный гидрофильный N-терминальный участок [92]. Это позволяет предполагать, что в растворе $\alpha 2$ -CN ведет себя так же, как $\alpha 1$ -CN.

Что касается каппа-казеина, то по соотношению гидрофильных и гидрофобных участков его молекула является зеркальным отражением молекулы бэта-казеина (преимущественно гидрофобный N-терминальный участок и заряженный гидрофильный C-терминальный пептид). Поэтому и в растворе он ведет себя аналогично бэта-казеину, т.е. при умеренных концентрациях ассоциирует в эллипсоидные мицеллы с установлением равновесия мономер $\leftrightarrow$ мицелла [93, 94].

Однако гидрофобные взаимодействия являются не единственной движущей силой самоассоциации казеинов. Важным фактором, определяющим степень полимеризации и лимитирующим рост мицелл и полимерных цепей, являются силы электростатического отталкивания [12, 31].

Силы электростатического отталкивания препятствуют казеин-казеиновым гидрофобным взаимодействиям при нейтральных значениях pH. Если, не изменяя pH, увеличить ионную силу раствора путем добавления в него NaCl (до 150 mM), моновалентные катионы соли блокируют отрицательные заряды, что приводит к усилению ассоциации казеинов за счет гидрофобных взаимодействий. Замена хлорида натрия на 2 mM CaCl_2 также усилит межмолекулярные взаимодействия казеинов, но уже за счет того, что бивалентные ионы кальция, связываясь с фосфосериловыми остатками, «работают» не только как нейтрализующие отрицательный заряд катионы, но и как «сшивающие» агенты [74].

Экспериментально доказано, что увеличение pH сопровождается увеличением заряда белков и приводит к уменьшению размеров ассоциатов как для $\alpha 1$ -, так и для β -CN. Напротив, увеличение ионной силы раствора снижает силы электростатического отталкивания, что

способствует увеличению агрегатов α 1- и β -CN [88, 90]. Важно отметить, что экранирование заряда при повышении ионной силы является неспецифическим эффектом, который лишь ослабляет радиус действия электростатических сил, но не изменяет величин самих зарядов, являющихся основой этих взаимодействий.

Методом флуоресцентного анализа, в сочетании с турбидиметрией, показано, что молекулы казеинов могут самопроизвольно ассоциировать в казеиновые мицеллы в двух диапазонах pH: 2,0–3,0 и 5,5–12,0. Основными типами взаимодействий при самосборке казеиновых мицелл являются гидрофобные и электростатические взаимодействия, а также образование водородных связей. Структура КМ наиболее компактна при pH 5,5, когда силы электростатического отталкивания минимальны. При увеличении pH мицеллы становятся более «рыхлыми» [95].

Роль фосфорилированных остатков серина (SeP) наглядно продемонстрирована в опытах с дефосфорилированным α s-CN (рис. 2.12). Дефосфорилирование α s-CN устраняет отрицательный заряд остатков SeP и уменьшает суммарный негативный заряд молекулы, так как заряды карбоксильных групп и аминокетильных групп при этом сохраняются. Это приводит к тому, что изоэлектрическая точка белка повышается. В результате при нейтральных значениях pH молекула α s-CN приближается к электронейтральному состоянию и образует ассоциаты с α s-, β - и κ -CN в основном за счет гидрофобных взаимодействий [74].

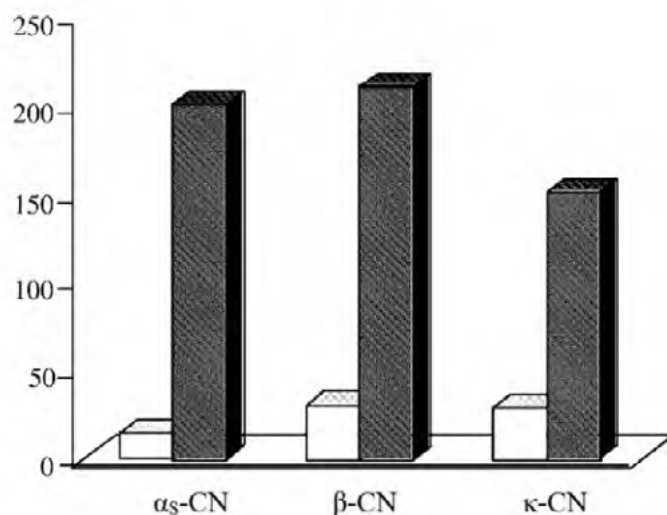


Рис. 2.12. Связывание нативного (фосфорилированного) (□) и дефосфорилированного (■) растворимого α s-казеина с иммобилизованными на карбоксиметил декстрани α s-, β - и κ -казеинами [74]. На оси Y показана степень связывания в условных единицах. Рабочий буфер: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH=7,4. Концентрация растворимых казеинов – 4 мкМ

Таким образом, преодолеть или значительно ослабить силы электростатического отталкивания можно тремя способами. Первый – понижая pH; это нейтрализует фосфосериловые и карбоксильные группы белков и вызовет кислотную преципитацию казеинов в изоэлектрических точках. Второй – повышая концентрацию ионов кальция, что приведет к их связыванию фосфосерилами и осаждению фосфорилированных казеинов в порядке их чувствительности к Ca^{2+} : α s2 > α s1 > β [96]. Третий способ – дефосфорилирование альфа- и бета-казеинов, приводящее к снижению суммарного отрицательного заряда и росту pI [74].

Рассматривая казеины в растворе как гидрофобный коллоид, можно сделать вывод, что энергия взаимодействия между молекулами определяется соотношением сил гидрофобного взаимодействия и электростатического отталкивания. Отсюда следует, что степень связывания ионов кальция критична для агрегационной стабильности α s- и β -CN, несущих фосфосе-

риловые анионные кластеры. Модельные исследования казеиновых смесей показали, что Ca^{2+} в концентрации 2 mM значительно усиливает агрегацию αs - и $\beta\text{-CN}$ за счет формирования межмолекулярных кальциевых мостиков [74].

D.G. Dalgleish и T.G. Parker [97] установили, что связывание Ca^{2+} с $\alpha\text{s1-CN}$ усиливается при повышении pH и температуры и значительно ослабевает при увеличении ионной силы раствора. В случае $\alpha\text{s1-CN}$ процессу агрегации, в присутствии Ca^{2+} , предшествует lag-фаза, в ходе которой ММ белка почти не изменяется, до некоторой критической концентрации ионов кальция, после превышения которой происходит быстрое образование высокомолекулярных агрегатов. D.S. Horne и D.G. Dalgleish [98] показали, что логарифм критического времени агрегации является функцией суммы общего отрицательного заряда белка и количества ионов кальция, связавшихся с белком. При использовании этих данных для оценки агрегационной стабильности индивидуальных казеинов и их смесей необходимо учитывать влияние как pH на заряд белка, так и ионной силы на электростатические взаимодействия. Несмотря на то, что подобные исследования для $\alpha\text{s2-CN}$ не проводились, высокая Ca^{2+} -чувствительность этого белка предполагает аналогичное поведение [31].

Температура является важным фактором, влияющим на ассоциативные свойства казеинов. При увеличении температуры гидрофобные взаимодействия усиливаются, что было подтверждено экспериментально S. Hjertén на примере связывания сывороточных белков с гидрофобными лигандами [99]. Отметим, что Ван дер Ваальсовы взаимодействия, которые, предположительно, вносят вклад в формирование гидрофобных связей, также усиливаются при повышении температуры [100, 101].

Способность $\beta\text{-CN}$ к кальций-индуцированной агрегации падает с уменьшением температуры: при 4 °C преципитация вообще не наступает [10]. Значительная температурная зависимость наблюдается и при самоассоциации этого белка, когда при низкой температуре в растворе доминируют индивидуальные молекулы $\beta\text{-CN}$, а при $T \geq 20$ °C происходит усиленное мицеллообразование. D.S. Horne постулирует, что силами, которые управляют самоассоциацией казеинов, являются гидрофобные взаимодействия: именно поэтому процесс мицеллообразования $\beta\text{-CN}$ в растворе заканчивается только при повышении температуры до 20 и более градусов Цельсия [31].

Каппа-казеин, несущий всего один фосфорилированный остаток серина (SeP149) [1], не способен связывать значительные количества ионов кальция, которые позволили бы преодолеть силы межмолекулярного электростатического отталкивания и вызвать агрегацию этого белка, как это происходит в случае $\alpha\text{s1-}$, $\alpha\text{s2-}$ и $\beta\text{-CN}$ [12,31,74].

2.4. Структура казеиновой мицеллы по D.S. Horne

Итак, самоассоциация казеинов происходит под действием гидрофобных сил, но степень ассоциации и размеры образующихся полимеров (ассоциатов) лимитируются силами электростатического отталкивания. Это следует из вариации молекулярной массы олигомеров при изменении ионной силы, pH, концентрации ионов кальция и в процессе изоэлектрической преципитации $\alpha\text{s1-}$, $\alpha\text{s2-}$ и $\beta\text{-CN}$ [12]. С точки зрения биофункциональности, мицеллы казеина являются высшим уровнем самоорганизации, в которую вовлечены все группы казеинов. Однако в отличие от мицелл индивидуальных белков, казеиновые мицеллы молока характеризуются одним очень важным свойством: они содержат микрокристаллические включения фосфата кальция, именуемые нанокластерами [78].

D.S. Horne рассматривает мицеллярный фосфат кальция не только как «сшивающий» (cross-linking), но и как **нейтрализующий**, положительно заряженный агент, связанный с от-

рицательно заряженными фосфосериновыми кластерами $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -CN. Связавшись с анионными кластерами казеинов, фосфат кальция уменьшает их отрицательный заряд до такого уровня, при котором начинают доминировать силы гидрофобного взаимодействия. То, что последние являются важными для поддержания интегральной стабильности мицеллы, подтверждается следующими фактами.

Как показали Т.С.А. McGann и Р.Ф. Fox [27], мицеллы почти полностью диссоциируют в присутствии мочевины, препарата, который не разрушает связи, образованные фосфатом кальция, но ослабляет гидрофобные взаимодействия. В то же время мицеллярная структура казеина сохраняется в случае растворения нанокластеров фосфата кальция, при кислых значениях pH (суммарный заряд казеинов снижается по мере приближения к изоэлектрическим точкам) [102]. В данном случае то, что мицеллы не диссоциируют при растворении нанокластеров, объясняется конкурентной нейтрализацией фосфосериновых зарядов протонами; таким образом, баланс внутримицеллярных сил склоняется в сторону гидрофобных сил притяжения. Однако если молоко диализовать (удалить ионы) и установить первоначальные значения pH-6,5–6,7 (суммарный отрицательный заряд казеинов, по мере удаления от изоэлектрических точек, возрастает), происходит диссоциация мицелл казеина [103], поскольку вновь приобретающие заряд фосфосерины (при повышении pH) не экранируются ионами Ca^{2+} и силы электростатического отталкивания начинают превалировать над гидрофобными взаимодействиями [12].

Аналогичная картина (диссоциация мицелл) наблюдается, если при физиологических значениях pH молока (далеких от изоэлектрических точек казеинов), удалить ионы кальция таким хелатирующим агентом, как ЭДТА [26] или элиминировать фосфат кальция, диализовав молоко против буфера, не содержащего фосфатов [104]. Эти данные также возможно интерпретировать как результат усиления действия сил электростатического отталкивания, преобладающих гидрофобные взаимодействия, что приводит к диссоциации казеиновых мицелл молока.

Каппа-казеин присоединяется к мицелле N-терминальным (гидрофобным) участком, а также за счет гидрофобных взаимодействий. Единственный фосфосериловый остаток данного представителя казеинов находится в макропептидной области молекулы (SeP149) [1], которая образует «волоосковый» слой, важный для поддержания стерической стабильности мицеллы, что признается авторами почти всех выдвигавшихся моделей. Фосфорилированный остаток Ser149 в молекуле κ -казеина является «свободным» анионным сайтом, поскольку не образует никаких связей с фосфатом кальция [12, 31].

Таким образом, модель D.S. Horne рассматривает казеины как сополимеры блочной структуры, в которых чередуются гидрофильные и гидрофобные участки: β - и κ -CN состоят из двух, $\alpha 1$ -CN – из трех, а $\alpha 2$ -CN из четырех блоков [92]. Рост мицеллы происходит так, как это изображено на рисунке 2.13.

Первоначально два или несколько гидрофобных (неполярных) участков разных молекул $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -CN образуют гидрофобно-связанный кластер. Рост таких полимеров ингибируется силами электростатического отталкивания отрицательно заряженных фосфорилированных остатков серина. Нейтрализация заряженных фосфосериловых остатков происходит за счет их реакции с нанокластерами фосфата кальция, что приводит к образованию следующего гидрофобного кластера, и так далее. Считается, что один нанокластер КФК может эффективно экранировать фосфосериловые остатки четырех молекул казеинов, одновременно связывая их [96]. Терминирование роста цепи происходит, когда образование очередного гидрофобного кластера происходит при участии κ -казеина. После этого рост цепи прекращается по двум

причинам: во-первых, макропептидная область κ -CN гидрофильна и не формирует гидрофобных связей, во-вторых, её фосфосериловый остаток не связывается через фосфат кальция с гидрофильными фосфорилированными участками других казеинов [12, 31]. Так, κ -CN, этот молекулярный «терминатор», преимущественно оказывается на поверхности мицеллы, формируя «волосковый» слой, который стабилизирует её до того момента, пока сам не будет разрушен протеолитическим ферментом (за счет гидролиза связи Phe105-Met106) или изменением физико-химических свойств окружающего его раствора [61, 105].

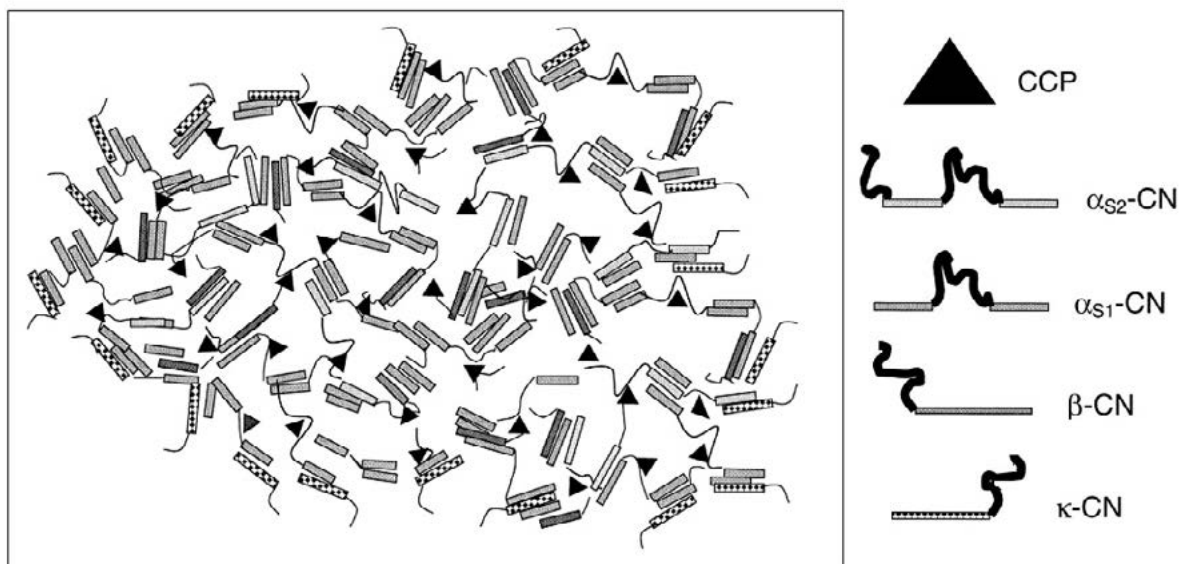


Рис. 2.13. Структура казеиновой мицеллы согласно поликонденсационной модели (модели двойного связывания) D.S. Horne [12, 16, 31]. Прямоугольные участки и изогнутые линии на схемах казеинов соответствуют гидрофобным и гидрофильным участкам полипептидной цепи. Треугольником (▲) обозначены нанокластеры коллоидного фосфата кальция (CCP – colloidal calcium phosphate)

Поддержание интегральной целостности казеиновой мицеллы молока является сложным равновесным процессом, который не всегда поддается однозначному объяснению. Например, изменение физиологических значений pH молока в сторону его увеличения вызывает диссоциацию мицелл, о чем свидетельствует уменьшение оптической плотности молока при $\text{pH} > 8,0$. Возможно, это вызвано значительным возрастанием заряда фосфосериловых групп, в результате чего они утрачивают связь с мицеллярным фосфатом кальция, или же усиление общего отрицательного заряда белков критично для состояния равновесия и сдвигает его в сторону преобладания сил электростатического отталкивания.

Увеличение ионной силы также приводит к диссоциации мицелл молока [106] либо из-за уменьшения рК карбоксильных групп, что приводит к увеличению суммарного заряда белка, либо из-за скрытых механизмов, влияющих на физико-химические свойства нанокластеров фосфата кальция. Установление тонкого механизма интегральной целостности мицеллы является объектом дальнейших исследований.

2.5. Мицеллярные взаимодействия

Концепция образуемого молекулами каппа-казеина «волоскового» слоя, стабилизирующего мицеллу стерически и электростатически [22, 40, 61, 107], получила всеобщее признание. В модели D.S. Horne отрицательно заряженные макропептидные «хвосты» каппа-казеинов также физически препятствуют сближению и взаимодействию гидрофобных участков казеинов и тем самым предотвращают их агрегацию и гелеобразование [31]. Изoeлектрическая точка мицелл находится при $\text{pH} \approx 4,6$ [108]. Приближение к изoeлектрической точке мицелл

при подкислении молока снижает растворимость макропептидного участка к-CN. При 2 °С мицеллы остаются стабильными до порогового значения pH ≈ 5, дальнейшее минимальное понижение pH приводит к коллапсу (сжиманию) волоскового слоя, агрегации мицелл и образованию геля [108–110]. Таким образом, любые события, приводящие к «выключению» функции гликомакропептидного участка: устранение при помощи протеолитического фермента (химозина, пепсина), нейтрализация заряда и коллапс при понижении pH или в присутствии этанола, – инициируют коагуляцию. По мнению автора модели двойного связывания, то, что после устранения стабилизирующего «волоскового» слоя, в дело вступают гидрофобные взаимодействия, подтверждается тем, что ни обработка химозином, ни подкисление молока до значений изоэлектрических точек казеинов, не сопровождается агрегацией мицелл и гелеобразованием при температурах ниже 10 °С [31]. Сразу же отметим, что агрегация очень слабо выражена и при минимальных концентрациях Ca²⁺ и это позволяет предполагать его участие как в нейтрализации отрицательного заряда казеинов (и сил электростатического отталкивания), так и в формировании специфических ионных связей [16, 111].

2.6. Может ли модель структуры казеиновой мицеллы D.S. Horne объяснить некоторые реологические свойства молочных гелей?

Молочные гели представляют собой вязкоупругие структуры, для исследования которых используется метод малоамплитудных динамических колебаний [14, 16, 112–115]. Принцип метода заключается в следующем. Образец подвергается сдвиговой синусоидальной деформации малой амплитуды. В результате чего в образце возникает напряжение сдвига, которое изменяется также синусоидально, но не совпадает по фазе с деформирующим воздействием. Сдвиг фазы зависит от вязкоупругих свойств исследуемого материала. В случае абсолютно упругих структур деформирующее усилие и напряжение сдвига колеблются в одной фазе, для абсолютно вязких материалов сдвиг фазы составляет 90°. Для вязкоупругих материалов, таких как молочные гели, сдвиг фаз принимает промежуточное значение. Основными исследуемыми параметрами являются: модуль упругости (elastic или storage modulus) G' , который определяет количество энергии аккумулируемой системой за один колебательный цикл, модуль потерь (viscous или loss modulus) G'' , который определяет энергию, рассеянную за один цикл в виде тепла, и тангенс угла потерь (loss tangent) $\tan \delta$, который зависит от соотношения вязких и упругих свойств. Указанные параметры определяются так:

$$G' = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \cos \delta;$$

$$G'' = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \sin \delta;$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'},$$

где τ_0 – амплитуда напряжения сдвига; γ_0 – амплитуда деформации; δ – угол сдвига фаз.

Применительно к молочным гелям тангенс угла потерь ($\tan \delta$) характеризует релаксацию (ослабление) связей в сгустке в процессе его деформации [16, 112, 113]. Исследование реологических свойств сычужных гелей методом малоамплитудных динамических колебаний [116] показало, что после небольшого изначального lag-периода, во время которого происходит гидролиз к-CN, наблюдается быстрое уплотнение геля, сопровождающееся потерей эластичности (рис. 2.14).

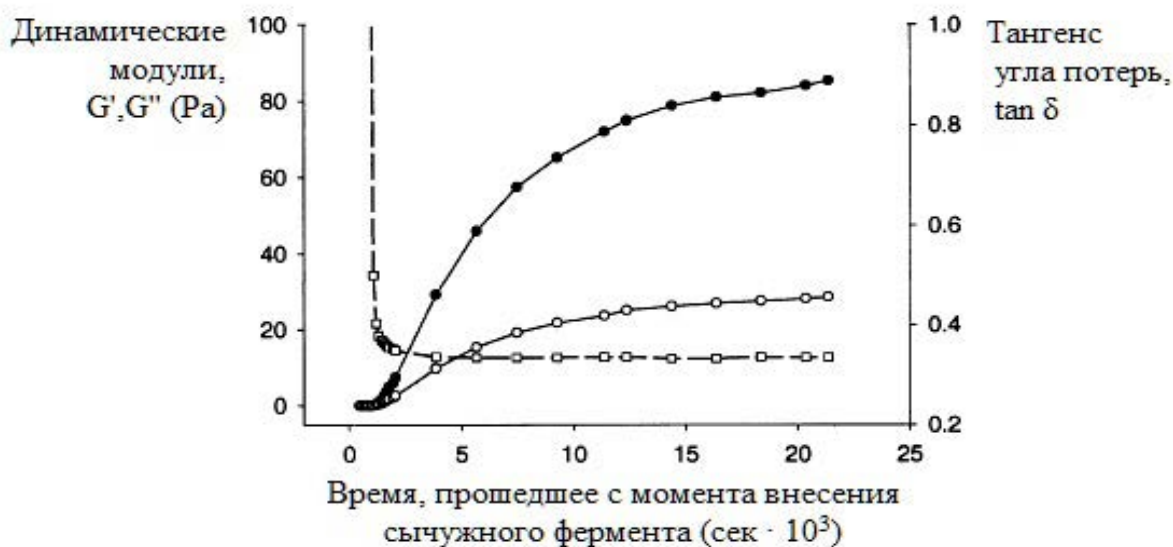


Рис. 2.14. Реологические свойства модельного сычужного геля как функция времени после внесения сычужного фермента. Данные получены методом динамических малоамплитудных колебаний с частотой 0,1 Гц [16, 116]. Условные обозначения: (●) модуль упругости, G' ; (○) модуль потерь, G'' ; (□) тангенс угла потерь, $\tan \delta$

В момент гелеобразования $\tan \delta$ быстро уменьшается, до значения ~0,3, которое не изменяется при постоянных значениях pH в течение примерно 7 часов, что свидетельствует об образовании и стабилизации множественных связей между мицеллами, а также об усилении эластичных свойств геля. Динамические модули (G' , G''), изначально быстро увеличивающиеся, постепенно выходят на плато, что интерпретируется как увеличение площади контакта между агрегировавшими мицеллами и дополнительное инкорпорирование мицелл в гель. Известно, что скорость агрегации сычужно-модифицированных (rennet-altered) мицелл казеина возрастает с увеличением температуры. Диапазон температур свертывания, при которых образуются гели с наибольшими значениями модуля упругости (G') составляет 30–35°C [16].

В отличие от сычужных сгустков, йогуртовые гели можно отнести к кислотным, поскольку они формируются за счет снижения pH среды в результате ферментации лактозы и молочной кислоты термофильными штаммами стартерной закваски (*Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*). Процесс образования йогуртовых гелей протекает при более высоких температурах, порядка 40–45°C, а в качестве сырья используют предварительно прогретое молоко [16].

Длительная тепловая обработка молока при температурах выше 70°C вызывает денатурацию сывороточных белков, некоторые из них ассоциируют с казеиновыми мицеллами, в частности с κ -CN, за счет гидрофобных взаимодействий и формирования межмолекулярных дисульфидных связей [117]. Взаимодействие денатурированных сывороточных белков с мицеллами казеина облегчает формирование трехмерной сетки геля, что приводит к значительному увеличению модуля упругости (G') [118]. В силу этих технологических особенностей реологические и физико-химические показатели сычужных и кислотных гелей значительно различаются (табл. 2.2).

Технология получения сгустка при выработке большинства натуральных сыров предусматривает использование молокосвертывающего фермента (МФ) и бактериальной заквасочной культуры, активность которой приводит к значительному закислению среды. В результате формируются комбинированные гели, образование которых инициируется молокосвертыва-

вающим ферментом, а изначальные реологические свойства изменяются при снижении pH [121, 122].

Таблица 2.2

Сравнительные характеристики сычужных и кислотных гелей [16,119,120]

Реологические и физико-химические параметры	Сычужные гели ¹⁾	Кислотные гели ²⁾
Модуль упругости ³⁾ , G' , (Па)	85-95	200-220
Тангенс угла потерь, $\tan \delta$, максимальное значение ⁴⁾	~ 0,35	0,50-0,54
Напряжение деформации, (Па)	80-95	90-100
Проницаемость, 10^{-3} м^2	~2,5	~1,5
Поверхностное отделение сыворотки, 5) %	~ 0,1	~ 1,1

1) Сычужные гели получены при 32 °С. Измерения выполнены спустя 6 часов после внесения молоко-свертывающего фермента в молоко.

2) Кислотные гели получены из молока, прогретого при 82 °С в течение 30 минут и инкубировавшиеся при 40 °С с 2% стартерной культурой. Измерения выполнены при pH=4,6.

3) Измерения выполнены при частоте 0,1 Гц.

4) Приведены максимальные значения, достигнутые после фазы гелеобразования;

5) Количество спонтанно выделяемой сыворотки.

Рассмотрим динамику изменения реологических свойств сырного сгустка и попытаемся интерпретировать её исходя из представлений модели D.S. Horne о балансе электростатических и гидрофобных сил при внутри- и межмицеллярных взаимодействиях (рис. 2.15).



Рис. 2.15. Реологические свойства модельного сырного сгустка. Сгусток содержит жидкий сычужный фермент (~7,5 мл на 100 кг молочной смеси) и кислотообразующую стартерную культуру для сыров типа Чеддар (~16 гр на 100 кг молочной смеси). Данные получены при температуре 32 °С методом динамических малоамплитудных колебаний с частотой 0,1 Гц и амплитудой 1% [16, 121]. Условные обозначения: (●) модуль упругости, G' ; (□) pH; (▲) тангенс угла потерь, $\tan \delta$

В момент гелеобразования тангенс угла потерь ($\tan \delta$) снижается до минимума и остается на постоянном уровне, а модуль упругости (G') постоянно нарастает до тех пор, пока pH не достигнет значения ~5,5. При этих значениях pH происходит растворение комплексов ККФ, часть меж- и внутримицеллярных связей утрачивается за счет высвобождения ионов

Ca^{2+} . Растворение ККФ изменяет баланс между вязкими и упругими свойствами геля. В результате G' начинает стремительно снижаться, а $\tan \delta$ нарастает и достигает максимума.

При дальнейшем понижении pH ($<5,0$) отрицательный заряд казеинов, формирующих трехмерную сеть геля, уменьшается (казеины переходят в изоэлектрическое состояние), вместе с ним уменьшаются и силы электростатического отталкивания, следовательно, одновременно усиливаются гидрофобные взаимодействия. В ответ на эти изменения тангенс угла потерь ($\tan \delta$) начинает снижаться, а модуль упругости повышается.

Молоко утрачивает способность сворачиваться при действии МФ, если концентрация ККФ снижается на 30% (при постоянной активности Ca^{2+}). Утраченная коагуляционная способность молока может быть восстановлена путем добавления CaCl_2 [123, 124]. Поскольку элиминация ККФ приводит к диссоциации значительных количеств казеина, было не совсем понятно, с чем связана утрата способности молока к свертыванию: с потерей ККФ или со значительными структурными изменениями казеиновых мицелл. С учетом идей D.S. Horne можно рассматривать элиминацию ККФ как утрату связующих кальций-фосфатных мостиков, приводящую к росту сил электростатического отталкивания между молекулами казеинов, как следствие, к их частичной диссоциации из мицелл. Внесение хлорида кальция не только восстанавливает внутримицеллярные кальций-фосфатные связи, но и гасит силы электростатического отталкивания между казеинами [16].

2.7. Казеины как реоморфные белки.

«Новый взгляд» на структуру казеинов

Детерминированность структуры и функции белков является одним из главных положений молекулярной биологии. Основные функции и свойства казеинов – эффективное связывание и транспорт Ca^{2+} , а также способность к самоассоциации, приводящая к образованию стабильных коллоидных систем, – исследованы достаточно подробно [125, 126]. В отличие от функций казеинов, их пространственная организация во многом остается *terra incognita*. Ранние работы с использованием методов оптического рассеивания показали, что в казеинах отсутствуют α -спиральные структуры, а поскольку это было всё, что поддавалось измерению на тот момент, казеины стали считать белками с нерегулярной (случайной, хаотической, статистической) структурой.

Это так называемый «старый взгляд» на структуру казеинов [125]. Гетерогенность структур затрудняет детальную характеристику нерегулярных белков, поэтому пространственную организацию таких протеинов часто характеризуют как случайный (статистический) клубок (random coil). Состояние статистического клубка рассматривается как совокупность огромного количества случайных конформаций белковой молекулы, подвижность которой определяется вращением вокруг жестких ковалентных связей [127]. Однако все больше данных свидетельствует о том, что в случае нерегулярных белков мы имеем дело не с такой экстремально хаотичной структурой. Разработка и внедрение новых методов определения аминокислотной последовательности и спектрального анализа структуры белков позволили говорить о наличии периодических (а значит, упорядоченных) участков в молекулах казеинов [125, 128].

В основе «нового взгляда» на пространственную организацию казеинов лежит **концепция нативно-неупорядоченной структуры** некоторых белков. Принято считать, что нерегулярные белковые структуры образуются при действии определенных денатурирующих факторов (температуры, хаотропных агентов, УФ-излучения и др.), т.е. в условиях, отличных от физиологических. Но в последние годы становится всё более очевидным, что белки, имеющие нерегулярную структуру, существуют также и при физиологических условиях [129].

То, что такие белки могут выполнять важные биологические функции, заставляет по-иному взглянуть на парадигму структурно-функциональных характеристик протеинов [130]. В настоящее время к белкам с нативно-неупорядоченной структурой относят фосфофорины кости и фосвитины яичного желтка [131], ингибиторы протеаз Боумана-Бирка [132], металлотронеины [133], протимозин α [134], бактериальный фибронектин-связывающий белок [135], α -, β -, γ -синуклеины мозга [136], а также **α -, β -, и κ -казеины молока** [82, 127].

Большинство перечисленных выше белков, в том числе и казеины молока, характеризуются наличием особенного элемента вторичной структуры, который получил название, поли(L-пролин) II (PP II) спирали [127, 137]. С одной стороны, PP II-спираль не образует водородных связей, поэтому протяженные участки такой структуры придают белковой молекуле пластичные, подвижные свойства. С другой стороны, PP II-спираль делает пространственную структуру белка более открытой или «рыхлой». Структура типа PP II-спираль характерна для белков соединительной ткани – коллагенов, богатых пролином (Pro) и гидроксипролином (Hyp), но может присутствовать и в некоторых глобулярных белках [137, 138]. Особенности структуры PP II-спирали изучены на модельном соединении – поли-L-пролине. Этот синтетический полипептид имеет спиральную форму, совершенно отличную от α -спирали, так в нем отсутствуют водородные связи. Вместо них стабилизацию спирали обеспечивают силы стерического отталкивания пирролидоновых колец в остатках пролина. При спирализации полипептидной цепи пирролидоновые кольца располагаются как можно дальше друг от друга, образуя так называемую транс-спираль типа II, структура которой оказывается гораздо более развернутой по сравнению с туго закрученной α -спиралью [137–139]. Расстояние между двумя аминокислотными остатками по оси спирали поли-L-пролина составляет 3,1 Å, тогда как в α -спирали оно равно 1,5 Å. Относительное содержание иминокислот (пролин + гидроксипролин) в коллагене из кожи телят составляет 23,2% [140]. Относительное содержание только пролина в α 1-, α 2-, β - и κ -казеине составляет 8,5, 4,8, 16,7, 11,8% соответственно [1]. По сравнению с альфа-казеинами, бета- и каппа-казеины в большей степени богаты пролином, и именно в этих белках четко регистрируется спираль типа поли(L-пролин) II [127].

Впервые предположение о том, что казеины молока представляют собой не хаотичный клубок, а имеют особую функциональную доменную структуру, высказал Н.Е. Swaisgood в 1982 г. [126]. Позднее С. Holt и L. Sawyer (1993) обратили внимание на то, что открытая и относительно подвижная конформация казеинов, которая позволяет протеолитическим ферментам легко гидролизовать их до небольших полипептидов, лучше описывается как реоморфная (греч. *rheos* – поток, *morphe* – форма) структура, а не как случайный клубок [82]. Такая структура хорошо объясняет эффективное связывание кальций-фосфатных нанокластеров, ассоциативные свойства и высокую степень гидратации казеиновых мицелл (1–8 гр H₂O / грамм белка), а также шаперонные свойства α 1-казеина [141].

Основные различия реоморфного и глобулярного белков, имеющих одинаковое количество аминокислотных остатков, заключаются в следующем. Радиус вращения и гидродинамический радиус реоморфного белка примерно в 2–4 больше [82, 134, 135]. Относительно короткие участки реоморфных белков (5–10 аминокислотных остатков) образуют жесткие, малоподвижные отрезки [134, 135], остальные части молекулы могут формировать небольшие «островки» регулярной вторичной структуры с характерными для них взаимодействиями и связями. Реоморфная структура отличается и от состояния «расплавленной глобулы», поскольку последняя является почти такой же компактной, как полностью сформированная глобулярная структура. Радиус вращения и гидродинамический радиус «расплавленной гло-

булы» примерно на 10–30% больше, чем у полностью сформированной глобулярной структуры и имеет гораздо больше участков с регулярной вторичной структурой [127, 142, 143].

Так или иначе, но именно межмолекулярные взаимодействия конформомеров казеинов определяют их физиологическую функцию. В силу отсутствия жесткой трехмерной структуры, казеины очень быстро реагируют на функциональные изменения в клетках молочной железы, в частности, оперативно связывают небольшие кластеры фосфата кальция, предотвращая их преципитацию и кальцификацию тканей вымени [12, 42]. Выраженная конформационная подвижность казеинов позволяет им связывать и тем самым нейтрализовывать или транспортировать самые разные типы молекул, так что по этому параметру они могут быть отнесены к классу белков-сорбентов («мусорщиков») с неупорядоченной структурой [144].

Открытым остается вопрос о природе и движущих силах стабилизации структуры реоморфных белков. В 1998 г. D. Ingber предложил использовать концепцию напряженности (tensegrity) для описания структурных белковых взаимодействий [145]. Термин «напряженность» взят из архитектуры, где он используется для описания структур, которые самостабилизируются за счет баланса между силами сжатия и напряжения. Простая трехмерная модель, изображенная на рисунке 2.16, демонстрирует, как несколько жестких распорок, соединенных подвижными сжимающимися элементами, формируют стабильную открытую систему при минимуме используемых строительных материалов.

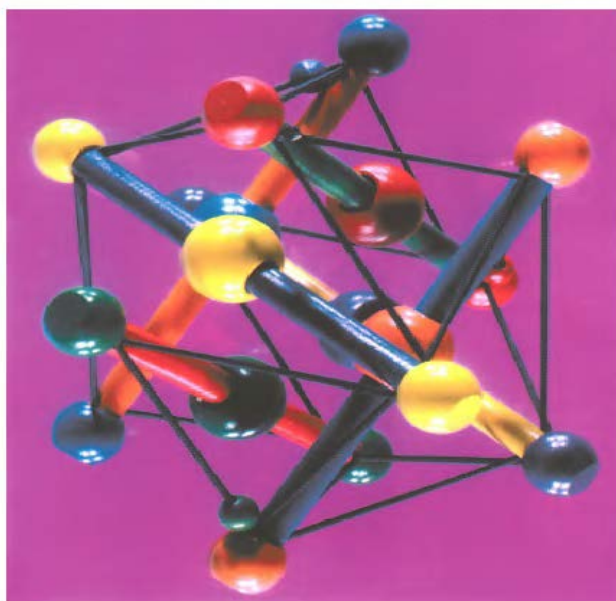


Рис. 2.16. Трехмерная модель, иллюстрирующая возможную стабилизацию структуры нативно-неупорядоченных белков в соответствии с концепцией напряженности [125]. Стабильная открытая структура, состоящая из жестких (толстых) стержней, соединенных эластичными (тонкими) упругими элементами (например, резиновыми жгутами). Стабилизация структуры достигается за счет баланса сил сжатия и напряжения

Позднее Н.М. Farrell (Jr.) с соавторами предположили, что структура казеинов стабилизируется в соответствии с принципом напряженности D. Ingber, т.е. определенным балансом сил сжатия и напряжения [125]. При этом пролин считается структуро-разрушающей аминокислотой по отношению к α -спирали и β -складке, но в то же время служит инструментом образования изгибов и поворотов в пептидах и белках [146]. В трехмерных моделях казеинов мотивы «складка-поворот-складка» с остатком пролина в центре (на участке «поворота») рассматриваются как относительно жесткие структуры, а участки, образующие петли и спирали, соответствуют более подвижным элементам [125].

2.8. Модель сцепленной трехмерной решетки

В последние годы идеи D.S. Horne получают практическое подтверждение и широко используются при трактовке результатов исследования структуры КМ с использованием традиционных для такого рода исследований физических методов: рентгеновского малоуглового рассеивания [76, 147], сканирующей [71] и трансмиссионной электронной микроскопии [70, 148], флюоресцентного анализа и турбидиметрии [95].

Невозможность получения кристаллов индивидуальных казеинов ограничивает использование методов кристаллографии и протонного ядерного магнитного резонанса для исследования структуры этих белков. В этих условиях электронная микроскопия является важнейшим инструментом расшифровки надмолекулярной организации казеинов внутри мицелл. При этом основной проблемой является такая подготовка образцов, чтобы полученное методом электронной микроскопии изображение максимально соответствовало супермолекулярной структуре нативных КМ [70, 148]. Рассмотрим одну из работ, выполненных с применением электронной микроскопии, подтверждающих правомерность идей D.S. Horne. Заметим, что предлагаемая авторами модель сцепленной (трехмерной) решетки (interlocked lattice model) – это модель поликонденсационного типа, но с «авторским» названием и подтвержденная результатами конкретного исследования.

В 2008 г. были опубликованы результаты исследования супермолекулярной (надмолекулярной) структуры казеиновых мицелл с использованием трансмиссионной электронной микроскопии высокого разрешения (High-Resolution Transmission Electron Microscopy = HRTEM). Для подготовки препарата медную сетчатую подложку (600 mesh) последовательно покрывали нитроцеллюлозой (толщина слоя 40 нм) и поли-L-лизинном. В результате получали поверхность с положительным электростатическим зарядом, на которой адсорбировали казеиновые мицеллы. Адсорбированные мицеллы обрабатывали уранил оксалатом, который связывается как с нанокластерами фосфата кальция, так и с казеинами и выполняет роль позитивного контрастанта, после чего препараты быстро охлаждали до $-159\text{ }^{\circ}\text{C}$, высушивали в вакууме (сублимировали) и исследовали методом HRTEM (рис. 2.17) [148].

Алгоритм анализа микрофотографий КМ. Для анализа было выбрано цифровое увеличенное изображение периферического участка КМ коровы (рис. 2.17А). Каждый электронно плотный участок (объект) помечали определенным цветом в зависимости от того, сколько пятен расположено в непосредственной близости от исследуемого объекта. Количество «соседей» (контактов) определяло функциональность (f) исследуемого объекта (рис. 2.17В). Терминирующие объекты ($f = 1$), обозначали красным, объекты с двумя соседними пятнами ($f = 2$) – зеленым, с тремя ($f = 3$) – синим, с четырьмя и более – черным цветом.

После выполнения этих процедур становится очевидно, что электронно плотные участки, лежащие в одной плоскости, образуют линейные и разветвленные полимерные цепочки, сцепленные друг с другом в определенных участках (узлах). В местах сцепления наблюдается скопление нескольких электронно плотных участков. При этом полимерные цепочки образуют похожие на звезду структуры, в центре которых расположены узлы, от которых расходятся «лучи», упирающиеся в другие узлы. Таким образом, в пространстве электронно плотные области образуют трехмерную сетчатую структуру (решетку), содержащую звездообразные точки сцепления (рис. 2.17С, 2.17D).

Полимеризация казеинов. Полимеризационное (агрегационное) поведение различных групп казеинов определяется их химической структурой. Функциональность (f) индивидуальных казеинов зависит от нескольких типов взаимодействий, общих для большинства белков: 1) Ca^{2+} -опосредуемых взаимодействий с кластерами фосфосериновых групп [149]; 2) взаимо-

действий гидрофобных и гидрофильных участков [150]; 3) образования водородных связей и различных электростатических взаимодействий (образование кальциевых мостиков между одиночными отрицательно заряженными группами, формирование ионных пар). Кроме того, возможны и другие способы взаимодействия казеинов друг с другом – образование гомополимеров (гомоагрегатов) и гетерополимеров (гетероагрегатов), – и с минералами (прежде всего с ионами Ca^{2+} и нанокластерами фосфата кальция). Поэтому в зависимости от микроокружения степень функциональности казеинов может варьировать.

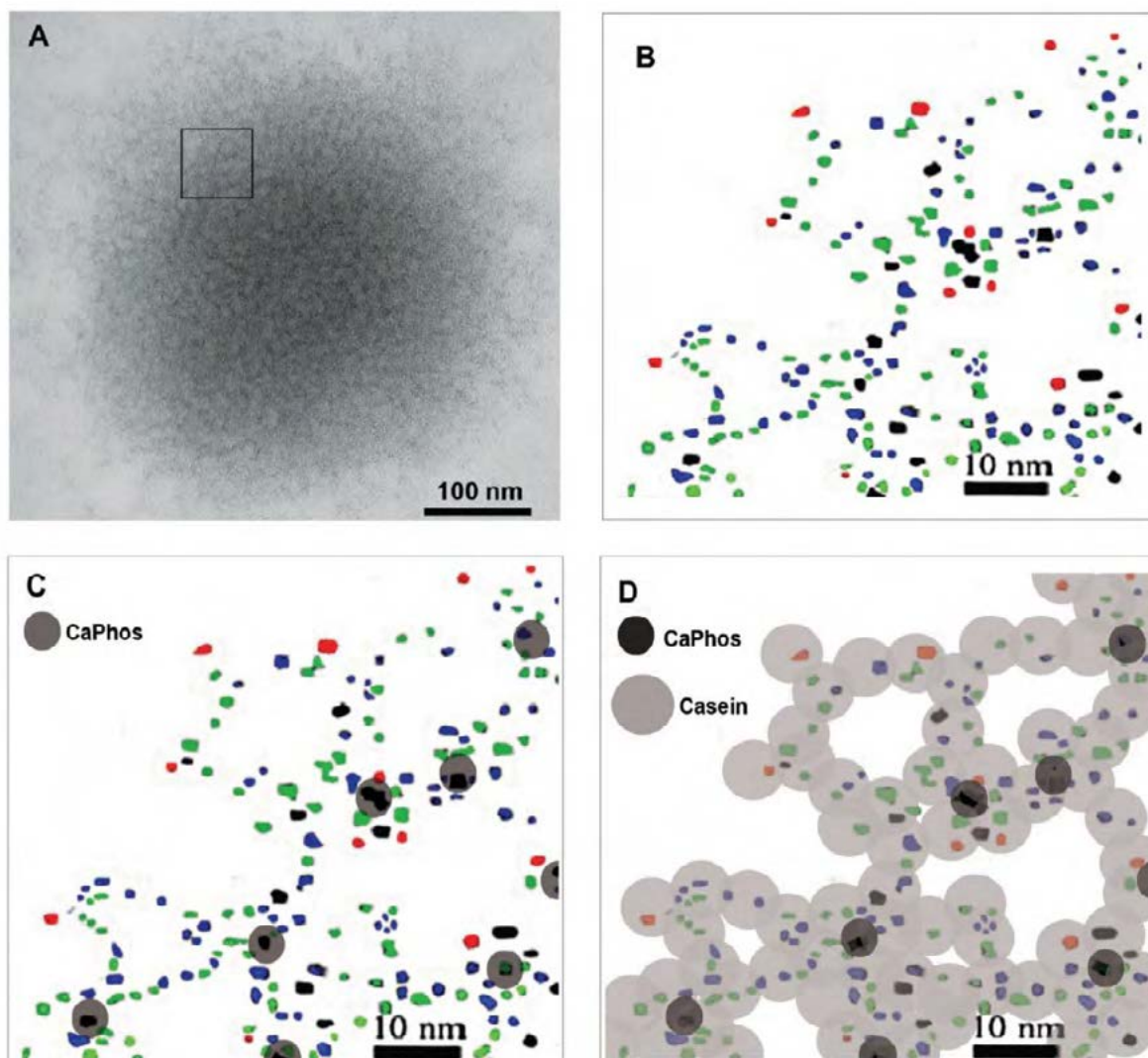


Рис. 2.17. Основные стадии анализа микрофотографий казеиновых мицелл, полученных методом трансмиссионной электронной микроскопии высокого разрешения (HRTEM) [148]. А. Микрофотография казеиновой мицеллы, в рамке – периферический участок изображения, выбранный для анализа. В. Увеличенное цифровое изображение периферического участка мицеллы на котором электронно плотные участки, расположенные в одной плоскости, помечены определенным цветом, в зависимости от количества контактов (красный – один контакт, зеленый – два контакта, синий – три контакта, черный – четыре контакта и более). С. Нанокластеры фосфата кальция (радиус $\approx 4,8$ nm) обозначены темными кругами. D. Электронно плотные участки (радиусом ≈ 8 nm), соответствующие молекулам казеинов, обозначены кругами серого цвета [148]

Основываясь на том, что молекула $\alpha\text{s}1\text{-CN}$ связывает от 4 до 10 ионов Ca^{2+} , D.G. Dalgleish и T.G. Parker установили, что для кальций-индуцированной агрегации этого белка $f = 2$ [149]. D.S. Horne с соавторами считают, что κ -, β - и αs -CN являются, соответственно, терминирующи-

ми ($f = 1$), бифункциональными ($f = 2$), и трифункциональными ($f = 3$) белками [151]. По мнению авторов рассматриваемого исследования, более правильным было бы считать $\alpha 1$ -казеины бифункциональными ($f = 2$), а $\alpha 2$ -казеины – трифункциональными ($f = 3$) [148].

Как известно, внутри мицеллы казеины могут вступать в белок-белковые гидрофобные и ионные взаимодействия [95], а также взаимодействовать с нанокластерами фосфата кальция при участии фосфосериновых групп. Для анализа таких внутримицеллярных казеин-казеиновых взаимодействий D.S. Horne [12,31] и S.R. Euston и D.S. Horne [152] предложили рассматривать казеины как блочные полимеры, которые состоят из чередующихся участков (блоков) богатых гидрофильными и гидрофобными аминокислотами.

С точки зрения самосборки КМ, полифункциональность казеинов является одной из важнейших характеристик этих белков. Заметим, однако, что такие молекулы, как, например, $\alpha 2$ -CN, с четырьмя функциональными участками, не обязательно вступит в максимально возможное количество контактов с другими белками хотя бы из-за наличия стерических препятствий и ограничений. Совокупность различных способов ассоциации казеинов, растворимость фосфата кальция и способность фосфосериловых групп α - и β -CN стабилизировать фосфат кальция в виде аморфных нанокластеров, предполагает возможность того, что внутренняя структура КМ содержит как глобулярные, так и линейные белковые агрегаты [148].

Нанокластеры фосфата кальция (НФК). Наиболее вероятными кандидатами на роль агентов, ответственных за группирование электронно плотных участков (рис. 2.17В) и образование узлов в супермолекулярной структуре КМ, являются НФК. С. Holt с соавторами придерживаются мнения, что функциональность НФК ≥ 4 , поскольку они способны связывать одновременно несколько молекул фосфопротеинов ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ - и β -CN) [153]. В процессе формирования КМ быстрое связывание четырех-пяти молекул казеинов с НФК приводит к образованию структурообразующих точек (центров) [78], – казеинат-кальцийфосфатных агрегатов размером 7–13 nm [154]. Поскольку при формировании узлов домены молекул $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -CN, несущие фосфосериновые кластеры, развернуты в сторону нанокластеров КФК, то и гидрофобные области соседних белков могут взаимодействовать друг с другом. Такое латеральное («боковое») связывание казеинов напоминает самоориентацию амфифильных белков, образующих мономолекулярный слой на границе раздела водной и масляной фазы [155]. Внутри мицеллы казеины связываются и удерживаются друг с другом не только за счет взаимодействия НФК и фосфосериловых кластеров, но и за счет белок-белковых гидрофобных и электростатических взаимодействий. Поэтому, если растворить НФК, мицелла будет сохранять структуру до тех пор, пока не будут разрушены (или ослаблены до некоторого критического значения) гидрофобные и электростатические казеин-казеиновые взаимодействия [148].

Супермолекулярная структура КМ. Соответствующие казеинам электронно плотные участки на обработанных ТЭМВР-микрофотографиях (рис. 2.17D), условно обозначили сферами диаметром 8 nm (при этом нужно четко представлять, что конформационный облик молекул казеинов не является сферическим и во многом зависит от взаимодействий с соседними молекулами белков). В состав казеинаткальцийфосфатных агрегатов могут включаться как моно- так и олигомеры казеинов, причем олигомерные формы могут взаимодействовать с различными НФК. В дополнение к казеин-казеиновым гидрофобным взаимодействиям структура КМ стабилизируется за счет кальциевых мостиков между карбоксильными группами или фосфосериловыми остатками, которые не входят в состав анионных кластеров, связанных с НФК [156].

Анализ ТЭМВР-изображений не только показывает, что КМ имеют открытую (рыхлую) структуру, но и позволяет выявить такие нюансы структурной организации, как длинные ли-

нейные, разветвленные или двойные переплетенные цепочки казеинов. Повсюду встречаются короткие ответвления от белковых цепочек, которые, по-видимому, являются результатом терминирующего действия κ -CN, молекулы которого присутствуют не только на поверхности КМ, но и в её глубине. Свободное пространство внутри КМ занято сывороточной фазой, содержащей лактозу, ионы, и другие растворимые субстанции молока [148].

Модель сцепленной (трехмерной) решетки (interlocked lattice model). По результатам исследования ТЭМВР-изображений предложена модель супермолекулярной структуры КМ (рис. 2.18). Молекулы казеинов окружают нанокластеры КФК, связывают между собой узловые точки и частично выходят за пределы мицеллы. Супермолекулярная структура иррегулярна и предполагает огромное разнообразие связей между НФК, играющими роль точек связывания, и казеинами, которые «работают» как удлинители (β - и α s1-CN), разветвители (α s1- и α s2-CN) и терминаторы (κ -CN) мицеллярных белковых цепей.

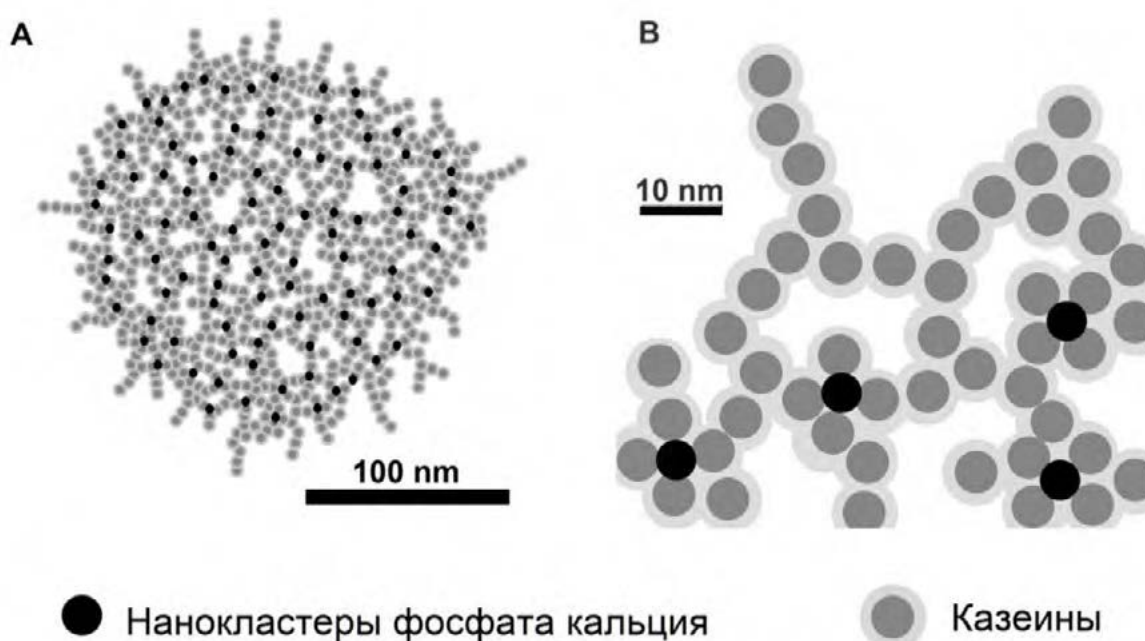


Рис. 2.18. Структура казеиновой мицеллы согласно модели сцепленной (трехмерной) решетки [148]. А. Схема супермолекулярной структуры казеиновой мицеллы в поперечном разрезе. В. Периферический участок казеиновой мицеллы, на котором нанокластеры фосфата кальция диаметром $\approx 4,8$ nm обозначены черными кругами, а молекулы казеинов, с условным «гидродинамическим» диаметром ≈ 8 nm, – серыми кругами

Часть казеиновых полимерных цепочек, заканчивающихся молекулами κ -CN (мономерного или в форме дисульфидно связанных полимеров), выходит за пределы основного объема мицеллы (подобно протуберанцам на поверхности Солнца или «шипам» коронавируса SARS-Cov-2) (рис. 2.18А, 2.18В).

Количество казеиновых «протуберанцев» несколько меньше, чем это постулировалось предшествующими описаниями поверхности КМ, – моделями «волоскового слоя» (hairy layer) [157] и «полиэлектролитной щетки» (polyelectrolyte brush) [42], которые исходили из того, что весь мицеллярный каппа-казеин локализован на поверхности мицеллы. Длина протуберанцев составляет примерно 30 нм, что согласуется с данными D.G. Dalgleish с соавторами, полученными методом сканирующей электронной микроскопии [71].

В целом, супермолекулярная структура образует стабильную коллоидную частицу, состоящую, в зависимости от диаметра КМ, из 0,5–10 тысяч белковых молекул и нескольких сотен НФК. Расстояние между участками сцепления (узлами) колеблется от 16 до 48 нм, но в среднем составляет примерно 18 нм [140], что совпадает с расчетами C.G. de Kruif и C. Holt для НФК [42]. Согласно данным E. Smith с соавторами, на долю фосфата кальция приходится примерно 7% сухой массы КМ [144], таким образом, мицелла диаметром 200 нм и массой порядка 10⁶ кДа содержит примерно 800 НФК [148].

Функциональность казеинов коровьего молока носит избыточный (дублированный) характер, как это видно на примере перекрывающейся функциональности α s1-, α s2- и β -CN [148]. Соотношение индивидуальных групп белков и их функциональность в молоке разных видов млекопитающих может варьировать, что сказывается как на топографии казеинов в структуре КМ, так и на размерах мицелл (рис. 2.19).

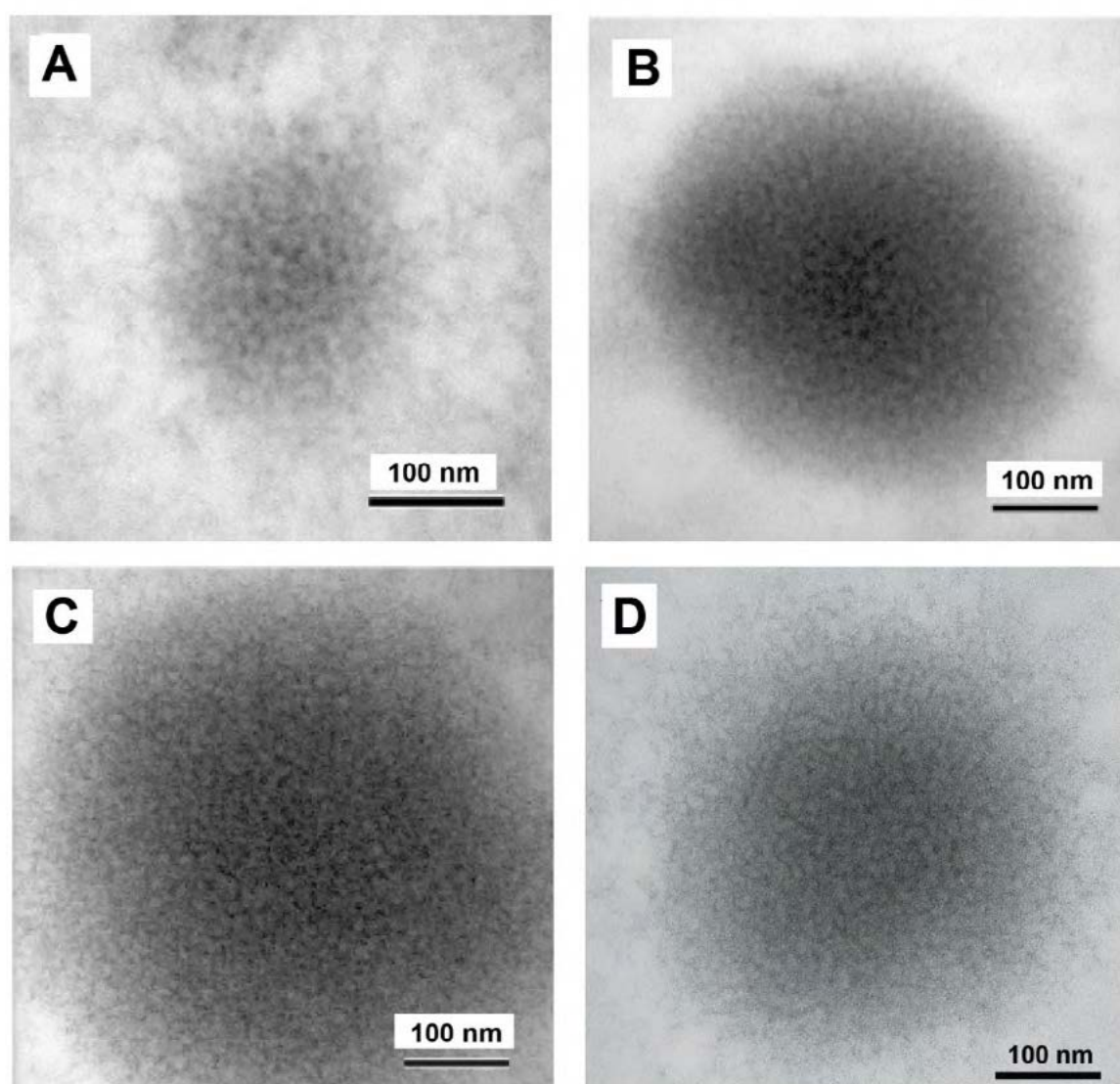


Рис. 2.19. Микрофотографии казеиновых мицелл человека (А), лошади (В), козы (С) и коровы (D), полученные методом трансмиссионной электронной микроскопии высокого разрешения (HRTEM) [148]

Например, генетический вариант F α s1-CN козьего молока не содержит фосфосериновых кластеров, следовательно, выступает (как коровий κ -CN) в качестве терминатора белковых цепей, поэтому локализован преимущественно на поверхности мицеллы [158]. Но, несмотря

на внутривидовые различия, в каждом конкретном случае белки, синтезируемые молочной железой, адаптированы к выполнению основной миссии – формированию коллоидных супермолекулярных структур, обеспечивающих транспорт фосфата кальция и белков, необходимых для роста и развития новорожденного. Микрофотографии, представленные на рисунке 2.19, свидетельствуют о том, что казеиновые мицеллы человека, коровы, лошади и козы имеют сходную надмолекулярную структуру [148].

2.9. Фибриллоподобные структуры в казеинах и казеиновых мицеллах

Наблюдаемый в последнее десятилетие интерес к белкам с нативно-неупорядоченной структурой (ННС) объясняется главным образом их способностью образовывать фибрилловые комплексы и фибриллоподобные структуры [159]. Установлено, что при определенных условиях белки с ННС агрегируют не случайным образом, а соединяются в упорядоченные фибриллы, состоящие из участков полипептидных цепей, имеющих бэта-складчатую структуру и связанных между собой водородными связями. При этом бэта-складки различных полипептидных цепей располагаются параллельно оси фибриллы [160, 161].

Причиной образования внутриклеточных фибриллярных комплексов могут быть мутации, в результате которых изначально стабильные глобулярные белки начинают формировать амилоидогенные структуры, которые являются причиной возникновения различных заболеваний, в частности, таких как возрастной системный амилоидоз (болезнь Альцгеймера) [162, 163]. Кроме того, *in vivo* многие глобулярные белки, например, β -лактоглобулины, которые в норме не являются амилоидогенными, при условиях, вызывающих их частичную денатурацию, могут образовывать фибриллоподобные самоассоциаты [164]. Молекулярные механизмы формирования таких фибрилловых комплексов остаются загадкой [165].

В случае белков с ННС вся полипептидная цепь или ее участок сначала формирует бэта-складчатую структуру шириной 5–13 нм, в которой водородные связи расположены вдоль оси фибриллы [163]. Образование фибрилл начинается с ассоциации белков в небольшие гранулоподобные аморфные агрегаты, которые трансформируются в короткие тонкие протофибриллы [161] из которых, в свою очередь, формируются линейные, неветвящиеся макрофибриллы длиной 200–600 нм [166].

Классическими способами количественной и качественной регистрации фибрилловых белковых комплексов является окраска препаратов красителями Конго красный [167] или Тιοфлавин Т [168]. В 2005 г. D.C. Thorn с соавторами, используя Тιοфлавин Т, показали, что в растворе α S- и κ -CN (но не β -CN) могут формироваться фибриллоподобные структуры [169].

Эти данные хорошо согласуются с результатами компьютерного моделирования пространственной структуры казеинов, которые указывают на наличие в молекулах α S1- и κ -CN структурных мотивов типа «складка-поворот-складка» (sheet-turn-sheet motifs) которые считаются первичными «строительными» блоками формирования фибрилл [170, 171]. Кроме того, H.M. Farrel (Jr) с соавторами показали, что молекула каппа-казеина может формировать четыре бэта-складчатых участка, разделенных отрезками с R-группой пролина в центре, которая обеспечивает поворот (изгиб) полипептидной цепи. Эти же авторы установили, что бэта-складчатые участки такого типа могут взаимодействовать между собой с образованием фибриллоподобных комплексов [172].

Динамичная (реоморфная) трехмерная структура казеинов [82] и их способность образовывать упорядоченные белковые агрегаты послужили основанием для выдвижения R.W. Lencki гипотезы о присутствии фибриллярных структур в нативных казеинах и казеиновых мицеллах [173].

В подтверждение своей гипотезы R.W. Lencki приводит следующие данные. Внесение Конго красного (КК) в препараты разбавленного коровьего молока и в препараты индивидуальных казеиновых фракций вызывает смещение спектров поглощения в красную сторону, что указывает на присутствие фибриллоподобных структур (рис. 2.20А).

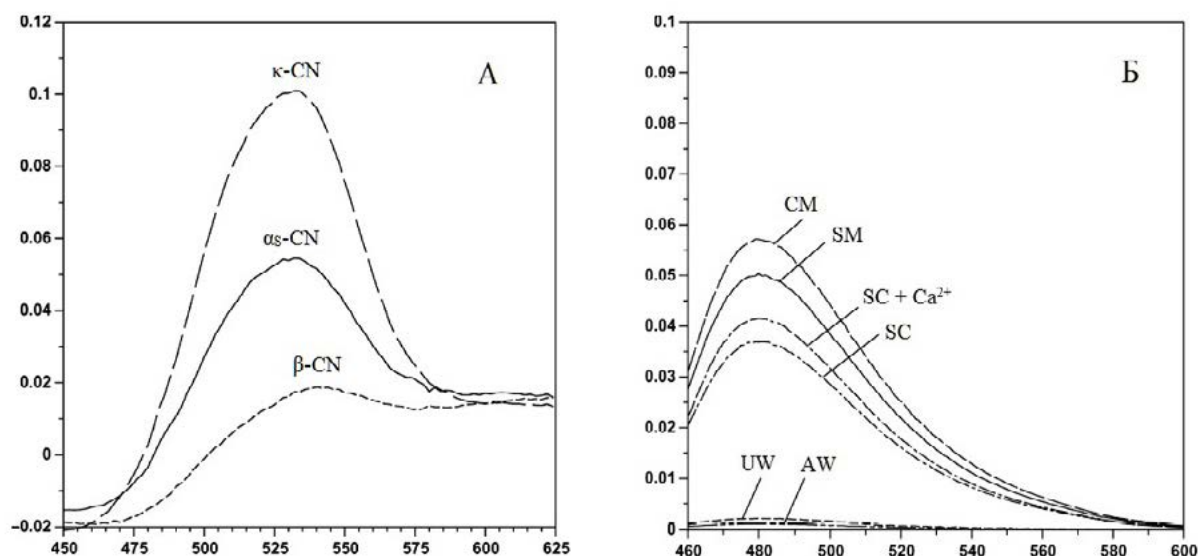


Рис. 2.20. Спектры поглощения казеинов (А) и тиюфлавиновой флюоресценции препаратов, содержащих белки молока (Б) [173]. А. Дифференциальные спектры поглощения растворов αs-, κ-CN и β-CN в присутствии красителя Конго красного. Б. Спектры тиюфлавиновой флюоресценции. Условные обозначения: SM – обезжиренное молоко; UW – молочная сыворотка, полученная методом ультрацентрифугирования; CM – казеиновые мицеллы; AW – кислотная молочная сыворотки; SC – казеинат натрия; SC+Ca²⁺ – казеинат натрия + Ca²⁺. Оси абсцисс – длина волны (нм), оси ординат – оптическая плотность (арбитражные единицы, AU)

Добавление к препаратам молока Тиюфлавина Т (ТТ) приводит к появлению специфического пика флюоресценции при длине волны 485 нм, что является индикатором образования ТТ-фибрилловых комплексов. Известно, что простые гидрофобные взаимодействия не индуцируют ТТ-флюоресценцию. Пробы с ТТ-зондом отрицательны (т.е. не выявляют пик флюоресценции при 485 нм) в белках с нативно-упорядоченной структурой, образующих регулярные полимеры или случайные агрегаты; специфическая ТТ-флюоресценция наблюдается только в присутствии амилоидных (фибриллоподобных) структур [174]. Эксперименты с различными компонентами молока доказывают, что смещение спектров поглощения в присутствии КК и появление пика ТТ-флюоресценции обусловлено именно казеинами и казеиновыми мицеллами (рис. 2.20Б).

Пики ТТ-флюоресценции, свидетельствующие о наличии фибрилл, наблюдаются и после добавления ТТ к растворам очищенных препаратов αs- и κ-CN в 0,5M HEPES буфере (pH 6,8). В случае β-CN флюоресценция при 485 нм была минимальной. Внесение Ca²⁺ до концентрации 25 mM не оказывало никакого влияния на флюоресценцию растворов бэта-казеина, но приводило к значительному уменьшению пика ТТ-флюоресценции в растворах каппа-казеина.

Тот факт, что в присутствии 25 mM Ca²⁺ препараты αs-CN мутнеют, а ТТ-флюоресценция увеличивается примерно в 6 раз, трактуется автором гипотезы как свидетельство того, что образующиеся белковые агрегаты содержат фибриллоподобные структуры [173]. По-видимому, в присутствии ионов кальция самоассоциация (агрегация) αs-CN, по крайней мере частично, обусловлена взаимодействием участков, имеющих структуру бэта-складок. Можно предполагать, что такого рода взаимодействия присутствуют и в казеиновых мицеллах.

Анализ микрофотографий казеиновых мицелл, полученных при помощи трансмиссионной электронной микроскопии, позволил выявить присутствие коротких (7–10 нм) микрофибрилл, связанных («сшитых») между собой небольшими участками с повышенной электронной плотностью (рис. 2.21).

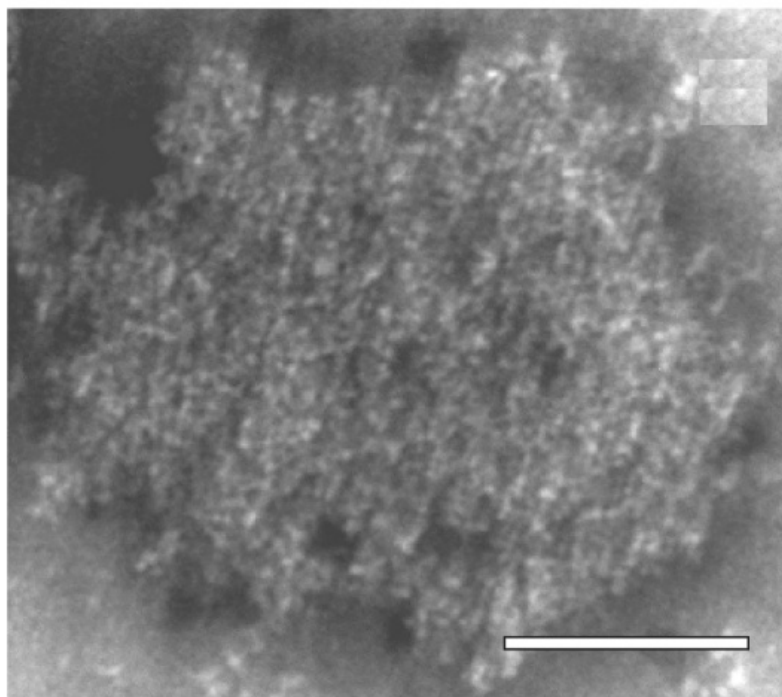


Рис. 2.21. Микрофибриллы в казеиновой мицелле. Микрофотография получена методом трансмиссионной электронной микроскопии [173]. Длина маркерной белой полосы – 50 нм

Известно, что α s-CN взаимодействуют с кальцием с образованием агрегатов, которые имеют размеры порядка 5 нм [175], что сопоставимо с электронно плотными участками, наблюдаемыми на рисунке 2.21. Выявленные в казеиновых мицеллах фибрилловые образования очень похожи на протофибриллы [176], наблюдаемые в процессе формирования амилоидных структур [161].

Наличие в белках фибрилловых структур придает им повышенную термостабильность [15]. Можно предполагать, что именно наличие фибрилловых структур обеспечивает хорошо известную устойчивость казеинов к тепловой денатурации [177]. С одной стороны, высокая тепловая стабильность и устойчивость фибрилл к действию протеолитических ферментов делают эти структуры «нежелательными» компонентами белков *in vivo*, поскольку их чрезмерное накопление приводит к образованию амилоидных структур, являющихся причиной различных патологий [160]. С другой – наличие фибриллоподобных структур в белках молока (но не фибриллообразование!) может обеспечить и ряд преимуществ.

Дестабилизация и агрегация казеинов в секретирующих тканях вымени может быть причиной серьезного ухудшения здоровья животных и снижения молочной продуктивности. Поэтому очень важным является поддержание стабильной структуры казеинов до момента попадания в желудок теленка. Фибриллоподобные участки полипептидной цепи казеинов повышают их денатурационную устойчивость и, таким образом, предотвращают дестабилизацию и агрегацию белков в тканях коровьего вымени. Кроме того, фибриллы очень часто связывают ионы металлов [160], что в случае казеинов может повысить их хелатирующие свойства и тем самым увеличить способность казеиновых мицелл поддерживать и транспортировать кальций в растворимом и биодоступном состоянии.

Таким образом, казеиновые мицеллы молока – это наглядный пример супермолекулярных белковых структур, формирующихся в соответствии с принципами самоорганизации, взаимозависимости и функциональности.

Библиографический список к главе 2

1. Farrell, Jr., H.M. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk – Sixth Revision / H.M. Farrell Jr., R. Jimenes-Flores, G.T. Bleck, E.M. Brown, J.E. Butler, L.K. Creamer, C.L. Hicks, C.M. Hollar, K.F. Ng-Kwai-Hang, H.E. Swaisgood // *J. Dairy Sci.* – 2004. – V. 87. – P. 1641–1674.
2. Pisano, A. Characterization of O-linked glycosylation motifs in the glycopeptide domain of bovine κ -casein / A. Pisano, N.H. Packer, J.W. Redmond, K.L. Williams, A.A. Gooley // *Glycobiology.* – 1994. – V. 4. – P. 837–844.
3. Zevaco, C. A study on the carbohydrate binding sites of bovine κ -casein using high performance liquid chromatography / C. Zevaco, B. Ribadeau-Dumas // *Milchwissenschaft.* – 1984. – V. 39. – P. 206–210.
4. Vreeman, H.J. Characterization of bovine κ -casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography / H.J. Vreeman, S. Visser, C. J. Slangen, J.A.M. van Riel // *Biochem. J.* – 1986. – V. 240. – P. 87–97.
5. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition, Volume I: General Aspects. Rennet-induced Coagulation of Milk / D.S. Horne, J.M. Banks.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee, eds. – London, UK: Elsevier Academic Press, 2004. – P. 47–70.
6. Mercier, J.-C. Phosphorylation of the caseins, present evidence for an amino acid triplet code post-translationally recognized by specific kinases / J.-C. Mercier // *Biochimie.* – 1981. – V. 63. – P. 1–17.
7. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, part A, Proteins. 3rd ed. Chemistry of the caseins / H.E. Swaisgood; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. – New York, NY: Kluwer Academic/Plenum, 2003. – P. 139–202.
8. Fundamentals of Dairy Chemistry, 3rd ed. Proteins of milk / R.M. Whitney.; N.P. Wong, ed. – New York, NY: Avi Books, Van Norstrand Reinhold, 1988. – P. 81–169.
9. Aoki, T. Role of phosphate groups in the calcium sensitivity of α s2-casein / T.Aoki, K. Toyooka, Y. Kako // *J. Dairy Sci.* – 1985. – V. 68. – P.1624–1629.
10. Parker, T.G. Binding of calcium ions to bovine β -casein / T.G. Parker, D.G. Dalgleish // *J. Dairy Res.* – 1981. – V. 48. – P. 71–76.
11. Farrell, Jr., H.M. Calcium-induced associations of the caseins – a thermodynamic linkage approach to precipitation and resolubilization / H. M. Farrell, Jr., T.F. Kumosinski, P. Pulaski, M.P. Thompson // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1988. – V. 265. – P. 146–158.
12. Horne, D.S. Casein structure, self-assembly and gelation / D.S. Horne // *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.* – 2002. – V. 7. – P. 456–461.
13. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, part A, Proteins. 3rd ed. Milk Proteins: General and Historical Aspects. / P.F. Fox; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. – New York, NY: Kluwer Academic / Plenum, 2003. – P. 1–48.
14. Осинцев, А.М Теоретическое и экспериментальное исследование процессов, лежащих в основе свертывания молока / А.М. Осинцев. – Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. – Кемерово, 2003. – 120 с.
15. Holt, C. Structure and stability of bovine casein micelles / C. Holt // *Adv. Prot. Chem.* – 1992. – V. 43. – P. 63–151.
16. Lucey, J.A. Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels / J.A. Lucey // *J. Dairy Sci.* – 2002. – V. 85. – N 2. – P. 281–294.

17. International Union of Pure and Applied Chemistry. 2nd ed. Accessed October 31, 2007. Compendium of chemical terminology. – 1997. – Vol. 1994. – № 66. – P. 1169.
18. Holt, C. Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods / C. Holt, J.A. Carver, H. Ecroyd, D.C. Thorn // *J. Dairy Sci.* 2013. – V. 96. – N 10. – P. 6127–6146.
19. Developments in Dairy Chemistry. 1. Proteins. Association of casein and casein micelle structure / D.G. Schmidt,; P.F. Fox, ed. – London: Applied Science Publishers, 1982. – P. 61–86.
20. McMahon, D.J. Composition structure and integrity of casein micelles: a review / D.J. McMahon, R.J. Brown // *J. Dairy Sci.* – 1984. – V. 67. – P. 499–452.
21. Schorsch, C. Micellar casein gelation at high sucrose content / C. Schorsch, M.G. Jones, I.T. Norton // *J. Dairy Sci.* – 2002. – V. 85. – N 12. – P. 3155–3163.
22. Walstra, P. On the stability of casein micelles / P. Walstra // *J. Dairy Sci.* – 1990. – V. 73. – P. 1965–1979.
23. Cross, K.J. Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes / K.J. Cross, L. Huq, J.P. Palamara, J.W. Perich, E.C. Reynolds // *J. Biological Chem.* – 2005. – V. 280. – N 15. – P. 15362–15369.
24. Holt, C. Inorganic constituents of milk. III. The colloidal calcium phosphate of cow's milk / C. Holt // *J. Dairy Res.* – 1982. – V. 49(1). – P. 29–38.
25. Dalgleish, D.G. pH-induced dissociation of casein micelles. 1. Analysis of liberated caseins / D.G. Dalgleish, A.J.R. Law // *J. Dairy Res.* – 1988. – V. 55. – P. 529–538.
26. Griffin, M.C.A. The disaggregation of calcium-depleted micelles / M.C.A. Griffin, R.L.J. Lyster, J.C. Price // *Eur. J. Biochem.* – 1988. – V. 174. – P. 339–343.
27. McGann, T.C.A. Physico-chemical properties of casein micelles reformed from urea-treated milk / T.C.A McGann, P.F. Fox // *J. Dairy Res.* – 1974. – V. 41. – P. 45–53.
28. Dalgleish, D.G. Measurement of electrophoretic mobilities and zeta potential of particles from milk using laser Doppler electrophoresis / D.G. Dalgleish // *J. Dairy Res.* – 1984. – V. 51. – P. 425–438.
29. Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins, 3rd Edition, Part B. Enzymatic coagulation of milk / D.B. Hyslop.; P. F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, NY: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 839–878.
30. Payens, T.A.J. Casein micelles: the colloid-chemical approach / T.A.J. Payens // *J. Dairy Res.* – 1979. – V. 46. – P. 291–306.
31. Horne, D.S. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products / D.S. Horne // *Int. Dairy J.* – 1998. – V. 8. – 171–177.
32. Holt, C. The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implication for dairy technology / C. Holt, D.S. Horne // *Neth. Milk Dairy J.* – 1996. – V. 50. – P. 85–111.
33. Johansson, A. Epitope characterization of a supramolecular protein assembly with a collection of monoclonal antibodies: The case of casein micelle / A. Johansson, D. Lugand, O. Rolet-Répécaud, D. Mollé, M.M. Delage, G. Peltre, S. Marchesseau, J. Léonil, D. Dupont // *Mol. Immunol.* – 2009. – V. 46 (6). – P. 1058–1066.
34. Walstra, P. Casein sub-micelles: do they exist? / P. Walstra // *Int. Dairy J.* – 1999. – V. 9. – P. 189–192.
35. Morr, C.V. Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim-milk casein micelles / C.V. Morr // *J. Dairy Sci.* – 1967. – V. 50. – P. 1744–1749.
36. Shimmin. P.D. An electron microscope study of the internal structure of casein micelles / P.D. Shimmin, R.D. Hill // *J. Dairy Res.* – 1964. – V. 31. – P. 121–125.

37. Slattery, C.W. Review: casein micelle structure; an examination of models / C.W. Slattery // *J. Dairy Sci.* – 1976. – V. 59. – P. 1547–1554.
38. Schmidt, D.G. Colloidal aspects of casein / D.G. Schmidt, T.A.J. Payens // *Surface Colloid Sci.* – 1976. – V. 9. – P. 165–169.
39. Ono, T. A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits / T. Ono, T. Obata // *J. Dairy Res.* – 1989. – V. 56. – P. 453–459.
40. Dalgleish, D.G. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities / D.G. Dalgleish / *J. Dairy Sci.* – 1998. – V. 81. – P. 3013–3018.
41. Advanced Dairy Chemistry, Vol.I: Proteins. (3rd ed.) Casein association and micelle formation. / H.S. Rollema.; P.F. Fox, ed. – New York, NY: Elsevier Applied Science, 1992. – P. 111–140.
42. Advanced Dairy Chemistry, Vol.1: Proteins. Part A. Casein micelle structure, functions, and interactions / C.G. de Kruif, C. Holt.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, NY: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 233–276.
43. Waugh, D.F. Casein micelles. Formation and structure II / D.F. Waugh, R.W. Noble, Jr. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1965. – V. 87. – P. 2246–2257.
44. Payens, T.A.J. Association of caseins and their possible relation to structure of the casein micelle / T.A.J. Payens // *J. Dairy Sci.* – 1966. – V. 49. – P. 1317–1324.
45. Rose, D. A proposed model of micelle structure in bovine milk / D. Rose // *Dairy Sci. Abstr.* – 1969. – V. 31. – P. 171–175.
46. Qi, P.X. Review. Studies of casein micelle structure: the past and the present / P.X. Qi // *Lait.* – 2007. – V. 87. – P. 363–383.
47. Farrell, Jr. H.M. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? / H.M. Farrell Jr., E.L. Malin, E.M. Brown, P.X. Qi // *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.* – 2006. – V. 11. – P. 135–147.
48. Horne, D.S. Casein micelle structure: Models and muddles / D.S. Horne // *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.* – 2006. – V. 11. – P. 148–153.
49. de Kruif, C.G. Casein micelles and their internal structure / C.G. de Kruif, T. Huppertz, V.S. Urban, A.V. Petukhov. // *Adv. Colloid Interface Science.* – 2012. – V. 171–172. – P. 36–52.
50. Sadiq, U. Review. Casein Micelles as an Emerging Delivery System for Bioactive Food Components / U. Sadiq, H. Gill, J. Chandrapala // *Foods.* – 2021. – V. 10. – P. 1965.
51. Trejo, R. Casein Micelles from Bovine Milk: Native Structure, Interactions, and Practical Applications of their Structural Modification, PhD diss., University of Tennessee, 2012. https://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/1568.
52. Waugh, D.F. The interaction of α s, β - and κ -caseins in micelle formation / D.F. Waugh // *Faraday Society Discuss.* – 1958. – V. 25. P. 186–192.
53. Parry, R.M., Jr. Location of K-casein on milk micelles / R.M., Jr. Parry, R.J. Carroll // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1969. – V. 194. – P. 138–150.
54. Garnier, J. Structure of the casein micelle. A proposed model / J. Garnier, B. Ribadeau-Dumas // *J. Dairy Res.* – 1970. – V. 37. – P. 493–504.
55. Schmidt, D.G. Location of α s1-, β - and K-casein in artificial casein micelles / D.G. Schmidt, P. Both // *Milchwissenschaft.* – 1982. – V. 37. – P. 336–340.
56. Dalgleish, D. G. Size related differences in bovine casein micelles / D.G. Dalgleish, D. S. Home, A.J.P. Law // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – V. 991. – P. 383–385.
57. Donnelly, W. J. Comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles / W.J. Donnelly, G. P. McNeill, W. Buchheim, T.C.A. McGann // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1984. – V. 789. – P. 136–137.

58. Horne, D.S. Application of fractal concepts to the study of casein aggregation phenomena / D.S. Horne // *J. Dairy Res.* – 1989. – V. 56. – P. 535–540.
59. Holt, C. Electrophoretic and hydrodynamic properties of bovine casein micelles interpreted in terms of particles with an outer hairy layer / C.Holt, D. G. Dalgleish // *J. Colloid Interface Sci.* – 1986. – V. 114. – P. 513–517.
60. Slattery, C.W. A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition / C.W. Slattery, R. Evard // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – V. 317. – P. 529–538.
61. Holt, C. The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implications for dairy technology / C. Holt, D.S. Horne // *Neth. Milk Dairy J.* – 1996. – V. 50. – P. 85–111.
62. Schmidt, D.G. Colloidal aspects of the caseins / D.G. Schmidt // *Neth. Milk. Dairy J.* – 1980. – V. 34. – P. 42–64.
63. West, D.W. Energy-dependent calcium sequestration activity in a Golgi apparatus fraction derived from lactating mammary glands / D.W. West // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1981. – V. 673. – P. 374–386
64. West, D.W. The influence of calmodulin on calcium accumulation and membrane protein auto-phosphorylation by Golgi vesicles from lactating rat mammary gland / D.W. West, R.A. Clegg // *Biochem. Soc. Trans.* – 1981. – V. 9 (1). – P. 77.
65. Stothart, P.H. Small-angle neutron scattering study of bovine casein micelles and sub-micelles / P.H. Stothart, D.J. Cebula // *J. Mol. Biol.* – 1982. – V. 160. – P. 391–395.
66. Carroll, R.J. Ultrastructural and biochemical investigations of mature human milk / R.J. Carroll, J.J. Basch, J.G. Phillips, H.M. Farrell, Jr. // *Food Microstruct.* – 1985. – V. 4. – P. 323–331.
67. Kalab, M. Milk gel structure XIII. Rotary shadowing of casein micelles for electron microscopy / M. Kalab, B.E. Phibbs-Todd, P. Allan-Wojtas // *Milchwissenschaft.* – 1982. – V. 37. – P. 513–518.
68. Schmidt, D.G. Elektronenmikroskopische untersuchung der feinstuktur von caseinmicellen in kuhmilch / D.G. Schmidt, W. Buchheim // *Milchwissenschaft.* – 1970. – V. 25. – P. 596–600.
69. Holt, C. Substructure of bovine casein micelles by small angle X-ray and neutron scattering / C. Holt, C.G. De Kruif, R. Tunier, P.A. Timmins // *Colloids and Surfaces A.* – 2003. – V. 213. – P. 275–284.
70. McMahon, D.J. Rethinking casein micelle structure using electron microscopy / D.J. McMahon, W.R. McManus // *J. Dairy Sci.* – 1998. – V. 81. – P. 2985–2993.
71. Dalgleish, D.G. A possible structure of casein micelle based on high resolution field-emission scanning electron microscopy / D.G. Dalgleish, P.A. Spagnuolo, H.D. Goff // *Int. Dairy J.* – 2004. – V. 14 (12). – P. 1025–1031.
72. Heertje, I. Structure formation in acid milk gels / I. Heertje, J. Visser, P.Smits // *Food Microstructure.* – 1985. – V. 4. – P. 267–278.
73. Anema, S.G. Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk / S.G. Anema, Y. Li // *J. Agricul. Food Chem.* – 2003. – V. 51. – P. 1640–1646.
74. Marchesseau, S. Casein interactions studied by the surface plasmon resonance technique / S. Marchesseau, J-C. Mani, P. Martineau, F. Roquet, J-L. Cuq, M. Pugniere // *J. Dairy Sci.* – 2002. – V. 85. – P. 2711–2721.
75. Groves, M.L. Environmental effects on disulfide bonding patterns of bovine κ -casein / M.L. Groves, E.D. Wickham, H.M. Farrell Jr. // *J. Prot. Chem.* – 1998. – V. 17. – P. 73–84.
76. Marchin, S. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultrasmall-angle x-ray scattering / S. Marchin, J.L. Putaux, F. Pignon, J. Léonil // *J. Chem. Phys.* 2007. – V. 126(4). – P. 045–101.

77. Lucey, J. A. Dissociation of colloidal calcium-phosphate depleted casein particles as influenced by pH and concentration of calcium and phosphate / J.A. Lucey, C. Dick, H. Singh, P. A. Munro // *Milchwissenschaft.* – 1997. – V. 52. – P. 603–606.
78. Holt, C. Casein structure and casein-calciumphosphate interactions / C. Holt // *Proceedings of 25th International Dairy Congress, Aarhus, Denmark.* Copenhagen: Danish National Committee of International Dairy Federation. – 1998. – P. 200–208.
79. Holt, C. The relation of secondary structure to function in caseins / C. Holt // *Proceedings of 8th Egyptian Conference on Dairy Science and Technology.* – 2001. – P. 187–200.
80. Holt, C. A core-shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by β -casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small-angle X-ray and neutron scattering measurements / C. Holt, P.A. Timmins, N. Errington, J. Leaver // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – V. 252. – P. 73–78.
81. Holt, C. Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by Sephacryl column chromatography / C. Holt // *J. Dairy Sci.* – 1998. – V. 81. – P. 2994–3003.
82. Holt, C. Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α s1-, β - and κ -caseins / C. Holt, L. Sawyer // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* – 1993. – V. 89. – P. 2683–2692.
83. *Developments in Dairy Chemistry. The milk protein system.* / P.F. Fox.; P.F. Fox, ed. – London, United Kingdom: Elsevier Applied Sciences, 1989. – P. 1–53.
84. Baumi, J.J. Study of calcium binding to phosphoserine residues of β -casein and its phosphopeptide (1–25) by ^{31}P NMR / J.J. Baumi, P. Guenot, S. Sinbandhit, G. Brule' // *J. Dairy Res.* – 1989. – V. 56. – P. 403–409.
85. Gaucheron, F. Binding of cations to casein molecules: importance of physicochemical conditions / F. Gaucheron, Y. Le Graet, E. Boyaval, M. Piot // *Milchwissenschaft.* – 1997. – V. 52. – P. 322–327.
86. Dickinson, E. Self-consistent-field modeling of adsorbed casein: interaction between two protein-coated surfaces / E. Dickinson, V.J. Pinfield, D.S. Horne, F.A.M. Leermakers // *J. Chem. Society Faraday Transactions.* – 1997. – V. 93. – P. 1785–1790.
87. Horne, D.S. Protein-stabilized emulsions / D.S. Horne // *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.* – 1996. – V. 1. – P. 752–758.
88. Payens, T.A.J. Self-association in non-ideal systems. Combined light scattering and sedimentation measurements in β -casein solutions / T.A.J. Payens, J.A. Brinkhuis, B.W. Van Markwijk // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1969. – V. 175. – P. 434–437.
89. Kajiwara, K. Micellar structure of β -casein observed by small-angle X-ray scattering / K. Kajiwara, R. Niki, H. Urakawa, Y. Hiragi, N. Donkai, M. Najura // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – V. 955. – P. 128–134.
90. Schmidt, D.G. Association of a α s1-casein at pH 6.6 / D.G. Schmidt // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1970. – V. 207. – P. 130–138.
91. Schmidt, D.G. Differences between the association of the genetic variants B, C and D of α s1-casein / D.G. Schmidt // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1970. – V. 221. – P. 140–142.
92. Lucey, J.A. Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese / J.A. Lucey, M.E. Johnson, D.S. Horne // *J. Dairy Sci.* – 2003. – V. 86. – P. 2725–2743.
93. Vreeman, H.J. Purification and some physicochemical properties of bovine κ -casein / H.J. Vreeman, P. Both, J.A. Brinkhuis, C. Van der Spek // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1977. – V. 491. – P. 93–103.
94. Vreeman, H.J. The association of bovine SH- κ -casein at pH 7.0 / H.J. Vreeman // *J. Dairy Res.* – 1979. – V. 46. – P. 271–276.

95. Liu, Y. pH-dependent structures and properties of casein micelles / Y. Liu, R. Guo // *Biophys. Chem.* – 2008. – V. 136 (2–3). – P. 67–73.
96. *Advances in Protein Chemistry*, vol. Structure and stability of the bovine casein micelle / C. Holt.; C.B. Anfinsen, J.D. Edsall, F.R. Richards, D.S. Eisenberg, eds. – San Diego: Academic Press, 1992. – P. 63–151.
97. Dalgleish, D.G. Binding of calcium ions to bovine α s1-casein and precipitability of the protein-calcium ion complex / D.G. Dalgleish, T.G. Parker // *J. Dairy Res.* – 1980. – V. 47. – P. 113–122.
98. Horne, D.S. Electrostatic interactions and kinetics of protein aggregation: α s1-casein / D.S. Horne, D.G. Dalgleish // *Int. J. of Biol. Micromolecules.* – 1980. – V. 2. – P. 154–160.
99. Hjertén, S. Fractionation of proteins by hydrophobic interaction chromatography, with reference to serum proteins / S. Hierten // *Proceedings Intl. Workshop on Technology for Protein Separation & Improvement of Blood Plasma Fractionation.* – Reston, Virginia. – 1977. – P. 410–421.
100. Parsegian, V.A. Temperature-dependent van der Waals forces / V.A. Parsegian, B.W. Ninham // *Biophys. J.* – 1970. – N 10. – P. 664–674.
101. Srinivasan, R. Role of physical forces in hydrophobic interaction chromatography / R. Srinivasan, E. Ruckenstein // *Separation & Purification Methods.* – 1980. – N 9. – P. 267–370.
102. Dalgleish, D.G. pH-Induced dissociation of bovine casein micelles. II. Mineral solubilization and its relation to casein release / D.G. Dalgleish, A.J.R. Law // *J. Dairy Res.* – 1989. – V. 56. – P. 727–735.
103. Lucey, J.A. Dissociation of colloidal calcium-phosphate depleted casein particles as influenced by pH and concentration of calcium and phosphate / J.A. Lucey, C. Dick, H. Singh, P. A. Munro // *Milchwissenschaft.* – 1997. – V. 52. – P. 603–606.
104. Holt, C. Effects of colloidal calcium phosphate content and free calcium ion concentration in the milk serum on the dissociation of bovine casein micelles / C. Holt, D.T. Davies, A.R.J. Law // *J. Dairy Res.* – 1986. – V. 53. – P. 557–572.
105. De Kruif, C.G. Casein micelle interactions / C.G. De Kruif // *Int. Dairy J.* – 1999. – V. 9. – P. 183–188.
106. Saito, Z. Electron microscopic and compositional studies of casein micelles / Z. Saito // *Neth. Milk and Dairy J.* – 1973. – V. 27. – P. 143–162.
107. *Proceedings of International Conference on Colloid and Surface Science*, Vol. 1. The stability of casein micelles / C. Holt; E. Wolfram, ed. – Budapest : Academia Kiado, 1975. – P. 641–664.
108. Vasbinder, A.J. Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; Studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles / A.J. Vasbinder, H.S. Rollema, A. Bot, C.G. de Kruif // *J. Dairy Sci.* – 2003. – V. 86. – N 5. – P. 1556–1563.
109. Tuinier, R. Stability of casein micelles in milk / R. Tuinier, C.G. de Kruif // *J. Chem. Physics.* – 2002. – V. 117. – P. 1290–1295.
110. De Kruif, C.G. κ -Casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles / C.G. de Kruif, E.B. Zhulina // *Colloids Surfaces A.* – 1996. – V. 117. – P. 151–159.
111. Dalgleish, D.G. Coagulation of renneted bovine casein micelles: Dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength / D.G. Dalgleish // *J. Dairy Res.* – 1983. – V. 50. – P. 331–340.
112. Zoon, P. Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 1. Introduction / P. Zoon, T. van Vliet, P. Walstra // *Neth. Milk Dairy J.* – 1988. – V. 42. – P. 249–269.
113. Zoon, P., Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 2. The effect of temperature / P. Zoon, T. van Vliet, P. Walstra // *Neth. Milk Dairy J.* – 1988. – V. 42. – P. 271–294.
114. Tokita, M. Dynamic viscoelastic studies on the mechanism of milk clotting process / M. Tokita, K. Hikichi, R. Niki, R. Arima, S. Arima // *Biorheology.* – 1982. – V. 19. – P. 209–219.

115. Bohlin, L. Viscoelastic properties of coagulating milk / L. Bohlin, P. Hegg, H. Ljusberg-Wahren // J. Dairy Sci. – 1984. – V. 67. – P. 729–734.
116. Esteves, C. Mathematical modeling of the formation of rennet-induced gels by plant coagulants and chymosin / C. Esteves, J.A. Lucey, E. Pires // J. Dairy Res. – 2001. – V. 68. – P. 499–510.
117. Heat-Induced Changes in Milk. 2nd ed. Heat-induced changes in casein, including interactions with whey proteins / H. Singh.; P. F. Fox, ed. – Brussels: International Dairy Federation, 1995. – P. 86–104.
118. Lucey, J.A. Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels / J.A. Lucey, M. Tamehana, H. Singh, P.A. Munro // J. Dairy Res. – 1998. – V. 65. – P. 555–567.
119. Lucey, J.A. Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk / J.A. Lucey, C.T. Teo, P.A. Munro, H. Singh // J. Dairy Res. – 1997. – V. 64. – P. 591–600.
120. Lucey, J.A. Whey separation in acid skim milk gels made with glucono- δ -lactone: Effects of heat treatment and gelation temperature / J.A. Lucey, P.A. Munro, H. Singh // J. Text. Stud. – 1998. – V. 29. – P. 413–426.
121. Lucey, J.A. Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono- δ -lactone / J.A. Lucey, M. Tamehana, H. Singh, P.A. Munro // J. Dairy Res. – 2000. – V. 67. – P. 415–427.
122. Lucey, J.A. Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid / J.A. Lucey, M. Tamehana, H. Singh, P.A. Munro // Int. Dairy J. – 2001. – V. 11. – P. 559–565.
123. Zoon, P. Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 3. The effect of calcium and phosphate / P. Zoon, T. van Vliet, P. Walstra // Neth. Milk Dairy J. – 1988. – V. 42. – P. 295–312.
124. Udabage, P. Effects of mineral salts and calcium chelating agents on the gelation of renneted skim milk / P. Udabage, I.R. McKinnon, M.A. Augustin // J. Dairy Sci. – 2001. – V. 84. – P. 1569–1575.
125. Farrell, H.M., Jr. Molten globule structures in milk proteins: Implications for potential new structure-function relationships / H.M. Farrell, Jr., P.X. Qi, E.M. Brown, P.H. Cooke, M. H. Tunick, E.D. Wickham, J.J. Unruh // J. Dairy Sci. – 2002. – V. 85. – P. 459–471.
126. Developments in Dairy Chemistry. Chemistry of milk proteins / H.E. Swaisgood.; P.F. Fox, ed. – London, United Kingdom.: Applied Science, 1982. – P. 1–60.
127. Syme, C.D. A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau. New insight into the structure and behavior of natively unfolded proteins / C.D. Syme, E.W. Blanch, C. Holt, R. Jakes, M. Goedert, L. Hecht, L.D. Barron // Eur. J. Biochem. – 2002. – V. 269. – P. 148–156.
128. Creamer, L.K. Secondary structure of α 1- and β -caseins in solution / L.K. Creamer, T. Richardson, D.A.D. Parry // Arch. Biochem. Biophys. – 1981. – V. 211. – P. 689–696.
129. Uversky, V.N. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? / V.N. Uversky, J.R. Gillespie, A.L. Fink // Proteins. – 2000. – V. 41. – P. 415–427.
130. Wright, P.E. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm / P.E. Wright, H.J. Dyson // J. Mol. Biol. – 1999. – V. 293. – P. 321–331.
131. Calcified Tissue. Interaction of phosphoproteins with calcium phosphates / C. Holt, M.J.J.M. van Kemenade.; D.W.L. Hukins, ed. – London, UK: Macmillan, 1989. – P. 175–213.
132. Sierra, I.L. de la. Dimeric crystal structure of a Bowman-Birk protease inhibitor from pea seeds / I.L. de la Sierra, L. Quillien, P. Flecker, J. Gueguen, S. Brunie // J. Mol. Biol. – 1999. – V. 285. – P. 1195–1207.

133. Braun, W. Comparison of the NMR solution structure and the X-ray crystal structure of rat metallothionein-2 / W. Braun, M. Vařák, A.H. Robbins, C.D. Stout, G. Wagner, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89. – P. 10124–10128.
134. Gast, K. Prothymosin a: a biologically active protein with a random coil conformation / K. Gast, H. Damaschun, K. Eckert, K. Schulze-Forster, H.R. Maurer, M. Müller-Frohne, D. Zirwer, J. Czarnecki, G. Damaschun // Biochemistry. – 1995. – V. 34. – P. 13211–13218.
135. Penkett, C.J. Structural and dynamical characterization of a biologically active unfolded fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus* / C.J. Penkett, C. Redfield, J.A. Jones, I. Dodd, J. Hubbard, R.A.G. Smith, L.J. Smith, C.M. Dobson // Biochemistry. – 1998. – V. 37. – P. 17054–17067.
136. Biere, A.L. Parkinson's disease-associated α -synuclein is more fibrillogenic than β - and γ -synuclein and cannot cross-seed its homologs / A.L. Biere, S.J. Wood, J. Wypych, S. Steavenson, Y. Jiang, D. Anafi, F.W. Jacobsen, M.A. Jarosinski, G.M. Wu, J.C. Louis, F. Martin, L.O. Narhi, M. Citron // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275. – P. 34574–34579.
137. Smyth, E. Solution structure of native proteins with irregular folds from Raman optical activity / E. Smyth, C.D. Syme, E.W. Blanch, L. Hecht, M. Vařák, L.D. Barron // Biopolymers. – 2000. – V. 58. – P. 138–151.
138. Adzhubei, A.A. Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins / A.A. Adzhubei, M.J.E. Sternberg // J. Mol. Biol. – 1993. – V. 229. – P. 472–493.
139. Stapley, B.J. A survey of left-handed polyproline II helices / B.J. Stapley, T.P. Creamer // Protein Sci. – 1999. – V. 8. – P. 587–595. M. : Мир, 1984. – C. 179–197.
141. Bhattacharyya, J. Molecular Chaperone-like Properties of an Unfolded Protein, α S-Casein / J. Bhattacharyya, K.P. Das // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – N 22. – P. 15505–15509.
142. Ptitsyn, O.B. Molten globule and protein folding / O.B. Ptitsyn // Adv. Prot. Chem. – 1995. – V. 47. – P. 83–229.
143. Arai, M. The role of the molten globule state in protein folding / M. Arai, K. Kuwajima // Adv. Prot. Chem. – 2000. – V. 53. – P. 209–282.
144. Smith, E. A biological perspective on the structure and function of caseins and casein micelles / E. Smith, R. Clegg, C. Holt // Int. J. Dairy Technol. – 2004. – V. 57. – P. 121–126.
145. Ingber, D.E. The architecture of life / D.E. Ingber // Sci. Am. – 1998. – V. 1. – P. 48–57.
146. Kumosinski, T.F. Three dimensional molecular modeling of caseins: an energy minimized κ -casein structure / T.F. Kumosinski, E.M. Brown, H.M. Farrell, Jr. // J. Dairy Sci. – 1993. – V. 76. – P. 2507–2520.
147. David, C. Spatial and temporal *in situ* evolution of the concentration profile during casein micelle ultrafiltration probed by small-angle X-ray scattering / C. David, F. Pignon, T. Narayanan, M. Sztucki, G. Gésan-Guiziou, A. Magnin // Langmuir. – 2008. – V. 24(9). – P. 4523–4529.
148. McMahon, D.J. Supramolecular Structure of the Casein Micelle / D. J. McMahon, B. S. Oommen // J. Dairy Sci. – 2008. – V. 91. – P. 1709–1721.
149. Dalgleish, D.G. Quantitation of α s1-casein aggregation by the use of polyfunctional models / D.G. Dalgleish, T.G. Parker // J. Dairy Res. – 1979. – V. 46. – P. 259–263.
150. Yoshikawa, M. Effects of chemical phosphorylation of bovine casein components on the properties related to casein micelle formation / M. Yoshikawa, R. Sasaki, H. Chiba // Agric. Biol. Chem. – 1981. – V. 45. – P. 909–914.
151. Food Colloids. Spec. Publ. No. 75. Casein micelles, polycondensation and fractals / D.S. Horne, T.G. Parker, D.G. Dalgleish.; R.D. Bee, P. Richmond, J. Mingins, ed. – London, England: R. Soc. Chem., 1989. – P. 400–406.

152. Euston, S.R. Simulating the self-association of caseins / S.R. Euston, D.S. Horne // *Food Hydrocolloids*. – 2005. – V. 19. – P. 379–386.
153. Holt, C. Ability of a β -CN phosphopeptide to modulate the precipitation of calcium phosphate by forming amorphous dicalcium phosphate nanoclusters / C. Holt, N.M. Wahlgren, T. Drakenberg // *Biochem. J.* – 1996. – V. 314. – P. 1035–1039.
154. Hojou, K. Some applications of ion beam sputtering to high resolution electron microscopy / K. Hojou, T. Oikawa, K. Kanaya, T. Kimura, K. Adachi // *Micron*. – 1977. – V. 8. – P. 151–170.
155. Dickinson, E. Time-dependent polymerization of β -lactoglobulin through disulfide bonds at the oil-water interface in emulsions / E. Dickinson, Y. Matsumura // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1991. – V. 13. – P. 26–30.
156. *Advanced Dairy Chemistry, Vol.1: Proteins. Part A. Chemistry of the caseins* / H. E. Swaisgood.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, NY: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 139–187.
157. Horne, D.S. Steric effects in the coagulation of casein micelles by ethanol / D.S. Horne // *Biopolymers*. – 1984. – V. 23. – P. 989–993.
158. Tziboula, A. The role of α s1-casein in the structure of caprine casein micelles / A. Tziboula, D.S. Horne // *Int. Dairy J.* – 1999. – V. 9. – P. 173–178.
159. Rochet, J.-C. Amyloid fibrillogenesis: Themes and variations / J.-C. Rochet, P.T. Lansbury, Jr. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2000. – V. 10. – P. 60–68.
160. Sunde, M. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and x-ray diffraction / M. Sunde, C. Blake // *Adv. Protein Chem.* – 1997. – V. 50. – P. 123–159.
161. Dobson, C.M. Protein folding and misfolding / C.M. Dobson // *Nature*. – 2003. – V. 426. – P. 884–890.
162. Kelly, J.W. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behaviour / J.W. Kelly // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1996. – V. 6. – P. 11–17.
163. Benzinger, T.L. Propagating structure of Alzheimer's β -amyloid (10–35) is parallel β -sheet with residues in exact register / T.L. Benzinger, D.M. Gregory, T.S. Burkoth, H. Miller-Auer, D.G. Lynn, R.E. Botto, S.C. Meredith // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – V. 95. – P. 13407–13412.
164. Carrotta, R. Conformational characterization of oligomeric intermediates and aggregates in β -lactoglobulin heat aggregation / R. Carrotta, R. Bauer, R. Wanninge, C. Rischel // *Protein Sci.* – 2001. – V. 10. – P. 1312–1318.
165. Nelson, R. Recent atomic models for amyloid fibril structure / R. Nelson, D. Eisenberg // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2006. – V. 16. – P. 260–265.
166. Fink, A.L. Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloids / A.L. Fink // *Fold. Des.* – 1998. – V. 3. – P. R9–R23.
167. Klunk, W.E. Quantifying amyloid by Congo red spectral shift assay / W.E. Klunk, R. F. Jacob, R.P. Mason // *Meth. Enzymol.* – 1999. – V. 309. – P. 285–305.
168. Khurana, R. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils / R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S.A. Carter, V. Krishna, R.K. Grover, R. Roy, S. Singh // *J. Struct. Biol.* – 2005. – V. 151. – P. 229–238.
169. Thorn, D.C. Amyloid fibril formation by bovine milk κ -casein and its inhibition by the molecular chaperones α S- and β -casein / D.C. Thorn, S. Meechan, M. Sunde, A. Rekas, S.L. Gras, C.E. McPhee, C.M. Dobson, M.R. Wilson, J.A. Carver // *Biochemistry*. – 2005. – V. 44. – P. 17027–17036.
170. Kumosinski, T.F. Three dimensional molecular modeling of bovine caseins: A refined energy-minimized κ -casein structure / T.F. Kumosinski, E.M. Brown, H.M. Farrell, Jr. // *J. Dairy Sci.* – 1993. – V. 76. – P. 2507–2520.

171. Alaimo, M.H. Conformational analysis of the hydrophobic peptide α s1-casein (f 136–196) / M.H. Alaimo, H.M. Farrell, Jr., M.W. Germann // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – V. 1431. – P. 410–420.
172. Farrell, H.M., Jr. Environmental influences on bovine κ -casein: Reduction and conversion to fibrillar (amyloid) structures / H.M. Farrell, Jr., P.H. Cooke, E.D. Wickham, E.G. Piotrowski, P.D. Hoagland // *J. Protein Chem.* – 2003. – V. 22. – P. 259–273.
173. Lencki, R.W. Evidence for Fibril-Like Structure in Bovine Casein Micelles / R.W. Lencki // *J. Dairy Sci.* – 2007. – N. 90. – P. 75–89.
174. Le Vine, H., III. Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin-T / H. Le Vine, III // *Meth. Enzymol.* – 1999. – V. 309. – P. 274–284.
175. Dosako, S. Polymerization of α s1-casein by calcium ions / S. Dosako, T. Kimura, S. Taneya, T. Sone, S. Kaminogawa, K. Yamauchi // *Agric. Biol. Chem.* – 1980. – V. 44. – P. 2443–2448.
176. Blake, C. Synchrotron x-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous β -sheet helix / C. Blake, L. Serpell // *Structure* . – 1996. – V. 4. – P. 989–998.
177. Paulsson, M. Thermal denaturation of whey proteins in mixtures with caseins studied by differential scanning calorimetry / M. Paulsson, P. Dejmek // *J. Dairy Sci.* – 1990. – V. 73. – P. 590–600.

Глава 3. Номенклатура и свойства сывороточных белков

3.1. Общая характеристика сывороточных белков молока

Главный предмет нашего рассмотрения – основные белки молочной сыворотки, содержание которых составляет не менее 0,01 г/л. Все они имеют прикладное значение и могут быть использованы в различных сферах деятельности человека. Но прежде чем приступить к подробной характеристике индивидуальных протеинов, рассмотрим несколько общих вопросов, связанных с номенклатурой и физико-химическими свойствами основных сывороточных белков коровьего молока.

Термин «сывороточные белки молока» используется для определения протеинов, которые остаются в молочной сыворотке после преципитации казеинов при pH=4,6 и 20 °C [1, 2]. Традиционно основными компонентами этой группы белков считаются β -лактоглобулин (β -LG), α -лактальбумин (α -LA), сывороточный альбумин (SA), иммуноглобулины (Ig) и протеозо-пептонная фракция [1]. Метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и β -меркаптоэтанола (SDS-PAGE) позволяет выявить в образцах сыворотки еще один белок – лактоферрин (LF), который также относится к сывороточным белкам молока [1–4] (рис. 3.1).

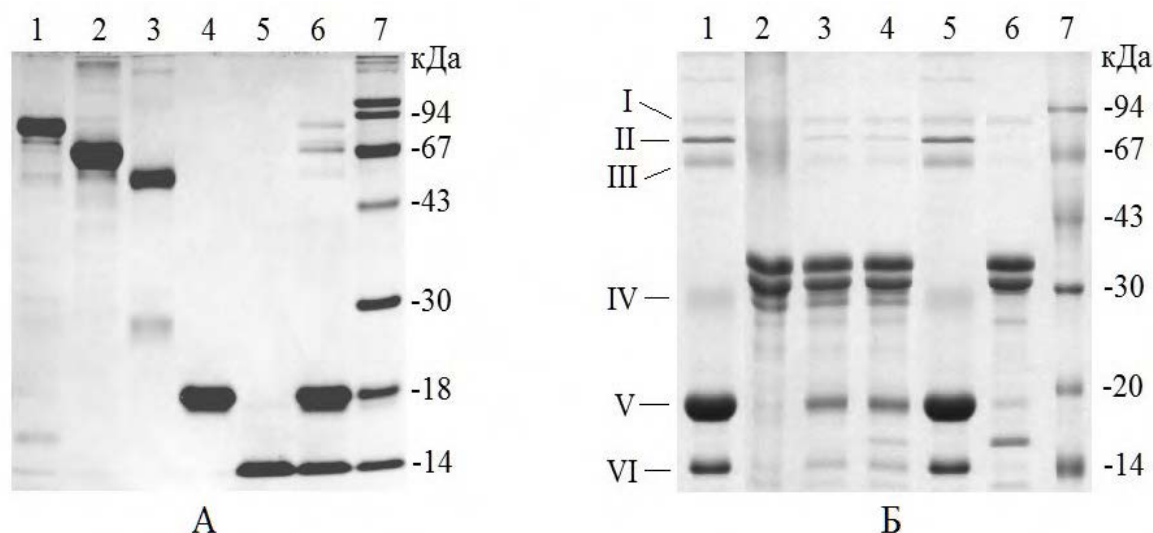


Рис. 3.1. Исследование методом SDS-PAGE полипептидного состава сыворотки, очищенных сывороточных белков, молочной смеси, подготовленной для выработки сыра и сырного зерна (все препараты получены из коровьего молока). А. Электрофореграмма, представленная в VI Номенклатуре белков молока [1, 5]. Номерами обозначены треки образцов: 1 – LF; 2 – SA; 3 – IgG (фракция II по Кону, тяжелая цепь – вверх, легкая цепь – вниз), 4 – β -LG; 5 – α -LA; 6 – молочная сыворотка (pH=4,6); 7 – маркеры молекулярных масс. Б. Электрофореграмма, полученная в лаборатории биохимии СибНИИС [6]. Номерами обозначены треки образцов: 1,5 – подсырная сыворотка; 2 – казеин по Гаммерстену; 3 – молочная смесь до внесения молокосвертывающего ферментного препарата (МФП); 4 – молочная смесь сразу после внесения МФП; 6 – сырное зерно перед прессованием; 7 – маркеры молекулярных масс. Римскими цифрами обозначены: LF (I); SA (II); тяжелые цепи IgG (III); легкие цепи IgG (IV); β -LG (V); α -LA (VI). Справа от электрофореграмм указаны молекулярные массы (кДа) маркеров

В отличие от казеинов, основные сывороточные белки молока коровы демонстрируют достаточно широкий разброс таких физико-химических параметров, как молекулярные массы (от 14 до ≥ 1000 кДа) и изоэлектрические точки (pI) (от 4,2 до 8,8) (табл. 3.1).

Кроме β -LG, α -LA, SA, Ig и LF, во фракции сывороточных белков присутствуют продукты протеолитической деградации казеинов [2], некоторые эндогенные ферменты молока [9, 10], протеины мембран молочных жировых глобул [11] и ряд минорных белков, однако правомерность включения всех этих компонентов в номенклатуру является предметом дискуссии [1].

Таблица 3.1

Физико-химические свойства основных сывороточных белков коровьего молока [1, 2, 7, 8]

Название белка (международная аббревиатура)	C ¹⁾ , (г/л)	Генетические варианты ²⁾	ММ ³⁾ , (кДа)	pI	Нф ⁴⁾
β-Лактоглобулин (β-LG)	2-4	A B	18,363 18,277	5,13 5,13	1211 1217
α-Лактальбумин (α-LA)	0,6-1,7	B	14,178	4,2-4,5	1120
Сывороточный альбумин (SA)	0,4	A	66,399	4,7-4,9	1120
Иммуноглобулин G1 (IgG1)	0,3-0,6	н.д. ⁵⁾	~161,000	5,5-6,8	н.д.
Иммуноглобулин G2 (IgG2)	0,05	н.д.	~150,000	7,5-8,3	н.д.
Иммуноглобулин A (IgA)	0,01	н.д.	~385,000- ~417,000	н.д.	н.д.
Иммуноглобулин M (IgM)	0,09	н.д.	~1000,000	н.д.	н.д.
Секреторный компонент (SC)	0,02-0,1	н.д.	63,750	н.д.	н.д.
Лактоферрин (LF)	0,02-0,2	н.д.	76,110	8,81	1053
Остеопонтин (OPN) ⁶⁾	~0,018	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.

1) Концентрация в обезжиренном молоке.

2) Представлены основные варианты.

3) Молекулярные массы. Получены методом сложения молекулярных масс входящих в состав белка аминокислот. При этом считали, что все кислотные группы протонированы, а все основные группы - не протонированы. Учитывались известные дисульфидные группы. Для иммуноглобулинов приведены примерные молекулярные массы.

4) Средняя гидрофобность. Размерность – ккал/аминокислотный остаток. Вычислена на основе данных о свободной энергии переноса одного аминокислотного остатка из органического растворителя в воду [7].

5) Нет данных.

6) Не входит в Номенклатуру белков коровьего молока (VI издание), принятую в 2004 году.

В результате гидролиза β-казеина плазмином молока образуются различные продукты его деградации, обозначавшиеся ранее как γ-казеины и протеозо-пептоны (табл. 3.2).

Таблица 3.2

Идентифицированные и потенциально возможные продукты деградации бэта-казеинов молока под действием плазмина [12]

Протеозо-пептоны		Гамма-казеины
Идентифицированные	Потенциально возможные	
PP 8f β-CN ф. 1-28	β-CN ф. 106-113	γ1-CN (β-CN ф. 29-209)
PP 8s β-CN ф. 29-105	β-CN ф. 108-113	γ2-CN (β-CN ф. 106-209)
PP 8s β-CN ф. 29-107	β-CN ф. 114-183	γ3-CN (β-CN ф. 108-209)
PP-T β-CN ф. 29-113	β-CN ф. 106-183	γ4-CN (β-CN ф. 114-209)
PP 5 β-CN ф. 1-105	β-CN ф. 108-183	γ5-CN (β-CN ф. 184-209)
PP 5 β-CN ф. 1-107	β-CN ф. 1-113	

Комитет по номенклатуре, классификации и методологии белков молока (Committee on the Nomenclature, Classification and Methodology of Milk Proteins) при ADSA (American Dairy Science Association) рекомендует называть γ-казеины и протеозо-пептоны 5 и 8 продуктами деградации (или фрагментами) бэта-казеина, указывая в скобках длину полипептидного фрагмента с номерами аминокислотных остатков цепи β-казеина. Например: γ1-казеин обозначается как β-CN (ф. 29-209) («ф» =фрагмент), γ2-казеин – как β-CN (ф. 106-209), γ3-казеин – как β-CN (ф. 108-209) и так далее [1].

Как уже говорилось, словосочетание «сывoroточные белки молока» используется для описания протеинов, остающихся в растворенном состоянии при pH 4,6 и температуре 20 °C. Коммерческие продукты, обозначаемые как «изоляты (или концентраты) сывoroточных белков», чаще всего являются побочными продуктами сыроделия, получены при более высоких значениях pH и дополнительно содержат как интактные казеины (CN), так и продукты их протеолиза, такие как CN-макропептид и протеозо-пептоны.

Классификация индивидуальных групп (семейств) белков, таких как β -LG, α -LA, SA и LF, строится на основе гомологии первичной структуры, с использованием различных электрофоретических методов для характеристики и идентификации внутригрупповых компонентов [1].

Иммуноглобулины и сывoroточный альбумин не являются уникальными для молока белками, поскольку обнаруживаются в других тканях и тканевых жидкостях (например, в сыворотке крови). Иммуноглобулины продуцируются В-лимфоцитами и являются продуктом соматических мутаций и рекомбинаций генных сегментов. Число генетических вариантов иммуноглобулинов составляет несколько миллионов, что само по себе создает значительные трудности при их биохимическом описании. В лабораторной практике для количественной характеристики иммуноглобулинов используются иммунохимические критерии, однако молекулярная генетика этих белков с трудом поддается структурному анализу [1].

3.2. β -Лактоглобулин (β -LG)

Бета-лактоглобулин является основным сывoroточным белком коровьего молока. Содержание β -LG составляет около 50% от всех белков сыворотки.

Семейство β -LG состоит из 11 генетических вариантов. Варианты A и B с одинаково высокой частотой встречаются у различных пород коров, а присутствие того или другого варианта в значительной степени влияет на свойства молока [12, 14]. Отчасти это вызвано различиями в физико-химических свойствах, а также тем, что вариант A экспрессируется на гораздо более высоком уровне, чем варианты B и C [14–17].

Референтный белок семейства – β -LG B – состоит из одной полипептидной цепи и 162 аминокислотных остатков: Asp10, Asn5, Thr8, Ser7, Glu16, Gln9, Pro8, Gly4, Ala15, Cys5, Val9, Met4, Ile10, Leu22, Tyr4, Phe4, Lys15, His₂, Trp2, Arg3. Вычисленная молекулярная масса составляет 18,277 кДа [1] и практически совпадает с результатами измерения этого параметра с помощью физико-химических методов 18,278 кДа [18] и 18,277 кДа [19]. Представленная на рисунке 3.2 первичная структура β -LG B опубликована в V Номенклатуре белков молока [2] и за прошедшее время не претерпела значительных изменений. Уточнения коснулись только структуры сульфгидрильных групп и дисульфидных связей: было установлено, что -S-S- мостики связывают Cys66-Cys160 и Cys106-Cys119, тогда как Cys121 несет свободную SH-группу [20–26]. По данным [27] во всех исследованных генетических вариантах β -лактоглобулина обнаруживается альтернативная дисульфидная связь в положении Cys106-Cys121.

Первичная последовательность β -LG B коровы (*Bos taurus*), а также дополнительная информация о структуре этого белка размещены в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/P02754>). Идентификационный номер коровьего β -LG – P02754 (LACB_BOVIN) [27].

Структура гена и а.к. последовательность β -лактоглобулина были изучены в 1993–1996 гг. [28–30]. Сигнальный пептид (пре-фрагмент) состоит из 16 аминокислот, таким образом, полная последовательность молекулы пре- β -лактоглобулина насчитывает 178 аминокислотных остатков.

В диапазоне pH 2-8 при умеренной ионной силе (например, 100 mM NaCl) и температурах выше 20 °C β -LG существует в виде димеров, тогда как при pH <3 и низкой ионной силе (I<10 mM), преобладает мономерная форма. Димеризация β -LG происходит при участии гидрофобных и электростатических взаимодействий. Считается, что в условиях получения, хранения и переработки молока мономеры и димеры β -LG находятся в состоянии динамического равновесия, которое сдвинуто в сторону димерных форм [31].

```

      10      20      30      40      50
MKCLLLALAL TCGAQA LIVT QTMKGLDIQK VAGTWYSLAM AASDISLLDA
      60      70      80      90     100
QSAPLRVYVE ELKPTPEGDL EILLQKWENG ECAQKKIIAE KTKIPAVFKI
      110     120     130     140     150
DALNENKVLV LDTDYKKYLL FCMENSAEPE QSLACQCLVR TPEVDDEALE
      160     170
KFDKALKALP MHIRLSFNPT QLEEQCHI

```

Рис. 3.2. Первичная структура **пре- β -LG B** [1, 2, 27]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид (Met1-Ala16), желтым фоном обозначена а.к. цепь зрелого β -LG B. В нативном белке Cys121 (нумерация а.к. последовательности, без учета сигнального пептида) несет свободную SH-группу (выделен бирюзовым фоном); дисульфидные связи образуют Cys66-Cys160 (выделены лиловым фоном) и Cys106-Cys119 (выделены серым фоном) [5, 21–26]. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1.

В настоящее время идентифицировано 11 генетических вариантов β -LG (табл. 3.3).

Таблица 3.3

Различия в аминокислотной последовательности генетических вариантов
 β -лактоглобулина [1]

Положение аминокислот	Генетические варианты β -лактоглобулина (β -LG)										
	A	B*	C	D	E	F	G	H	I	J	W
45		Glu		Gln							
50		Pro				Ser					
56		Ile									Leu
59		Gln	His								
64	Asp	Gly						Asp			
70		Lys						Asn			
78		Ile					Met				
108		Glu							Gly		
118	Val	Ala						Val			
126		Pro								Leu	
129		Asp				Tyr**					
158		Glu			Gly	Gly	Gly				

* Референтный белок семейства. Положение аминокислот референтного белка выделено курсивом.

** Возможна аналогичная замена в положении 130.

С момента опубликования в 1984 г. V Номенклатуры белков молока [2] описано 4 новых генетических варианта β -LG: H [32,33], I [34], J [34] и W [35]. Точная аминокислотная последовательность варианта H не установлена, замена Lys70→Asn обнаружена в 2003 г. [36]. Бэта-лактоглобулин J оказался идентичен β -LG X, найденному ранее у венгерской пятнистой и венгерской серой пород коров [37]. Выпавший из алфавитной последовательности вариант β -LG W называют «молчащим». Замена одной незаряженной аминокислоты на другую (Ile56→Leu)

не сказывается на электрофоретической подвижности при щелочном электрофорезе и с трудом обнаруживается при изоэлектрофокусировании (ИЭФ) [35].

Во избежание путаницы и повторений новые генетические варианты рекомендовано обозначать литерой X до установления их первичной структуры.

В последние годы все чаще предпринимаются попытки конструирования искусственных белков, которые лишь незначительно отличаются от природных аналогов. Например, Т.Р. Kim и соавторы [38] экспрессировали β -LG с несколько измененным N-терминальным участком (Glu-Ala-Glu-Ala-Tyr-Val-Thr- вместо Leu-Ile-Val-Thr- в природном белке), что привело к изменению его электрофоретического поведения. Авторы VI Номенклатуры белков коровьего молока отмечают, что такие модифицированные протеины должны быть четко маркированы с тем, чтобы их можно было легко отличить от натуральных аналогов [1].

В отличие от казеинов, получение β -LG в кристаллической форме сделало возможным исследование его трехмерной структуры методом дифракции рентгеновских лучей [20, 21, 23, 25]. Исследование структуры β -LG методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) при pH около 2,5 подтвердило данные рентгеноструктурного анализа [39, 40].

Сервис Alpha Fold Monomer v 2.0. [41, 42] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P02754>) с высокой достоверностью (в основном > 90%) предсказывает трехмерную организацию зрелого β -LG (а.к. последовательность 17–178), тогда как сигнальный пептид (последовательность 1–16) не структурирован (рис. 3.3).

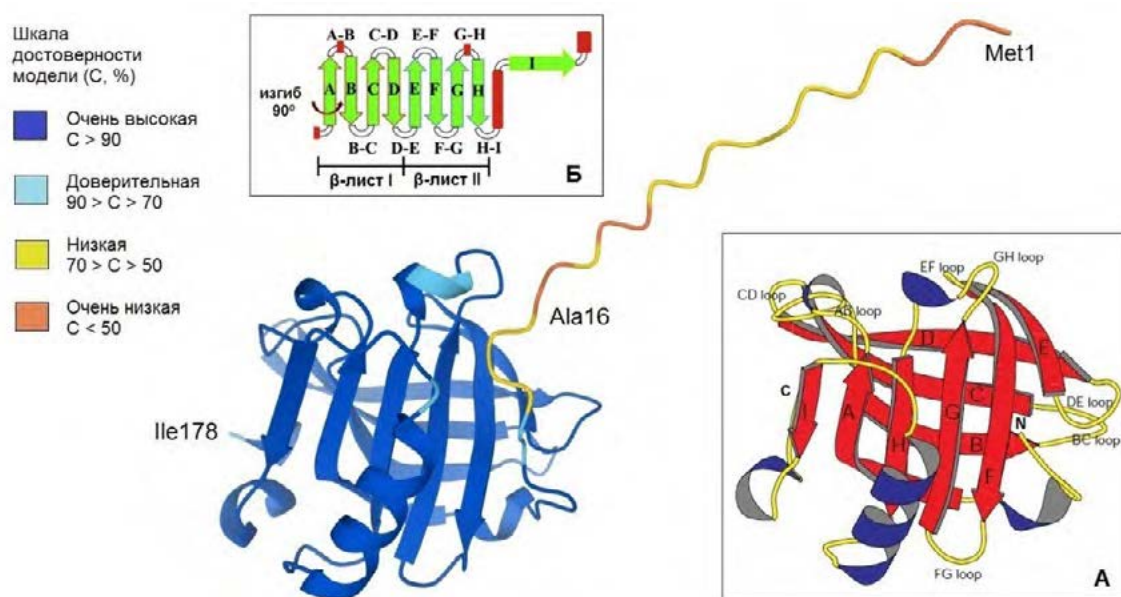


Рис. 3.3. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре- β -лактоглобулина, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P02754>) [41, 42]. А. Ленточная модель пространственной структуры β -лактоглобулина (162 а.к. остатка) с β -нитеями (А-І, обозначены красным цветом), образующими антипараллельные β -складчатые слои, соединяющими их петлями (обозначены желтым цветом) и α -спиральными участками (обозначены серым и синим цветом) [23]. Б. Схема элементов вторичной структуры β -лактоглобулина. Альфа-спирали окрашены в красный цвет, β -нити – в зеленый. Бэта-нити А-Н образуют две β -складчатые структуры – β -лист І и β -лист ІІ; стрелкой указано место изгиба β -нити А под углом 90° [31]

По современным представлениям, молекула β -LG может содержать пять α -спиральных участков и девять антипараллельных β -нитей, образующих два β -листа. Бэта-лист І образуют нити А-Д, а β -лист ІІ – нити Е-Н (рис. 3.3А). Из ленточной модели третичной структуры β -LG следует, что β -лист І и β -лист ІІ располагаются ортогонально (рис. 3.3Б). Бэта-нить І отделена

от β -нити Н альфа-спиральным участком Asp145-Leu156 и, по данным [31], участвует в образовании димерных форм β -LG.

Известно, что β -LG является источником пептидов, обладающих антигипертензивной, антимикробной, антиоксидантной, противораковой, иммуномодулирующей, опиоидной, гипоchoлестеринемической активностью и другими метаболическими эффектами [43, 44]. В модельных экспериментах на лабораторных животных показано, что пептид β -лактозин В (ALPM; β -LG (ф. 142–145)) проявляет значительную антигипертензивную активность, а триптический пептид ПАЕК (β -LG (ф. 71–75)) демонстрирует гипоchoлестеринемический эффект.

Также установлено, что опиоидный пептид β -лакторфин (YLLF; β -LG (ф. 102–105)) улучшает функции артерий у крыс линии SHR. Несмотря на то, что пептиды, полученные из β -LG, проявляют разнообразную биологическую активность *in vitro*, для подтверждения их физиологических эффектов необходимы тщательные исследования *in vivo*. Так, в исследовании [45] показано, что пептидный ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (ALPMHIR; β -LG (ф. 142–148)) быстро разлагался *in vitro* при инкубации с сывороткой крови человека, а после перорального приема в сыворотке пациентов не обнаруживался.

Интересным свойством β -LG является его способность связывать гидрофобные и амфифильные молекулы, такие как гексан, пальмитиновая кислота и витамин D [46–49]. Способность связывать ретинол (витамин А), что является важным для нормального роста и развития молодых животных, позволяет отнести β -LG к семейству липокалинов [23, 49].

Однако, несмотря на то, что некоторые ретинолы и жирные кислоты могут связываться с гидрофобными участками β -LG [26, 50–52], биологическая функция этого белка до конца не ясна. Предполагается, что β -LG имеет отношение к физиологии вскармливания, не исключено его участие в процессах, связанных с метаболизмом фосфора в молочной железе и в поддержании питательной ценности молока [52, 53].

В эпителии молочных желез происходит гликозилирование [54], а при нагревании молока или сыворотки – значительное лактозилирование β -LG, которое происходит по механизму реакции Майяра [54–57]. В первую очередь лактозилируются Lys47 и Lys 91, тогда как Lys8 и Lys141 – менее реакционноспособны [56]. Лактозилирование приводит к повышению аллергенных свойств β -LG. В тестах на кожные реакции аллергенность β -LG, выделенного из пастеризованного молока была примерно в 100 раз выше, чем у β -LG выделенного из нативного молока [57].

В результате термообработки молока наблюдается денатурация и агрегация денатурированного β -LG с другими белками. В частности, β -LG образует дисульфидно-связанные агрегаты с к-CN [53].

3.3. α -Лактальбумин (α -LA)

Референтным белком семейства лактальбуминов считается α -LA В – небольшой глобулярный белок, состоящий из одной полипептидной цепи и 123 аминокислотных остатков: Ala3, Arg1, Asn8, Asp13, Cys8, Gln6, Glu7, Gly6, His3, Ile8, Leu13, Lys12, Met1, Phe4, Pro2, Ser7, Thr7, Trp4, Tyr4, Val6 [58]. Пре- α -LA содержит сигнальный пептид, состоящий из 19 аминокислотных остатков [59, 60]. Вычисленная молекулярная масса составляет 14,178 кДа [1]. Первичная структура α -LA, представленная на рисунке 3.4, была определена методом секвенирования аминокислотной последовательности [58] и подтверждена секвенированием геномной ДНК [61, 62]. Аминокислотная последовательность α -LA *B. taurus*, а также дополнительная информация о структуре и биохимических свойствах этого белка размещены в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/P00711>). Идентификационный номер коровьего α -LA – P00711 (LALBA_BOVIN) [63].

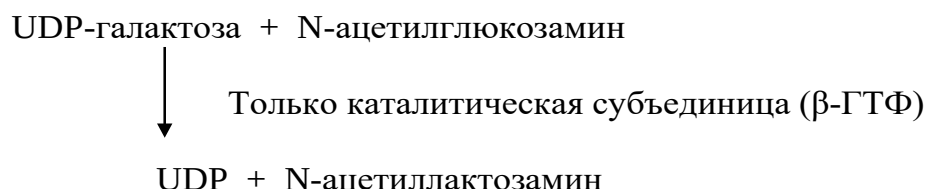
Известны три генетических варианта α -LA – А, В и С [1, 2, 65]. В молоке большинства пород, относящихся к виду *Bos taurus*, присутствует вариант В, тогда как у пород коров, относящиеся к виду *Bos indicus*, обнаруживаются генетические варианты А и В [66]. Кроме того, генетический вариант А с небольшой частотой наблюдается у итальянских и восточно-европейских линий *Bos taurus* [67]. Различия генетических вариантов А и В на уровне первичной структуры заключаются в одной аминокислотной замене Gln10→Arg [68]. Из молока коров породы бантенг (*Bos javanicus*) выделен третий вариант α -LA – С [69], однако его аминокислотная последовательность не установлена, а также не определена нуклеотидная последовательность геномной ДНК. Предположительно, вариант С отличается от варианта В заменой Asn?→Asp или Gln?→Glu [1].

10	20	30	40	50
MMSFVSLLLV	GILFHATQAE	QLTKCEVFRE	LKDLKGYGGV	SLPEWVCTTF
60	70	80	90	100
HTSGYDTQAI	VQNNDSTEYG	LFQINNKIWC	KDDQNPHSSN	ICNISC DKFL
110	120	130	140	
DDDLTDDIMC	VKKILDKVGI	NYWLANKALC	SEKLDQWLCE	KL

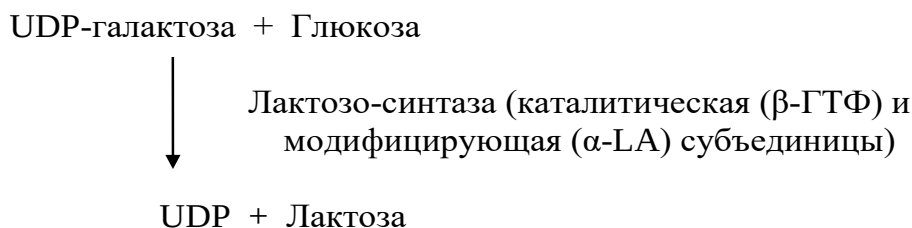
Рис. 3.4. Первичная структура **пре- α -LA В** [58,63]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид (Met1-Ala19), желтым фоном обозначена а.к. цепь зрелого α -LA. В нативном зрелом α -LA дисульфидные связи образуют Cys25-Cys139 (выделены бирюзовым фоном, нумерация пре- α -LA), Cys47-Cys130 (выделены лиловым фоном), Cys80-Cys96 (обозначены серым фоном) и Cys92-Cys110 (выделены синим фоном) [63,64]. На участке 100-110 подчеркнутым жирным шрифтом выделены аспартаты, участвующие в связывании двухвалентных катионов. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Содержание незаменимых аминокислот (Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Thr, Met, Cys, Lys, Val) в α -LA составляет 63,2%; для общего казеина эта цифра равна 51,4%. Гомология первичной последовательности коровьего и человеческого α -LA составляет 72%, что делает этот белок идеальным компонентом детского питания [70].

Физиологическая роль α -LA связана с функционированием молочной железы, в частности с регуляцией синтеза лактозы [71, 72]. В аппарате Гольджи клеток эпителия молочной железы альфа-лактальбумин связывается с ферментом β -1,4-галактозилтрансферазой (β -ГТФ), с образованием лактозо-синтазного комплекса [1]. Таким образом, лактозо-синтазный комплекс (лактозо-синтаза) состоит из каталитической (β -ГТФ) и модифицирующей (α -LA) субъединиц. Молярное соотношение субъединиц в комплексе равно 1:1. Изолированная β -1,4-галактозилтрансфераза катализирует перенос галактозы с UDP-галактозы на N-ацетилглюкозамин с образованием N-ацетиллактозамина:



В результате связывания с α -лактальбумином (модифицирующей субъединицей) специфичность каталитической субъединицы (β -ГТФ) изменяется. Образующийся комплекс – лактозо-синтаза – переносит галактозу не на N-ацетилглюкозамин, а на глюкозу, что приводит к образованию лактозы:



Бэта-1,4-галактозилтрансфераза постоянно присутствует в большинстве тканей млекопитающих, где участвует в синтезе углеводного компонента гликопротеинов и гликолипидов. В отличие от β -ГТФ, лактозо-синтаза обнаруживается только в молочной железе. Во время беременности β -ГТФ синтезируется и накапливается в молочной железе, в это время модифицирующая субъединица (α -LA) образуется в небольшом количестве. При родах происходят резкие изменения в содержании некоторых гормонов, которые запускают усиленный синтез α -LA. Для дифференцировки эпителиальных секреторных клеток молочной железы необходимы два гормона – кортизол и инсулин; секрецию молока стимулирует гормон пролактин. Он стимулирует синтез казеинов, α -лактальбумина и ряда ферментов. Так, например, *in vitro*, в препаратах ткани молочной железы, ранее инкубированной с кортизолом и инсулином, пролактин индуцирует синтез казеинов и α -LA. Образующийся в результате этого лактозо-синтазный комплекс обеспечивает синтез больших количеств лактозы [71–74].

Опубликованы результаты работ по созданию искусственной химерной лактозо-синтазы, состоящей из рекомбинантного мышинового α -LA и рекомбинантной β -1,4-ГТФ коровы [75]. После получения лактозо-синтазного комплекса в кристаллической форме была исследована его трехмерная структура. Установлено, что α -LA фиксирует молекулу глюкозы и ингибирует связывание N-ацетилглюкозамина с β -1,4-галактозилтрансферазой. В результате глюкоза присоединяется к UDP-галактозе с образованием молекулы лактозы.

Методами сайт-направленного мутагенеза и экспрессии полученных мутантных генов в бактериях были выявлены важные для функционирования α -LA аминокислотные остатки. Мутации, приводившие к замене Glu117 и Trp118, значительно снижали аффинность α -LA по отношению к β -1,4-галактозилтрансферазе. Замены Phe31 и His32 влияли на способность α -LA инициировать присоединение глюкозы к лактозо-синтазному комплексу [76].

Значение α -LA для нормального функционирования молочной железы и секреции молока было продемонстрировано в опытах с мышами, несущими ген функционально неактивного, «выключенного» («knocked out») белка [77, 78]. Молоко гомозиготных особей, синтезировавших функционально-неактивный α -LA, не содержало лактозы, обладало повышенной вязкостью и не высасывалось новорожденными мышатами из молочных желез. Молоко гетерозигот, синтезировавших примерно 50% нормального α -LA, имело пониженную концентрацию лактозы и концентрацию сухих веществ, значительно превышающую норму. Результаты этих опытов указывают на то что α -LA является не только важным белковым компонентом молока, но и регулятором синтеза лактозы и секреции молока.

Небольшая часть присутствующего в молоке α -LA, N-гликозилирована по остаткам Asn [79]. Причина, по которой только небольшой процент α -LA несет остатки сахаров, не ясна. Гипотеза существования стерического ограничения доступа ферментов, катализирующих гликозилирование протеинов, к сайтам потенциального гликозилирования зрелого α -лактальбумина [80] не нашла подтверждения при исследовании третичной структуры этого белка [81]. Потенциальная физиологическая роль гликозилирования α -LA также остается невыясненной.

В нативной форме α -LA не фосфорилирован [82]. Однако в экспериментах *in vitro* показано, что после восстановления и карбоксиметилирования сульфгидрильных групп, α -LA становится субстратом для казеин-киназы [82].

Концентрация α -LA в молоке зависит от физиологического цикла животного и колеблется от 0,6 до 1,7 г/л [1, 66]. Для молочных пород коров в конце периода лактации, на фоне повышения уровня основных белков [83], характерно снижение концентрации α -LA в молоке [84, 85]. Уменьшение концентрации α -LA сопровождается падением концентрации молочного сахара (лактозы). Пониженное содержание α -LA также коррелирует с наличием инфекционных заболеваний молочной железы [84].

Структура α -LA и нуклеотидная последовательность его ДНК очень схожи с таковыми для лизоцимов С-типа [67]. Сравнительное исследование трехмерных структур и аминокислотных последовательностей этих белков выявило их совпадение и гомологию, соответственно в 62,2 и 35,8% [86, 87]. Несмотря на то, что а.к. последовательность α -LA гомологична белками семейства лизоцимов, его цитолитическая активность, в 106 ниже, чем специфическая активность куриного лизоцима.

Модель предполагаемой трехмерной структуры α -LA представлена на рисунке 3.5.

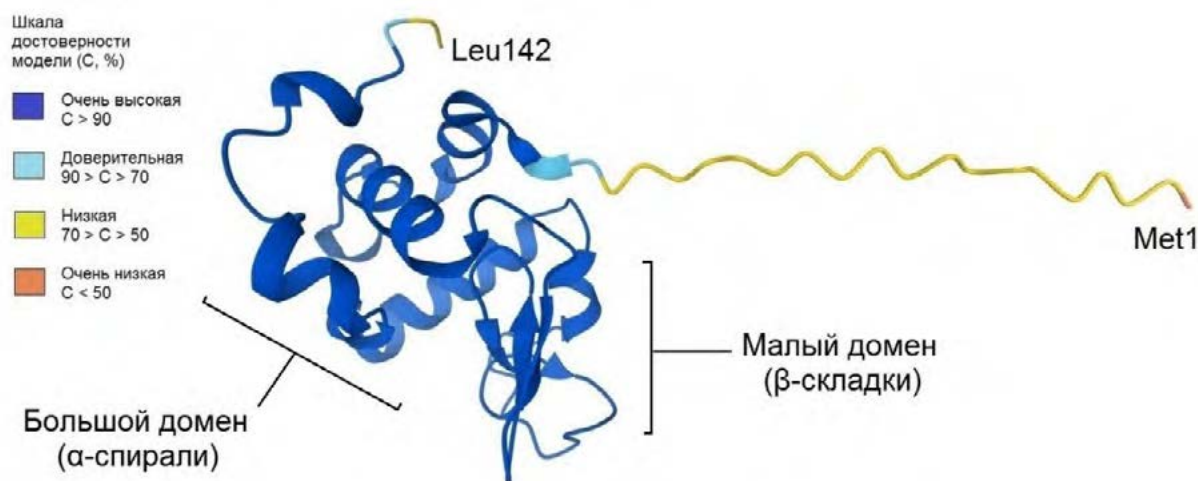


Рис. 3.5. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре- α -лактальбумина, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P00711>) [41, 42]

Нативный α -LA коровы состоит из двух доменов: большого, содержащего α -спиральные структуры, и малого, несущего β -складки, которые соединены между собой Ca^{2+} -связывающей петлей [88]. Большой домен состоит из трех классических α -спиральных участков (а.к. последовательности 5–11 (А), 23–34 (В) и 86–99 (С) (нумерация зрелого α -LA)) и двух коротких 3_{10} -спиралей (три а.к. остатка на один оборот спирали, в образовании водородных связей участвуют 10 атомов) на участках 17–21 и 115–119. Малый домен состоит из серии петель, небольшой трехцепочечной антипараллельной β -складки, образуемой последовательностями 40–43, 47–50, 55–56, и одной 3_{10} -спирали, на участке а.к. последовательности 76–82. Домены α -LA разделены глубокой бороздой, в которой расположен Ca^{2+} -связывающий участок. Пространственная структура α -LA стабилизируется четырьмя дисульфидными мостиками: Cys6–Cys120, Cys 61–Cys77, Cys73–Cys91 и Cys 28–Cys111 (нумерация зрелого α -LA) [89].

Альфа-LA идентифицирован как Ca^{2+} -связывающий металлопротеин [90]. Способность связывать двухвалентные катионы обусловлена наличием пяти остатков аспарагиновой аминокислоты на участке 79–88 (нумерация зрелого белка), расположенном в петле, связывающей

большой и малый домены α -LA [88]. Помимо кальция, α -LA связывает также цинк [91], однако именно Ca^{2+} необходим для формирования и стабилизации третичной структуры белка [88, 89, 92]. В частности, ионы кальция необходимы для правильного фолдинга (укладки, свертывания) полипептидной цепи и формирования дисульфидных связей зрелого α -LA [81]. Процесс фолдинга полипептидной цепи α -LA коровы, человека, морской свинки, бабуина и козы исследован методами рентгеноструктурного анализа [81, 87, 93–97]. Во всех случаях в молекуле α -LA выявлено наличие кальций-связывающего сайта.

В 2000 г. М. Svensson с соавторами показали, что α -LA человека после удаления связанных с ним ионов кальция (путем обработки ЭДТА и перевода белка в форму апо- α -LA) и пропускания через ионообменную колонку, насыщенную олеиновой кислотой, превращается в специфическую активную форму, способную индуцировать апоптоз («программируемую смерть») определенных типов опухолевых клеток [98]. Позднее такая активная форма белка, являющаяся комплексом апо- α -LA и олеиновой кислоты, получила название HAMLET (HAMLET = “human α -LA made lethal to tumor cells”) [99]. HAMLET вызывает апоптоз опухолевых клеток, но не оказывает влияния на зрелые (дифференцированные) клетки. Апо-форма α -лактальбумина коровы и некоторых других видов в комплексе с олеиновой кислотой также способны превращаться в HAMLET-подобные белки [99].

В мягких денатурирующих условиях α -LA может существовать в особой конформационной форме – «расплавленной глобулы» (molten globule) [100–104]. Состояние расплавленной глобулы (незавершенного фолдинга) характерно для белков, у которых сформирована нативная вторичная структура, но межрадикальные связи остаются пока случайными и непрочными. Общее количество одновременно существующих связей относительно невелико, поэтому конформационное состояние белковой молекулы является неустойчивым. Расплавленная глобула считается промежуточным состоянием в процессе формирования нативной третичной структуры и служит классической наглядной моделью фолдинга белков [97, 100, 101, 104, 105].

Установлено, что α -LA и его гидролизаты обладают антистрессовой активностью [106], антимикробным [107] и иммуномодулирующим действием [108], гипотензивной активностью [109], способностью регулировать рост клеток [110].

В экспериментах на лабораторных животных показано, что α -LA обладает сильными гастропротективными свойствами и может тормозить развитие язвы желудка, вызванной этанолом или стрессом. Исследование метаболизма слизистой оболочки желудка позволило установить, что α -LA стимулирует синтез и секрецию муцина – основного компонента желудочной слизи, выполняющей роль защитного барьера. В опытах *in vitro* α -LA, в концентрации 3 мг/мл, на 23% усиливал синтез муцина в культуре эпителиальных клеток желудка. Исследования *in vivo* показали, что прием α -LA *per os* в дозировке 300 мг/кг веса три раза в день, в течение недели вызывал достоверное увеличение толщины слизистого слоя, предохраняющего клетки желудочного эпителия от повреждающих воздействий [111, 112].

Альфа-лактальбумин служит источником незаменимых аминокислот триптофана (Trp) и цистеина (Cys), которые являются предшественниками серотонина (медиатор нервной системы) и глутатиона (трипептид с антиоксидантными свойствами) [44].

Предполагается, что у человека пероральный прием α -LA может улучшить способность справляться со стрессом. Клиническое исследование с группой лиц, подверженных стрессу показало, что диета, обогащенная α -LA, способствует снятию стресса и снижению депрессивного настроения [106], а также улучшает когнитивные функции и повышает активность триптофана и серотонина в мозге [113]. В то же время в клиническом исследовании Н. Scrutton с соавторами

[114] никаких изменений в эмоциональном статусе испытуемых на фоне ежедневного приема α -LA выявлено не было.

Благодаря высокой степени аминокислотной гомологии с α -LA человека, нативный коровий α -LA и его гидролизаты находят применение в качестве ингредиента питательных смесей и ферментированных молочных продуктов. Например, обогащенный α -LA гидролизат сывороточных белков «Vivinil Alpha» (BDH, Нидерланды) используется как «средство для расслабления и сна» [43, 44].

Альфа-лактальбумин является источником биологически-активных пептидов. В 1986 г. в результате обработки α -LA пепсином был получен тетрапептид Tyr-Gly-Leu-Phe (ф. 50–53), обладающий способностью ингибировать ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) и получивший название α -лакторфин [115]. Впоследствии из α -LA были получены дипептиды (ф. 18–19, ф. 50–51 и ф. 52–53), трипептиды (ф. 50–52), пентапептиды (ф. 104–108) и декапептиды (ф. 99–108), – также обладающие анти-АПФ активностью [43].

Клиническое исследование с использованием детской питательной смеси, обогащенной α -LA, показало антибактериальную активность в отношении энтеропатогенного штамма *Escherichia coli*, сравнимую с активностью грудного молока [116]. Такое действие может быть связано с пептидами, которые высвобождаются из α -LA во время пищеварения.

Известно, что обработка трипсином α -LA высвобождает два антибактериальных пептида: Glu-Gln-Leu-Thr-Lys (ф. 1–5) и Gly-Tyr-Gly-Gly-Val-Ser-Leu-Pro-Glu-Trp-Val-Cys-Thr-Thr-Phe (ф. 17–31), который, в свою очередь, связан с последовательностью Ala-Leu-Cys-Ser-Glu-Lys (ф. 109–114) дисульфидным мостиком. Обработка α -LA химотрипсином приводит к образованию еще одного антибактериального пептида, а именно: Cys-Lys-Asp-Asp-Gln-Asn-Pro-His (ф. 61–68), также связанного дисульфидной связью с последовательностью Ile-Ser-Cys-Asp-Lys-Phe (ф. 75–80). Преимущественно, эти пептиды были активны в отношении грамположительных бактерий, однако слабые эффекты наблюдались и в отношении грамотрицательных микроорганизмов [107].

В работе [107] после обработки α -LA пепсином не были обнаружены антибактериальные пептиды. В то же время в другом исследовании показано, что как пепсин, так и трипсин высвобождали из α -LA пептиды, которые ингибировали рост *Escherichia coli* (штамм JM103) [117].

3.4. Сывороточный альбумин (SA)

Сывороточный альбумин (SA) – основной белок сыворотки крови – присутствует также во всех тканях и секретах. Этот белок играет центральную роль в транспорте, метаболизме и распределении самых разных лигандов, участвует в поддержании осмотического давления крови, ингибирует повреждающее действие свободных радикалов [1, 118]. Коровий сывороточный альбумин (BSA), обнаруживаемый в молоке физическими [119] и иммунологическими методами [120], идентичен сывороточному альбумину крови. На долю BSA приходится примерно 1,5% от общего белка молока и около 8% от общего белка молочной сыворотки.

До 1990 г. считалось, что BSA состоит из 582 аминокислотных остатков и имеет вычисленную молекулярную массу 66,267 кДа [121–123]. Однако в 1990 г. Hirayama и соавторы, используя результаты, полученные одним из вариантов масс-спектрометрии (Electrospray Ionization Mass Spectrometry – EIMS), внесли в эту структуру поправку и доказали, что зрелый BSA состоит из 583 аминокислот, содержит 17 дисульфидных связей и имеет вычисленную молекулярную массу 66,399 кДа [124]. Группа тех же авторов представила скорректированный и принятый сегодня аминокислотный состав BSA: Ala47, Arg23, Asn14, Asp40, Cys35, Gln20, Glu59, Gly16, His17, Ile14, Leu61, Lys59, Met4, Phe27, Pro28, Ser28, Thr33, Trp2, Tyr20, Val36 [92]. В зрелом

белке только один из 35 остатков цистеина свободен и несет SH-группу, остальные 34 остатка Cys образуют внутримолекулярные дисульфидные связи [1, 124].

Уточненная а.к. последовательность сывороточного альбумина коровы (*Bos taurus*), а также дополнительная информация о структуре этого белка, размещены в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/P02754>). Идентификационный номер коровьего SA – P02769 (ALBU_BOVIN) [125].

Сывороточный альбумин синтезируется в виде предшественника – пре-проальбумина, состоящего из 607 а.к. остатков. Как следует из названия, транслируемый белок содержит N-концевой пре-фрагмент (сигнальный пептид), состоящий из 18 аминокислот, который удаляется в ЭР с образованием проальбумина. В свою очередь, проальбумин превращается в секретируемый зрелый альбумин в аппарате Гольджи, после удаления пропептида, в состав которого входят шесть а.к. остатков [125].

Первичная структура пре-проальбумина *B. taurus* представлена на рисунке 3.6.

10	20	30	40	50
MKWTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA
▼60	70	80	90	100
FSQYLQQCP	DEHVKLVNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK
110	120	130	140	150
VASLRETYGD	MADCEKQEP	ERNECFLSHK	DDSPDLPKLK	PDPNTLCDEF
160	170	180	190	200
KADEKKFWGK	YLYEIAARRHP	YFYAPELLYY	ANKYNGVFQE	CCQAEDKGAC
210	220	230	240	250
LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA	RLSQKFPAKE
260	270	280	290	300
FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDLLECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
310	320	330	340	350
CCDKPLLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAKDAFL
360	370	380	390	400
GSFLYEYSRR	HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAKDDPH	ACYSTVFCDKL
410	420	430	440	450
KHLVDEPQNL	IKQNCQFEK	LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS
460	470	480	490	500
RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL	NRLCVLHEKT	PVSEKVTKCC
510	520	530	540	550
TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP	DTEKQIKKQT
560	570	580	590	600
ALVELLKHKP	KATEEQQLKTV	MENFVAFVVK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV
			607	
			STQTALA	

Рис. 3.6. Первичная структура **пре-проальбумина** коровы [125]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид (Met1-Ser18), серым фоном обозначен пропептид (Arg19-Arg24), желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого BSA. Остатки Cys выделены лиловым цветом. Треугольником (▼) обозначен остаток Cys58 (нумерация пре-проальбумина), несущий свободную SH-группу

В эволюционном ряду млекопитающих наблюдается высокая гомология аминокислотных последовательностей SA (табл. 3.4) и консервативность структуры внутримолекулярных дисульфидных связей [118, 126]. Например, гомология первичной структуры BSA и овечьего SA составляет 92%, а для BSA и сывороточного альбумина человека (HSA) – 76% [118].

Таблица 3.4

Гомология первичной структуры сывороточного альбумина в ряду млекопитающих [118, 126]

Сравниваемые аминокислотные последовательности	Степень гомологии, %
SA лошади – SA человека	76
SA лошади – SA коровы	74
SA лошади – SA свиньи	76
SA лошади – SA овцы	75
SA лошади – SA крысы	76
SA коровы – SA овцы	92
SA коровы – SA человека	76

Трехмерная структура HSA установлена методами кристаллографии и, основываясь на гомологии первичной последовательности, можно предполагать, что BSA имеет аналогичную пространственную организацию [126]. Модель предполагаемой трехмерной структуры и доменной организации BSA представлена на рисунке 3.7.

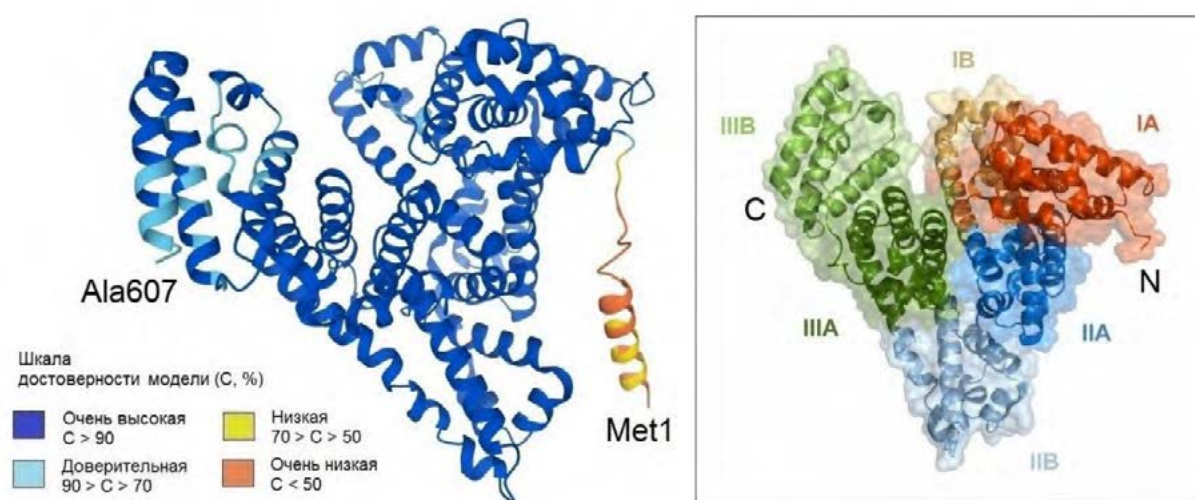


Рис. 3.7. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-проальбумина коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P02769>) [41,42]. В рамке показана модель доменной организации зрелого альбумина [129]

Структуру всех известных на сегодняшний день сывороточных альбуминов (кроме SA речной миноги) составляют три гомологичных домена (I–III). Общая архитектура каждого домена схожа, поскольку альбумины позвоночных являются результатом трипликации генов. Домены располагаются друг относительно друга таким образом, что при pH 4,5 – 8,0 молекула сывороточного альбумина по форме напоминает сердце (heart-shaped) или равносторонний треугольник с вершиной внизу. Каждый домен состоит из двух субдоменов, А и В, содержащих шесть спиралей и четыре спирали соответственно, которые способны связывать различные лиганды (рис. 3.7). Вся пространственная структура SA стабилизирована 17 дисульфидными мостиками. При изменении pH SA образует конформационные изомеры, которые адаптируют пространственную структуру к изменению внешних условий [118, 127–130].

Кроме образования внутримолекулярных дисульфидных связей, BSA подвергается ряду других ПТМ, среди которых фосфорилирование по остаткам Ser в положениях 29, 82, 89, 269, 442, 512 (нумерация пре-проBSA) и Thr в положениях 107, 443, 445, 569. Кроме того, BSA несет два N6-сукциниллизина в положениях 228 и 587, а также один N6-метиллизин в положе-

нии 557 [125]. В положении 151 BSA несет остаток Lys, который может быть неферментативно N-гликозилирован при определенных условиях *in vitro* [125, 131]. Однако *in vivo* SA, по-видимому, не гликозилирован [132].

Поскольку молекула SA не покрыта углеводной оболочкой, она может связывать широкий спектр молекул и атомов: воду и катионы металлов (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+}), свободные жирные кислоты и жирорастворимые гормоны, трансферрин, окись азота и некоторые лекарственные препараты [125, 132].

Альбумин является не только пассивным переносчиком, но и активным участником фармако- или токсикокинетических процессов. В многочисленных экспериментах была показана эстеразная или псевдоэстеразная активность SA по отношению к α -нафтилацетату и п-нитрофенилацетату, эфирам жирных кислот, аспирину, глюкурониду кетопрофена, эфирам никотиновой кислоты, фосфорорганическим пестицидам и ряду других соединений [132].

В то время как роль BSA в кровообращении коровы хорошо изучена, его функции в молоке четко не определены. Считается, что присутствие BSA в молоке связано с нарушением ультраструктуры клеток эпителия молочной железы. Резкое увеличение концентрации BSA наблюдалось при мастите и первоначально было оценено как потенциальный маркер этого заболевания [133]. Но из-за высокой индивидуальной вариативности этого параметра концентрацию BSA в молоке нельзя считать надежным маркером мастита [134].

Коровий SA известен как агент, вызывающий аллергию у детей [135]. Существует гипотеза о том, что BSA, присутствующий в молоке, может стимулировать иммунный ответ у человека, который перекрестно реагирует с поверхностным антигеном, специфичным для В-клеток поджелудочной железы. Это может вызвать аутоиммунный ответ, потенциально, приводящий к инсулинзависимому диабету [136].

3.5. Лактоферрин (LF)

Молоко большинства млекопитающих содержит трансферрины – белки, способные обратимо связывать и транспортировать ионы железа [137].

В 1960 г. из коровьего молока M.L. Groves выделил и частично очистил белок красного цвета («red protein»), который позднее получил наименование лактоферрин (LF) или лакто-трансферрин [138]. Специфическое название было присвоено для того, чтобы отличить его от мембраносвязанного овотрансферрина и сывороточного трансферрина, чья активность также обнаруживается в молоке [138] и молозиве [139]. Кроме молока, лактоферрин выявлен в секретах некоторых типов эпителиальных клеток [140], а также в полиморфноядерных лейкоцитах [141]. В норме содержание LF в молоке составляет 20–200 мг/л, а при воспалении или инфекции концентрация этого белка многократно возрастает [1].

Лактоферрин молока коровы – простой белок с различной степенью гликозилирования, состоящий из одной полипептидной цепи, в состав которой входят 689 аминокислотных остатков: Asp36, Asn29, Thr36, Ser45, Glu40, Gln29, Pro30, Gly49, Ala67, Cys34, Val46, Met4, Ile16, Leu66, Tyr21, Phe27, Lys54, His10, Trp13, Arg37. Все остатки цистеина образуют внутримолекулярные -S-S- связи. Вычисленная молекулярная масса, с учетом 17 дисульфидных мостиков, составляет 76,110 кДа. Молекулярная масса нативного белка может в значительной степени варьировать в зависимости от степени гликозилирования [142]. Первичная структура LF была установлена в начале 90-х гг. прошлого века. Сигнальный пептид лактоферрина состоит из 19 аминокислотных остатков [143–145].

Аминокислотная последовательность пре-LF *B. taurus* (рис. 3.8), а также дополнительная информация о структуре и биохимических свойствах этого белка, размещены в открытой базе

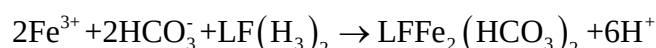
данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/P24627>). Идентификационный номер коровье-го LF – UniProtKB – P24627 (TRFL_BOVIN) [146].

10	20	30	40	50
MKLFVPALLS	LGALGLCLAA	PRKNVRWC	TI SQPEWFKC	RRR WQWRMKKLGA
60	70	80	90	100
PSITCVRRAF	ALECIRAI	AE KKADAVTLDG	GMVFEAGRDP	YKLRPVAAEI
110	120	130	140	150
YGTKE	SPQTH YYAVAVVKKG	SNFQLDQLQG	RKSC	HTGLGR SAGWIIPMGI
160	170	180	190	200
LRPYLSWTES	LEPLQGAVAK	FFSASC	VP	CI DRQAYPNLC
210	220	230	240	250
ACSSREPYFG	YSGAFK	CLQD GAGDVA	FVKE TTVFENLPEK	ADRDQYELL
260	270	280	290	300
LNNSRAPVDA	FKECHLAQVP	SHAVVARSVD	GKEDLIWKLL	SKAQEKFGKN
310	320	330	340	350
KSRSFQLFGS	PPGQRDLLFK	DSALGFLRIP	SKVDSALYLG	SRYLTTTLKLN
360	370	380	390	400
RETAEVVKAR	YTRVWC	AVG PEEQKKC	QQW SQQSGQ	NVTC ATASTTDD
410	420	430	440	450
VLVLKGEADA	LNLDGGYIYT	AGKCGLVPVL	AENRKSSKHS	SLDCVLRPTE
460	470	480	490	500
GYLAVAVVKK	ANEGLTWN	SL KDKKSC	HTAV DRTAGWNIPM	GLIVNQ
510	520	530	540	550
AFDEFFSQSC	APGADPKSRL	CALCAGDDQG	LDKCVPNSKE	KYYGYTGAFR
560	570	580	590	600
CLAEDVGDVA	FVKNDTVWEN	TNGESTADWA	KNLNREDFRL	LCLDGTRKPV
610	620	630	640	650
TEAQSCHLAV	APNHAVVSRS	DRAAHVKQVL	LHQQALFGKN	GKNCPDKFCL
660	670	680	690	700
FKSETKNLLF	NDNTECLAKL	GGRPTYEEYL	GTEYVTAIAN	LKKCSTSP
				LL
				708
				EACAFLTR

Рис. 3.8. Первичная структура **пре-лактоферрина** [146]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид (Met1-Ala19), желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого LF (Ala20-Arg708). Остатки Cys выделены лиловым цветом. Бирюзовым цветом обозначены потенциальные сайты N-гликозилирования по R-группам Asn

Молекула LF несет 5 потенциальных сайтов N-гликозилирования – Asn252, Asn300, Asn387, Asn495 и Asn564 (нумерация пре-LF) – каждый из которых связан с гликанами [146–148]. Одна из карбогидратных цепей, присоединенная к Asn564, участвует во внутримолекулярных взаимодействиях и влияет на скорость высвобождения железа из С-терминального домена LF [147]. Углеводные группы LF имеют сложный состав, который изменяется в зависимости от стадии лактации [1].

Уже во время открытия LF его красно-коричневая окраска и сходство со свойствами трансферрина и овотрансферрина позволили предположить, что этот белок участвует в транспорте ионов металлов [138]. Позднее это предположение полностью подтвердилось. Одна молекула LF способна связывать два иона Fe^{3+} . Связывание железа происходит в присутствии ионов бикарбоната:



Свободное железо и его соединения катализируют образование свободных радикалов. Захват железа лактоферрином в значительной степени тормозит образование свободных радикалов, поэтому LF может считаться компонентом неспецифической антиоксидантной системы. Присоединение ионов железа к LF сдвигает его изоэлектрическую точку с 9,2 до 8,5 за счет одновременного присоединения ионов бикарбоната, несущих отрицательный заряд [149].

Аффинность LF к ионам железа исключительно высока: равновесная константа диссоциации (KD) комплекса составляет ~10-20 М. В зависимости от степени насыщения железом LF может существовать в 3-х формах: белок не связанный с железом – аполактоферрин (ни N-, ни С-домен не содержит Fe^{3+}); белок, полностью насыщенный железом – гололактоферрин (N- и С-домены несут по одному Fe^{3+}) и белок, частично насыщенный железом – монолактоферрин (N- или С-домен связан с одним Fe^{3+}) [150,151].

Лактоферрин полностью насыщенный ионами Fe^{3+} имеет оранжево-розовую, «лососевую» окраску (salmon-colored). По данным Е.Н. Бейкера с соавторами [150], в молоке степень насыщения LF железом составляет 6–8%. В. Wang с соавторами сообщают о том, что коммерческие препараты LF, полученные из молока коровы, насыщены железом на 10–20% [151]. Механизмы связывания и высвобождения ионов железа, а также транспортные функции LF рассмотрены в работе [151].

Трехмерная структура LF с разрешением 2,8 Å исследована группой Moore с соавторами [147]. Модель трехмерной структуры пре-LF, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer, представлена на рисунке 3.9.

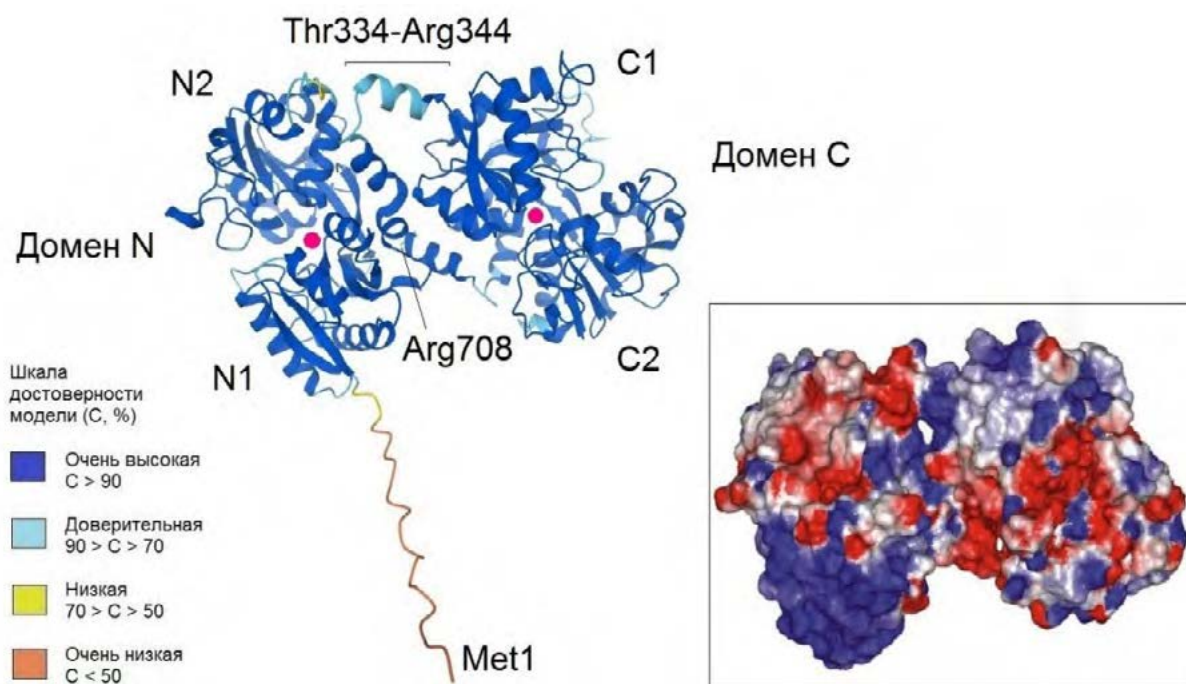


Рис. 3.9. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-лактоферрина коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P24627>) [41, 42]. Окружностями красного цвета указано положение Fe^{3+} -связывающих сайтов в доменах N и С. Субдомены обозначены как N1, N2, C1, C2. Последовательность Thr334–Arg-344 обозначает шарнирный участок, соединяющий домены N и С. В рамке представлена модель распределения поверхностного заряда лактоферрина, насыщенного железом. Синий, белый и красный цвета соответствуют положительным, нейтральным и отрицательным зарядам соответственно [151, 155]

Третичная структура зрелого LF состоит из двух симметричных глобулярных долей или доменов – N (последовательность 1-333) и С (участок 345-676). Каждая доля, в свою очередь,

разделена на два субдомена (N1 – участки 1–90 и 251–333, N2 – участок 91–250; C1 – последовательности 345–431 и 593–676 и C2 – участок 432–592). Остатки Thr334-Arg344 образуют небольшую трехвитковую α -спираль (шарнирный участок), которая соединяет N- и C-домены. Лактоферрин может существовать в двух конформациях: «открытой», в которой белок не связан с ионами железа, и «закрытой» – характерной для комплекса LF-Fe³⁺. Во время перехода открытая $\leftrightarrow$ закрытая конформация, когда LF высвобождает или связывает ионы железа, участок Thr334-Arg344 ведет себя как подвижный шарнир [151–154]. Структура коровьего LF стабилизируется 17 внутримолекулярными дисульфидными связями [147].

Одной из особенностей структуры LF является то, что некоторые участки его поверхности несут положительный заряд, что облегчает связь белка с анионными биомолекулами. Обширный положительно заряженный участок LF расположен на внешней области первой спирали домена N1. Показано, что именно эта область отвечает за связывание LF с ДНК, гепарином и липополисахаридами [151].

Ранние исследования LF были сфокусированы в основном на конформационных изменениях, вызванных связыванием Fe³⁺ [156, 157]. Позже было установлено, что LF несет два железо-связывающих сайта, расположенных в выемках между субдоменами N1 и N2, C1 и C2 (рис. 3.9). Сайты связывания Fe³⁺ формируются четырьмя аминокислотными остатками: в домене N – Asp60, Tyr92, Tyr192, His253, в домене C – Asp395, Tyr433, Tyr526, His595 (нумерация зрелого LF). Необходимые для связывания железа анионы, карбонаты или бикарбонаты фиксируются специфическими участками, расположенными в субдоменах N2 (Arg121, Thr117) и C2 (Arg463, Thr459) [147].

Поскольку комплекс LF-Fe³⁺ исключительно стабилен и распадается только при pH ниже 3,5 (в то время как трансферрин высвобождает ионы железа в слабокислой среде – при pH = 5,5 [158]), вероятно, правильнее было бы классифицировать LF не как транспортный белок, а как хелатор Fe³⁺.

LF и трансферрины различных видов млекопитающих имеют похожие аминокислотные составы, особенности вторичной (включая дисульфидные связи) и третичной структуры, а также положение Fe³⁺-связывающих сайтов (рис. 3.10) [159].

Одна из основных биологических функций лактоферрина связана с его антибактериальными и противовоспалительными свойствами [160]. Наибольший антибактериальный эффект лактоферрин оказывает на представителей грамотрицательных бактерий – *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* [161].

Первоначально считалось, что бактериостатические свойства LF проявляются лишь благодаря способности полностью связывать ионы железа, в том числе из очень разбавленных растворов, лишая тем самым микроорганизмы важного компонента питания [162, 163]. Но позднее было показано, что даже голо-LF подавляет рост многих видов бактерий. Это означает, что антибактериальные свойства LF, не связаны напрямую с его хелатирующим действием по отношению к Fe³⁺. В частности, установлено, что бактерицидный эффект апо-LF обусловлен его способностью образовывать ассоциаты с липопротеинами клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Это приводит к нарушению проницаемости клеточной мембраны или подавляет защитное действие мембраносвязанных липопротеинов по отношению к антимикробным катионным пептидам [151, 159, 164]. За счет поверхностного положительного заряда LF связывает анионные молекулы (например, липотейхоевую кислоту) на поверхности клеток грамположительных бактерий. Это электростатическое связывание уменьшает общий отрицательный заряд клеточной стенки и повышает эффективность антибактериальных соединений, таких как лизоцим и антибиотики [165, 166].

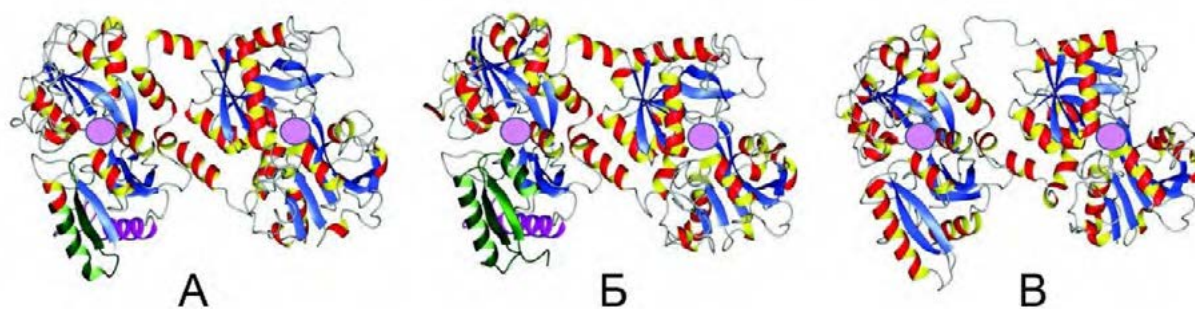


Рис. 3. 10. Модели трехмерной структуры лактоферрина коровы (А), лактоферрина человека (Б) и сывороточного трансферрина кролика (В). Сферами розового цвета указано положение Fe^{3+} -связывающих сайтов (по данным [155, 159])

Предполагается, что маннозидгликановые группы LF связываются с поверхностью бактериальных клеток и, тем самым, ингибирует их способность к адгезии [167].

Антибактериальными свойствами обладают также пептиды, образующиеся из LF под действием пепсина и, при определенных условиях, химозина (Хн) [168–170]. Высвобождаемый из N-терминального домена LF, в результате гидролитического действия пепсина, пептид, не обладающий железосвязывающими свойствами [168], получил название лактоферрицин В (Lfcin В). Лактоферрицин В, идентифицированный как фрагмент 17–41, с ММ 3,2 кДа, обладает сильными щелочными свойствами, содержит одну дисульфидную связь и активен против большой группы микроорганизмов, включая бактерии, дрожжи и грибы [171–175]. Интерес к Lfcin В связан еще и с тем, что участок полипептидной цепи LF, включающий в себя фрагмент 17–41, может, подобно амилоидогенным прионовым белкам и бэта-пептидам, обнаруживаемым при болезни Альцгеймера, принимать спиральную или складчатую конформацию [176]. Химозин при значениях pH, близких к нейтральным (6,3–6,5), не способен гидролизовать LF [177]. Однако при низких значениях pH коровий Хн проявляет пепсиноподобную активность. Поэтому при pH около 3,0 рекомбинантный Хн коровы гидролизует LF с образованием лактоферрицина В и трех дополнительных пептидов, которые также проявляют антибактериальные свойства [170].

Другой антибактериальный пептид, под названием лактоферрампин (ф. 265–284) был получен из N-концевого домена коровьего LF. По сравнению с лактоферрицином бактерицидная активность лактоферрампина несколько ниже. Было показано, что бактерицидный эффект обоих пептидов коррелирует с их способностью нарушать проницаемость мембран бактерий [159, 178].

Данные, полученные в последние годы, свидетельствуют о том, что LF обладает выраженной противовирусной активностью в отношении широкого спектра оболочечных и безоболочечных ДНК- и РНК-вирусов [179–183]. Лактоферрин ингибирует проникновение вирусов в клетки-мишени хозяина путем прямого прикрепления к вирусным частицам или путем блокирования их клеточных рецепторов [180]. Показано, что LF предотвращает попадание в клетки хозяина вируса простого герпеса [184], папилломавируса человека [185], вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [186] и ротавируса [187]. Для облегчения проникновения в клетки-мишени все эти вирусы обычно используют расположенные на клеточной мембране гепарансульфат протеоглики (HSPGs). Гепарансульфат протеоглики являются «посадочными местами» на клеточной мембране и помогают вирусу установить первичный контакт с клетками-мишенями [179, 184]. Было показано, что LF способен связываться с HSPGs и блокировать проникновение (интернализацию) некоторых вирусов внутрь клеток-мишеней [179, 181, 188].

Лактоферрин и COVID-19. COVID-19 – потенциально тяжёлая острая респираторная инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus 2). При COVID-19 у многих пациентов развивается тяжёлый острый респираторный синдром (SARS), который приводит к отеку легких и легочной недостаточности, а также поражению печени, сердца и почек. Эти симптомы связаны с «цитокиновым штормом» [189], проявляющимся повышением сывороточных уровней интерлейкинов (IL) IL-1b, IL-2, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-17, а также колониестимулирующих факторов гранулоцитов и макрофагов, интерферона, α -фактора некроза опухоли, γ -индуцированного белка, моноцитарного хемоаттрактантного белка, воспалительных белков макрофагов 1-A и 1-B [190].

Вирус SARS-CoV, который вызывает тяжёлый острый респираторный синдром (SARS), известный также как атипичная пневмония 2003 г., связывается с рецептором – ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) – расположенным на поверхности клеток-мишеней [191]. Это интегральный мембранный фермент (экзопептидаза), являющийся хорошо известным рецептором и точкой входа в клетку-мишень для респираторных вирусов. Рецептор ACE2 в изобилии экспонируется на мембране альвеолярных эпителиальных клетках легких человека, энтероцитах тонкой кишки и клетках проксимальных канальцев почек. Установлено, что одним из предварительных мест стыковки SARS-CoV с поверхностью клетки-хозяина являются HSPGs, которые, очевидно, играют важную роль в процессе интернализации вируса [179].

Вирус SARS-CoV-2 также проникает в клетки хозяина через ACE2 [192]. В настоящее время нет подтвержденной информации о том, что SARS-CoV-2 связывается с HSPGs, однако известно, что LF блокирует заражение SARS-CoV путем взаимодействия с HSPGs [179]. Неизвестно, связывается ли LF с ACE2, но он точно связывается с HSPGs [179]. Вопрос о том, проникает ли SARS-CoV-2 в клетки хозяина при участии HSPGs таким же образом, как и SARS-CoV, требует дальнейшего изучения. Предполагаемый механизм блокировки проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетку-мишень представлен на рисунке 3.11.

Несмотря на низкую концентрацию в молочной сыворотке, мультифункциональные свойства делают LF весьма привлекательным объектом для коммерческого использования [150, 193, 194]. В настоящее время, в первую очередь в Японии и Европе, для целей медицинской и пищевой промышленности организовано крупномасштабное выделение и очистка LF из подсырной сыворотки [195, 196].

Полезным технологическим свойством LF является высокая термостабильность (особенно при кислых значениях pH), благодаря чему стандартные режимы пастеризации практически не изменяют его структуру и биологическую активность [197, 198]. Производство LF в промышленных масштабах дало новый импульс исследованиям продуктов его гидролиза. Противовоспалительные и бактерицидные свойства позволяют использовать LF и продукты его частичного гидролиза в качестве компонентов детского питания, в различных пищевых добавках, а также в кормовых смесях для сельскохозяйственных и домашних животных [197]. Антиоксидантные свойства LF открывают перспективы применения этого белка в косметических препаратах [153].

По мнению B.D. Kell и соавторов [159], LF, принимаемый *per os*, полезен для здоровья, что позволяет считать его нутрицевтическим средством. Для применения в качестве нутрицевтика необходимо обеспечить доставку LF к рецепторам, расположенным в щеточной кайме тонкой кишки. Предлагается использовать для этих целей капсулы с энтеросолюбильным (кишечнорастворимым) покрытием, которое позволит высвободить LF после прохождения желудка и предотвратить его разрушение пепсином. Это позволит осуществлять доставку нутрицевтика к LF-специфичным рецепторам тонкого кишечника и его последующий перенос

в системный кровоток [199]. В экспериментальных условиях потребление инкапсулированного кишечнорастворимого LF было примерно в 10 раз выше, чем у не капсулированного LF, введенного в желудок лабораторных животных [200]. В свете этих данных LF в форме капсул с энтеросолюбильной оболочкой можно рассматривать как потенциальное средство для профилактики или терапии заболеваний, вызванных коронавирусами [159].

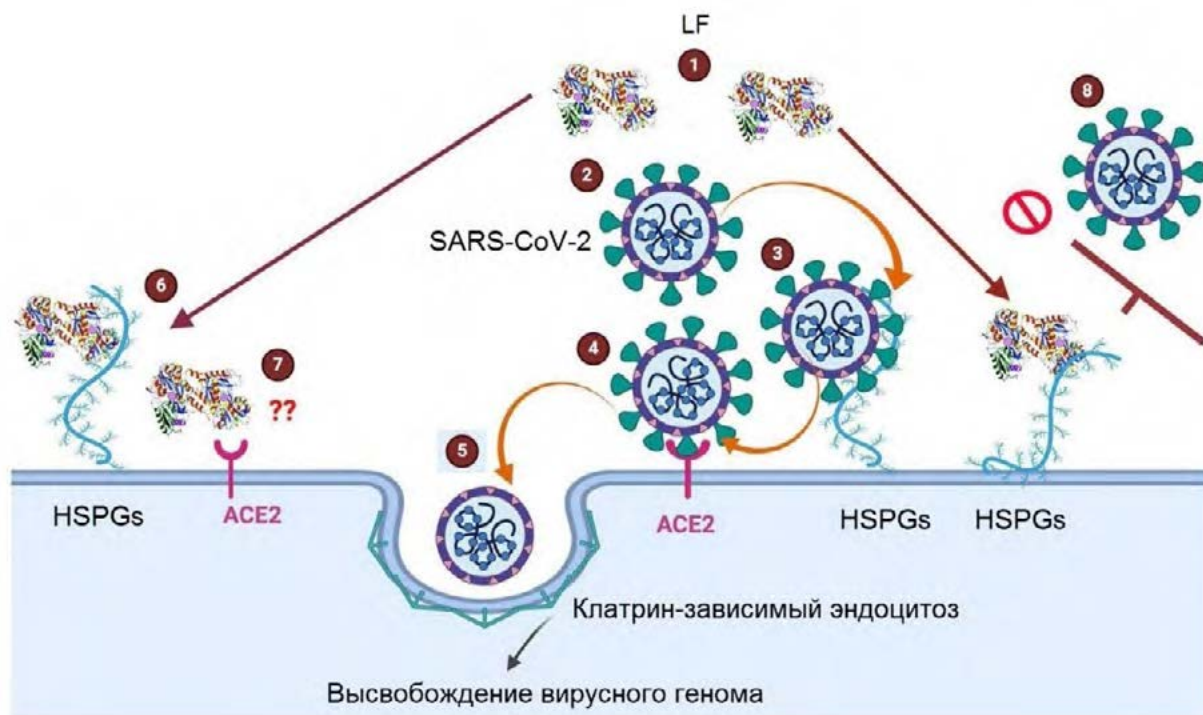


Рис. 3.11. Предполагаемый механизм участия лактоферрина в блокировке проникновения коронавируса SARS-CoV-2 в клетку-мишень (по данным [159]). Условные обозначения: 1 – лактоферрин; 2 – коронавирус SARS-CoV-2; 3 – коронавирус, взаимодействующий с гепарансульфат протеогликанами (HSPGs); 4 – комплекс коронавируса с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2); 5 – проникновение коронавируса внутрь клетки (по механизму клатрин-зависимого эндоцитоза); 6 – доказанная возможность связывания лактоферрина с HSPGs; 7 – предполагаемое связывание лактоферрина с ACE2; 8 – предполагаемая блокировка связывания SARS-CoV-2 с клеткой-мишенью

Не исключено, что LF обладает и протеолитической активностью. Так, в 2004 г. Massucci с соавторами сообщили, что LF коровы катализирует гидролиз синтетических субстратов пептидной природы, проявляя сходную с трипсином специфичность [201]. Значения K_m и k_{cat} составили, соответственно, $50 \mu M$ и $0,03 \text{ сек}^{-1}$. Максимальную трипсиноподобную активность LF проявлял при $pH=7,5$ и $25^\circ C$, при этом наблюдалось его аутокаталитическое расщепление на участках Arg415-Lys416 и Lys440-Lys441 (нумерация пре-LF). Протеолитическая активность LF полностью подавлялась специфическим ингибитором сериновых протеаз – фенилметилсульфонил фторидом (PMSF) и при насыщении ионами железа [201].

3.6. Иммуноглобулины (Ig)

Иммуноглобулины (антитела) представляют собой семейство сывороточных гликопротеинов со сходной структурной организацией, способных специфически взаимодействовать с антигенами или гаптенами. Фракция Ig составляет примерно 1% от общих белков молока или 6% от общего белка сыворотки [1]. При анализе образцов сыворотки или молока методом SDS-PAGE, иммуноглобулины выявляются в виде четких электрофоретических зон (рис. 3.12).

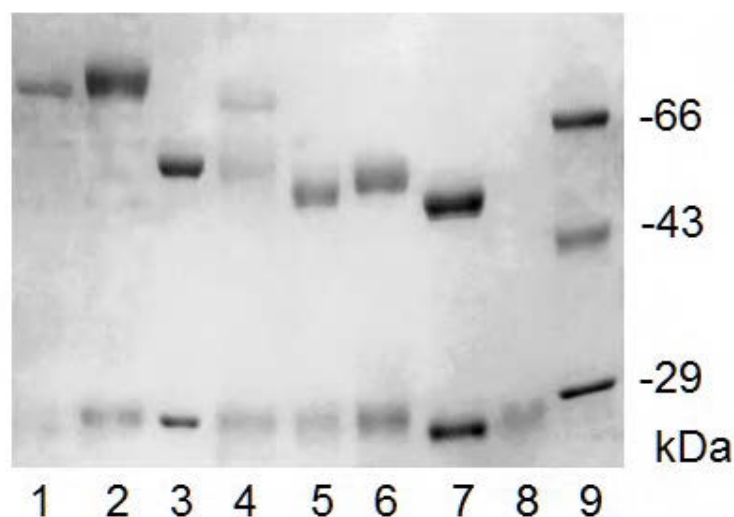


Рис. 3. 12. Фракционирование иммуноглобулинов коровы и человека методом SDS-PAGE (по данным [1]). Условные обозначения: 1 – моноклональный IgM человека; 2 – IgM коровы; 3 – моноклональный IgA человека; 4 – IgA коровы (полипептид наибольшей молекулярной массы соответствует секреторному компоненту); 5 – IgG2 коровы; 6 – IgG1 коровы; 7 – IgG человека; 8 – легкие цепи Ig коровы; 9 – маркеры молекулярных масс (кДа)

Классификация иммуноглобулинов коровьего молока, опубликованная в IV и V Номенклатурах [2,202], основывалась на ранее предложенной классификации белков одомашненных представителей семейства *Bovidae* [203] и принципах, утвержденных ВОЗ для Ig животного происхождения [204]. Аминокислотные последовательности и сравнительный анализ структуры Ig различных видов представлены в работах Национального института здоровья (США) [205] и на сайте The International Immunogenetics Information System® (<http://www.imgt.org>). Информацию о трехмерных структурах иммуноглобулинов, полученную методами рентгеновской кристаллографии или ЯМР-спектроскопии, можно найти в базе данных Protein Data Bank (PDB), размещенной на платформе Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) (<https://www.rcsb.org/structure/1IGT>). Действующие в настоящее время правила классификации иммуноглобулинов человека, предложенные в работе [206], распространяются также и на белки коровьего молока (табл. 3.5).

Таблица 3.5

Классы (изотипы) иммуноглобулинов рода *Bos* (по данным [1])

Первоначальное обозначение	Современное обозначение	Аллотип	Ген
IgG1	IgG1a	$\gamma 1^a$	IGHG1
	IgG1b	$\gamma 1^b$	IGHG1
IgG2a(A1)	IgG2a	$\gamma 2^a$	IGHG2
IgG2a(A2)	IgG2b	$\gamma 2^b$	IGHG2
IgG2b/IgG3	IgG3a	$\gamma 3^a$	IGHG3
	IgG3b	$\gamma 3^b$	IGHG3
IgA	IgA	α	IGHA
IgM	IgM	μ	IGHM
IgE	IgE	ϵ	IGHE
IgD	IgD	δ	IGHD

Иммуноглобулины молозива и молока являются основными факторами, обеспечивающими эффективную иммунную защиту новорожденного от воздействия патогенов и дру-

гих источников антигенной стимуляции, возникающих при взаимодействии с окружающей средой. Концентрация антител в секретах молочной железы зависит от структуры плаценты и механизма передачи факторов пассивного иммунитета от матери плоду (в случае пренатального трансплацентарного переноса Ig) или новорожденному (постнатальный перенос Ig с молозивом и молоком) [207–210]. Иммуноглобулины молозива и молока являются биоконпонентами, которые связывают мать и ее потомство. Набор специфичных At, содержащихся в секретах молочной железы, отражает историю иммунологической реакции кормящего животного на окружающую среду, которая передается потомству для формирования иммунной защиты.

У млекопитающих выделяют пять классов (или пять изотипов) антител (табл. 3.5) – IgA, IgG, IgD, IgE и IgM [210], которые отличаются друг от друга функциями и особенностями структуры.

В целом, структура иммуноглобулинов человека и животных, относящихся к роду *Bos*, совпадает [211–213]. Молекула мономерного Ig напоминает по форме букву «Y» и состоит из четырех полипептидных цепей, соединенных внутримолекулярными, а в случае полимерной структуры – межмолекулярными дисульфидными связями (рис. 3.13). Мономерная форма Ig формируется двумя идентичными тяжелыми (H) цепями, с молекулярными массами от 55 до 76 кДа (в зависимости от класса Ig) и двумя идентичными легкими (L) цепями с молекулярными массами (MM) от 23 до 27 кДа [213]. Для каждого класса Ig характерен определенный тип тяжелых цепей: IgA – альфа (α), IgG – гамма (γ), IgD – дельта (δ), IgE – эпсилон (ϵ), IgM – мю (μ) (табл. 3.5). В аналитических целях для разделения тяжелых и легких цепей и определения их MM обычно используется метод SDS-PAGE.

Тяжелые цепи иммуноглобулинов включают в себя константный (C) участок, состоящий из трех или четырех доменов (примерно по 110 аминокислотных остатков) и N-терминальный переменный (V) участок, состоящий из одного домена. Легкие цепи могут быть лямбда (λ)- или к-типа; каждая состоит из одного C-терминального домена и одного N-терминального переменного (V) домена. V-домены тяжелых и легких цепей взаимодействуют между собой и образуют антигенсвязывающий сайт. Домены Ig содержат характерный структурный мотив, представленный двумя β -слоями, которые стабилизируются дисульфидными связями и электростатическими взаимодействиями. Домены взаимодействуют друг с другом посредством гидрофобных взаимодействий. N-концы всех цепей участвуют в распознавании антигена. Поскольку одна молекула Ig несет по две H- и L-цепи, иммуноглобулин в мономерной форме – бивалентен [212].

При ограниченном протеолизе Ig получают несколько типов фрагментов в зависимости от положения гидролизуемой пептидной связи. Наиболее часто для протеолитического расщепления иммуноглобулинов используют пепсин и папаин. В первую очередь гидролизу подвергаются так называемые шарнирные (hinge) участки между первым (C_H1) и вторым (C_H2) константным доменом H-цепей, тогда как β -складчатые структуры более устойчивы к действию протеаз.

В результате обработки IgG папаином образуются два моновалентных антигенсвязывающих фрагмента (~50 кДа) – Fab (от англ. F – *fragment*, ab – *antigen binding*) и один (~50 кДа) фрагмент, не способный к связыванию антигена, но обладающий другими биологически важными функциями и получивший название Fc (от англ. *crystallizable* – кристаллизуемый). В случае инкубации IgG с пепсином продуктами реакции являются один дивалентный F(ab)'2 фрагмент (~120 кДа) и один Fc' фрагмент (~30 кДа). Иммуноглобулины классов M, E и A наиболее устойчивы к воздействию протеаз [215].

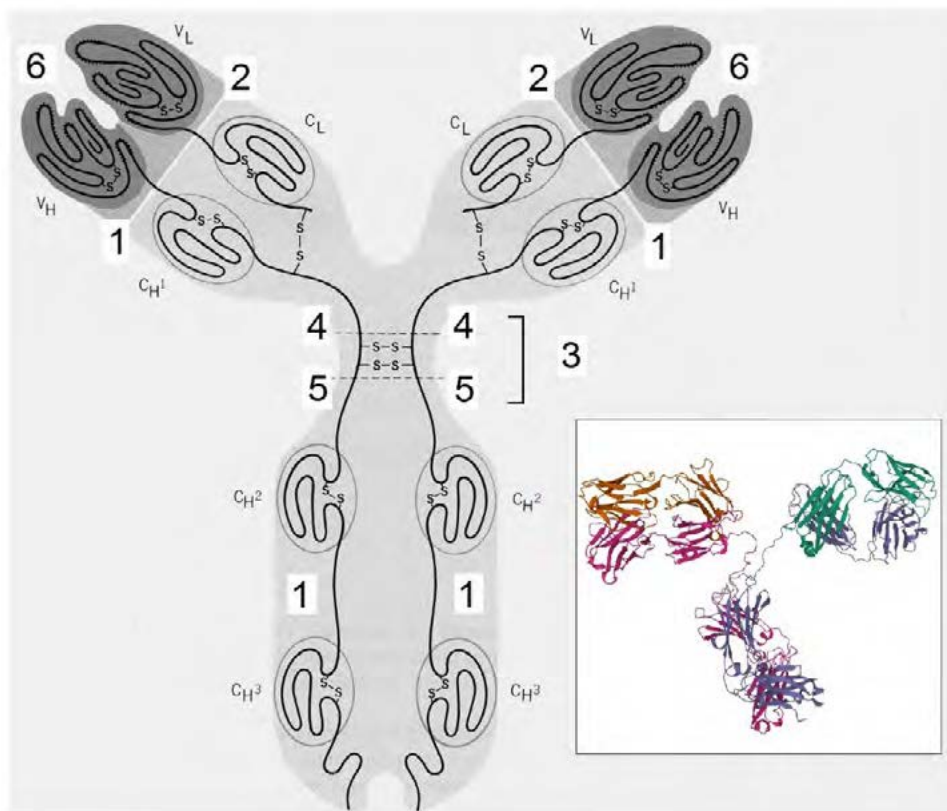


Рис. 3.13. Структура молекулы иммуноглобулина. Условные обозначения: 1 – тяжелые (H) цепи; 2 – легкие (L) цепи; 3 – шарнирный участок («талия»); 4 – участки гидролиза тяжелых цепей папаином; 5 – участки гидролиза тяжелых цепей пепсином; 6 – участки связывания антигена; CL – константные домены легких цепей; VL – переменные домены легких цепей; CH1-3 – константные домены тяжелых цепей; VH – переменные домены тяжелых цепей. В рамке представлена модель трехмерной структуры иммуноглобулина G2a с разрешением 3,5 Å, полученная методом рентгеновской кристаллографии (по данным [214])

Парные переменные домены H- и L-цепей детерминируют антигенсвязывающую специфичность, тогда как константные регионы определяют изотип (класс) иммуноглобулинов – IgM, IgG и т.д., а также различные биологические функции, такие как перенос Ig через плаценту, связывание с комплементом и другие [213]. Внутрипопуляционные генетические варианты Ig называются аллотипами (аналогия – группы крови человека); аллотипические детерминанты располагаются обычно в константных участках H- и L-цепей.

N-терминальные переменные домены кодируются тремя (V, D, J) генными сегментами для H-цепей и двумя (V, J) генными сегментами для L-цепей (вне зависимости от типа цепи – κ- или λ-). Полный ген переменного участка образуется путем рекомбинации генных сегментов. Сегменты являются мультигенными структурами, так, например, у человека имеется 95 V_H, 30 D_H и 6 J_H сегментов. В процессе дифференцировки В-клеток происходит физическая перестановка сегментов таким образом, что на каждую клетку приходится по одному индивидуальному V, D, J и V, J набору. Экспрессия таких индивидуальных наборов генных сегментов, коррелирует со специфичностью антител, синтезируемых данной В-клеткой.

Антитела, несущие индивидуальные наборы V, D, J и V, J сегментов, называются идиотипами. Поскольку мультигенные структуры (V, D, J сегменты) кодируют переменные области тяжелых и легких цепей, ответственных за антигенную специфичность, рекомбинация мультигенных генетических сегментов порождает огромное разнообразие иммуноглобулинов. Число возможных вариантов антител за счет рекомбинации сегментов достигает 107. Следует также учитывать вариацию нуклеотидных последовательностей в местах соединения

(на стыках) генных сегментов, что приводит к смещению рамки считывания нуклеотидной последовательности и также увеличивает разнообразие антител. Кроме того, мультигенные структуры являются мишенью соматических гипермутаций, частота которых несоизмеримо выше частоты мутаций в соматических клетках. Все это приводит к тому, что организм млекопитающих синтезирует огромный репертуар антител – до 10¹² видов – с различной антигенной специфичностью [1, 216].

Как уже было сказано выше, полипептидные цепи молекулы Ig уложены с образованием компактных доменов, имеющих гомологичные последовательности. Каждый домен, включая переменные участки, имеет характерную β -складчатую структуру. Антигенсвязывающий фрагмент (Fab) Ig состоит из четырех расположенных в виде тетраэдра глобулярных субъединиц V_L , V_H , C_L и C_H1 , очень сходных по пространственной структуре. Общая структурная особенность четырех доменов – наличие двух широких антипараллельных β -складок, между которыми расположены плотно упакованные R-группы гидрофобных аминокислот. Такой повторяющийся элемент структуры назван «иммуноглобулиновой складкой» [1].

Иммуноглобулины классов G, E, D существуют в виде мономеров, тогда как IgM и IgA могут образовывать пентамерные, тетрамерные и димерные формы [210] при помощи «объединяющей» J (joining) цепи, – небольшого полипептида с молекулярной массой около 15 кДа. (рис. 3.14).

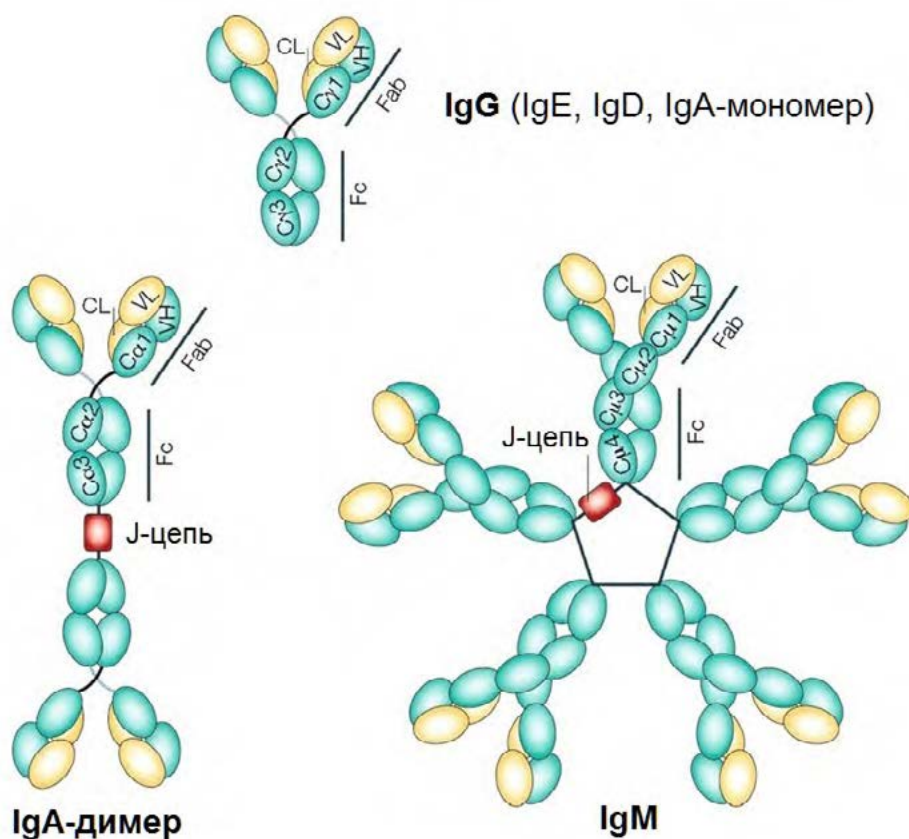


Рис. 3. 14. Структуры мономерных (IgG, IgE, IgD), димерных (IgA) и пентамерных (IgM) иммуноглобулинов. Иммуноглобулины представляют собой Y-образные гетеромерные комплексы, состоящие из двух легких цепей (обозначены желтым цветом) и двух тяжелых (обозначены зеленым цветом) цепей. Красным цветом отмечены J-цепи IgA и IgM (по данным [210])

Цепь J играет важную роль в сборке полимерных Ig и их селективном транспорте через слой эпителиальных клеток. Объединяющий полипептид (J-цепь) ковалентно связывается

с С-терминальными участками μ - и α -цепей за счет дисульфидных связей [217]. В ряду высших позвоночных (человек, корова, коза, овца, свинья, лошадь, кошка, собака, морская свинка, крыса, мышь, курица, ёж) J-цепь демонстрирует высокую эволюционную консервативность и гомологию первичной структуры [217, 218]. Из молока и молозива J-цепь может быть выделена как в свободной форме, так и в составе полимерных иммуноглобулинов [219, 220].

Имуноглобулин А, поступающий в молоко и молозиво, синтезируется лимфоидными клетками, рассеянными в форме скоплений под цилиндрическим эпителием. Способность проникать в секреты молочной железы IgA приобретает после присоединения так называемого секреторного компонента (SC), который синтезируется клетками серозного эпителия. Секреторный компонент встречается только в составе секреторного IgA. Секреторный IgA представляет собой димер, в котором IgA-мономеров «состыкованы» конец в конец своими Fc-участками. Последние «обвиты» секреторным компонентом. Молекулярная масса всего комплекса составляет 380–390 кДа [221]. Секреторный компонент обнаружен в молоке в свободной форме и в составе димеров IgA [2], кроме того, этот белок входит в состав полимерного рецептора иммуноглобулинов [222].

С-терминальные домены каждого класса (изотипа) Ig транскрибируются в двух вариантах. Первый содержит информацию о коротком участке последовательности (мембранный экзон, или «якорь»), способном связываться с мембраной В-лимфоцита. Нуклеотидная последовательность второго варианта кодирует еще более короткий участок, так называемый секреторный экзон. Впоследствии молекулы первого варианта экспрессируются как рецепторы клеточной мембраны В-лимфоцитов, а второго – как секретируемые В-клетками антитела [1].

Многие белки, имеющие отношение к иммунной системе, кодируются генами, относящимися к суперсемейству Ig:

- а) рецепторы В-клеток;
- б) белки главного комплекса гистосовместимости;
- в) рецепторы Т-клеток;
- г) большинство рецепторов Fc фрагментов;
- д) некоторые белки адгезии,
- е) некоторые рецепторы цитокинов;
- ж) β_2 -микроглобулин (полипептид, связанный с белками главного комплекса гистосовместимости).

Последний впервые был выделен из молока и первоначально назывался лактолин [2, 223, 224].

Коровий иммуноглобулин G состоит из трех подклассов – G1, G2 и G3, причем последний является минорным и обнаруживается в молоке и молозиве в следовых количествах [225]. Относительное содержание IgG1 и IgG2 в сыворотке крови примерно равное, тогда как в молозиве и зрелом молоке отношение IgG1 : IgG2 составляет, соответственно, 15–20 : 1 и 4–7 : 1 [226]. При воспалении (например, при мастите) наблюдается усиленная транссудация в молоко всех сывороточных белков, в том числе и IgG2 [227–229].

В секретах молочной железы жвачных животных идентифицированы все пять классов иммуноглобулинов (G, A, E, M, D) [212–215, 217–220, 222–227]. Содержание основных классов иммуноглобулинов (прежде всего G, A, M) в молоке и молозиве представлено в таблице 3.6.

Механизмы синтеза и секреции различных изотипов Ig, а также структурные различия иммуноглобулинов сыворотки крови, молока и молозива были предметом многочисленных исследований [211, 227, 231–233]. В результате удалось установить, что IgG, в частности IgG1, преобладают как в молоке, так и в молозиве. Наличие в этих секретах преимущественно Ig од-

ного подкласса [231] предполагает существование IgG1-специфичного механизма секреции, однако досконально этот механизм не выяснен [1]. В последние годы на роль предполагаемого переносчика коровьего IgG1 через концевой слой эпителиальных клеток молочной железы выдвигается специфический рецептор Fc фрагмента [234].

Таблица 3.6

Содержание иммуноглобулинов в секретах молочной железы и сыворотке крови некоторых видов млекопитающих (по данным [1, 225, 230])

Вид	Классы Ig	Концентрация, мг/мл		
		Молозиво	Зрелое молоко	Сыворотка крови
Человек	IgG (общий)	0,85 ± 0,21	0,04	12,4
	IgA	86,8 ± 13,6	1,0	2,91
	IgM	2,64 ± 0,92	0,1	1,17
Корова	IgG1	46,4	0,58	11,2
	IgG2	2,87	0,05	9,2
	IgG3	Следы	Следы	Нет данных
	IgA	5,36	0,1	0,37
	IgM	6,77	0,09	3,1
	IgE	Следы	Следы	Нет данных
	IgD	Следы	Следы	Нет данных
Овца	IgG1	94,0→162,0	1,0	18,1
	IgG2	2,0	0,1	7,9
	IgA	3,5	0,2	0,2
	IgM	1,3→21,2	0,2	3,6
Свинья	IgG (общий)	61,8	1,6	24,0
	IgA	11,3	4,1	2,0
	IgM	3,8	1,5	2,5
Кролик	IgG (общий)	1,5	0,1	5,0→10
	IgA	~30,0	~5,0	0,01
	IgM	0,01	Следы	0,01

Свойства иммуноглобулинов молока и молозива. После ультрацентрифугирования коровьего молока, содержащего радиоактивно меченые иммуноглобулины >90, 85, 80 и 70% IgG1, IgG2, IgA и IgM соответственно, обнаруживаются в сывороточной фракции. Жировая фракция (сливки) и фракция казеиновых мицелл также содержит примеси Ig, среди которых преобладают IgM, IgA и IgG2 [210, 235].

При высоких концентрациях, например, таких как в коровьем молозиве, Ig достаточно стабильны при охлаждении и замораживании. Это имеет практическое значение при хранении молозива, используемого для кормления новорожденных телят [210].

Иммуноглобулины являются термолабильными белками [236–238], что следует учитывать при пастеризации молозива или молока, используемого в лечебных целях [239–242]. Тепловая денатурация приводит к конформационным изменениям [243], которые в большей степени затрагивают антигенсвязывающие области Ig [244, 245]. Содержащийся в коровьем молоке IgM является наименее термостабильным, по сравнению с Ig классов G и A [246]. При стандартных режимах термообработки в пастеризованном молоке сохраняется 25–75% от ис-

ходной концентрации IgG. После пастеризации молока при сверхвысокой температуре в нем обнаруживаются лишь следовые количества IgG [247].

В целях сохранения иммунных свойств молока было разработано несколько альтернативных методов его стерилизации, которые позволяют избежать негативного воздействия высоких температур на Ig. Эти методы рассмотрены в обзоре W.L. Hurley и P.K. Theil [207].

Изолированный IgG коровьего молока, при pH 6-7 стабилен в течение нескольких часов при 37 °C, однако быстро инактивируется при $\text{pH} \leq 3$ и при $\text{pH} \geq 10$ [236, 248]. Повышение температуры усиливает негативное влияние pH на стабильность IgG [245, 249].

Получение коровьего молока с повышенным содержанием иммуноглобулинов. Иммуноглобулины молока выполняют несколько функций: агглютинацию бактериальных клеток и антигенов, связывание белков системы комплемента, предотвращение адгезии патогенных микроорганизмов к клеткам эндотелия, ингибирование метаболизма бактерий путем блокирования секретируемых бактериальных ферментов, нейтрализацию токсинов и вирусов [250-251].

Известно, что вакцинирование коров приводит к повышению концентрации определенных классов иммуноглобулинов в молоке. Молоко, получаемое от коров, иммунизированных различными бактериальными и вирусными антигенами («специфическое иммунное молоко»), обладает повышенными защитными свойствами и препятствует развитию определенных инфекционных заболеваний [250-252]. В перспективе иммунное молоко рассматривается как натуральный и безопасный компонент новых функциональных продуктов питания [252-254].

Для получения иммунного молока использовали вакцины против таких кишечных патогенов, как *Helicobacter felis* и *Escherichia coli* [255-256]. До недавнего времени считалось, что наиболее эффективным способом увеличения концентрации иммуноглобулинов в молоке являются различные варианты регулярного вакцинирования лактирующих животных [253].

В этой связи сообщалось о разработке имплантатов, обеспечивающих дозированное высвобождение антигенов (ДВА), которые стимулировали продукцию и накопление в молоке специфических антител [257]. Используемые в устройствах ДВА иммуностимулирующие комплексы (ИКОМ) могут включать в себя адъюванты и несколько антигенов, что обеспечивает более быстрый иммунный ответ по сравнению с традиционными методами вакцинирования [258, 259]. Устройства ДВА содержат антиген, покрытый оболочкой (различной толщины) из биосовместимой и биodeградируемой полимолочной кислоты (полилактид), скорость растворения которой контролирует время высвобождения антигена. За счет медленного высвобождения антигена одно устройство ДВА заменяет несколько вакцинаций.

G.L. Liu и соавторы использовали вакцину на основе ИКОМ, состоящего из адъюванта Quil A и аффинно очищенной липазы типа XIII, выделенной из бактерий рода *Pseudomonas*, покрытого оболочкой из полилактида кислоты. Авторы исследования сделали вывод о том, что устройства ДВА способствуют эффективному увеличению концентрации специфических антител в крови и молоке. Кроме того, соотношение титров специфических Ig в сыворотке крови и молочной сыворотке, позволяет предположить, что применение устройств ДВА активизирует механизмы ускоренного переноса IgG из крови в молоко [257].

Таким образом, инжиниринг иммуногенных свойств молочной железы и, в частности, исследования, направленные на стимуляцию секреции Ig в молоко коровы, являются одним из этапов на пути создания новых гипериммунных молочных продуктов [257, 260].

3.7. Остеопонтин (OPN)

Наряду с высоким содержанием питательных веществ, витаминов и минеральных солей, молоко содержит белки, играющие важную роль в обеспечении иммунного статуса новорожденных. В раннем постнатальном периоде, пока иммунная система новорожденного еще не сформирована, вскармливание молоком обеспечивает эффективную защиту от инфекций [261, 262]. В последние годы активизировались исследования, направленные на выделение и очистку индивидуальных защитных белков молока (главным образом, лактоферрина и продуктов его частичной протеолитической деградации) и включение их в состав детских питательных смесей [171–175, 263]. Традиционно, к основным защитным компонентам молока относят достаточно хорошо изученные белки: лактоферрин, лактопероксидазу, лизоцим и иммуноглобулины [264, 265]. Наряду с ними в молоке присутствует группа слабо охарактеризованных протеинов, которые потенциально могут играть важную роль в поддержании иммунного статуса новорожденных. Одним из таких белков является остеопонтин [8].

Остеопонтин (OPN) не включен в официальную (VI) номенклатуру белков молока, опубликованную в 2004 г. [1]. Возможно, это объясняется тем, что свойства остеопонтина стали объектом интенсивного изучения лишь в последнее время [8, 266–283]. Но в связи с особенностями биологических функций, связанных прежде всего с иммуномодуляторными свойствами остеопонтина и открывающейся перспективой его применения в продуктах детского питания нового поколения, автор решил включить его в данный обзор (что-то вроде специального приглашения – «вайлд кард» – на турнирах «Большого шлема»).

Остеопонтин представляет собой О-гликозилированный фосфопроtein, который синтезируется в различных типах тканей и клеток. Первоначально OPN был идентифицирован как белок костного матрикса, а в последствие – как цитокин (Eta-1), продуцируемый активированными Т-клетками, трансформированными клеточными линиями [266, 277, 284, 285]. Рецепторами OPN являются интегрины [286–288] и некоторые варианты белка CD44 [289–290], которые опосредуют клеточную миграцию и адгезию. Способность OPN взаимодействовать с множеством поверхностных клеточных рецепторов делает его активным участником многих физиологических и патологических процессов, включая заживление ран, регенерацию костной ткани, онкогенез, воспаление, ишемию и иммунные реакции [277].

Аминокислотная последовательность остеопонтина *B. taurus*, а также дополнительная информация о структуре и биохимических свойствах этого белка размещены в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/P31096>). Идентификационный номер коровьего остеопонтина – UniProtKB – P31096 (OSTP_BOVIN) [291].

Остеопонтин синтезируется в виде предшественника – pre-OPN – который содержит 278 а.к. остатков, включая сигнальный пептид, состоящий из 16 аминокислот. Зрелый OPN состоит из одной полипептидной цепи и 262 аминокислотных остатков. Вычисленная молекулярная масса составляет 30,904 кДа [291]. Представленная на рисунке 3.15 первичная структура пре-OPN B была определена методом секвенирования кДНК [292].

Остеопонтин принимает участие в процессах жизнеобеспечения клеток, формирования костной ткани, регуляция иммунного ответа, способствует подавлению кальцификации. Этот белок обнаружен во многих тканях и тканевых жидкостях, включая кровь, мочу, желчь и молоко [266]. Остеопонтин – кислый ($pI < 7,0$) высокофосфорилированный гликопротеин, содержащий интегрин-связывающую последовательность (Arg152-Gly153-Asp154). Остеопонтин из коровьего молока несет 33 фосфосериновых и три фосфотреониновых остатка [291]. Сайты фосфорилирования OPN человека и коровы сгруппированы в кластеры, содержащие от трех до пяти аминокислотных остатков, и локализованы в местах связывания казеинкиназы (и ка-

зеинкиназы II) из молочной железы [267, 268]. При этом механизмы фосфорилирования OPN, казеинов и протеозо-пептона PP3, по-видимому, идентичны [269]. В молоке белок обнаруживается в виде смеси интактных молекул и частично деградированных N- или C-терминальных фрагментов [270].

10	20	30	40	50
MRIAVICFCL	LGIASALPVK	PTSSGSSSEK	QLNNKYPDAV	ATWLKPDPSQ
60	70	80	90	100
KQTFLAPQNS	VSSEETDDNK	QNTLPSSKNE	SPEQTDDLDD	DDDNSQDVNS
110	120	130	140	150
NDSDDAETTD	DPDHSDESHH	SDESDEVDFP	TDIPTIAVFT	PFIPTESAND
160	170	180	190	200
GRGDSVAYGL	KSRSKKFRRS	NVQSPDATEE	DFTSHIESSE	MHDAPKKTSSQ
210	220	230	240	250
LTDHSEKETNS	SELSKELTPK	AKDKNKHNSL	IESQENSKLS	QEFHSLDKL
260	270			
DLDHKSSEEDK	HLKIRISHHEL	DSASSEVN		

Рис. 3.15. Первичная структура **пре-остеопонтина** [291, 292]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид (Met1-Ala16), желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого OPN (Leu17-Asn278). Лиловым цветом отмечены фосфорилированные остатки серина (Ser). Бирюзовым цветом обозначены фосфорилированные остатки треонина (Thr). О-гликозилированные остатки треонина (Thr) отмечены серым цветом. Интегрин-связывающая последовательность (152-154) выделена жирным шрифтом с подчеркиванием

Однозначного ответа на вопрос о биологической роли остеопонтина в молоке коровы нет. Вместе с тем о некоторых функциях этого белка можно строить обоснованные предположения. Известно, например, что OPN связан с процессами развития и дифференцировки клеток молочной железы [271]. Уже на ранних стадиях лактации в ткани молочной железы наблюдается усиленная экспрессия остеопонтина [272]. Имеются данные о том, что при участии электростатических и аффинных взаимодействий OPN способен избирательно связываться с такими белками коровьего молока, как лактоферрин, лактопероксидаза и IgM [273]. Это позволяет предполагать, что OPN играет роль переносчика иммуноглобулинов и антибактериальных белков к месту их действия. Кроме того, за счет сильных анионных свойств (обусловленных высокой степенью фосфорилирования) остеопонтин образует растворимые комплексы с ионами кальция и, таким образом, ингибирует их кристаллизацию и преципитацию в протоках молочных желез [274].

R. Ohri и соавторы в модельных опытах *in vivo* показали, что при введении OPN-дефицитным мышам экзогенного OPN наблюдается снижение степени кальцификации ткани молочной железы [275]. Установлено, что OPN подавляет рост и агрегацию кристаллов оксалата кальция в мочевыводящих путях и препятствует развитию мочекаменной болезни почек [276].

По-видимому, OPN, так же, как и казеины, относится к белкам с нативно-неупорядоченной (реоморфной структурой), особенности которой мы обсуждали в главе 1. По данным протонного ЯМР рекомбинантный OPN в растворе ведет себя как полностью неструктурированный белок со множеством подвижных конформаций. Вероятно, реоморфная структура позволяет этому относительно небольшому гликопротеину эффективно реализовывать свою мультифункциональность и взаимодействовать с различными лигандами – от клеточных рецепторов до минеральных солей [293, 294]. Модель предполагаемой трехмерной структуры OPN представлена на рисунке 3.16. Видно, что сервис Alpha Fold Monomer с доверительной вероятностью предсказывает только спиральную структуру сигнального пептида (пре-фрагмента).

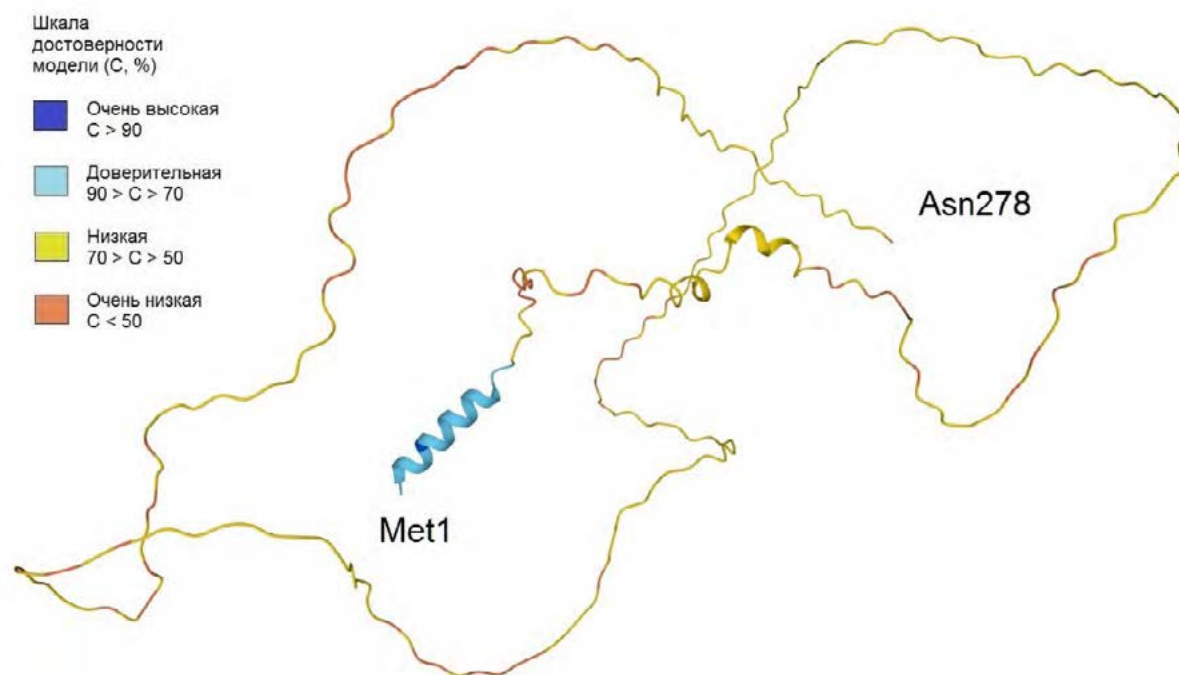


Рис. 3.16. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-остеопонтина, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P31096>) [41, 42]

Остеопонтин играет ключевую роль в развитии и поддержании определенных типов иммунного ответа, поскольку влияет на функции различных видов иммунокомпетентных клеток, таких как макрофаги, дендроциты и Т-клетки [277]. Как известно, Т-клетки способны дифференцироваться в две основные субпопуляции: Т-хелперы 1 (ТХ-1) и Т-хелперы 2 (ТХ-2), которые различаются тем, что при стимуляции антигеном секретируют различные типы цитокинов [278]. Иммунный ответ, опосредуемый ТХ-1, направлен против вирусов и некоторых типов бактерий. Установлено, что OPN является важнейшим ранним регулятором иммунного ответа, который усиливает активацию ТХ-1 [279]. Остеопонтин повышает устойчивость к различным типам инфекций [280], выступает в роли опсонина (белка, связывающегося с антигенами клеточной стенки бактерий, что способствует их фагоцитозу) и стимулирует фагоцитарную активность лимфоцитов [281].

Установлено, что в культуре человеческих мононуклеарных клеток, изолированных из желудочно-кишечного тракта и являющихся первой линией иммунитета в слизистой оболочке кишечника, OPN индуцирует продукцию ТХ-1 цитокина IL-12 [8]. Это позволяет предполагать, что компоненты иммунной системы в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) могут активизироваться экзогенным остеопонтином. Такое предположение подтверждается данными о том, что OPN устойчив к действию протеолитических ферментов желудочного сока новорожденных [282]. Следовательно, по крайней мере часть экзогенного OPN способна преодолевать желудок новорожденного и достигать иммунокомпетентных клеток слизистой оболочки кишечника. Кроме того, в кишечном тракте OPN может опсонизировать патогенные микроорганизмы с их последующей элиминацией фагоцитами [281].

Концентрация остеопонтина в молоке человека составляет ~138 мг/л, что соответствует ~2,1% (вес/вес) от общего белка. Это намного превышает содержание OPN в коровьем молоке (~ 18 мг/л) и в детских питательных смесях (в среднем, около 9 мг/л) [8].

Несмотря на постоянное совершенствование детских смесей, имитирующих состав грудного молока, показатели роста, здоровья и развития нервной системы детей, находящихся

на искусственном вскармливании, отличаются от показателей детей, находящихся на грудном вскармливании [295]. Причиной тому могут быть различия в количественном и качественном содержании биологически активных соединений, таких как белки, в грудном молоке и детских смесях [296–298]. Результаты исследований показывают, что введение коровьего ОРН в питательные смеси повышает иммунный статус [298], улучшает развитие кишечника [299], оказывает благотворное влияние на рост и здоровье мозга новорожденных млекопитающих, включая человека [283].

Таким образом, исследование физико- и биохимических свойств ОРН, наряду с разработкой методов его промышленного получения, открывает перспективу обогащения детских питательных смесей коровьим остеопонтином и обеспечения новорожденных дополнительным фактором иммунной защиты.

3.8. Минорные сывороточные белки

Результаты исследования белкового состава молока с помощью высокочувствительных методов двумерного электрофореза в сочетании с масс-спектрометрией, продемонстрировали, что протеом молока гораздо сложнее, чем считалось ранее (рис. 3.17). Кроме казеинов и основных сывороточных белков в молоке присутствует множество других протеинов.

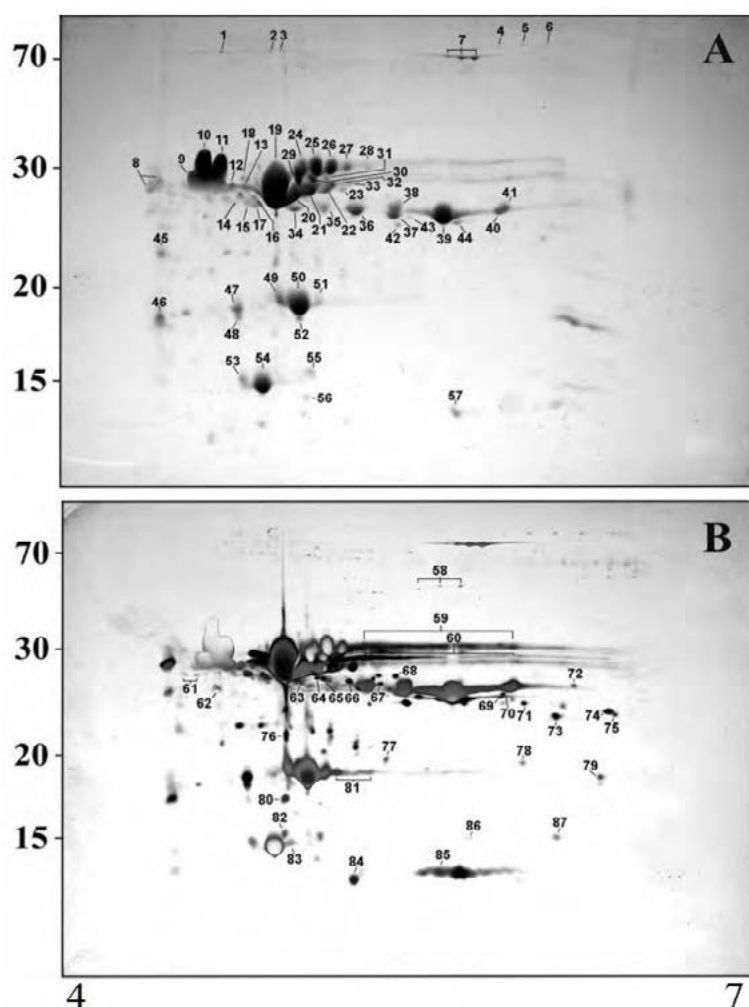


Рис. 3. 17. Двумерный электрофорез белков обезжиренного молока. В первом направлении белки разделяли методом ИЭФ в диапазоне рН 4-7, во втором направлении – методом SDS-PAGE. На оси Х указан диапазон рН, на оси Y – молекулярные массы в кДа. Белки визуализировали окрашиванием СВВ G250 (А) или серебром (В). Пронумерованы пятна идентифицированных белков [302]

Большинство идентифицированных минорных полипептидных компонентов молока связано с защитными и метаболическими функциями [300–305]. В то же время физиологическая роль множества белков, содержащихся в молоке в низких (или очень низких) концентрациях, нуждается во всестороннем исследовании и уточнении.

Минорные белки коровьего молока оказывают влияние не только на развитие, формирование иммунной системы и защиту новорожденного теленка от патогенов, но и на физиологическую регуляцию лактации. Кроме белков, которые синтезируются и секретируются клетками молочной железы, многие протеины и пептиды, попадают в молоко из материнского кровотока; по всей видимости, эти молекулы не являются его случайными компонентами и обеспечивают выполнение определенных функций.

Данный раздел не претендует на исчерпывающую характеристику минорных белковых компонентов молока. Его задача состоит в том, чтобы дать общее представление о разнообразии молочных белков и сформировать у читателя понимание того, что по мере развития технологий идентификации белков в молоке будет найдено и охарактеризовано множество новых минорных протеинов и полипептидов, вызывающих биологические реакции, как у новорожденного, так и у его матери.

3.8.1. Ангиогенины (ANG)

Ангиогенины представляют собой небольшую группу мономерных белков из суперсемейства панкреатических рибонуклеаз с ММ около 14 кДа. Семейство состоит из протеинов со сходными структурными элементами и каталитическими свойствами, которые проявляют различный уровень ферментативной активности.

В коровьем молоке идентифицировано несколько вариантов ангиогенина: первоначально были обнаружены два гомолога ангиогенина человека [306], а позднее – еще два аналогичных белка. Один из них имеет ММ 15 кДа и называется ангиогенин 1 (ANG-1), другой – с ММ 17 кДа, – назван лактогенином или ангиогенином 2 (ANG-2) [307].

Гомология а.к. последовательности ANG-1и ANG-2 составляет 57%. Лактогенин (ANG-2) отличается от ANG-1 наличием единственного сайта гликозилирования, что приводит к снижению его рибонуклеазной активности. Способность ANG стимулировать развитие сосудистой сети (ангиогенная активность) была продемонстрирована на хорионаллантоисной мембране цыпленка, роговице и мениске коленного сустава кролика [134].

Связь между рибонуклеазной и ангиогенной способностью этих белков была установлена с использованием метода сайт-направленного мутагенеза каталитического домена мышино-го ангиогенина 4, в результате чего удалось показать, что ферментативная активность важна для ангиогенной функции [308].

Вне зависимости от его РНК-азной активности ANG инициирует активность синтазы оксида азота (NOS) в эндотелии пупочной вены человека и эндотелиальных клетках, полученных из эмбриональных стволовых клеток [309]. Модификация ангиогенином повышает устойчивость мезенхимальных стволовых клеток к гипоксии *in vitro* и улучшает их жизнеспособность при инфаркте миокарда. Это помогает сохранить сократительную функцию сердца в процессе восстановительной терапии [310]. Таким образом, ANG способны изменять функции сосудов различными способами.

Не исключено, что ANG способны оказывать воздействие на функции нервной системы, поскольку ключевые мутации этого белка коррелируют с развитием семейных и спорадических форм бокового амиотрофического склероза, смертельного нейродегенеративного заболевания, вызывающего избирательное разрушение двигательных нейронов [311].

Показано, что ANG коровьего молока ингибирует резорбцию (деградацию) костной ткани путем прямого воздействия на остеокласты [312].

Ангиогенин коровьего молока также индуцирует выработку цитокинов IL-1b, IL-6 и TNF-а в лейкоцитах человека [313] и, следовательно, играет роль одного из факторов иммунологической защиты.

Структура и свойства ANG более подробно рассматриваются в главе 4 «Эндогенные ферменты молока».

3.8.2. Гепарин-аффинный регуляторный пептид (HARP)

Гепарин-аффинный регуляторный пептид (HARP) считается фактором роста и обнаруживается как в молозиве, так и в молоке. Полипептидная цепь HARP состоит из 136 аминокислот, ММ составляет 18 кДа. Как следует из названия, белок демонстрирует высокое сродство к гликозаминогликану гепарину, который обладает антикоагулянтными свойствами [134].

Первоначально HARP был обнаружен в головном мозге и идентифицирован как белок, участвующий в регуляции роста нейритов (аксонов) [314]. В дальнейшем было установлено, что HARP экспрессируется также в миокарде, матке, хрящах, костях и в молочной железе. Во внеклеточном матриксе многих тканей HARP ассоциирован с гликозаминогликанами и влияет на взаимодействие эпителия и мезенхимы, а также на миграцию нейронов в процессе нейрогенеза.

Концентрация HARP в молозиве, примерно в три раза выше, чем в молоке [134, 315]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* интактный HARP и его фрагменты (HARP (ф. 1-21) и HARP (ф. 121-139)) демонстрируют способность трансформировать фенотип клеточных линий, стимулировать репликацию клеток, хемотаксис и ангиогенез [134, 316].

3.8.3 Кининоген

Кининогены представляют собой полифункциональные многодоменные гликопротеины, родственные цистатинам (семейство белков-ингибиторов цистеиновых протеиназ) [317]. Из коровьего молока выделены две формы кининогена: высокомолекулярная (ММ 68 кДа) и низкомолекулярная (ММ 16-17 кДа), которые отличаются от форм, идентифицированных в плазме крови крупного рогатого скота (КРС) [318]. Высокомолекулярный кининоген крови расщепляется плазменной протеиназой калликреином с образованием четырех фрагментов: тяжелой цепи, брадикинина, фрагмента 1.2 и легкой цепи. Фрагмент 1.2, выделенный из коровьего молока, проявляет способность стимулировать пролиферацию остеобластов [319] и подавлять резорбцию кости [320].

3.8.4. Бэта-2-микроглобулин

Новорожденные млекопитающие нуждаются в широком спектре защитных пептидов и белков, поскольку их врожденная иммунная функция не развита или не полностью развита при рождении. Одним из таких белков является β_2 -микроглобулин – компонент легкой цепи главного комплекса гистосовместимости класса I [321].

Бэта-2-микроглобулин был выделен из коровьего молока с использованием методов ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Полипептидная цепь белка состоит из 98 а.к. остатков, ММ составляет 11,8 кДа. Свободный β_2 -микроглобулин может образовывать тетра- и октамеры с ММ 48 и 96 кДа [321]. Методом двумерного электрофореза β_2 -микроглобулин выявляется в молочной сыворотке коровы [322].

Известно, что у парнокопытных большая часть материнских антител передается новорожденному через молозиво, которое содержит IgG в высокой концентрации (до 50 мг/мл).

Показано, что функция β_2 -микроглобулина связана с регуляцией активного транспорта IgG в молоко. В молочной железе коровы β_2 -микроглобулина экспрессируется постоянно, но при родах происходит кратковременное резкое увеличение продукции этого белка, которое коррелирует с пиком выработки IgG [323]. В экспериментах на животных моделях показано, что антитела, специфичные к β_2 -микроглобулину, индуцируют апоптоз опухолевых клеток как *in vitro*, так и *in vivo* [324].

В научной периодике есть информация о том, что β_2 -микроглобулин является важным иммунологическим компонентом молока сумчатых млекопитающих [325].

3.8.5. Протеозо-пептон 3

Протеозо-пептон 3 (PP3), который также называется лактофорином или лактогликофорином – термостабильный эндогенный белок молока, входит в семейство фосфорилированных гликопротеинов. Несмотря на то, что PP3 обнаруживается в протеозо-пептонной фракции молочной сыворотки, он, в отличие от других протеозо-пептонов (PP 5, PP8 (медленный), PP8 (быстрый)), не является продуктом ограниченного протеолиза казеина [326–328].

Коровий PP3 состоит из 135 а.к. остатков, его ММ составляет 28 кДа. Все остатки Ser в положениях 29, 34, 38, 40 и 46 – фосфорилированы. Одна N-связанная углеводная группа обнаружена в Asn77, а Thr16 и Thr86 несут O-связанные углеводные группы. Изолированная из молока фракция PP3, кроме основного белка (ММ 28 кДа), содержит два компонента с ММ 18 и 11 кДа, которые являются продуктами деградации PP3 под действием плазмينا [328].

Концентрация PP3 в молоке коровы составляет 0,2–0,3 г/л, что сопоставимо или превышает концентрации лактоферрина и остеопонтина, обсуждавшихся выше. Возможно, это объясняется тем, что кроме молочной сыворотки, PP3 обнаруживается также в мембране молочной жировой глобулы [329].

Функция PP3 *in vivo* не ясна. Установлено, что PP3 ингибирует активность липазы в молоке путем конкурентной адсорбции [330], а пептиды, образующиеся из PP3, проявляют иммуностимулирующие свойства [331]. С-терминальный фрагмент PP3 действует как мощный ингибитор ротавирусных инфекций человека в эмбриональных клетках обезьян и мышей [332].

Пептид лактофорицин, полученный из С-концевого участка PP3 (PP3 (ф. 113–135))), вызывает образование пор в плоских липидных бислоях, а также проявляет антибактериальную активность как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных штаммов бактерий [333–335]. Другой С-концевой пептид PP3 (PP3 (ф. 110–135)) проявлял антибактериальную активность в отношении *Streptococcus thermophilus* (но был неактивен по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*), тогда как полноразмерный PP3 такими свойствами не обладал. Это может указывать на то, что PP3 функционирует как белок-предшественник, который при протеолизе высвобождает антибактериальные пептиды [336].

3.8.6. Лактопероксидаза (LPO)

Лактопероксидаза (ЕС 1.11.1.7) (LPO) является основным растворимым ферментом коровьего молока. Концентрация LPO в молозиве составляет 11–45 мг/л, а в молоке – 13–30 мг/л в молоке [134].

В присутствии перекиси водорода фермент катализирует окисление тиоцианата (SCN⁻) с образованием мощной антибактериальной системы, которая в 50–100 раз эффективнее, чем только H₂O₂. Система LPO активна в отношении широкого спектра организмов: грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов и грибов [326].

Эндогенная молочная LPO может быть использована для холодной стерилизации молока. Тиоцианат присутствует в сыром коровьем молоке в концентрации ≈ 24 мг/л. Этого более чем достаточно для активации нативной LPO (необходимая концентрация ≈ 15 мг/л). Поскольку в коровьем молоке обычно содержится очень низкий уровень H_2O_2 , система LPO может быть активирована дополнительно за счет внесения в молоко тиоцианата и перекиси. Такая процедура применяется для увеличения срока хранения охлажденного сырого молока [134, 326].

Антибактериальные свойства LPO определяют коммерческое использование препаратов этого фермента, включая зубную пасту, жидкость для полоскания рта, косметику, заменители молока для новорожденных сельскохозяйственных животных и корм для рыб. Лактопероксидаза также используется в качестве отбеливающего агента для подсырной сыворотки, содержащей краситель «Аннато». Поскольку человеческое молоко содержит очень мало или вообще не содержит LPO, фермент может быть полезной добавкой к детским питательным смесям [134, 326, 337].

Структура и свойства LPO также рассматриваются в главе 4 «Эндогенные ферменты молока».

3.8.7. Лизоцим

Лизоцим (или мурамидаза) (ЕС 3.2.1.17) является важным компонентом защитной системы млекопитающих. Фермент катализирует гидролиз $\beta 1-4$ связей между N-ацетилмураминовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в пептидогликановых слоях бактериальной клеточной стенки [134].

Поскольку содержание пептидогликанов в клеточной стенке грамположительных бактерий составляет около 90%, эти микроорганизмы более чувствительны к действию лизоцима, чем грамотрицательные (у которых содержание пептидогликанов в клеточной стенке составляет 5–10%). Действие лизоцима на грамположительные бактерии лежит в основе метода определения активности фермента, включающего лизис *Micrococcus luteus* (ранее *Micrococcus lysodeikticus*) [326].

У грамотрицательных бактерий пептидогликаны защищены внешним (барьерным) слоем липополисахаридов. Если барьерный слой нарушен, бактерии становятся более чувствительными к лизоциму. Например, в случае *Escherichia coli* лизоцим действует синергически с лактоферрином, который вызывает деструкцию липополисахаридного слоя, что облегчает лизоциму доступ к пептидогликанам. В результате комбинация лизоцима и лактоферрина обладает более высоким бактериостатическим эффектом, чем любой из белков по отдельности [338]. В то время как гидролитическое действие лизоцима на клеточную стенку бактерий обычно рассматривается как основной механизм его бактериостатического и бактерицидного действия, в настоящее время имеются данные, указывающие на то, что может быть задействован и неферментативный механизм воздействия этого белка на микроорганизмы [339].

Концентрация лизоцима в молозиве и нормальном молоке составляет 0,14–0,7 мг/л и 0,07–0,6 мг/л соответственно [340].

Лизоцим, содержащийся в молоке коровы, представляет собой одноцепочечный белок с ММ ≈ 18 кДа [341]. Аминокислотный состав лизоцима коровы значительно отличается от состава лизоцима человека и лизоцима из яичного белка [342]. Вместе с тем аминокислотная последовательность коровьего лизоцима в высокой степени гомологична аминокислотной последовательности α -лактальбумина. Это позволяет предполагать, что лизоцим эволюционировал, превратившись в α -LA [339].

В молочной промышленности лизоцим используется для подавления роста спорообразующих бактерий *Clostridium tyrobutyricum*, споры которых не инактивируются при режимах

пастеризации, используемых в сыроделии, что вызывает вспучивание сыров Gouda, Edam, Emmental, Parmigiano Reggiano и Grana Padana на поздних этапах созревания [326].

Потенциал этого фермента в настоящее время реализуется при создании трансгенных свиней и КРС, экспрессирующих генно-инженерный человеческий лизоцим в концентрациях, которые в 50 раз превышают его содержание в нормальном молоке. Так, в случае КРС выход рекомбинантного лизоцима человека в молоке трансгенных животных составил 25 мкг/мл [343, 344].

Структура и свойства лизоцима дополнительно рассматриваются в главе 4 «Эндогенные ферменты молока».

3.8.8. Цитокины

Цитокины представляют собой небольшие (ММ 5-25 кДа) растворимые гликопротеины, которые являются неотъемлемой частью защитной системы хозяина. К цитокинам относятся интерфероны, интерлейкины, хемокины, факторы некроза опухоли, колониестимулирующие факторы и факторы роста. Принцип действия этих сигнальных белков является эстафетным: воздействие цитокина на клетку вызывает образование ею других цитокинов (таким образом, формируется цитокиновый каскад).

В норме цитокины содержатся в биологических жидкостях в пикомолярных ($\approx 10^{-12}$ М) концентрациях. В период ранней лактации, когда системы органов новорожденного активно развиваются, содержание цитокинов в молоке повышается.

В молоке крови идентифицированы различные группы цитокинов: трансформирующие факторы роста (TGF), факторы некроза опухоли (TNF- α), интерфероны (IFN- γ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и интерлейкины (IL-8, IL-12) [327, 345, 346]. Трансформирующие факторы роста преобладают в секретах молочной железы коровы. Так, TGF β 1 и TGF β 2 экспрессируются в коровьем молозиве на уровне 400 нг/мл и около 3 мкг/мл соответственно [347]. Синтез белков молока подавляется экзогенным TGF β 1 только в период гестационного развития молочной железы, но не во время лактации. Экспрессия TGF α , TGF β 1 и TGF β 2 повышается при мастите, вызванном *Escherichia coli* [348]. После пастеризации молока концентрация TGF β в нем снижается наполовину [349].

3.8.9. Инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), нейрегулин 4 (NRG4)

Молочная сыворотка содержит несколько факторов роста, включая инсулиноподобные факторы роста (IGF), фактор роста фибробластов (FGF) и эпидермальный фактор роста (EGF) [350, 351].

Инсулиноподобные факторы роста (соматомедины) участвуют в регуляции процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей. Это небольшие белки с ММ около 7,6 кДа. Человеческий и коровий IGF-I имеют 100% гомологию, что позволяет предположить, что эти две формы могут обладать сопоставимой функциональностью. Концентрации IGF-I (соматомедин С) и IGF-II (соматомедин А) выше в коровьем молоке по сравнению с молоком человека. Несколько исследований показали, что инсулиноподобные факторы роста стимулируют пролиферацию клеток и подавляют апоптоз [352, 353].

Факторы роста фибробластов (FGFs) – гепарин-связывающие белки, которые относятся к семейству факторов роста, участвующих в ангиогенезе и эмбриональном развитии, в процессах пролиферации и дифференцировки широкого спектра клеток и тканей. Содержащийся в молоке FGF21 стимулирует развитие пищеварительной и эндокринной функции ЖКТ в неонатальном периоде [354].

Эпидермальный фактор роста (EGF) стимулирует процессы дифференцировки и пролиферации эпителиальных клеток. Это небольшой белок с ММ около 6 кДа, первоначально выделенный из подчелюстных слюнных желез мышей как фактор, «ускоряющий прорезывание зубов и открывание век у новорожденных» [355]. Потребление EGF с молоком индуцирует пролиферацию и восстановление клеток кишечника [356]. Концентрация EGF в коровьем молоке составляет около 2–3 нг/мл [357]. В коровьем молоке обнаруживается еще один белок, относящийся к семейству EGF – бетацеллюлин [358]. В имплантологической практике препараты EGF используются как модификатор волокнистых матрицсов биоинженерных имплантов, для стимуляции пролиферации эпителиальных клеток *in vivo* и *in vitro* [359].

Также в молоке идентифицирован нейрегулин 4 (NRG4) – один из четырех белков семейства нейрегулинов, родственных эпидермальным факторам роста. Нейрегулины выполняют различные функции в процессе развития нервной системы. По данным S.J. McElroy с соавторами, NRG4 повышает жизнеспособность эпителиальных клеток и тормозит развитие экспериментального некротического энтероколита у мышей. Потенциальная клиническая значимость этих результатов связана с тем, что NRG4 и его рецептор ErbB4 присутствуют в грудном молоке и развивающемся кишечнике человека. Таким образом, использование NRG4 в детских питательных смесях представляется логичным шагом в профилактике или лечении некротического энтероколита [360]. Возможно, сыворотка коровьего молока может служить источником для выделения NRG4 [327].

3.8.10. Белки, связывающие инсулиноподобные факторы роста (IGFBPs)

В молоке и молозиве найдены белки, связывающие инсулиноподобные факторы роста. IGF-связывающие белки (IGFBPs) представляют собой семейство из шести гомологичных протеинов с высокой аффинностью к IGF-1 и IGF-2. Связывание IGF может регулироваться посттрансляционными модификациями IGFBP, такими как фосфорилирование и протеолиз, а также ассоциацией IGFBP с клеткой или внеклеточным матриксом. Действие IGFBP на активность IGF носит двоякий характер и, вероятно, также зависит от степени ПТМ IGF-связывающих белков. С одной стороны, было показано, что все шесть IGFBP ингибируют действие IGF на такие процессы, как синтез клеточной ДНК, регуляция уровня глюкозы и рост всего организма. С другой – были установлены стимулирующие эффекты IGFBP-1, IGFBP-3 и IGFBP-5 на IGF-зависимый синтез ДНК, на связывание IGF с клеточными рецепторами и на активность IGF-1 в фибробластах [361].

Белки, связывающие инсулиноподобные факторы роста, могут взаимодействовать с сигнальными путями других факторов роста. Например, IGFBP-3 оказывает влияние на сигнальные пути цитокина TGF β через белки Smad [362]. Лактоферрин также конкурирует с IGF-1 за сайты связывания с IGFBP-3 и модулирует влияние системы IGF в инволюции молочной железы [363].

3.8.11. Фолат-связывающий протеин (FBP)

Из молока коровы выделен и идентифицирован фолат-связывающий протеин (FBP) [364]. Фолат-связывающие белки млекопитающих являются высокоэффективными рецепторами фолиевой кислоты, участвующей в метаболизме нуклеиновых кислот и необходимой для роста, регуляции биосинтеза протеинов и формирования кровеносной и иммунной систем [365–368]. Основная функция FBP в молоке – обеспечение новорожденного витамином B9. В молоке коровы FBP обнаруживается в виде мономерного гликозилированного протеина с ММ около 30 кДа. Полипептидная цепь FBP состоит из 222 а.к. и стабилизируется внутримолекулярными дисульфидными связями, число которых достигает восьми [369].

Белок может существовать в двух формах – растворимой и мембраносвязанной. Форма FBP, содержащая гидрофобный гликозилфосфатидил инозитоловый «хвост», закрепляется на плазматических мембранах в качестве мембраносвязанного рецептора фолата [370]. Растворимый FBP осуществляет транспорт фолата, например, в молоке или сыворотке крови; мембраносвязанная форма участвует в трансмембранном переносе лиганда. Считается, что FBP не только обеспечивает доступность фолатов молока для тканей новорожденного, но и несет антибактериальную функцию, предотвращая потребление витамина B9 микрофлорой ЖКТ [371].

Концентрация FBP в молоке составляет 170-260 нМ. После пастеризации при 72оС в молоке сохраняется 80–90% от исходного содержания FBP [366].

3.8.12. Витамин D-связывающий протеин

Ионы кальция играют важную роль в формировании казеиновых мицелл молока. Витамины группы D (кальциферолы) обеспечивает всасывание кальция и фосфора пищи в тонком кишечнике [372].

В организме млекопитающих кальциферолы транспортируются специфическим белком, который называется витамином D-связывающий протеин (DBP). Это полиморфный гликопротеин из семейства сывороточных альбуминов, с ММ ≈58 кДа (458 а.к. остатков), который также связывает G-актин, жирные кислоты и некоторые хемотаксические агенты. Концентрация DBP в сыворотке молозива и сыворотке крови гораздо выше, чем в зрелом молоке [134].

Кроме связывания витаминов группы D, DBP выполняет и ряд других функций. Так, дегликозилирование приводит к образованию модифицированной формы белка – DBP-фактора, активирующего макрофаги (DBP-maf), который является мощным активатором макрофагов и остеокластов. Установлено, что DBP-maf увеличивает выживаемость мышей с асцитной опухолью Эрлиха [373].

3.8.13. Витамин B₁₂-связывающие протеины

Витамин B₁₂ (кобаламин) важен для новорожденных млекопитающих, поскольку он усиливает превращение глюкозы в сукцинат, который, помимо участия в реакциях тканевого дыхания, играет роль метаболического сигнала, запускающего важные адаптационные механизмы [374]. В молоке разных видов кобаламин (Cbl) обычно связывается со специфическими Cbl-связывающими белками – гаптокоррином (HCr) и/или транскобаламином (TCb), каждый из которых обладает необычайно высоким сродством к витамину B₁₂ [375, 376].

Человеческий HCr – это мономерный высокогликозилированный (~34% углеводов) белок с ММ около 43 кДа [377]. Показано, что HCr не только способствует усвоению витамина B12 у новорожденных детей [378], но и ограничивает его доступность для поглощения микробами и, таким образом, может влиять на рост желудочно-кишечной микрофлоры [134].

В молоке коров Holstein Friesian, так же, как и в молоке человека, обнаружены и HCr и TCb. В то же время показано, что количественный и качественный составы Cbl-связывающих белков в молоке европейских и индийских пород КРС различаются. Так, в молоке датских пород КРС обнаружен только TCb, в молоке коров индийских пород – TCb + HCr, а в молоке итальянских линий животных – преимущественно HCr [375].

3.8.14. Рибофлавин-переносящий белок (RCP)

Рибофлавин (лактофлавин, витамин B₂) – важнейший водорастворимый витамин, переносчик протонов и электронов, кофермент множества биохимических реакций. Рибофла-

вин-переносящий белок (RCP) первоначально был выделен из птичьих яиц и идентифицирован как фосфогликопротеин с ММ 37 кДа. Показано, что RCP широко распространен среди позвоночных животных и играет важную роль в эмбриональном и в постнатальном периодах развития [379, 380].

Рибофлавин-переносящий белок обнаруживается в молоке приматов, грызунов и коров. Поскольку концентрация рибофлавина в молоке в несколько раз выше, чем в кровотоке матери во время лактации, логично предположить, что RCP обеспечивает перенос рибофлавина в молоко, для удовлетворения потребности новорожденного млекопитающего в витамине В₂. Выделенный из коровьего молока RCP демонстрирует физико-химические и иммунологические свойства, сходные с птичьим аналогом, что указывает на его эволюционную консервативность. Биосинтез RCP модулируется эстрогеном и прогестероном как *in vitro* – в культуре эпителиальных клеток молочной железы – так и *in vivo* [380].

3.8.15. Лептин (LEP)

Лептин (LEP) – белок с ММ 18,7 кДа (167 а.к.), который обладает гормоноподобной активностью и относится к семейству цитокинов (сигнальных биомолекул). Лептин продуцируется клетками жировой ткани (адипоцитами), его основной физиологической функцией считается регуляция энергетического обмена [381, 382].

По данным ресурса UniProt, функции этого белка исключительно многообразны, LEP участвует в таких процессах, как активация протеинкиназ В, С и фосфатидилинозитол-3 киназы; регуляция пищевого поведения; негативная регуляция аппетита, аутофагии и потребления глюкозы; активация фагоцитоза; позитивная регуляция биосинтеза жирных кислот; стимуляция продукции интерлейкинов (IL-12, IL-6, IL-8); активация сигнальных путей MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), JAK-STAT (Janus Kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription) и TOR (Target Of Rapamycin); стимулирование пролиферации Т-лимфоцитов и эндотелиоцитов; позитивная регуляция продукции фактора некроза опухоли; регуляция пролиферации и активации NK-клеток (Natural Killer cells); секреция простогландинов; ремоделирование костной ткани; регуляция клеточного цикла, активности NO-синтазы, дифференцировки клеток бурого жира и ангиогенеза [381].

Показано, что LEP синтезируется в эпителиальных клетках молочной железы КРС. Предполагается, что LEP, обнаруживаемый в молоке, происходит из эпителия молочной железы, а не из крови матери. Важно отметить, что LEP-рецепторы также были идентифицированы в эпителии молочной железы, что предполагает потенциальную аутокринную или паракринную роль LEP в ткани этого органа [382, 383].

Данные о роли LEP в регуляции лактации противоречивы. По данным [384] гормоны роста и лактогенные гормоны подавляют синтез мРНК лептина в эпителиальных клетках молочной железы, полученных от беременной особи КРС. Показано, что LEP ингибирует пролиферацию эпителиальных клеток молочной железы КРС дозозависимым образом и, как предполагается, играет определенную роль в нарушении развития молочной железы у части телок препубертатного возраста, находящихся на высокоэнергетической диете [385]. Напротив, в работе [386] установлено, что совместное культивирование лептина и пролактина с эпителиальными клетками молочной железы стимулирует их пролиферацию. Не исключено, что LEP может усиливать действие пролактина на эпителиальные клетки молочной железы КРС.

Средние значения концентрации LEP в молозиве и молоке (в течение первого месяца лактации) составляют 13,9 и 6,11 мкг/л, соответственно [387].

3.8.16. Ингибитор лактации с обратной связью (FIL)

В молоке человека, козы и коровы идентифицирован ингибитор лактации с обратной связью (FIL) – небольшой гликопротеин с ММ 7,6 кДа, подавляющий синтез казеинов и лактозы [388]. В отличие от лактогенных гормонов пролактина и окситоцина, FIL подавляет синтез и секрецию молока, когда частота грудного вскармливания снижается. Это обеспечивает контроль над выработкой молока, позволяя избежать переполнения молочной железы.

Предполагается, что FIL может участвовать в регуляции апоптоза при инволюции молочной железы после прекращения лактации [389]. Точные механизмы, с помощью которых FIL влияет на функцию эпителиальных клеток молочной железы, не установлены [134].

3.8.17. Паратиреоидный гормон-родственный белок (PTHrP)

Паратиреоидный гормон-родственный белок (PTHrP) вырабатывается эпителиальными клетками молочной железы и действует на окружающие мезенхимальные клетки, способствуя их дифференцировке, развитию протоков и формированию ткани оболочки соска [390].

Первоначально было показано, что PTHrP играет основную роль в патогенезе распространенного паранеопластического синдрома, известного как гуморальная гиперкальциемия злокачественных новообразований [391]. Структурно PTHrP напоминает паратиреоидный гормон, который является основным регулятором уровня циркулирующего кальция у четвероногих (*Tetrapoda*) [392]. В настоящее время установлено, что PTHrP необходим для нормального развития костей, зубов, легких, кожи и молочной железы [390].

PTHrP обнаружен в молоке нескольких видов, включая *Bos taurus* [134]. Структура коровьего PTHrP не изучена. Человеческий PTHrP экспрессируется как пре-проPTHrP, состоящий из 173 а.к. остатков. После удаления сигнальных последовательностей образуется зрелый PTHrP (141 а.к.) из которого в результате ограниченного протеолиза образуются несколько биоактивных пептидов (например, PTHrP (ф.1-34) и ф. 67-86)) [393, 394].

3.8.18. Релаксин

В молоке коровы содержится релаксин – пептидный гормон с ММ 6 кДа, относящийся к семейству инсулинов [134]. Структурно релаксин представляет собой гетеродимер из двух пептидных цепей (24 и 29 а.к.), соединенных -S-S- мостиками. Эффекты релаксина в молоке людей, крыс и свиней в целом изучены достаточно подробно. Релаксин обладает широким спектром биологической активности, которая включает в себя: индукцию ремоделирования коллагена и размягчение тканей родовых путей перед родами; угнетение сократительной активности матки; стимуляцию роста и дифференцировки молочной железы; регуляцию роста клеток рака молочной железы в культуре; стимуляцию расширения кровеносных сосудов в матке, молочной железе, легких и сердце; ингибирование высвобождения гистамина тучными клетками; угнетение агрегации тромбоцитов и их высвобождения мегакариоцитами; влияние на секрецию гормонов гипофиза [395]. В то же время данные о структуре и функциях релаксина коровьего молока – немногочисленны и фрагментарны. В частности, неясно, происходит ли релаксин молока из материнского кровотока или синтезируется эпителиальными клетками молочной железы коровы [134].

Внутривенное введение релаксина не оказывало заметного влияния на выделение молока у коров [396].

3.8.19. Плазмин

Молоко коровы содержит несколько эндогенных протеолитических ферментов, основным из которых является плазмин (ЕС 3.4.21.7) или фибринолизин. Фактически в молоке присут-

ствует такая же плазминовая система, как в плазме крови: плазмин, пламиноген, активаторы пламиногена (PAs) и ингибиторы как PAs, так и пламина. Компоненты этой система поступают в молоко из крови.

Активность пламина возрастает в ситуациях, когда наблюдается повышенный приток компонентов крови в молоко, например, при мастите. Предполагается, что плазмин может быть связан с физиологией лактации. В частности, было показано, что продукт гидролиза β -казеина плазином – протеозо-пептон 8f (β -CN (ф. 1-28)) – способен угнетать секрецию молока в вымени [12].

Структура и свойства пламина подробно рассматриваются в главе 4 «Эндогенные ферменты молока».

3.8.20. Катепсин D

Катепсин D (ЕС 3.4.23.5) – кислая аспарагиновая протеиназа, которая является лизосомальным ферментом, но обнаруживается также в молочной сыворотке в концентрации 0,3 мг/л. В молоке катепсин D существует в нескольких формах: прокатепсин D (зимоген), псевдокатепсин D и зрелый катепсин D. Зимоген (ММ 45–46 кДа), в результате ограниченного аутолиза 18 а.к. остатков, превращается в псевдокатепсин D (ММ 43 кДа), который после утраты еще 26 а.к., становится зрелым катепсином D (ММ 39 кДа). Псевдокатепсин D и зрелый катепсин D – активные протеолитические ферменты, которые способны гидролизовать все группы казеинов и α -LA. При этом в результате протеолитической активности (ПА) катепсина D наиболее интенсивно расщепляется α s1-казеин. В результате протеолиза казеинов под действием катепсинов и химозинов образуются аналогичные продукты, включая гликомакропептид к-казеина. Основной белок молочной сыворотки – β -LG – устойчив к действию катепсина D [326].

Катепсин D обладает молокосвертывающей активностью (МА) и при определенных условиях способен медленно свертывать молоко [397].

По-видимому, катепсин D не выполняет прямой физиологической функции в коровьем молоке [326], однако его высокая термостабильность (ТС) играет негативную роль в технологической практике переработки молока. После прогревания при 55 °С катепсин D теряет 55% активности, а полностью инактивируется только после 10 минут при 70 °С [398, 399]. Показано, что относительно высокая ТС и частичная устойчивость к пастеризации является результатом нежелательной ПА катепсина D, которая приводит к негативным изменениям органолептических показателей и текстуры некоторых видов сыров; например, швейцарского сыра [400] и кварга [401].

Предполагается, что кроме катепсина D в молоке также могут присутствовать другие лизосомальные ферменты: катепсины В, G, H, L [12].

3.8.21. Гликомакропептид (GMP)

Пептидная связь F105-M106 в молекуле к-казеина с высокой скоростью гидролизуется химозином (ЕС 3.4.23.4) или другими молокосвертывающими ферментами. Продуктами гидролиза являются пара-к-CN (к-CN (ф. 1–105)) и гликомакропептид (к-CN (ф. 106–169)).

В сыворотке нормального коровьего молока гликомакропептид (GMP) присутствует в концентрации $\approx$ 4,3 мг/л [402]. Его наличие в молоке может быть обусловлено активностью эндогенных протеолитических ферментов молока (например, катепсина D) или микробных протеиназ [326, 403]. Более высокие уровни GMP регистрируются в молозиве и маститном молоке [402]. Концентрация GMP в сладкой подсырной сыворотке в 9–15 раз выше, чем в молоке,

что, естественно, объясняется ПА молокосвертывающего фермента. Молоко, в котором происходит существенный рост бактерий рода *Pseudomonas*, также имеет повышенное содержание GMP. Это обусловлено тем, что некоторые протеиназы псевдомонад способны гидролизовать к-CN по сайту 105–106 или по близлежащим пептидным связям [326, 403].

Гликомакропептид не содержит ароматических аминокислот. Это делает его привлекательным полипептидным компонентом для лечения фенилкетонурии (ФКУ) – наследственного заболевания, развивающегося вследствие врожденного дефекта фермента фенилаланин гидроксилазы, отвечающего за нормальный обмен фенилаланина (Phe) [404]. Следствием данной ферментопатии является тяжелое психическое недоразвитие. Без своевременного лечения больные ФКУ на всю жизнь остаются глубокими инвалидами. Главным способом лечения ФКУ является диетотерапия, ограничивающая поступление в организм Phe; приступать к ней нужно немедленно после установления диагноза. При ранней диагностике это гарантирует нормальное нервно-психическое развитие ребенка. Основными компонентами белковой диеты детей, страдающих ФКУ, являются синтетические а.к. смеси или белковые гидролизаты (БГ), с ограниченным содержанием Phe. Получение БГ с использованием протеинов животного или растительного происхождения является непростой задачей, поскольку Phe в значительных количествах присутствует во всех пищевых белках [404–406].

Гликомакропептид не содержит остатков Phe и, в принципе, может напрямую использоваться в качестве белкового компонента питания для больных ФКУ. Дешевым и доступным сырьем для получения GMA в промышленных масштабах может быть подсырная сыворотка. Поскольку GMP имеет $pI \leq 4$, его просто выделить из сладкой молочной сыворотки с помощью анионообменной хроматографии в сочетании с ультрафильтрацией [407]. С практической точки зрения отсутствие в GMP ароматических а.к. делает невозможным определение его концентрации спектрофотометрически, по поглощению при 280 нм. В то же время любое поглощение при 280 нм свидетельствует о присутствии в препаратах GMP балластных примесей [326].

3.8.22. Просапозин

В коровьем молоке идентифицирован высокомолекулярный гликопротеин просапозин. Считается, что просапозин – это нейротрофический фактор, который участвует в развитии, восстановлении и функционировании нервной ткани. Известно, что просапозин является предшественником сапозинов А, В, С и D, которые, однако, не были обнаружены в молоке. Физиологическая роль просапозина в молоке неизвестна [328].

Библиографический список к главе 3

1. Farrell, Jr., H.M. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk – Sixth Revision / H.M. Farrell Jr., R. Jimenes-Flores, G.T. Bleck, E.M. Brown, J.E. Butler, L.K. Creamer, C.L. Hicks, C.M. Hollar, K.F. Ng-Kwai-Hang, H.E. Swaisgood // J. Dairy Sci. – 2004. – V. 87. – P. 1641–1674.
2. Eigel, W.N. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision / W.N. Eigel, J.E. Butler, C.A. Ernstrom, H.M. Farrell, Jr., V.R. Harwalkar, R. Jenness, R.M. Whitney // J. Dairy Sci. – 1984. – V. 67. – P. 1599–1631.
3. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing / Handbook. – Edition: Amersham Biosciences, 2001. – P. 23–30.
4. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
5. Basch, J.J. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure /

- J.J. Basch, F.W. Douglass, Jr., L.G. Prochino, V.H. Holsinger, H.M. Farrell, Jr. // *J Dairy Sci.* – 1985. – V. 68. – P. 23–31.
6. Ельчанинов, В.В. Исследование молокосвертывающего фермента из сычугов северных оленей : дисс. ... канд. техн. наук: 05.18. 04: защищена 23.01.06 / Вадим Валентинович Ельчанинов. – Барнаул, 2005. – 172 с. – Библиогр.: С. 121–147.
 7. Bigelow, C.C. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure / C.C. Bigelow // *J. Theoret. Biol.* – 1967. – V. 16. – P. 187–211.
 8. Schack, L. Considerable variation in the concentration of osteopontin in human milk, bovine milk, and infant formulas. / L. Schack, A. Lange, J. Kelsen, J. Agnholt, B. Christensen, T.E. Petersen, E.S. Sørensen // *J. Dairy Sci.* – 2009. – V. 92. – P. 5378–5385.
 9. Fox, P.F. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – Part 2 / P.F. Fox, A.L. Kelly // *Int. Dairy J.* – 2006. – V. 16. – P. 517–532.
 10. Fox, P.F. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – Part 1 / P.F. Fox, A.L. Kelly // *Int. Dairy J.* – 2006. – V. 16. – P. 500–516.
 11. Mather, I.H. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane / I.H. Mather // *J. Dairy Sci.* – 2000. – V. 83. – P. 203–247.
 12. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition, Volume I: General Aspects. Proteolysis in Cheese during Ripening / V.K. Upadhyay, P.L.H. McSweeney, A.A.A. Magboul, P.F. Fox.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee, eds. – London, UK: Elsevier Academic Press, 2004. – P. 391–433.
 13. Jakob, E. Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins – A review / E. Jakob, Z. Puhan // *Int. Dairy J.* – 1992. – V. 2. – P. 157–178.
 14. Macromolecular Interactions in Food Technology. ACS Symp. Ser. 650. Effect of bovine β -lactoglobulin phenotype on the properties of β -lactoglobulin, milk composition, and dairy products / J.P. Hill, M.J. Boland, L.K. Creamer, S.G. Anema, D.E. Otter, G.R. Paterson, R. Lowe, R.L. Motion, W.C. Thresher.; N. Parris, A. Kato, L.K. Creamer, and R.J. Pearce, ed. – Washington, DC.: Amer. Chem. Soc., 1996. – P. 281–294.
 15. Aschaffenburg, R. Genetics of the β -lactoglobulins of cow's milk / R. Aschaffenburg, J. Drewry // *Nature (Lond.)*. – 1957. – V. 180. – P. 376–378.
 16. Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins. Genetic polymorphism of milk proteins / K.F. Ng-Kwai-Hang, F. Grosclaude.; P.F. Fox, ed. – New York, NY: Elsevier Applied Science, 1992. – P. 405–455.
 17. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, part B, Proteins. 3rd ed. Genetic polymorphism of milk proteins / K.F. Ng-Kwai-Hang, F. Grosclaude.; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. – New York, NY: Kluwer Academic/Plenum, 2003. – P. 739–816.
 18. Le´onil, J. Analysis of major bovine milk proteins by online high-performance liquid chromatography and electro spray ionization-mass spectrometry / J. Le´onil, D. Molle´, F. Gaucheron, P. Arpin, P. Guenot, J. L. Maubois // *Lait*. – 1995. – V. 75. – P. 193–210.
 19. Milk Protein Polymorphism. Int. Dairy Fed. Special Issue 9702. ESI-MS phenotyping of bovine β -lactoglobulin genetic variants in a New Zealand dairy cattle population / R.G. Burr, C.H. Moore, J.P. Hill.; Brussels, Belgium: Int. Dairy Fed., 1997. – P. 340–344.
 20. Papiz, M.Z. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol binding protein / M.Z. Papiz, L. Sawyer, E.E. Eliopoulos, A.C.T. North, J.B.C. Findlay, R. Sivaprasadarao, T.A. Jones, M.E. Newcomer, P.J. Kraulis // *Nature*. – 1986. – V. 324. – P. 383–385.
 21. Milk Protein Polymorphism. Int. Dairy Fed. Special Issue 9702. β -Lactoglobulin and its variants: A three-dimensional structural perspective./ M.C. Bewley, B.Y. Qin, G.B. Jameson, L. Sawyer, E.N. Baker.; Brussels, Belgium: Int. Dairy Fed., 1997. – P. 100–109.

22. Milk Protein Polymorphism. Int. Dairy Fed. Special Issue 9702. Labeling the free sulfhydryl group in β -lactoglobulin A, B and C / H. Brittan, J.C. Mudford, G.E. Norris, T.M. Kitson, J.P. Hill.; Brussels, Belgium: Int. Dairy Fed., 1997. – P. 200–203.
23. Brownlow, S. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution – Still an enigmatic lipocalin / S. Brownlow, J.H. Morais-Cabral, R. Cooper, D.R. Flower, S.J. Yewdall, I. Polikarpov, A.C.T. North, L. Sawyer // *Structure*. – 1997. – V. 5. – P. 481–495.
24. Qin, B.Y. Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin / B.Y. Qin, M.C. Bewley, L.K. Creamer, E.N. Baker, G.B. Jameson // *Protein Sci.* – 1999. – V. 8. – P. 75–83.
25. Qin, B.Y. Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin / B.Y. Qin, M.C. Bewley, L.K. Creamer, H.M. Baker, E.N. Baker, G.B. Jameson // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37. – P. 14014–14023.
26. Qin, B.Y. 12-Bromododecanoic acid binds inside the calyx of bovine β -lactoglobulin / B.Y. Qin, L.K. Creamer, E.N. Baker, G.B. Jameson // *FEBS Lett.* – 1998. – V. 438. – P. 272–278.
27. UniProt KB – P02754 (LACB_BOVIN) – открытая база данных последовательностей белков. Beta-lactoglobulin. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02754> (дата обращения: 16.04.2022).
28. Alexander, L.J. Complete nucleotide sequence of bovine β -lactoglobulin gene / L.J. Alexander, G. Hayes, W. Bawden, A.F. Stewart, A.G. Mackinlay // *Anim. Biotechnol.* – 1993. – V. 4. – P. 1–10.
29. Wagner, V.A. DNA variants within the 5' flanking region of milk protein-encoding genes II. The β -Lactoglobulin-encoding gene / V.A. Wagner, T.A. Scild, H. Geldermann // *Theoret. Appl. Genet.* – 1994. – V. 89. – P. 121–126.
30. Geldermann, H. DNA variants within the 5' flanking region of bovine milk protein encoding genes / H. Geldermann, J. Gogol, M. Kock, G. Tacea // *J. Anim. Breed. Gen.* – 1996. – V. 113(4–5). – P. 261–267.
31. Mercadante, D. Bovine β -Lactoglobulin Is Dimeric Under Imitative Physiological Conditions: Dissociation Equilibrium and Rate Constants over the pH Range of 2.5–7.5 / D. Mercadante, L.D. Melton, G.E. Norris, T.S. Loo, M.A.K. Williams, R.C.J. Dobson, G.B. Jameson // *Biophys. J.* – 2012. – V. 103(2). – P. 303–312.
32. Conti, A. Bovine β -lactoglobulin H: Isolation by preparative isoelectric focusing in immobilized pH gradients and preliminary characterization / A. Conti, L. Napolitano, A.M. Cantisani, R. Davoli, S. Dall'Olio // *J. Biochem. Biophys Methods*. – 1988. – V. 16. – P. 205–214.
33. Davoli, R. A new β -lactoglobulin variant in bovine milk / R. Davoli, S. Dall'Olio, D. Bigi // *Scienza-e-Tecnica-Lattiero-Casearia*. – 1988. – V. 39. – P. 439–443.
34. Godovac-Zimmermann, J. Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine β -lactoglobulins I and J / J. Godovac-Zimmermann, I. Krause, M. Baranyi, S. Fischer-Fruhholz, J. Juszczak, G. Erhardt, J. Buchberger, H. Klostermeyer // *J. Protein Chem.* – 1996. – V. 15. – P. 743–750.
35. Godovac-Zimmermann, J. Genetic variants of bovine β -lactoglobulin. A novel wild-type β -Lactoglobulin W and its primary sequence / J. Godovac-Zimmermann, I. Krause, J. Buchberger, G. Weiss, H. Klostermeyer // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. – 1990. – V. 371. – P. 255–260.
36. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, part B, Proteins. 3rd ed. Genetic polymorphism of milk proteins. / K.F. Ng-Kwai-Hang, F. Grosclaude.; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. – New York, NY: Kluwer Academic/Plenum, 2003. – P. 739–816.
37. Baranyi, M. Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian Spotted and Hungarian Grey cattle: A possible new genetic variant of β -lactoglobulin / M. Baranyi, Z. Bösze, J. Buchberger, I. Krause // *J. Dairy Sci.* – 1993. – V. 76. – P. 630–636.

38. Kim, T.-R. High-level expression of bovine β -lactoglobulin in *Pichia pastoris* and characterization of its physical properties / T.-R. Kim, Y. Goto, N. Hirota, K. Kuwata, H. Denton, S.-Y. Wu, L. Sawyer, C.A. Batt // *Prot. Eng.* – 1997. – V. 10. – P. 1339–1345.
39. Kuwata, K. Solution structure and dynamics of bovine β -lactoglobulin A / K. Kuwata, M. Hoshino, V. Forge, S. Era, C.A. Batt, Y. Goto // *Protein Sci.* – 1999. – V. 8. – P. 2541–2545.
40. Uhrinova, S. Structural changes accompanying pH induced dissociation of the β -lactoglobulin dimer / S. Uhrinova, M.H. Smith, G.B. Jameson, D. Uhrin, L. Sawyer, P.N. Barlow // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – P. 3565–3574.
41. Varadi, M. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models / M. Varadi, S. Anyango, M. Deshpande, S. Nair, C. Natassia, G. Yordanova, D. Yuan, O. Stroe, G. Wood, A. Laydon, A. Židek, T. Green, K. Tunyasuvunakool, S. Petersen, J. Jumper, E. Clancy, R. Green, A. Vora, M. Lutfi, M. Figurnov, A. Cowie, N. Hobbs, P. Kohli, G. Kleywegt, E. Birney, D. Hassabis, S. Velankar // *Nucleic Acids Research.* – 2022. – V. 50. – Iss. D1. – P. D439–D444.
42. Jumper, J. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis // *Nature.* – 2021. – V. 596. – P. 583–589.
43. Chatterton, D.E.W. Review: Bioactivity of b-lactoglobulin and a-lactalbumin – Technological implications for processing / D.E.W. Chatterton, G. Smithers, P. Roupas, A. Brodkorb // *Int. Dairy J.* – 2006. – V. 16. – P. 1290–1240.
44. Bioactive Components in Milk and Dairy Products. Section I: 2. Bioactive Components in Bovine Milk / H.J. Korhonen.; Y.W. Park, ed. – Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2009. – P. 15–42.
45. Roufik, S. *In vitro* digestibility of bioactive peptides derived from bovine β -lactoglobulin / S. Roufik, S.F. Gauthier, S.L. Turgeon // *Int. Dairy J.* – 2006. – V. 16. – P. 294–302.
46. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1. Proteins. B-Lactoglobulin. / S.G. Hambling, A.S. McAlpine, L. Sawyer.; P.F. Fox, ed. – London, United Kingdom: Elsevier Applied Science, 1992. – P. 141–190.
47. Perez, M.D. Interaction of β -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: A review / M.D. Perez, M. Calvo // *J. Dairy Sci.* – 1995. – V. 78. – P. 978–988.
48. Narayan, M. Fatty acids and retinoids bind independently and simultaneously to β -lactoglobulin / M. Narayan, L.J. Berliner // *Biochemistry.* – 1997. – V. 36. – P. 1906–1911.
49. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1 Proteins. 3rd ed. Part A. β -Lactoglobulin / L. Sawyer.; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. – New York, NY : Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 319–386.
50. Cho, Y. Probing the retinol-binding site of bovine β -lactoglobulin / Y. Cho, C.A. Batt, L. Sawyer // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 11102–11107.
51. Wang, Q. Binding of lipophilic nutrients to β -lactoglobulin prepared by bioselective adsorption / Q. Wang, J.C. Allen, H.E. Swaisgood // *J. Dairy Sci.* – 1999. – V. 82. – P. 257–264.
52. Kontopidis, G. The ligand-binding site of bovine β -lactoglobulin: Evidence for a function? / G. Kontopidis, C. Holt, L. Sawyer // *J. Mol. Biol.* – 2002. – V. 318. – P. 1043–1055.
53. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, part B, Proteins. 3rd ed. Nutritional aspects of milk proteins / L. Hambræus, B. Lännerdal.; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. – New York, NY: Kluwer Academic/Plenum, 2003. – P. 605–646.

54. Le'onił, J. Characterization by ionization mass spectrometry of lactosyl β -lactoglobulin conjugates formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactosebinding site / J. Le'onił, D. Molle', J. Fauquant, J.L. Maubois, R.J. Pearce, S. Bouhallab // J. Dairy Sci. – 1997. – V. 80. – P. 2270–2281.
55. Burr, R. Evidence of multiple glycosylation of bovine β -lactoglobulin by electrospray ionization mass spectrometry / R. Burr, C.H. Moore, J.P. Hill // Milchwissenschaft. – 1996. – V. 51. – P. 488–492.
56. Morgan, F. Lactolation of β -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry / F. Morgan, S. Bouhallab, D. Molle', G. Henry, J.-L. Maubois, J. Le'onił // Int. Dairy J. – 1998. – V. 8. – P. 95–98.
57. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, part B, Proteins. 3rd ed. Allergenicity of milk proteins / S. Kaminogawa, M. Totsuka; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. – New York, NY: Kluwer Academic/Plenum, 2003. – P. 647–674.
58. Brew, K. The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin / K. Brew, F.J. Castellino, T.C. Vanaman, R.L. Hill // J. Biol. Chem. – 1970. – V. 245. – P. 4570–4582.
59. Gaye, P. Complete nucleotide sequence of ovine α -lactalbumin mRNA / P. Gaye, D. Hue-Delahaie, J.-C. Mercier, S. Soulier, J.-L. Vilotte, J.-P. Furet // Biochimie. – 1987. – V. 69. – P. 601–608.
60. Hurley, W.L. Molecular cloning and nucleotide sequence of a bovine α -lactalbumin cDNA / W.L. Hurley, L.A. Schuler // Gene. – 1987. – V. 61. – P. 119–123.
61. Vilotte, J.L. Complete nucleotide sequence of bovine α -lactalbumin gene: Comparison with its rat counterpart / J.L. Vilotte, S. Soulier, J.-C. Mercier, P. Gaye, D. Hue-Delahaie, J.P. Furet // Biochimie. – 1987. – V. 69. – P. 609–620.
62. Bleck, G.T. Sequence and single-base polymorphisms of the bovine α -lactalbumin 5' flanking region / G.T. Bleck, R.D. Bremel // Gene. – 1993. – V. 126. – P. 213–218.
63. UniProt KB – P00711 (LALBA_BOVIN) – открытая база данных последовательностей белков. Alpha-lactalbumin. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00711> (дата обращения: 24.04.2022).
64. Vanaman, T.C. The disulfide bonds of bovine α -lactalbumin / T.C. Vanaman, K. Brew, R.L. Hill // J. Biol. Chem. – 1970. – V. 245. – P. 4583–4590.
65. Bhattacharya, S.D. Inherited α -lactalbumin and β -lactoglobulin polymorphism in Indian Zebu cattle. Comparison of Zebu and buffalo α -lactalbumins / S.D. Bhattacharya, A.K. Roychoudhury, N.K. Sinha, A. Sen // Nature. – 1963. – V. 197. – P. 797–799.
66. Lactation, Vol. III. The composition of milk / R. Jenness.; B.L. Larson, V.R. Smith, ed. – New York, NY: Academic Press, 1974. – P. 3–107.
67. Mariani, P. Polmorfismo genetico della α -lactalbumina nelle razze bovine / P. Mariani, V. Russo // Riv. Zootec. Vet. – 1977. – V. 6. – P. 603–610.
68. Milk Proteins: Vol. II. A-Lactalbumin / W.G. Gordon.; H.A. McKenzie, ed. – New York, NY: Academic Press, 1971. – P. 331–363.
69. Bell, K. Bovine α -lactalbumin C and α s1-, β -, and κ -caseins of Bali (Banteng) cattle, *Bos (Bibos) javanicus* / K. Bell, K.E. Hopper, H.A. McKenzie // Aust. J. Biol. Sci. – 1981. – V. 34. – P. 149–159.
70. Heine, W.E. The importance of α -lactalbumin in infant nutrition / W.E. Heine, P.D. Klein, P.J. Reeds // J. Nutr. – 1991. – V. 121. – P. 277–283.
71. Brew, K. Lactose biosynthesis / K. Brew, R.L. Hill // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. – 1975. – V. 72. – P. 105–158.
72. Hill, R.L. Lactose synthetase / R.L. Hill, K. Brew // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. – 1975. – V. 43. – P. 411–490.

73. Jones, E.A. Synthesis and secretion of milk sugars / E.A. Jones // Symp. Zool. Soc. London. – 1977. – V. 41. – P. 77–92.
74. Kuhn, N.J. Lactose synthesis: Possibilities of regulation / N.J. Kuhn, D.T. Carrick, C. J. Wilde // J. Dairy Sci. – 1980. – V. 63. – P. 328–336.
75. Ramakrishnan, B. Crystal structure of lactose synthase reveals a large conformational change in its catalytic component, the β -1,4-galactosyltransferase-I / B. Ramakrishnan, P.K. Qasba // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 310. – P. 205–218.
76. Grobler, J.A. Study by mutagenesis of the roles of two aromatic clusters of α -lactalbumin in aspects of its action in the lactose synthase system / G.A. Grobler, M. Wang, A.C. W. Pike, K. Brew // J. Biol. Chem. – 1994. – V. 269. – P. 5106–5114.
77. Stinnakre, M.G. Creation and phenotypic analysis of α -lactalbumin-deficient mice / M.G. Stinnakre, J.L. Vilotte, S. Soulier, J.-C. Mercier // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – V. 91. – P. 6544–6548.
78. Stacey, A. Lactation is disrupted by α -lactalbumin deficiency and can be restored by human α -lactalbumin gene replacement in mice / A. Stacey, A. Schnieke, M. Kerr, A. Scott, C. McKee, I. Cottingham, B. Binas, C. Widle, A. Colman // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – V. 92. – P. 2835–2839.
79. Barman, T.E. Purification and properties of bovine milk glyco- α -lactalbumin / T.E. Barman // Biochem. Biophys. Acta. – 1970. – V. 214. – P. 242–244.
80. Pless, D.D. Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins / D.D. Pless, W.J. Lennarz // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – V. 74. – P. 134–138.
81. Chrysina, E.D. Crystal structures of apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions / E.D. Chrysina, K. Brew, K.R. Acharya // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275. – P. 37021–37029.
82. Bingham, E.W. Phosphorylation of β -casein and α -lactalbumin by casein kinase from lactating bovine mammary gland / E.W. Bingham, N. Parris, H.M. Farrell, Jr. // J. Dairy Sci. – 1988. – V. 71. – P. 324–336.
83. Davies, D.T. The content and composition of protein in creamery milks in south-west Scotland / D.T. Davies, A.J.R. Law // J. Dairy Res. – 1980. – V. 47. – P. 83–90.
84. Caffin, J.P. Physiological and pathological factors influencing bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin concentrations in milk // J.P. Caffin, B. Poutrel, P. Rainard // J. Dairy Sci. – 1985. – V. 68. – P. 1087–1094.
85. Regester, G.O. Seasonal changes in the β -lactoglobulin, α -lactalbumin, glycolmacropeptide, and casein content of whey protein concentrate / G.O. Regester, G.W. Smithers // J. Dairy Sci. – 1991. – V. 74. – P. 796–802.
86. McKenzie, H.A. Lysozyme and α -lactalbumin: structure, function, and interrelations / H.A. McKenzie, F.H. White // Adv. Prot. Chem. – 1991. – V. 41. – P. 173–315.
87. Acharya, K.R. Refined structure of baboon α -lactalbumin at 1.7 Å resolution. Comparison with c-type lysozyme / K.R. Acharya, D.I. Stuart, N.P.C. Walker, M. Lewis, D.C. Phillips // J. Mol. Biol. – 1989. – V. 208. – P. 99–127.
88. Permyakov, E.A. α -Lactalbumin: Structure and function / E.A. Permyakov, L.J. Berliner // FEBS Lett. – 2000. – V. 473. – P. 269–274.
89. Permyakov, E.A. α -Lactalbumin, Amazing Calcium-Binding Protein / E.A. Permyakov. // Biomolecules. – 2020. – 10 (9). – 1210. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10091210>.
90. Hiraoka, Y. α -Lactalbumin: A calcium metalloprotein / Y. Hiraoka, T. Segawa, K. Kuwajima, S. Sugai, N. Murai // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1980. – V. 95. – P. 1098–1104.

91. Ren, J. α -Lactalbumin possesses a distinct zinc binding site / J. Ren, D.I. Stuart, K.R. Acharya // J. Biol. Chem. – 1993. – V. 268. – P. 19292–19298.
92. Advanced Dairy Chemistry, Proteins. 2nd ed. A-Lactalbumin / K. Brew, J. Grobler.; P.F. Fox, ed. – New York, NY: Elsevier Sci. Pub. Ltd., 1992. – P. 191–229.
93. Pike, A.C.W. Crystal structures of guinea-pig, goat, and bovine α -lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase / A.C.W. Pike, K. Brew, K.R. Acharya // Structure. – 1996. – V. 4. – P. 691–703.
94. Acharya, K.R. Crystal structure of human α -lactalbumin at 1.7 Å resolution / K.R. Acharya, J.S. Ren, D.I. Stuart, R.E. Fenna, D.C. Phillips // J. Mol. Biol. – 1991. – V. 221. – P. 571–581.
95. Acharya, K.R. A critical evaluation of the predicted and X-ray structures of α -lactalbumin / K.R. Acharya, D.I. Stuart, D.C. Phillips, H.A. Scheraga // J. Prot. Chem. – 1990. – V. 9. – P. 549–563.
96. Harata, K. X-ray structural evidence for a local helix-loop transition in α -lactalbumin / K. Harata, M. Muraki // J. Biol. Chem. – 1992. – V. 267. – P. 1419–1421.
97. Farrell, H.M., Jr. Molten globule structures in milk proteins: Implications for potential new structure-function relationships / H.M. Farrell Jr., P.X. Qi, E.M. Brown, P.H. Cooke, M.H. Tunick, E.D. Wickham, J.J. Unruh // J. Dairy Sci. – 2002. – V. 85. – P. 459–471.
98. Svensson, M. Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. / M. Svensson, A. Hekansson, A.K. Mossberg, S. Linse, C. Svanborg // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – V. 97. – P. 4221–4226.
99. Pettersson, J. α -Lactalbumin species variation, HAMLET formation, and tumor cell death. / J. Pettersson, A.-K. Mossberg, C. Svanborg // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – V. 345. – P. 260–270.
100. Kuwajima, K. The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure / K. Kuwajima // Proteins: Struct. Func. Genet. – 1989. – V. 6. – P. 87–103.
101. Kuwajima, K. The molten globule state of α -lactalbumin / K. Kuwajima // FASEB J. – 1996. – V. 10. – P. 102–109.
102. Chakraborty, S. Structure and dynamics of the alpha-lactalbumin molten globule: fluorescence studies using proteins containing a single tryptophan residue / S. Chakraborty, V. Ittah, P. Bai, L. Luo, E. Haas, Z. Peng // Biochemistry. – 2001. – V. 40. – N 24. – P. 7228–7238.
103. Chowdhury, F.A. A comparative study of the alpha-subdomains of bovine and human alpha-lactalbumin reveals key differences that correlate with molten globule stability / F.A. Chowdhury, D.P. Raleigh // Protein Sci. – 2005. – V. 14. – N 1. – P. 89–96.
104. Enomoto, H. Glycation and phosphorylation of α -lactalbumin by dry heating: Effect on protein structure and physiological functions / H. Enomoto, Y. Hayashi, C.P. Li, S. Ohki, H. Ohtomo, M. Shiokawa, T. Aoki // J. Dairy Sci. – 2009. – V. 92. – P. 3057–3068.
105. Wijesinha-Bettoni, R. Comparison of the structure and dynamics of holo- and apo- α -lactalbumin / R. Wijesinha-Bettoni, C.M. Dobson, C. Redfield // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 307. – P. 885–898.
106. Markus, C.R. The bovine protein α -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. / C.R. Markus, B. Olivier, G.E.M. Panhuysen, J.V.D. Gugten, M.S. Alles, A. Truiten, H.G.M. Westenberg, D. Fekkes, H.F. Koppeschaar, E.E.H.F. de Haan // Am. J. Clin. Nutr. – 2000. – V. 71. – P. 1536–1544.
107. Pellegrini, A. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule / A. Pellegrini, U. Thomas, N. Bramaz, P. Hunziker, R. von Fellenberg // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – V. 1426. – P. 439–448.

108. Cross, M.L. Immunomodulatory properties of milk / M.L. Cross, H.S. Gill // *Br. J. Nutr.* – 2000. – V. 84. – P. S81–S89.
109. FitzGerald, R.J. Hypotensive peptides from milk proteins / R.J. FitzGerald, B.A. Murray, D.J. Walsh // *J. Nutr.* – 2004. – V. 134. – P. 980S–988S.
110. Sternhagen, L.G. Growth rates of a human colon adenocarcinoma cell line are regulated by the milk protein α -lactalbumin / L.G. Sternhagen, J.C. Allen // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2001. – V. 501. – P. 115–120.
111. Ushida, Y. Bovine α -Lactalbumin Stimulates Mucus Metabolism in Gastric Mucosa / Y. Ushida, Y. Shimokawa, T. Toida, H. Matsui, M. Takase // *J. Dairy Sci.* – 2007. – V. 90. – P. 541–546.
112. Matsumoto, H. New biological function of bovine alpha-lactalbumin: Protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats / H. Matsumoto, Y. Shimokawa, Y. Ushida, T. Toida, H. Hayasawa // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2001. – V. 65. – P. 1104–1111.
113. Markus, C.R. Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress – vulnerable subjects / C.R. Markus, B. Olivier, E.H. de Haan // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2002. – V. 75. – P. 1051–1056.
114. Scrutton, H. Effects of alpha-lactalbumin on emotional processing in healthy women / H. Scrutton, A. Carbonnier, P.J. Cowen, C. Harmer // *J. Psychopharmacol.* – 2007. – V. 21(5). – P. 519–524.
115. Yoshikawa, M. Opioid peptides from milk proteins / M. Yoshikawa, F. Tani, T. Yoshimura, H. Chiba // *Agric. Biol. Chem.* – 1986. – V. 50(9). – P. 2419–2421.
116. Bruck, W.M. rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic *Escherichia coli* / W.M. Bruck, S.L. Kelleher, G.R. Gibson, K.E. Nielsen, D.E. Chatterton, B. Lönnardal // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2003. – V. 37(3). – P. 273–280.
117. Pihlanto-Leppälä, A. The effect of α -lactalbumin and β -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103 / A. Pihlanto-Leppälä, P. Marnila, L. Hubert, T. Rokka, H.J. Korhonen, M. Karp // *J. Appl. Microbiol.* – 1999. – V. 87(4). – P. 540–545.
118. Carter, D.C. Structure of serum albumin / D.C. Carter, J.X. Ho // *Adv. Prot. Chem.* – 1994. – V. 45. – P. 153–203.
119. Polis, B.D. Isolation of a crystalline albumin from milk / B.D. Polis, H.W. Shmukler, J.H. Custer // *J. Biol. Chem.* – 1950. – V. 187. – P. 349–354.
120. Coulson, E.J. The serological relationship of bovine whey albumin to serum albumin / E.J. Coulson, H. Stevens // *J. Biol. Chem.* – 1950. – V. 187. – P. 355–363.
121. Reed, R.G. Sequence of residues 400–403 of bovine serum albumin / R.G. Reed, F. W. Putnam, T. Peters, Jr. // *Biochem. J.* – 1980. – V. 191. – P. 867–868.
122. Brown, J.R. Structure of bovine serum albumin / J.R. Brown // *Fed. Proc. FASEB.* – 1975. – V. 34. – P. 591.
123. Albumin Structure, Function, and Uses. Structure and evolution of serum albumin / J.R. Brown.; V.M. Rosenoer, M. Oratz, M.A. Rothschild, ed. – Oxford, UK: Pergamon Press, 1977. – P. 27–51.
124. Hirayama, K. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS / K. Hirayama, S. Akashi, M. Furuya, K. Fukuhara // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1990. – V. 173. – P. 639–646.
125. UniProt KB – P02769 (ALBU_BOVIN) – открытая база данных последовательностей белков. Albumin. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02769> (дата обращения: 29.04.2022).
126. Ho, J.X. X-ray and primary structure of horse serum albumin (*Equus caballus*) at 0.27-nm resolution / J.X. Ho, E.W. Holowachuk, E.J. Norton, P.D. Twigg, D.C. Carter // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – V. 215. – P. 205–212.

127. Bujacz, A. Crystal structures of serum albumins from domesticated ruminants and their complexes with 3,5-diiodosalicylic acid / A. Bujacz, J.A. Talaj, K. Zielinski, A.J. Pietrzyk-Brzezinska, P. Neumann // *Acta Crystallograph. Section D Structural Biology*. – 2017. – V. 73 (11). – P. 896–909.
128. Olivieri, J.R. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle x-ray scattering / J.R. Olivieri, A.F. Craievich // *Eur. Biophys. J.* – 1995. – V. 24. – P. 77–84.
129. Majorek, K.A. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins / K.A. Majorek, P.J. Porebski, A. Dayal, M.D. Zimmerman, K. Jablonska, A.J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor // *Mol. Immunol.* – 2012. – V. 52 (3–4). – P. 174–182.
130. Paris, G. About the structural role of disulfide bridges in serum albumins: Evidence from protein simulated unfolding / G. Paris, S. Kraszewski, C. Ramseyer, M. Enescu // *Biopolymers*. – 2012. – V. 97(11). – P. 889–898.
131. Xue, J. Advanced Glycation End Product Recognition by the Receptor for AGEs / J. Xue, V. Rai, D. Singer, S. Chabierski, J. Xie, S. Reverdatto, D.S. Burz, A.M. Schmidt, R. Hoffmann, A. Shekhtman // *Structure*. – 2011. – V. 19(5). – P. 722–732.
132. Гончаров, Н.В. О ферментативной активности альбумина / Н.В. Гончаров, Д.А. Белинская, А.В. Разыграев, А.И. Уколов // *Биоорганическая Химия*. – 2015. – Т 41. – № 2. – С. 131–144.
133. Harmon, R.J. Changes in lactoferrin, immunoglobulin G, bovine serum albumin, and alpha-lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows / R.J. Harmon, F.L. Schanbacher, L.C. Ferguson, K.L. Smith // *Infect. Immun.* – 1976. – V. 13 (2). – P. 533–542.
134. *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1A. Proteins: Basic aspects*. 4th ed. 11. Minor Proteins, Including Growth Factors / P.C. Wynn, P.A. Sheehy.; P.L.H. McSweeney and P.F. Fox, ed. – New York, NY: Springer Science+Business Media, 2013. – P. 317–334.
135. Restani, P. Characterization of bovine serum albumin epitopes and their role in allergic reactions / P. Restani, C. Ballabio, A. Cattaneo, P. Isoardi, L. Terracciano, A. Fiocchi // *Allergy*. – 2004. – V. 59. – P. 21–24.
136. Persaud, D.R. Bovine serum albumin and insulin-dependent diabetes mellitus: is cow's milk still a possible toxicological causative agent of diabetes? / D.R. Persaud, A. Barranco-Mendoza // *Food Chem. Toxicol.* – 2004. – V. 42 (5). – P. 707–714.
137. Schanbacher, F.O. Bovine mammary lactoferrin: Implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins / F.O. Schanbacher, R.E. Goodman, R.S. Talhouk // *J. Dairy Sci.* – 1993. – V. 76. – P. 3812–3831.
138. Groves, M.L. The isolation of a red protein from milk / M.L. Groves // *J. Am. Chem. Soc.* – 1960. – V. 82. – P. 3345–3350.
139. *Milk Proteins: Vol. II. Minor milk proteins and enzymes* / M.L. Groves.; H.A. McKenzie, ed. – New York, NY: Academic Press, 1971. – P. 367–418.
140. Masson, P.L. An iron-binding protein common to many external secretions / P.L. Masson, J.F. Heremans, C. Dive // *Clin. Chim. Acta*. – 1966. – V. 14. – P. 735–738.
141. Baggiolini, M. The enzymes of the granules of polymorphonuclear leukocytes and their functions / M. Baggiolini // *Enzyme*. – 1972. – V. 13. – P. 132–60.
142. Hurley, W.L. Electrophoretic comparisons of lactoferrin from bovine mammary secretions, milk neutrophils, and human milk / W.L. Hurley, R.C.J. Grieve, C.E. Magura. H.M. Hegarty, S. Zou // *J. Dairy Sci.* – 1993. – V. 76. – P. 377–387.
143. Mead, P.E. cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin / P.E. Mead, J.W. Tweedie // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – V. 18. – P. 7167–7175.

144. Goodman, R.E. Bovine lactoferrin mRNA: Sequence, analysis, and expression in the mammary gland / R.E. Goodman, F.L. Schanbacher // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1991. – V. 180. – P. 75–84.
145. Pierce, A. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactoferrin / A. Pierce, D. Colavizza, M. Benaissa, P. Maes, A. Tartar, J. Montreuil, G. Spik // *Eur. J. Biochem.* – 1991. – V. 196. – P. 177–184.
146. UniProt KB – P24627 (TRFL_BOVIN) – открытая база данных последовательностей белков. Lactotransferrin. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P24627> (дата обращения: 05.05.2022).
147. Moore, S.A. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution / S.A. Moore, B.F. Anderson, C.R. Groom, M. Haridas, E.N. Baker // *J. Mol. Biol.* – 1997. – V. 274. – P. 222–236.
148. Wei, Z. Presence of a glycan at a potential-glycosylation site, Asn-281, of bovine lactoferrin / Z. Wei, T. Nishimura, S. Yoshida // *J. Dairy Sci.* – 2000. – V. 83. – P. 683–689.
149. Зобкова, З.С. О роли антибактериальных факторов в повышении стойкости молока / З.С. Зобкова, А.В. Мишина, В.В. Смолянинов, Г.В. Шехватова // *Молочная промышленность*. – 2007. – №8. – С. 37–38.
150. Бейкер, Е.Н. Лактоферрин: свойства и применение / Е.Н. Бейкер, Х.М. Бейкер, Н. Кун, Р.Д. Кидд // *Молочная промышленность*. – 2006. – №2. – С. 38–39.
151. Wang, B. Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion / B. Wang, Y.P. Timilsena, E. Blanch, B. Adhikari // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2019. – V. 59 (4). – P. 580–596.
152. Baker, E.N. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin / E.N. Baker, H.M. Baker // *Biochimie*. – 2009. – V. 91(1). – P. 3–10.
153. Steijns, J.M. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin / J.M. Steijns, A.C.M. van Hooijdonk // *Br. J. Nutr.* – 2000. – V. 84. – P. S11–S17.
154. *Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 606: Bioactive Components Of Milk. II Biological Activity of Native Milk Proteins: Species-Specific Effects. Lactoferrin Structure and Functions* / D. Legrand, A. Pierce, E. Ellass, M. Carpentier, C. Mariller, J. Mazurier.; Z. Bösze, ed. – New York, NY: Springer, 2008. – P. 163–194.
155. Vogel, H.J. Lactoferrin, a bird's eye view / H.J. Vogel // *Biochem. Cell Biol.* – 2012. – V. 90(3). – P. 233–244.
156. *Advances in Experimental Medicine and Biology: Protein-Metal Interactions. Lactoferrin conformation and metal binding properties* / R.M. Parry, Jr., E.M. Brown.; M. Friedman, ed. – New York, NY: Plenum Press, 1974. – P. 141–160.
157. Brown, E.M. A spectroscopic study of bovine lactoferrin / E.M. Brown, R.M. Parry, Jr. // *Biochemistry*. – 1974. – V. 13. – P. 4560–4565.
158. Abdallah, F.B. Transferrins: Iron release from lactoferrin / F.B. Abdallah, J.M. El Hage Chahine // *J. Mol. Biol.* – 2000. – V. 303. – P. 255–266.
159. Kell, D.B. The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria / D.B. Kell, E.L. Heyden, E. Pretorius // *Frontiers Immunol.* – 2020. – V. 11. – Article 1221. eCollection 2020. DOI:10.3389/fimmu.2020.01221.
160. Ward, P.P. Lactoferrin and host defense / P.P. Ward, S. Uribe-Luna, O.M. Conneeley // *Biochem. Cell Biol.* – 2002. – V. 80. – P. 95–102.
161. Kutila, T. Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens / T. Kutila, S. Pyörlä, H. Saloniemi, L. Kaartinen // *Acta Vet. Scand.* – 2003. – V. 44. – N (1–2). – P.35–42.
162. Smith, K.L. Lactoferrin as a factor of resistance to infection of the bovine mammary gland / K.L. Smith, F.L. Schanbacher // *JAVMA*. – 1977. – V. 170. – P. 1224–1227.

163. Bullen, J.J. Role of iron in bacterial infection / J.J. Bullen, H.J. Rogers, E. Griffiths // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 1978. – V. 80. – P. 1–35.
164. Arnold, R.R. A bactericidal effect for human lactoferrin / R.R. Arnold, M.F. Cole, A. McGhee, Jr. // *Science.* – 1977. – V. 197. – P. 263–265.
165. Barbiroli, A. Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging / A. Barbiroli, F. Bonomi, G. Capretti, S. Iametti, M. Manzoni, L. Piergiovanni, M. Rollini // *Food Control.* – 2012. – V. 26(2). – P. 387–392.
166. González-Chávez, S.A. Lactoferrin: structure, function and applications / S.A. González-Chávez, S. Arévalo-Gallegos, Q. Rascón-Cruz // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2009. – V. 33(4). – P. 301.e1–301.e8. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020.
167. Barboza, M. Glycosylation of human milk lactoferrin exhibits dynamic changes during early lactation enhancing its role in pathogenic bacteria-host interactions / M. Barboza, J. Pinzon, S. Wickramasinghe, J.W. Froehlich, I. Moeller, J.T. Smilowitz, L.R. Ruhaak, J. Huang, B. Lönnér-dal, J. B. German, J.F. Medrano, B.C. Weimer, C.B. Lebrilla // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2012. – V. 11(6). – M111-015248. DOI:10.1074/mcp.m111.015248.
168. Vogel, H.J. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides / H.J. Vogel, D.J. Schibli, W. Jing, E.M. Lohmeier-Vogel, R.F. Epand, R.M. Epand // *Biochem. Cell Biol.* – 2002. – V. 80. – P. 49–63.
169. Strom, M.B. Important structural features of 15-residue lactoferrin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity / V.B. Strom, B.E. Haug, O. Rekdal, M.L. Skar, W. Stensen, J.S. Svendsen // *Biochem. Cell Biol.* – 2002. – V. 80. – P. 65–74.
170. Hoek, K.S. Antibacterial Activity of Bovine Lactoferrin-Derived Peptides / K.S. Hoek, J.M. Milne, P.A. Grieve, D.A. Dionisius, R. Smith // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1997. – V. 41. – N 1. – P 54–59.
171. Tomita, M. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin / M. Tomita, W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase // *J. Dairy Sci.* – 1991. – V. 74. – P. 4137–4142.
172. Bellamy, W. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin / W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, M. Tomita // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – V. 1121. – P. 130–136.
173. Bellamy, W. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin / W. Bellamy, M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase, M. Tomita // *J. Appl. Bacteriol.* – 1992. – V. 73. – P. 472–479.
174. Bellamy, W. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin / W. Bellamy, H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura, M. Tomita // *Med. Microbiol. Immunol.* – 1993. – V. 182. – P. 97–105.
175. Bellamy, W. Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin / W. Bellamy, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, M. Takase, N. Takakura, S. Shimamura, M. Tomita // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1994. – V. 18. – P. 230–233.
176. Hwang, P.M. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin / P.M. Hwang, N. Zhou, X. Shan, C.H. Arrowsmith, H.J. Vogel // *Biochem.* – 1998. – V. 37. – N 12. – P. 4288–4298.
177. Shimazaki, K. Susceptibility of bovine lactoferrin to plasmin and chymosin / K. Shimazaki, S. Nagata, Y.C. Yoo // *Agric. Biol. Chem.* – 1991. – V. 56. – P. 1125–1126.
178. Sijbrandij, T. Effects of lactoferrin derived peptides on simulants of biological warfare agents / T. Sijbrandij, A.J. Ligtenberg, K. Nazmi, E.C. Veerman, J.G. Bolscher, F.J. Bikker // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – V. 33(1) : 3. DOI: 10.1007/s11274-016-2171-8.

179. Lang, J. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans / J. Lang, N. Yang, J. Deng, K. Liu, P. Yang, G. Zhang, C. Jiang // PLoS ONE. – 2011. – V. 6(8). – e23710. DOI: 10.1371/journal.pone.0023710.
180. Redwan, E.M. Potential lactoferrin activity against pathogenic viruses / E.M. Redwan, V.N. Uversky, E.M. El-Fakharany, H. Al-Mehdar // C. R. Biol. – 2014. – V. 337. – P. 581–95.
181. Chen, J.M. Bovine lactoferrin inhibits dengue virus infectivity by interacting with heparan sulfate, lowdensity lipoprotein receptor, and DC-SIGN / J.M. Chen, Y.C. Fan, J.W. Lin, Y.Y. Chen, W.L. Hsu, S.S. Chiou // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – V. 18. – E1957. DOI: 10.3390/ijms18091957.
182. Carvalho, C.A.M. Bovine lactoferrin activity against Chikungunya and Zika Viruses / C.A.M. Carvalho, S.M.M. Casseb, R.B. Goncalves, E.V.P. Silva, A.M.O. Gomes, P.F.C. Vasconcelos // J. Gen. Virol. – 2017. – V. 98. – P. 1749–1754.
183. Van der Strate, B.W.A. Antiviral activities of lactoferrin. (Review) / B.W.A. Van der Strate, L. Beljaars, G. Molema, M.C. Harmsen, D.K.F. Meijer // Antiviral Res. – 2001. – V. 52. – P. 225–239.
184. Belting, M. Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier / M. Belting // Trends Biochem. Sci. – 2003. – V. 28. – P. 145–151.
185. Drobni, P. Lactoferrin inhibits human papillomavirus binding and uptake *in vitro* / P. Drobni, J. Näslund, M. Evander // Antiviral Res. – 2004. – V. 64. – P. 63–68.
186. Puddu, P. Antiviral effect of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection / P. Puddu, P. Borghi, S. Gessani, P. Valenti, F. Belardelli, L. Seganti // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 1998. – V. 30. – P. 1055–1062.
187. Superti, F. Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection / F. Superti, R. Siciliano, B. Rega, F. Giansanti, P. Valenti, G. Antonini // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – V. 1528. P. 107–115.
188. Sarrazin, S. Heparan sulfate proteoglycans / S. Sarrazin, W.C. Lamanna, J.D. Esko // Cold Spring Harbor Perspect. Biol. – 2011. – V. 3. – a004952. DOI: 10.1101/cshperspect.a004952.
189. Mehta, P. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression / P. Mehta, D.F. McAuley, M. Brown, E. Sanchez, R.S. Tattersall, J.J. Manson // Lancet. – 2020. – V. 395. – P. 1033–1034.
190. Wu, D. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: an emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib / D. Wu, X.O. Yang // Microbiol. Immunol. Infect. – 2020. – DOI: 10.1016/j.jmii.2020.03.005. [Epub ahead of print].
191. Wan, Y. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus / Y. Wan, J. Shang, R. Graham, R.S. Baric, F. Li // J. Virol. – 2020. – V. 94. – e00127-20. DOI: 10.1128/JVI.00127-20.
192. Baig, A.M. Evidence of the COVID-19 virus targeting the CNS: tissue distribution, host-virus interaction, and proposed neurotropic mechanisms / A.M. Baig, A. Khaleeq, U. Ali, H. Syeda // ACS Chem. Neurosci. – 2020. – V. 11. – P. 995–998.
193. Conference Abstracts. Abstracts of 5th Int. Conf. Lactoferrin: Structure, Function and Applications. Biochem. Cell Biol. – 2002. – V. 80. – P. 137–168.
194. Зобкова, З.С. Антимикробные свойства лактоферрина / З.С. Зобкова, А.В. Мишина, А.В. Бегунова // Молочная промышленность. – 2007. – №10. – С.60.
195. Horton, B.S. Commercial utilization of minor milk components in the health and food industries / B.S. Horton // J. Dairy Sci. – 1995. – V. 78. – P. 2584–2589.
196. Тамура, И. Производство лактоферрина / И. Тамура // Молочная промышленность. – 2006. – №2. – С. 39–40.
197. Sanchez, L. Kinetic parameters for denaturation of bovine milk lactoferrin / L. Sanches, J.M. Peiro, H. Castillo, M.D. Perez, J.M. Ena, M. Calvo // J. Food Sci. – 1992. – V. 57. – P. 873–879.

198. Abe, H. Heat stability of bovine lactoferrin at acidic pH / H. Abe, H. Saito, H. Miyakawa, Y. Tamura, S. Shimamura, E. Nagao, M. Tomita // *J. Dairy Sci.* – 1991. – V. 74. – P. 65–71.
199. Kawakami, H. Effects of enteric-coated lactoferrin supplementation on the immune function of elderly individuals: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial / H. Kawakami, H. Park, S. Park, H. Kuwata, R.J. Shephard, Y. Aoyagi // *Int. Dairy J.* – 2015. – V. 47. – P. 79–85.
200. Takeuchi, T. Enteric-formulated lactoferrin was more effectively transported into blood circulation from gastrointestinal tract in adult rats / T. Takeuchi, T. Jyonotsuka, N. Kamemori, G. Kawano, H. Shimizu, K. Ando, E. Harada // *Exp. Physiol.* – 2006. – V. 91. – P. 1033–1040.
201. Massucci, M.T. Proteolytic activity of bovine lactoferrin / M.T. Massucci, F. Giansanti, G. Di Nino, M. Turacchio, M.F. Giardi, D. Botti, R. Ippoliti, B. De Giulio, R. Siciliano, G. Donnarumma, P. Valenti, A. Bocedi, F. Polticelli, P. Ascenzi, G. Antonini // *BioMetals.* – 2004. – V. 17 (3). – P. 249–255.
202. Whitney, R.M. Nomenclature of the proteins of cow's milk: Fourth revision / R.M. Whitney, J.R. Brunner, K.E. Ebner, H.M. Farrell, Jr., R.V. Josephson, C.V. Morr, H.E. Swaisgood // *J. Dairy Sci.* – 1976. – V. 59. – P. 795–815.
203. Aalund, G.D. Proposed nomenclature for the immunoglobulins of the domesticated Bovidae / G.D. Aaiund, J.E. Butler, J.R. Duncan, M.J. Freeman, R. Jenness, J.M. Kehoe, J.-P. Mach, J. Rapacz, M.-P. Vaerman, A.J. Winter // *Can. J. Comp. Med.* – 1971. – V. 35. – P. 346–348.
204. Ambrosius, H. Proposed rules for the designation of immunoglobulins of animal origin / H. Ambrosius, R. Asofsky, R.A. Binaghi, D. Capra, L. Hood, E. Orlans, D.S. Rowe, P. Small, G. Torrigiani, J.-P. Vaerman // *Bull. World Health Org.* – 1978. – V. 56. – P. 815–817.
205. Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th ed. / E.A. Kabat, T.T. Wu, H.M. Perry, K.S. Gottsman, C. Foeller.; Washington, DC: US Dept. Health Human Serv., US Govt. Printing Office, 1991. – NIH Publ. No. 91–3242.
206. The Immunoglobulin Facts Book / M.-P. Le Franc, G. Le Franc.; San Diego, CA: Academic Press, 2001. – P. 1–457.
207. Hurley, W.L. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk / W.L. Hurley, P.K. Theil // *Nutrients.* – 2011. – V. 3. – P. 442–474.
208. Borghesi, J. Immunoglobulin Transport during Gestation in Domestic Animals and Humans – A Review / L.C. Mario, M.N. Rodrigues, P.O. Favaron, M.A. Miglino // *Open J. Animal Sci.* – 2014. – V. 4. – P. 323–336.
209. Lopes-Marques, M. Unusual loss of chymosin in mammalian lineages parallels neo-natal immune transfer strategies / M. Lopes-Marques, R. Ruivo, E. Fonseca, A. Teixeira, L. F. C. Castro // *Mol. Phylogenetics and Evolution.* – 2017. – V. 116. – P. 78–86.
210. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1A. Proteins: Basic aspects. 4th ed. 9. Immunoglobulins in Mammary Secretions / W.L. Hurley, P.K. Theil.; P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, ed. – New York, NY: Springer Science+Business Media, 2013. – P. 275–294.
211. Butler, J.E. Bovine immunoglobulins: An augmented review / J.E. Butler // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 1983. – V. 4. – P. 43–151.
212. Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins. Immunoglobulins of the mammary secretions / B.L. Larson.; P.F. Fox, ed. – New York, NY: Elsevier Applied Science, 1992. – P. 231–254.
213. Progress in Veterinary Microbiology and Immunology. Vol. 2. Biochemistry and biology of ruminant immunoglobulins / J.E. Butler.; R. Pandey, S. Karger, ed. – Basel, Switzerland, 1985. – P. 1–53.
214. Harris, L.J. The Three-Dimensional Structure of an Intact Monoclonal Antibody for Canine Lymphoma / L.J. Harris, S.B. Larson, K.W. Hasel, J. Day, A. Greenwood, A. McPherson // *Nature.* – 1992. – V. 360. – P. 369–372.

215. Mucosal Immunology. Microbial evasion of IgA functions / M. Kilian, M.W. Russell.; P.L. Ogra, J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J.R. McGhee, ed. – New York, NY: Academic Press, 1998. – P. 241–251.
216. Moser, M. Key concepts in immunology / M. Moser, O. Leo // *Vaccine*. – 2010. – V. 28S. – P. C2–C13.
217. Kulseth, M.A. Cloning and characterization of the bovine immunoglobulin J chain cDNA and its promoter region / M.A. Kulseth, S. Rogne // *DNA Cell Biol.* – 1994. – V. 13. – P. 37–42.
218. Kobayashi, K. Identification of J-chain in polymeric immunoglobulins from a variety of species by cross-reaction with rabbit antisera to human J-chain / K. Kobayashi, J.-P. Vaerman, H. Bazin, A.-M. Lebacqz-Verheyden, J.F. Heremans // *J. Immunol.* – 1973. – V. 111. – P. 1590–1594.
219. Komar, R. Isolation and characterization of J-chain from bovine colostrum immunoglobulin M / R. Komar, T.K.S. Mukkur // *Can. J. Biochem.* – 1975. – V. 53. – P. 943–949.
220. Kanno, C. Purification and characterization of the agglutinating factor for lactic streptococci from bovine milk: IgM-immunoglobulin / C. Kanno, D.B. Emmons, V.R. Harwalkar, J.A. Elliott // *J. Dairy Sci.* – 1976. – V. 59. – P. 2036–2045.
221. Кульберг, А.Я. Молекулярная иммунология: учеб. Пособие для вузов / А.Я. Кульберг. – М.: Высш. школа, 1985. – 287 с.
222. Kulseth, M.A. Cloning and characterization of two forms of bovine polymeric immunoglobulin receptor DNA / M.A. Kulseth, P. Krajci, O. Myklebost, S. Rogne // *DNA Cell Biol.* – 1995. – V. 14. – P. 251–256.
223. Peterson, P.A. β 2-Microglobulin – A free immunoglobulin domain / P.A. Peterson, B.A. Cunningham, I. Berggard, G.M. Edelman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1972. – V. 69. – P. 1697–1701.
224. Groves, M.L. Isolation, characterization and amino acid composition of a new crystalline protein, lactollin from milk / M.L. Groves, J.J. Basch, W.G. Gordon // *Biochemistry*. – 1963. – V. 2. – P. 2814–817.
225. Rabbani, H. Polymorphism of the IgHG3 gene in cattle / H. Rabbani, W.R. Brown, J.E. Butler, L. Hammarström // *Immunogenetics*. – 1997. – V. 46. – P. 326–331.
226. Guidry, A.J. IgA, IgG1, IgG2, IgM, and SA in serum and mammary secretion throughout lactation / A.J. Guidry, J.E. Butler, R.B. Pearson, B.T. Weinland // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 1980. – V. 1. – P. 329–341.
227. Butler, J.E. Studies on the relative synthesis and distribution of IgA and IgG in various tissues and body fluids of the cow / J.E. Butler, C.F. Maxwell, C.S. Pierce, M.B. Hylton, R. Asofsky, C.A. Kiddy // *J. Immunol.* – 1972. – V. 109. – P. 38–46.
228. Butler, J.E. The heterogeneity of bovine IgG2 – I. The A1 allotypic determinant is the major antigenic determinant recognized on bovine IgG2a by polyclonal rabbit anti-IgG2a / J.E. Butler, H. Heyermann // *Mol. Immunol.* – 1986. – V. 23. – P. 291–296.
229. Hidioglou, M. Effect of vitamin E supplementation and of health status of mammary gland on immunoglobulin concentration in milk of dairy cows / M. Hidioglou, T.R. Batra, K. H. Nielsen // *Ann. Rech. Vet.* – 1992. – V. 23. – P. 139–144.
230. Mucosal Immunology, 3rd ed. Immunocytes and immunoglobulins in milk / J.E. Butler, M.E. Kehrli, Jr.; P.L. Ogra, J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J.R. McGhee, J. Bienenstock, ed. – New York, NY: Academic Press, 2004. – P. 267–275.
231. The Ruminant Immune System. Humoral factors in the secretory immune system of ruminants / K.L. Morgan, F.J. Bourne, T.J. Newby, P.A. Bradley.; J.E. Butler, ed. – New York, NY: Plenum Press, 1981. – P. 391–411.
232. Kulczynski, A.J., Jr. Bovine milk IgG, but not serum IgG, inhibits pokeweed mitogen-induced antibody secretion by human peripheral blood mononuclear cell / A.J. Kulczynski, Jr., G.S. Nash, M.J. Bertovich, H.D. Burack, R.P. MacDermott // *J. Clin. Immunol.* – 1987. – V. 7. – P. 37–45.

233. Gorczyca, W. Immunoglobulins of colostrum. – VI. Comparative studies of cytophilic properties of bovine serum and colostrum IgG / W. Gorczyca, M. Ugorski, W. Nowacki, J. Lisowski J // *Mol. Immunol.* – 1986. – V. 23. – P. 961–964.
234. Kacs Kovics, I. Cloning and characterization of bovine MHC class I-like Fc receptor / I. Kacs Kovics, Z. Wu, N. Simister, V.L. Frenyo, L. Hammarstrom // *J. Immunol.* – 2000. – V. 164. – P. 1889–1897.
235. Frenyo, V.L. The association of extrinsic bovine IgG1, IgG2, SIgA and IgM with the major fractions and cells of milk / V.L. Frenyo, J.E. Butler, A.J. Guidry // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 1986. – V. 13. – P. 239–254.
236. Chen, C.-C. Effect of thermal protectants on the stability of bovine milk immunoglobulin G / C.-C. Chen, H.-M. Chang // *J. Agric. Food Chem.* – 1998. – V. 46. – P. 3570–3576.
237. Chen, C.-C. Thermal stability of bovine milk immunoglobulin G (IgG) and the effect of added thermal protectants on the stability / C.-C. Chen, Y.-Y. Tu, H.-M. Chang // *J. Food Sci.* – 2000. – V. 65. – P. 188–193.
238. Mainer, G. Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG, IgA and IgM / G. Mainer, L. Sanchez, J.M. Ena, M. Calvo // *J. Food Sci.* – 1997. – V. 62. – P. 1034–1038.
239. Godden, S.M. Effect of on-farm commercial batch pasteurization of colostrum on colostrum and serum immunoglobulin concentrations in dairy calves / S.M. Godden, S. Smith, J.M. Feirtag, L.R. Green, S.J. Wells, J.P. Fetrow // *J. Dairy Sci.* – 2003. – V. 86. – P. 1503–1512.
240. Godden, S. Heat-treatment of bovine colostrum. II: effects of heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G / S. Godden, S. McMartin, J. Feirtag, J. Stabel, R. Bey, S. Goyal, L. Metzger, J. Fetrow, S. Wells, H. Chester-Jones // *J. Dairy Sci.* – 2006. – V. 89. – P. 3476–3483.
241. McMartin, S. Heat treatment of bovine colostrum. I: effects of temperature on viscosity and immunoglobulin G level / S. McMartin, S. Godden, L. Metzger, J. Feirtag, R. Bey, J. Stabel, S. Goyal, J. Fetrow, S. Wells, H. Chester-Jones // *J. Dairy Sci.* – 2006. – V. 89. – P. 2110–2118.
242. Elizondo-Salazar, J.A. Effect of heat treatment of bovine colostrum on bacterial counts, viscosity, and immunoglobulin G concentration / J.A. Elizondo-Salazar, B.M. Jayarao, A.J. Heinrichs // *J. Dairy Sci.* – 2010. – V. 93. – P. 961–967.
243. Calmettes, P. Temperature and pH dependence of immunoglobulin G conformation / P. Calmettes, L. Cser, E. Rajnavolgy // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1991. – V. 291. – P. 277–283.
244. Dominguez, E. Effect of heat treatment on the antigen-binding activity of anti-peroxidase immunoglobulin in bovine colostrum / E. Dominguez, M.D. Perez, M. Calvo // *J. Dairy Sci.* – 1997. – V. 80. – P. 3182–3187.
245. Dominguez, E. Effect of pH on antigen-binding activity of IgG from bovine colostrum upon heating. / E. Dominguez, M.D. Perez, P. Puyol, L. Sanchez, M. Calvo // *J. Dairy Res.* – 2001. – V. 68. – P. 511–518.
246. Mainer, G. Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG, IgA and IgM. / G. Mainer, L. Sanchez, J.M. Ena, M. Calvo // *J. Food Sci.* – 1997. – V. 62. – P. 1034–1038.
247. Li-Chan, E. Stability of bovine immunoglobulins to thermal treatment and processing / E. Li-Chan, A. Kummer, J.N. Loso, D.D. Kitts, S. Nakai // *Food Res. Int.* – 1995. – V. 28. – P. 9–16.
248. Shimizu, M. Comparative studies in molecular stability of immunoglobulin G from different species / M. Shimizu, H. Nagashima, K. Hasimoto // *Comp. Biochem. Physiol. B.* – 1993. – V. 106. – P. 255–261.
249. Gao, W. Specific activity against diarrheagenic bacteria in bovine immune milk and effect of pH on its antigenbinding activity upon heating / W. Gao, L. Chen, L.B. Xu, X.H. Huang // *J. Dairy Res.* – 2010. – V. 77. – P. 220–224.

250. 164. UK Patent, International Class: A61K 35/20, A61P 31/00. Specific immune milk / A.J. Morris, D.W. Gorst, D.R. Telford, L.A. Bishop, A.D. Higham. – No. 2,362,572; Dept of Pathology, Royal Lancaster Infirmary, Filed 04.04. 2000; 28.11.2001.
251. Encyclopedia of dairy sciences. Immunoglobulins / P. Marnila, H. Korhonen.; H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox, ed. – London, UK: Academic Press, 2002. – P. 1950–1956.
252. Mehra, R. Milk immunoglobulins for health promotion / R. Mehra, P. Marnila, H. Korhonen // *Int. Dairy J.* – 2006. – V. 16. – P. 1262–1271.
253. Korhonen, H. Bovine milk antibodies for health / H. Korhonen, P. Marnila, S. H. Gill // *Br. J. Nutr.* – 2000. – V. 84 (Suppl. 1). – P. 135–146.
254. Lilius, E.M. The role of colostral antibodies in prevention of microbial infections / E.M. Lilius, P. Marnila // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2001. – V. 14. – P. 295–300.
255. Marnila, P. Prevention and suppression of *Helicobacter felis* infection in mice using colostral preparation with specific antibodies / P. Marnila, S. Rokka, L. Rehnberg-Laiho, P. Kärkkäinen, U.T. Kosunen, H. Rautelin // *Helicobacter*. – 2003. – V. 8. – P. 192–201.
256. Tawfeek, H.I. Efficacy of an infant formula containing anti-*E. coli* colostral antibodies from hyperimmunized cows in preventing diarrhea in infants and children: A field trial / H.I. Tawfeek, H.N. Najim, S. Al-Mashikhi // *Int. J. Infect. Dis.* – 2003. – V. 7. – P. 120–128.
257. Liu, G.L. Specific immune milk production of cows implanted with antigen-release devices / G.L. Liu, J.Q. Wang, D.P. Bu, J.B. Cheng, C.G. Zhang, H.Y. Wei, L.Y. Zhou, K.L. Liu, X.L. Dong // *J. Dairy Sci.* – 2009. – V. 92. – P. 100–108.
258. Sjölander, A. ISCOMs: An adjuvant with multiple functions / A. Sjölander, J.C. Cox, I.G. Barr // *J. Leukoc. Biol.* – 1998. – V. 12. – P. 713–723.
259. Pearce, M.J. ISCOMATRIX™ adjuvant: A potent inducer of humoral and cellular immune responses / M.J. Pearce, D. Drane // *Vaccine*. – 2004. – V. 19. – P. 2391–2395.
260. Kolb, F.A. Engineering immunity in the mammary gland / F.A. Kolb // *J. Mammary Gland Biol.* – 2002. – V. 7. – P. 123–134.
261. Lawrence, R.M. Human breast milk: Current concepts of immunology and infectious diseases / R.M. Lawrence, C.A. Pane // *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care*. – 2007. – V. 37. – P. 7–36.
262. Dewey, K.G. Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants / K.G. Dewey, M. J. Heinig, L. A. Nommsen-Rivers // *J. Pediatr.* – 1995. – V. 126. – P. 696–702.
263. Tomita, M. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: Production and applications / M. Tomita, H. Wakabayashi, K. Yamauchi, S. Teraguchi, H. Hayasawa // *Biochem. Cell Biol.* – 2002. – V. 80. – P. 109–112.
264. Hanson, L.A. Breast-feeding, infant formulas, and the immune system / L.A. Hanson, M. Korotkova, E. Telemo // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2003. – V. 90. – P. 59–63.
265. Field, C.J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants / C.J. Field // *J. Nutr.* – 2005. – V. 135. – P. 1–4.
266. Sodek, J. Osteopontin / J. Sodek, B. Ganss, M.D. McKee // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* – 2000. – V. 11. – P. 279–303.
267. Sörensen, E.S. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: Identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites / E.S. Sörensen, P. Höjrup, T.E. Petersen // *Protein Sci.* – 1995. – V. 4. – P. 2040–2049.
268. Christensen, B. Posttranslationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters. Identification of thirty-six phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications / B. Christensen, M.S. Nielsen, K.F. Haselmann, T.E. Petersen, E.S. Sörensen // *Biochem. J.* – 2005. – V. 390. – P. 285–292.

269. Sørensen, E.S. Phosphorylation, glycosylation and amino acid sequence of component PP3 from the proteose peptone fraction of bovine milk / E.S. Sørensen, T.E. Petersen. // J. Dairy Res. – 1993. – V. 60. – P. 535–542.
270. Sørensen, S. Purification and characterization of osteopontin from human milk / S. Sørensen, S. J. Justesen, A. H. Johnsen // Protein Expr. Purif. – 2003. – V. 30. – P. 238–245.
271. Nemir, M. Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal morphogenesis and lactation deficiency / M. Nemir, D. Bhattacharyya, X. Li, K. Singh, A. B. Mukherjee, B.B. Mukherjee // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275. – P. 969–976.
272. Rittling, S.R. Osteopontin expression in mammary gland development and tumorigenesis / S.R. Rittling, K.E. Novick // Cell Growth Differ. – 1997. – V. 8. – P. 1061–1069.
273. Azuma, N. A rapid method for purifying osteopontin from bovine milk and interaction between osteopontin and other milk proteins / N. Azuma, A. Maeta, K. Fukuchi, C. Kanno // Int. Dairy J. – 2006. – V. 16. – P. 370–378.
274. Gericke, A. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization / A. Gericke, C. Qin, L. Spevak, Y. Fujimoto, W.T. Butler, E.S. Sørensen, A.L. Boskey // Calcif. Tissue Int. – 2005. – V. 77. – P. 45–54.
275. Ohri, R. Mitigation of ectopic calcification in osteopontin-deficient mice by exogenous osteopontin / R. Ohri, E. Tung, R. Rajachar, C.M. Giachelli // Calcif. Tissue Int. – 2005. – V. 76. – P. 307–315.
276. Asplin, J.R. Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization / J.R. Asplin, D. Arsenault, J.H. Parks, F.L. Coe, J.R. Hoyer // Kidney Int. – 1998. – V. 53. – P. 194–199.
277. Wang, K.X. Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses / K.X. Wang, D.T. Denhardt // Cytokine Growth Factor Rev. – 2008. – V. 19. – P. 333–345.
278. Santana, M.A. What it takes to become an effector T cell: The process, the cells involved, and the mechanisms / M.A. Santana, Y. Rosenstein // J. Cell. Physiol. – 2003. – V. 195. – P. 392–401.
279. Ashkar, S. Eta-1 (osteopontin): An early component of type-1 (cell-mediated) immunity / S. Ashkar, G.F. Weber, V. Panoutsakopoulou, M.E. Sanchirico, M. Jansson, S. Zawaideh, S.R. Rittling, D.T. Denhardt, M.J. Glimcher, H. Cantor // Science. – 2000. – V. 287. – P. 860–864.
280. Rollo, E.E. The cytokine osteopontin modulates the severity of rotavirus diarrhea / E.E. Rollo, S.J. Hempson, A. Bansal, E. Tsao, I. Habib, S.R. Rittling, D.T. Denhardt, E.R. Mackow, R.D. Shaw // J. Virol. – 2005. – V. 79. – P. 3509–3516.
281. Schack, L. Osteopontin enhances phagocytosis through a novel osteopontin receptor, the alphaX-beta2 integrin / L. Schack, R. Stapulionis, B. Christensen, E. Kofod-Olsen, U.B. Skov-Sørensen, T. Vorup-Jensen, E.S. Sørensen, P. Höllsberg // J. Immunol. – 2009. – V. 182. – P. 6943–6950.
282. Chatterton, D.E.W. *In vitro* digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Research on biological functions / D.E.W. Chatterton, J.T. Rasmussen, C.W. Heegaard, E.S. Sørensen, T.E. Petersen // Trends Food Sci. Technol. – 2004. – V. 15. – P. 373–383.
283. Joung, S. Early-Life Supplementation of Bovine Milk Osteopontin Supports Neurodevelopment and Influences Exploratory Behavior / S. Joung, J.E. Fil, A.B. Heckmann, A.S. Kvistgaard, R.N. Dilger // Nutrients. – 2020. – V. 12(8). – 2206. DOI:10.3390/nu12082206.
284. Patarca, R. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T lymphocyte activation-1/osteopontin gene / R. Patarca, R.A. Saavedra, H. Cantor // Crit. Rev. Immunol. – 1993. – V. 13. – P. 225–246.
285. Denhardt, D.T. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival / D.T. Denhardt, M. Noda, A.W. O'Regan, D. Pavlin, J.S. Berman // J. Clin. Invest. – 2001. – V. 107. – P. 1055–1061.

286. O'Regan, A. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation / A. O'Regan, J.S. Berman // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2000. – V. 81. – P. 373–90.
287. Yokosaki, Y. Distinct structural requirements for binding of the integrins $\alpha\text{v}\beta\text{6}$, $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{5}$, $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ and $\alpha\text{9}\beta\text{1}$ to osteopontin / Y. Yokosaki, K. Tanaka, F. Higashikawa, K. Yamashita, A. Eboshida // *Matrix Biol.* – 2005. – V. 24. – P. 418–27.
288. El-Tanani, M.K. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer / M.K. El-Tanani, F.C. Campbell, V. Kurisetty, D. Jin, M. McCann, P.S. Rudland // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2006. – V. 17. – P. 463–74.
289. Weber, G.F. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1) / G.F. Weber, S. Ashkar, M.J. Glimcher, H. Cantor // *Science.* – 1996. – V. 271. – P. 509–512.
290. Sodek, J. Osteopontin and mucosal protection / J. Sodek, A.P. Batista Da Silva, R. Zohar // *J. Dent. Res.* – 2006. – V. 85. – P. 404–415.
291. UniProt KB – P31096 (OSTP_BOVIN) – открытая база данных последовательностей белков. Osteopontin. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P31096> (дата обращения: 20.05.2022).
292. Kerr, J.M. The cDNA cloning and RNA distribution of bovine osteopontin / J.M. Kerr, L.W. Fisher, J.D. Termine, M.F. Young // *Gene.* – 1991. – V. 108(2). – P. 237–243.
293. Fisher, L.W. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin / L.W. Fisher, D.A. Torchia, B. Fohr, M.F. Young, N.S. Fedarko // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – V. 280. – P. 460–465.
294. Kalmar, L. Structural disorder in proteins brings order to crystal growth in biomineralization / L. Kalmar, D. Homola, G. Varga, P. Tompa // *Bone.* – 2012. – V. 51(3). – P. 528–534.
295. Agostoni, C. Breast-feeding: A commentary by the espghan Committee on Nutrition / C. Agostoni, C. Braegger, T. Decsi, S. Kolacek, B. Koletzko, K.F. Michaelsen, W. Mihatsch, L.A. Moreno, J. Puntis, R. Shamir, H. Szajewska, D. Turck, J. van Goudoever // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2009. – V. 49. – P. 112–125.
296. Lönnerdal, B. Infant formula and infant nutrition: Bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas / B. Lönnerdal // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2014. – V. 99. – P. 712–717.
297. Lönnerdal, B. Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implications for Infant Formulas / B. Lönnerdal // *J. Pediatr.* – 2016. – V. 173. – P. S4–S9.
298. Lönnerdal, B. Growth, nutrition, and cytokine response of breast-fed infants and infants fed formula with added bovine osteopontin / B. Lönnerdal, A.S. Kvistgaard, J.M. Peerson, S.M. Donovan, Y.M. Peng // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2016. – V. 62. – P. 650–657.
299. Donovan, S.M. Bovine Osteopontin Modifies the Intestinal Transcriptome of Formula-Fed Infant Rhesus Monkeys to Be More Similar to Those That Were Breastfed / S.M. Donovan, H.M. Monaco, J. Drnevich, A.S. Kvistgaard, O. Hernell, B. Lönnerdal // *J. Nutr.* – 2014. – V. 144. – P. 1910–1919.
300. Smolenski, G. Characterisation of Host Defence Proteins in Milk Using a Proteomic Approach / G. Smolenski, S. Haines, F.Y.-S. Kwan, J. Bond, V. Farr, S.R. Davis, K. Stelwagen, T. T. Wheeler // *J. Proteome Res.* – 2007. – V. 6(1). – P. 207–215.
301. Abdelmegid, S. Proteomic 2D-DIGE Analysis of Milk Whey from Dairy Cows with *Staphylococcus aureus* Mastitis Reveals Overexpression of Host Defense Proteins / S. Abdelmegid, D. Kelton, J. Caswell, G. Kirby // *Microorganisms.* – 2020. – V. 8(12). – 1883. DOI: 10.3390/microorganisms8121883.
302. D'Ambrosio, C. A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and de-

- fense against pathogens / C. D'Ambrosio, S. Arena, A.M. Salzano, G. Renzone, L. Ledda, A. Scaloni // *Proteomics*. – 2008. – V. 8(17). – P. 3657–3666.
303. Agregán, R. Proteomic Advances in Milk and Dairy Products / R. Agregán, N. Echegaray, M. López-Pedrouso, R. Kharabsheh, D. Franco, J.M. Lorenzo // *Molecules*. – 2021. – V. 26(13). – 3832. DOI: 10.3390/molecules26133832.
 304. Abdelmegid, S. Identification of Host Defense-Related Proteins Using Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of Milk Whey from Cows with *Staphylococcus aureus* Subclinical Mastitis / S. Abdelmegid, J. Murugaiyan, M. Abo-Ismael, J. Caswell, D. Kelton, G. Kirby // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – V. 19(1). – 78. DOI: 10.3390/ijms19010078.
 305. Maity, S. Quantitative alterations in bovine milk proteome from healthy, subclinical and clinical mastitis during *S. aureus* infection / S. Maity, D. Das, K. Ambatipudi // *J. Proteomics*. – 2020. – V. 223. – 103815. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103815.
 306. Strydom, D.J. An angiogenic protein from bovine serum and milk – purification and primary structure of angiogenin-2 / D.J. Strydom, M.D. Bond, B.L. Vallee // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – V. 247(2). – P. 535–544.
 307. Ye, X.Y. Isolation and characterization of angiogenin-1 and a novel protein designated lactogenin from bovine milk / X.Y. Ye, K.L. Cheng, T.B. Ng // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – V. 263(1). – P. 187–191.
 308. Crabtree, B. Biological and structural features of murine angiogenin-4, an angiogenic protein / B. Crabtree, D.E. Holloway, M.D. Baker, K.R. Acharya, V. Subramanian // *Biochemistry*. – 2007. – V. 46 (9). – P. 2431–2443.
 309. Trouillon, R. Angiogenin induces nitric oxide release independently from its RNase activity / R. Trouillon, D.-K. Kang, S. Chang, D. O'Hare // *Chem. Commun.* – 2011. – V. 47(12). – P. 3421–3423.
 310. Liu, X.H. Therapeutic potential of angiogenin modified mesenchymal stem cells: angiogenin improves mesenchymal stem cells survival under hypoxia and enhances vasculogenesis in myocardial infarction / X.H. Liu, C.G. Bai, Z.Y. Xu, S.D. Huang, Y. Yuan, D.J. Gong, J.R. Zhang // *Microvasc. Res.* – 2008. – V. 76(1). – P. 23–30.
 311. McLaughlin, R.L. Angiogenin levels and ANG genotypes: dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis / R.L. McLaughlin, J. Phukan, W. McCormack, D.S. Lynch, M. Greenway, S. Cronin, J. Saunders, A. Slowik, B. Tomik, P.M. Andersen, D.G. Bradley, P. Jakeman, O. Hardiman // *PLoS ONE*. – 2010. – V. 5(11). – e15402. DOI: 10.1371/journal.pone.0015402.
 312. Morita, Y. Identification of angiogenin as the osteoclastic bone resorption-inhibitory factor in bovine milk / Y. Morita, H. Matsuyama, A. Serizawa, T. Takeya, H. Kawakami // *Bone*. – 2008. – V. 42(2). – P. 380–387.
 313. Shcheglovitova, O.N. Cow milk angiogenin induces cytokine production in human blood leukocytes / O.N. Shcheglovitova, E.V. Maksyanina, I.I. Ionova, Y.L. Rustam'yan, G.S. Komolova // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2003. – V. 135(2). – P. 158–160.
 314. Rauvala, H. An 18 kDa heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors / H. Rauvala // *EMBO J.* – 1989. – V. 8. – P. 2933–2941.
 315. Bernard-Pierrot, I. Heparin affin regulatory peptide in milk: its involvement in mammary gland homeostasis / I. Bernard-Pierrot, J. Delb, M. Heroult, C. Rosty, P. Souli, D. Barritault, P.E. Milhiet, J. Courty // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – V. 314. – P. 277–282.
 316. Papadimitriou, E. HARP induces angiogenesis *in vivo* and *in vitro*: implication of N or C terminal peptides / E. Papadimitriou, A. Polykratis, J. Courty, P. Koolwijk, M. Heroult, P. Katsoris // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – V. 282 (1). – P. 306–313.

317. Lalmanach, G. Kininogens: more than cysteine protease inhibitors and kinin precursors / G. Lalmanach, C. Naudin, F. Lecaille, H. Fritz // *Biochimie*. – 2010. – V. 92(11). – P. 1568–1579.
318. Wilson, W.E. Bradykinin and kininogens in bovine milk / W.E. Wilson, L.H. Lazarus, K.B. Tomer // *J. Biol. Chem.* – 1989. – V. 264(30). – P. 17777–17783.
319. Yamamura, J. Bovine milk kininogen fragment 1.2 promotes the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells / J. Yamamura, Y. Takada, M. Goto, M. Kumegawa, S. Aoe // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – V. 269(2). – P. 628–632.
320. Yamamura, J. The fragments of bovine high molecular weight kininogen promote osteoblast proliferation *in vitro* / J. Yamamura, Y. Morita, Y. Takada, H. Kawakami // *J. Biochem.* – 2006. – V. 140 (6). – P. 825–830.
321. Hoshi, F. Purification of bovine beta 2-microglobulin from colostrum and its complete amino acid sequence / F. Hoshi, D. Nagai, S. Higuchi, T. Noso, A. Takahashi, S. Kawamura // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 1996. – V. 53(1–2). – P. 29–38.
322. Boehmer, J.L. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine milk during experimentally induced *Escherichia coli* mastitis / J.L. Boehmer, D.D. Bannerman, K. Shefcheck, J.L. Ward // *J. Dairy Sci.* – 2008. – V. 91(11). – P. 4206–4218.
323. Adamski, F.M. Expression of the Fc receptor in the mammary gland during lactation in the marsupial *Trichosurus vulpecula* (brush-tail possum) / F.M. Adamski, A.T. King, J. Demmer // *Mol. Immunol.* – 2000. – V. 37. – P. 435–444.
324. Yang, J. Killing tumor cells through their surface beta(2)-microglobulin or major histocompatibility complex class I molecules / J. Yang, Q. Yi // *Cancer*. – 2010. – V. 116(7). – P. 1638–1645.
325. Joss, J.L. A longitudinal study of the protein components of marsupial milk from birth to weaning in the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) / J.L. Joss, M.P. Molloy, L. Hinds, E. Deane // *Dev. Comp. Immunol.* – 2009. – V. 33(2). – P. 152–161.
326. Whey Proteins. From Milk to Medicine. Chapter 1 – Whey Proteins: An Overview / H. Deeth, N. Bansal.: H. Deeth, N. Bansal, ed. – London, UK: Academic Press, 2019. – P. 1–50.
327. Whey Proteins. From Milk to Medicine. Chapter 12 – Whey Proteins in Infant Formula / M.A. Fenelon, R.M. Hickey, A. Buggy, N. McCarthy, E.G. Murphy.: H. Deeth, N. Bansal, ed. – London, UK: Academic Press, 2019. – P. 439–494.
328. Milk Proteins (Third Edition). From Expression to Food. Chapter 2 – Milk proteins: An overview / D.A. Goulding, P.F. Fox, J.A. O'Mahony.; M. Boland, H. Singh, ed. – London, UK: Academic Press, 2020. – P. 21–98.
329. Sørensen, E.S. The localization and multimeric nature of component PP3 in bovine milk: Purification and characterization of PP3 from caprine and ovine milks / E.S. Sørensen, L.K. Rasmussen, L. Møller, T.E. Petersen // *J. Dairy Sci.* – 1997. – V. 80. – P. 3176–3181.
330. Girardet, J.M. Study of mechanism of lipolysis inhibition by bovine milk proteose-peptone component 3 / J.M. Girardet, G. Linden, S. Loye, J.L. Courthaudon, D. Lorient // *J. Dairy Sci.* – 1993. – V. 76. – P. 2156–2163.
331. Sugahara, T. Immunostimulation effects of proteose-peptone component 3 fragment on human hybridomas and peripheral blood lymphocytes / T. Sugahara, H. Onda, Y. Shinohara, M. Horii, K. Akiyama, K. Nakamoto, K. Hara // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2005. – V. 1725. – P. 233–240.
332. Inagaki, M. The bovine lactophorin C-terminal fragment and PAS6/7 were both potent in the inhibition of human rotavirus replication in cultured epithelial cells and the prevention of experimental gastroenteritis / M. Inagaki, S. Nagai, T. Yabe, S. Nagaoka, N. Minamoto, T. Takahashi, T. Matsuda, O. Nakagomi, T. Nakagomi, T. Ebina, Y. Kanamaru // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2010. – V. 74. – P. 1386–1390.

333. Barzyk, W. The affinity of two antimicrobial peptides derived from bovine milk proteins for model lipid membranes / W. Barzyk, S. Campagna, K. Wieclaw, B. Korchowiec, E. Rogalska // *Colloid Surface A*. – 2009. – V. 343. – P. 104–110.
334. Campagna, S. Evidence for membrane affinity of the C-terminal domain of bovine milk PP3 component / S. Campagna, P. Cosette, G. Molle, J.L. Gaillard // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2001. – V. 1513. – P. 217–222.
335. Campagna, S. Antibacterial activity of lactophorin, a synthetic 23-residues peptide derived from the sequence of bovine milk component-3 of proteose peptone / S. Campagna, A.G. Mathot, Y. Fleury, J.M. Girardet, J.L. Gaillard // *J. Dairy Sci.* – 2004. – V. 87. – P. 1621–1626.
336. Pedersen, L.R. Proteolytic activation of proteose peptone component 3 by release of a C-terminal peptide with antibacterial properties / L.R. Pedersen, J.G. Hansted, S.B. Nielsen, T.E. Petersen, U.S. Sørensen, D. Otzen, E.S. Sørensen // *J. Dairy Sci.* – 2012. – V. 95. – P. 2819–2829.
337. From milk by-products to milk ingredients: Upgrading the cycle. Information sheets: Milk, lipids, cheese, whey / R. De Boer.; R. De Boer, ed. – Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd., 2014. – P. 207–262.
338. Severin, S. Milk biologically active components as nutraceuticals: review / S. Severin, X. Wenshui // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2005. – V. 45. – P. 645–656.
339. Advanced dairy chemistry. Vol. 1a Proteins: Basic aspects. Indigenous enzymes of milk / J.A. O'Mahony, P.F. Fox, A.L. Kelly.; P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, ed. – New York, NY: Springer, 2013. – P. 337–385.
340. Korhonen, H. Antimicrobial factors in bovine colostrum / H. Korhonen // *J. Sci. Agric. Soc. Finland*. – 1977. – V. 49. – P. 434–447.
341. Encyclopedia of dairy sciences (2nd ed.). Vol. 2. Enzymes indigenous to milk. Other enzymes / N.Y. Farkye, N. Bansal.; J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, ed. – San Diego, CA: Academic Press, 2011. – P. 327–334.
342. Eitenmiller, R.R. Relationship between composition and stability of bovine milk lysozyme / R.R. Eitenmiller, B.A. Friend, K.M. Shahani // *J. Dairy Sci.* – 1976. – V. 59. – P. 834–839.
343. Yang, B. Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle / B. Yang, J. Wang, B. Tang, Y. Liu, C. Guo, P. Yang, T. Yu, R. Li, J. Zhao, L. Zhang, Y. Dai, N. Li // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6(3). – e17593. DOI: 10.1371/journal.pone.0017593.
344. Tong, J. Production of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic pigs / J. Tong, H.X. Wei, X.H. Liu, W.P. Hu, M.J. Bi, Y.Y. Wang, Q.Y. Li, N. Li // *Transgenic Res.* – 2011. – V. 20(2). – P. 417–419.
345. Alluwaimi, A.M. Cytokines gene expression patterns of bovine milk during middle and late stages of lactation / A.M. Alluwaimi, J.S. Cullor // *J. Vet. Medicine, Series B*. – 2002. – V. 49. – P. 105–110.
346. Leutenegger, C.M. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction / C.M. Leutenegger, A.M. Alluwaimi, W.L. Smith, L. Perani, J.S. Cullor // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2000. – V. 77. – P. 275–287.
347. Marek, A. TGF-beta(1), IL-10 and IL-4 in colostrum of allergic and nonallergic mothers / A. Marek, M. Zagierski, A. Liberek, E. Aleksandrowicz, M. Korzon, G. Krzykowski, B. Kaminska, A. Szlagatys-Sidorkiewicz // *Acta Biochim. Pol.* – 2009. – V. 56(3). – P. 411–414.
348. Chockalingam, A. Increased milk levels of transforming growth factor-alpha, beta1, and beta2 during *Escherichia coli* - induced mastitis / A. Chockalingam, M.J. Paape, D.D. Bannerman, D.D. // *J. Dairy Sci.* – 2005. – V. 88(6). – P. 1986–1993.
349. Peroni, D.G. Transforming growth factor-beta is elevated in unpasteurized cow's milk / D.G. Peroni, G.L. Piacentini, A. Bodini, R. Pigozzi, A.L. Boner // *Pediatr. Allergy Immunol.* – 2009. – V. 20(1). – P. 42–44.

350. Pouliot, Y. Review. Milk growth factors as health products: Some technological aspects / Y. Pouliot, S.F. Gauthier // *Int. Dairy J.* – 2006. – V. 16. – P. 1415–1420.
351. Ryan, M.P. The biotechnological potential of whey / M.P. Ryan, G. Walsh // *Rev. Environment. Sci. Bio-Technol.* – 2016. – V. 15. – P. 479–498.
352. Chatterton, D.E.W. Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns / D.E.W. Chatterton, D.N. Nguyen, S.B. Bering, P.T. Sangild // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2013. – V. 45. – P. 1730–1747.
353. Pavelic, J. Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family / J. Pavelic, T. Matijevic, J. Knezevic // *Indian J. Med. Res.* – 2007. – V. 125. – P. 511–522.
354. Gavalda-Navarro, A. Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function / A. Gavalda-Navarro, E. Hondares, M. Giralt, T. Mampel, R. Iglesias, F. Villarroya // *Sci. Reports.* – 2015. – V. 5. – 13717. DOI: 10.1038/srep13717.
355. Cohen, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal / S. Cohen // *J. Biol. Chem.* – 1962. – V. 237. – P. 1555–1562.
356. Nair, R.R. Role of epidermal growth factor and other growth factors in the prevention of necrotizing enterocolitis / R.R. Nair, B.B. Warner, B.W. Warner // *Sem. Perinatol.* – 2008. – V. 32. – P. 107–113.
357. Iacopetta, B.J. Epidermal growth factor in human and bovine milk / B.J. Iacopetta, F. Grieu, M. Horisberger, G.I. Sunahara // *Acta Paediatr.* – 1992. – V. 81(4). – P. 287–291.
358. Bastian, S.E. Measurement of betacellulin levels in bovine serum, colostrum and milk. / S.E. Bastian, A.J. Dunbar, I.K. Priebe, P.C. Owens, C. Goddard // *J. Endocrinol.* – 2001. – V. 168(1). – P. 203–212.
359. Тенчурина, Т.Х. Модификация биodeградируемого волокнистого матрикса эпидермальным фактором роста при эмульсионном электроформовании для стимулирования пролиферации эпителиальных клеток / Т.Х. Тенчурина, А.В. Люндуп, А.Г. Демченко, М.Е. Крашенинников, М.В. Балясин, И.Д. Клабуков, А.Д. Шепелев, В.Г. Мамагулашвили, А.С. Орехов, С.Н. Чвалун, Т.Г. Дюжева // *Гены & Клетки.* – 2017. – Т XII. – №4. – С. 47–52.
360. McElroy, S.J. The ErbB4 ligand neuregulin-4 protects against experimental necrotizing enterocolitis / S.J. McElroy, S.L. Castle, J.K. Bernard, D. Almohazey, C.J. Hunter, B.A. Bell, D. Al Alam, L. Wang, H.R. Ford, M.R. Frey // *Am. J. Pathol.* – 2014. – V. 184. – P. 2768–2778.
361. Baxter, R.C. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities / R.C. Baxter // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2000. – V. 278(6). – E967–E976.
362. Firth, S.M. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins / S.M. Firth, R.C. Baxter // *Endocr. Rev.* – 2002. – V. 23(6). – P. 824–854.
363. Baumrucker, C.R. Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk / C.R. Baumrucker, N.E. Erondy // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* – 2000. – V. 5. – P. 53–64.
364. Ford, J.E. The folate binding protein in milk / J.E. Ford, D.N. Salter, K.J. Scott // *J. Dairy Res.* – 1969. – V. 36. – P. 435–446.
365. Menzies, K.K. A novel approach identified the FOLR1 gene, a putative regulator of milk protein synthesis / K.K. Menzies, C. Lefevre, J.A. Sharp, K.L. Macmillan, P.A. Sheehy, K.R. Nicholas // *Mamm. Genome.* – 2009. – V. 20 (8). – P. 498–503.
366. Encyclopedia of Dairy Sciences. (2nd ed.). Vitamins: Folates / C.M. Witthöft.; J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, ed. – San Diego, CA: Academic Press, 2011. – P. 678–686.
367. Heegaard, N.H.H. A novel specific heparin-binding activity of bovine folate-binding protein characterized by capillary electrophoresis / N.H.H. Heegaard, S.I. Hansen, J. Holm // *Electrophoresis.* – 2006. – V. 27(5–6). – P. 1122–1127.

368. Copp, A.J. Genetics and development of neural tube defects / A.J. Copp, N.D.E. Greene // J. Pathol. – 2010. – V. 220(2). – P. 217–230.
369. Svendsen, I.B. The complete amino acid sequence of the folate binding protein from cow's milk / I.B. Svendsen, S.I. Hansen, J. Holm, J. Lyngbye // Carlsberg Res. Commun. – 1984. – V. 49. – P. 123–131.
370. Holm, J. Characterization of a high affinity folate binding protein in porcine serum: ionic charge, concentration-dependent polymerization and ligand binding mechanism / J. Holm, S.I. Hansen // Biosci. Rep. – 2003. – V. 23(5–6). – P. 339–351.
371. Urquhart, B.L. The human protoncoupled folate transporter (hPCFT): modulation of intestinal expression and function by drugs / B.L. Urquhart, J.C. Gregor, N. Chande, M.J. Knauer, G. Tirona, R.B. Kim // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2010. – V. 298(2). – P. G248–G254.
372. Kent, J.C. Why calcium in breastmilk is independent of maternal dietary calcium and vitamin D / J.C. Kent, P.G. Arthur, L.R. Mitoulas, P.E. Hartmann // Breastfeed. Rev. – 2009. – V. 17(2). – P. 5–11.
373. Swamy, N. Biochemical and preliminary crystallographic characterization of the vitamin D sterol- and actin-binding by human vitamin D-binding protein / N. Swamy, J.F. Head, D. Weitz, R. Ray // Arch. Biochem. Biophys. – 2002. – V. 402(1). – P. 14–23.
374. Валеев, В.В. Биологические функции сукцината (обзор зарубежных экспериментальных исследований) / В.В. Валеев, А.Л. Коваленко, Е.В. Таликова, В.А. Заплутанов, Т.Ю. Дельви́г-Каменская // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – Т 60(9–10). – С. 33–37.
375. Fedosov, S.N. Vitamin B12 and its binding proteins in milk from cow and buffalo in relation to bioavailability of B12 / S.N. Fedosov, E. Nexø, C.W. Heegaard // J. Dairy Sci. – 2019. – V. 102. – P. 4891–4905.
376. Fedosov, S.N. Transcobalamin from cow milk: isolation and physico-chemical properties / S.N. Fedosov, T.E. Petersen, E. Nexø // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – V. 1292(1). – P. 113–119.
377. Brada, N. Production of gastric intrinsic factor, transcobalamin, and haptocorrin in opossum kidney cells / N. Brada, M.M. Gordon, J.S. Shao, J. Wen, D.H. Alpers // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2000. – V. 279(6). – P. F1006–F1013.
378. Lonnerdal, B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action / B. Lonnerdal // J. Paediatr. – 2010. – V. 156. – P. S26–S30.
379. Adiaga, P.R. Prospects of riboflavin carrier protein (RCP) as an antifertility vaccine in male and female mammals / P.R. Adiaga, S. Subramanian, J. Rao, M. Kumar // Hum. Reprod. Update. – 1997. – V. 3. – P. 325–334.
380. Karande, A.A. Riboflavin carrier protein: a serum and tissue marker for breast carcinoma / A.A. Karande, L. Sridhar, K.S. Gopinath, P.R. Adiga // Int. J. Cancer. – 2001. – V. 95(5). – P. 277–281.
381. UniProt KB – P50595 (LEP_BOVIN) – открытая база данных последовательностей белков. Leptin. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P50595> (дата обращения: 29.05.2022).
382. Feuermann, Y. Leptin Affects Prolactin Action on Milk Protein and Fat Synthesis in the Bovine Mammary Gland / Y. Feuermann, S.J. Mabjeesh, A. Shamay // J. Dairy Sci. – 2004. – V. 87(9). – P. 2941–2946.
383. Smith, J.L. Production and regulation of leptin in bovine mammary epithelial cells / J.L. Smith, L.G. Sheffield // Domest. Anim. Endocrinol. – 2002. – V. 22(3). – P. 145–154.
384. Yonekura, S. Growth hormone and lactogenic hormones can reduce the leptin mRNA expression in bovine mammary epithelial cells / S. Yonekura, K. Sakamoto, T. Komatsu, A. Hagino, K. Katoh Y. Obara // Domest. Anim. Endocrinol. – 2006. – V. 31(1). – P. 88–96.
385. Silva, L.F.P. Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland / L.F.P. Silva, M.J. Van-deHaar, M.S. Weber Nielsen, G.W. Smith // J. Dairy Sci. – 2002. – V. 85(12). – P. 3277–3286.

386. Feuermann, Y. Leptin up-regulates the lactogenic effect of prolactin in the bovine mammary gland *in vitro* / Y. Feuermann, A. Shamay, S.J. Mabjeesh // J. Dairy Sci. – 2008. – V. 91(11). – P. 4183–4189.
387. Pinotti, L. Leptin in bovine colostrum and milk / L. Pinotti, F. Rosi // Horm. Metab. Res. – 2006. – V. 38(2). – P. 89–93.
388. Knight, C.H. Local control of mammary development and function / C.H. Knight, M. Peaker, C.J. Wilde // Rev. Reprod. – 1998. – V. 3(2). – P. 104–112.
389. Wilde, C. Control of milk secretion and apoptosis during mammary involution / C. Wilde, C.H. Knight, D. Flint // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. – 1999. – V. 4(2). – P. 129–136.
390. Hens, J.R. BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction / J.R. Hens, P. Dann, J.-P. Zhang, S. Harris, G.W. Robinson, J. Wysolmerski // Development. – 2007. – V. 134(6). – P. 1221–1230.
391. Wysolmerski, J.J. Hypercalcemia of malignancy: the central role of parathyroid hormone-related protein / J.J. Wysolmerski, A.E. Broadus // Annu. Rev. Med. – 1994. – V. 45. – P. 189–200.
392. Philbrick, W.M. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology / W.M. Philbrick, J.J. Wysolmerski, S. Galbraith, E. Holt, J.J. Orloff, K.H. Yang, R.C. Vasavada, E.C. Weir, A.E. Broadus, A.F. Stewart // Physiol. Rev. – 1996. – V. 76. – P. 127–173.
393. Burtis, W.J. Parathyroid hormone-related protein: structure, function, and measurement / W.J. Burtis // Clin Chem. – 1992. – V. 38(11). – P. 2171–2183.
394. Encyclopedia of Reproduction (2nd ed.). Vol. 2. Placental Endocrinology / E.D. Albrecht, G.J. Pepe.; M.K. Skinner, ed. – Academic Press : Elsevier, 2018. – P. 491–501.
395. Bani, D. Relaxin: A pleiotropic hormone / D. Bani // Gen. Pharmacol. – 1997. – V. 28(1). – P. 13–22.
396. Donker, J.D. Lactation studies. I. Effects upon milk ejection in the bovine of various injection treatments using oxytocin and relaxin / J.D. Donker // J. Dairy Sci. – 1958. – V. 41(4). – P. 537–544.
397. Larsen, L.B. Bovine milk procathepsin D and cathepsin D: Coagulation and milk protein degradation / L.B. Larsen, C. Benfeldt, L.K. Rasmussen, T.E. Petersen // J. Dairy Res. – 1996. – V. 63. – P. 119–130.
398. Hayes, M. Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D / M. Hayes, M.J. Hurley, L.B. Larsen, C.W. Heegaard, A.A.A. Magboul, J.C. Oliveira, A.L. Kelly // J. Dairy Res. – 2001. – V. 68. – P. 267–276.
399. Kaminogawa, S. Acid protease of bovine milk / S. Kaminogawa, K. Yamauchi // Agric. Biol. Chem. – 1972. – V. 36. – P. 2351–2356.
400. Cooney, S. Effect of somatic cell count and polymorphonuclear leucocyte content of milk on composition and proteolysis during ripening of Swiss-type cheese / S. Cooney, D. Tiernan, P. Joyce, A.L. Kelly // J. Dairy Res. – 2000. – V. 67. – P. 301–307.
401. Hurley, M.J. Cathepsin D activity in quarg / M.J. Hurley, L.B. Larsen, A.L. Kelly, P.L.H. McSweeney // Int. Dairy J. – 2000. – V. 10. – P. 453–458.
402. Furlanetti, A.M. Free and total GMP (glycomacropeptide) contents of milk during bovine lactation / A.M. Furlanetti, L.F. Prata // Ciênc. Tecnol. de Alimentos (now Food Science and Technology (Campinas)). – 2003. – V. 2. – P. 121–125.
403. Miralles, B. Analysing para-kappa-casein and related peptides as indicators of milk proteolysis / B. Miralles, L. Amigo, M. Ramos, I. Recio // Milchwissenschaft. – 2003. – V. 58. – P. 412–415.
404. Ney, D.M. Glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria: a randomized, controlled, crossover trial / D.M. Ney, B.M. Stroup, M.K. Clayton, S.G. Murali, G.M. Rice, F. Rohr, H.L. Levy // Am. J. Clin. Nutr. – 2016. – V. 104. – P. 334–345.
405. Мощинский, П. Получение энзиматических гидролизатов казеина, обедненных фенилаа-ланином / П. Мощинский, Я. Идзяк // Прикладная биохимия и микробиология. – 1993. – Т. 29. – Вып. 3. – С. 398–403.

406. Остроумов Л.А. Контроль фенилаланина в молочных продуктах и способ его удаления / Л.А. Остроумов, А.Ю. Просеков, О.О. Бабич, Е.Я. Якимова // Молочная промышленность. – 2007. – № 9. – С. 71–72.
407. Kawasaki, Y. pHdependent molecular weight changes of kappa-casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration / Y. Kawasaki, H. Kawakami, M. Tanimot, S. Dosako, A. Tomizawa, M. Kotake // Milchwissenschaft. – 1993. – V. 48. – P. 191–196.

Глава 4. Эндогенные ферменты молока

4.1. Общая характеристика эндогенных ферментов молока

В молоке коровы (*Bos taurus*) обнаруживается около 70 эндогенных (или нативных) ферментов [1–5]. История исследования ферментов, содержащихся в секретах молочных желез, насчитывает более 140 лет.

Точкой отсчета изучения эндогенных ферментов молока коровы считается открытие в 1881 г. лактопероксидазы [6]. К 1902 г. в молоке были обнаружены пероксидаза (оксидаза), диастаза (амилаза), протеиназа, «фибрин-фермент» (плазмин), липаза и салоллаза (арилэстераза) [7]. В это время в молоке была открыта ксантиноксидоредуктаза. В середине 1930-х гг. список ферментов, содержащихся в коровьем молоке, включал в себя протеиназу, карбогидразу (амилазу), эстеразу/липазу, пероксидазу, ксантиноксидоредуктазу (альдегидкаталазу), каталазу, лактазу (β -галактозидазу) и салоллазу (арилэстеразу). К 1950-м гг. список эндогенных ферментов молока (ЭФМ) пополнился щелочной фосфатазой, лактазой и коагулазой (возможно, тромбином) [5]. В дальнейшем в результате разработки и совершенствования методов анализа ферментативной активности в молоке удалось идентифицировать много новых ферментов, история открытия которых рассмотрена в обзорах R.F. Fox и A.L. Kelly [2, 3]. В 1992 г. в молоке коровы насчитывали 59 ферментов [8], а в 2003 г. R.F. Fox и соавторы говорили уже о 69 различных видах ферментативной активности [1]. Вполне вероятно, что в молоке *B. taurus* присутствуют и другие ферменты, прежде всего лизосомальные [9].

Подавляющее большинство ЭФМ, вероятно, за исключением липопропротеин липазы и ксантиноксидоредуктазы, не играет физиологической роли в биосинтезе и секреции молока. Липопропротеин липаза гидролизует триглицериды в хиломикронах крови и обеспечивает поступление около 60% жирных кислот и моноглицеридов для синтеза триглицеридов в молочной железе. Ксантиноксидоредуктаза играет важную роль в механизме секреции молочных жировых глобул через апикальную мембрану маммоцитов и является одним из основных белков в мембране молочных жировых глобул (ММЖГ) [5].

Основными источниками эндогенных ферментов молока являются:

1. Цитоплазма секреторных клеток молочной железы. При формировании молочных жировых глобул (МЖГ) некоторые ферменты вместе с участками цитоплазмы могут инкапсулироваться в пространствах между фосфолипидными слоями мембраны МЖГ и в ходе секреции жировых глобул попадать в молоко.

2. Плазма крови. Плазматические ферменты проникают через межклеточные пространства («leaky junctions») между секреторными клетками молочной железы.

3. Мембраны молочных жировых глобул. Вероятно, это главный источник эндогенных ферментов молока, поскольку наружный слой МЖГ образуется из апикальной мембраны секреторных клеток молочной железы, которые, в свою очередь, образуются из мембран аппарата Гольджи.

4. Соматические клетки. В первую очередь лейкоциты, которые в случае бактериальных инфекций молочной железы попадают в ее ткань из плазмы крови.

Таким образом, основная часть ферментов попадает в молоко в результате особенностей механизмов секреции его компонентов различными видами клеток [3].

Молоко не содержит субстратов для большинства находящихся в нем ферментов. Часть эндогенных ферментов неактивны в молоке из-за неподходящих физико-химических параметров – pH, редокс-потенциала, ионной силы и др. В то же время некоторые ферменты

проявляют активность в свежесвыдоенном молоке и могут влиять на его технологические свойства, а также на выход и/или качество изготовленной из него продукции. Практическое значение ряда эндогенных ферментов молока определяется следующими положениями [3, 4]:

- эндогенные ферменты могут ухудшать качество молока, например, за счет активности липопропротеин липазы, протеаз, кислой фосфатазы, ксантиноксидоредуктазы;
- несколько широко известных ЭФМ – лактопероксидаза, супероксиддисмутаза, оксидаза сульфгидрильных групп и, возможно, лизоцим, рибонуклеаза и ангиогенин, – оказывают стабилизирующее действие на физико-химические и бактериологические показатели молока и, таким образом, способствуют сохранению его качества;
- некоторые ЭФМ, такие как щелочная фосфатаза, лактопероксидаза, каталаза, γ -глутамилтрансфераза, являются индикаторами «температурной истории» молока и могут использоваться для контроля качества молочного сырья;
- плазмин, кислая фосфатаза и ксантиноксидоредуктаза (ксантиндегидрогеназа/оксидаза), выдерживают стандартные режимы пастеризации (72 °C в течение 15 секунд) и могут сохранять активность в процессе созревания сыра;
- изменение концентрации таких ферментов, как N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза, каталаза и кислая фосфатаза, указывает на заболевание коров маститом;
- антимикробная активность некоторых эндогенных ферментов молока, в частности, лизоцима и лактопероксидазы (которая является компонентом системы: лактопероксидаза-перекись водорода-тиоцианат), могут использоваться для «холодной пастеризации молока»;
- такие ферменты, как ангиогенин, лактопероксидаза и рибонуклеаза, нужно рассматривать в качестве объектов коммерческого использования и, следовательно, промышленного выделения из сырья молочного происхождения;

Некоторые нативные ферменты молока играют определенную роль в физиологии новорожденных и в функционировании молочных желез. Например, амилаза и липаза участвуют в процессах переваривания пищи. Вместе с тем функции этих энзимов не являются жизненно важными для новорожденных, поскольку последние успешно выживают и нормально развиваются при вскармливании кипяченым молоком или искусственными смесями, в которых ЭФМ, в большинстве своем, инактивированы или попросту отсутствуют.

Концентрация/активность ЭФМ демонстрирует гораздо более широкую межвидовую изменчивость, чем другие белковые компоненты молока. Например, концентрация лизоцима в лошадином и человеческом молоке в 3000 раз выше, чем в молоке коровы. Лактопероксидаза является основным ферментом в коровьем молоке, но отсутствует в секрете молочной железы человека. Человеческое молоко содержит липазу, стимулируемую солями желчных кислот, но в молоке большинства млекопитающих этот фермент отсутствует. Основным липолитическим ферментом молока является липопропротеин липаза, которой в секрете молочной железы морской свинки в 500 раз больше, чем в молоке крысы. Коровье молоко обладает высоким уровнем активности ксантиноксидоредуктазы, но у большинства изученных видов активность этого фермента в молоке низка, поскольку в нем отсутствует молибден. Причины межвидовых различий в содержании и активности ЭФМ в большинстве случаев не установлены [10].

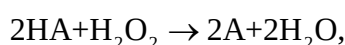
В данном разделе будут охарактеризованы основные эндогенные ферменты, преимущественно коровьего молока. В большинстве случаев рассматриваемые ферменты были выделены и идентифицированы либо потому, что методы регистрации их активности хорошо отработаны, либо вследствие того, что они представляли технологический интерес.

По состоянию «на сегодняшний день» наиболее значимыми ЭФМ, с точки зрения биологических свойств и влияния на качество и потребительские свойства молочной продук-

ции, являются: лактопероксидаза (ЕС 1.11.1.7), каталаза (ЕС 1.11.1.6), супероксид дисмутаза (ЕС 1.15.1.1), глутатион пероксидаза (ЕС 1.11.1.9), γ -глутамил трансфераза (ЕС 2.3.2.2; ЕС:3.4.19.13), липопротеин липаза (ЕС 3.1.1.34), фосфолипаза, эстеразы, рибонуклеаза (ЕС 4.6.1.18), лизоцим (ЕС 3.2.1.17), рибонуклеаза (ЕС 4.6.1.18), плазмин (ЕС 3.4.2.17), катепсин D (ЕС 3.4.23.5), кислая фосфатаза (ЕС 3.1.3.2), щелочная фосфатаза (ЕС 3.1.3.1), ксантиноксидоредуктаза (ЕС 1.17.1.4; 1.17.3.2), 5'-нуклеотидаза (ЕС 3.1.3.5), оксидаза сульфгидрильных групп (ЕС 1.8.3.2), амилазы (ЕС 3.2.1.1.; ЕС 3.2.1.2), β -N-ацетилгексозаминидаза (ЕС 3.2.1.52), альдолаза (ЕС 4.1.2.13), ангиогенин (ЕС 3.1.2) [4, 5].

4.2. Лактопероксидаза (ЕС 1.11.1.7)

Пероксидазы относятся к ферментам, использующим в качестве окислителя перекись водорода. Ферменты этой группы встречаются в клетках животных, растений и микроорганизмов. Пероксидазы катализируют реакцию:



где НА – окисляемый субстрат (восстановитель, донор водорода), который может быть ароматическим амином, (поли)фенолом, ароматической кислотой или лейкокрасителем.

Многие субстраты, окисление которых катализирует лактопероксидаза (LPO), являются хромогенными, что позволяет использовать их для количественного и качественного определения пероксидазной активности. Традиционно для определения активности лактопероксидазы использовали гваякол, пирогаллол и *p*-фенилендиамин. В настоящее время для этой цели применяют 2,2'-азиобис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота) с определением поглощения при длине волны 412 нм. Максимальная ферментативная активность LPO наблюдается в слабокислой среде при pH 5–6 [3, 5, 10].

В природе наиболее эффективное (и эффективное) использование пероксидаз мы наблюдаем у жука-бомбардира, который накапливает концентрированный раствор диоксифенола в ~25% растворе H_2O_2 в одной железе и суспензию кристаллической пероксидазы – в другой. В момент опасности через специальную трубку-смеситель жук выбрасывает содержимое этих желез в сторону противника. Смешиваемые компоненты реагируют настолько бурно, что жидкие продукты этой реакции имеют температуру около 100 °C!

Лактопероксидаза была первым ферментом, открытым в молоке С. Arnold в 1881 г. Тогда же было установлено, что фермент теряет активность при нагревании до 80 °C [6]. В дальнейшем это наблюдение послужило основанием для разработки методов выявления суперпастеризованного молока (т.е. прогретого в течение 15 секунд при температуре >76 °C) [11, 12] и исследований механизма высокотемпературной денатурации LPO [13, 14].

Изоэлектрическая точка LPO равна 9,6. Поскольку при pH нативного молока ($6,6 \pm 0,1$) лактопероксидаза, так же, как и лактоферрин, обладает катионными свойствами (заряжена положительно), то может быть выделена из молока или концентрированной сладкой (сычужной) сыворотки, методом катионообменной хроматографии [15] или методом гель-фильтрации в сочетании с гидрофобной хроматографией [16].

Структура гена и а.к. последовательность LPO коровы установлены в 1990–1991 гг. [18, 19]. Лактопероксидаза синтезируется в виде пре-профермента. Сигнальный пептид (пре-фрагмент) состоит из 22 аминокислот, а про-фрагмент – из 78. Полная последовательность молекулы пре-пролактопероксидазы включает в себя 712 а.к. остатков (рис. 4.1), её ММ составляет 80,642 кДа. Первичная последовательность LPO коровы (*Bos taurus*), а также дополнительная информация о структуре этого белка, размещены в открытой базе данных UniProt (<https://>

www.uniprot.org/uniprot/P80025). Идентификационный номер коровьей LPO – P80025 (PERL_BOVIN) [17]. Посттрансляционные модификации (ПТМ) включают в себя удаление сигнального пептида (Met1-Ser22) и про-фрагмента (Asp23-Arg100), N-гликозилирование (Asn106, Asn212, Asn322, Asn358, Asn449), образование внутримолекулярных дисульфидных мостиков (Cys123-Cys284, Cys132-Cys145, Cys246-Cys256, Cys250-Cys274, Cys354-Cys365, Cys573-Cys630, Cys671-Cys696), нитрирование Tyr482, фосфорилирование Ser315 [17].

10	20	30	40	50
MWVCLQLPVF	LASVTLFEVA	ASDTIAQAAS	TTTISDAVSK	VKIQVNKAFL
60	70	80	90	100
DSRTRLKTTL	SSEAPTTQQL	SEYFKHAKGR	TRTAIRNGQV	WEESLKRLRR
110	120	130	140	150
DTTLTNTVDP	SLDLTALSWE	VGCGAPVPLV	KCDENSPYRT	ITGDCNNRRS
160	170	180	190	200
PALGAANRAL	ARWLPAEYED	GLALPFGWTQ	RKTRNGFRVP	LAREVSNKIV
210	220	230	240	250
GYLDEEGVLD	QNRSLLFMQW	GQIVDHDLDL	APETELGSNE	HSKTQCEEYC
260	270	280	290	300
IQGDNCFPII	FPKNDPKLKT	QGKCMPPFFRA	GFVCPPTPYQ	SLAREQINAV
310	320	330	340	350
TSFLDASLVY	GSEPSLASRL	RNLSSPLGLM	AVNQEAWDHG	LAYLPFNNKK
360	370	380	390	400
PSPCEFIINT	ARVPCFLAGD	FRASEQILLA	TAHTLLLREH	NRLARELKKL
410	420	430	440	450
NPHWNGEKLY	QEARKILGAF	IQIITFRDYL	PIVLGSEMQR	WIPPYQGYIN
460	470	480	490	500
SVDPRISNVF	TFAFRFGHME	VPSTVSRLDE	NYQPWGPEAE	LPLHTLFFNT
510	520	530	540	550
WRIIKDGGID	PLVRGLLAKK	SKLMNQDKMV	TSELRNKLQF	PTHKIHGFDL
560	570	580	590	600
AAINLQRCRD	HGMPGYNSWR	GFCCGLSQPKT	LKGLQTVLKN	KILAKKLMDL
610	620	630	640	650
YKTPDNIDIW	IGGNAEPMVE	RGRVGPLLAC	LLGRQFQQIR	DGDRFWWENP
660	670	680	690	700
GVFTEKQRDS	LQKVSFSRLI	CDNTHITKVP	LHAFQANNYP	HDFVDCSTVD
710				
KLDLSPWASR	EN			

Рис. 4.1. Первичная структура **пре-пролактопероксидазы** коровы [17]. Зеленым фоном выделен пре-фрагмент (Met1-Ser22), лиловым фоном – про-фрагмент (Asp23-Arg100), желтым – а.к. цепь зрелой лактопероксидазы (Asp101-Asn712). Серым фоном обозначены сайты N-гликозилирования, голубым – остатки Cys, образующие -S-S- связи. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Зрелый фермент является мономером и состоит из 612 аминокислотных остатков, его вычисленная ММ (ММ образующих полипептидную цепь аминокислот без учета посттрансляционных модификаций) составляет 78,030 кДа [3]. По данным [20] полипептидная цепь LPO формирует ~65% β -складок и ~23% α -спиральных участков, остальные ~12% имеют неупорядоченную структуру. Сервис Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P80025>), с высокой достоверностью (в основном, >90%) предсказывает трехмерную организацию зрелой пре-пролактопероксидазы (рис. 4.2).

Степень гомологии первичной последовательности лактопероксидазы коровы с миелопероксидазой человека, пероксидазой эозинофилов и тиропероксидазой составляет 55, 54 и 45% соответственно [19].

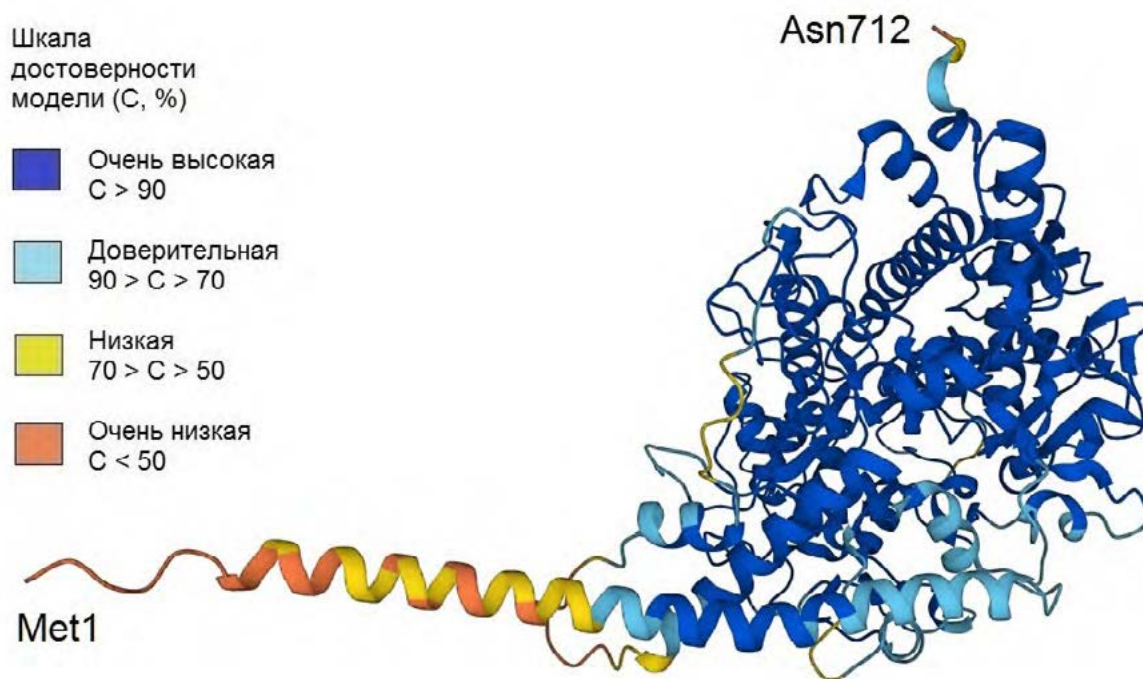


Рис. 4.2. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-пролактопероксидазы коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P80025>) [21, 22]

В зависимости от степени гликозилирования и дезаминирования Asn и/или Gln фермент может существовать в 10 изоформах. Лактопероксидаза связывает ионы кальция, которые оказывают на неё стабилизирующее действие. При pH < 5,0 фермент утрачивает Ca²⁺-связывающую способность, что сопровождается потерей его стабильности. Лактопероксидаза является гем-содержащим белком, в её состав входит феррипротопорфирин IX, содержащий один атом железа. Пик Core (интенсивный пик поглощения в синей области видимого спектра) лактопероксидазы равен 412 нм, а отношение $A_{412} : A_{280}$ составляет примерно 0,9 [3, 5].

При pH нормального молока (~6,7), LPO достаточно стабильна и выдерживает режим пастеризации HTST (High Temperature Short Time) – 72 °C в течение 15 секунд. С той же выдержкой (15 секунд), но при температуре 78 °C – фермент инактивируется. Такой характер термостабильности LPO позволяет дифференцировать молоко, термообработанное в режиме HTST, в котором активность фермента сохраняется, и молоко с увеличенным сроком хранения (ESL-milk), прошедшее высокотемпературную обработку (127 °C в течение трех секунд), в котором активность LPO отсутствует [23].

В слезной жидкости и в слюне человека обнаруживается LPO, аналогичная ферменту, который синтезируется в молочной железе *B. taurus* [24–26]. Лактопероксидаза является одним из самых распространенных (после ксантиноксидазы) ферментов молока, её концентрация составляет 30 мг/л или ~0,5% от общего количества сывороточных белков, или ~0,1% от общего количества белка. Ферментативная активность LPO в молоке коровы составляет 1,2-1,9 У/мл; это более чем в 20 раз выше, чем в молоке человека [5, 23, 27].

Показано, что в период ранней лактации концентрация LPO в молоке может использоваться в качестве значимого индикатора при диагностике субклинического мастита у коз [28], но плохо подходит для выявления этого заболевания у коров [29].

В настоящее время основной интерес к LPO связан прежде всего с её антибактериальной активностью [1, 23, 30, 31]. Даже в присутствии низких концентраций H₂O₂ и SCN⁻, лактопероксидаза проявляет очень сильную бактериостатическую активность. Обработка молока системой

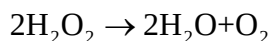
лактопероксидаза + H_2O_2 + тиоцианат, в 50–100 раз более эффективна, чем обработка одной перекисью водорода [5].

Показано, что активация системы путем добавления тиоцианата натрия и перкарбоната натрия, приводит к значительному увеличению срока хранения охлажденного сырого овечьего, коровьего и козьего молока [32]. Кроме того, обработка активированной системой LPO ($+\text{H}_2\text{O}_2$, $+\text{SCN}^-$) молока-сырья для выработки сыров типа Cheddar и Saint-Paulin, а также йогуртов, – позитивно влияет на показатели конечных продуктов [33–35]. Предполагается, что улучшение качества сыров происходит в результате подавления психротрофной микрофлоры после обработки молока системой LPO ($+\text{H}_2\text{O}_2$, $+\text{SCN}^-$) [33, 34].

Рекомбинантная коровья LPO, полученная в культуре клеток СНО (клетки яичника китайского хомячка), рассматривается как удобный объект для инжиниринга и изучения микроокружения и структуры гема в пероксидазах млекопитающих [27, 36].

4.3. Каталаза (EC 1.11.1.6)

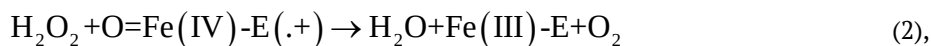
Каталаза (H_2O_2 : H_2O_2 оксидоредуктаза) катализирует реакцию распада перекиси водорода, которая в общем виде выглядит так:



Активность каталазы (CAT) измеряется количественно манометрическими (регистрация накапливающегося O_2) или титриметрическими (регистрация распада H_2O_2) методами. Каталаза включена в группу пероксидаз, поскольку способна окислять также ряд субстратов с участием перекиси водорода [3, 5].

Каталазы – гем-содержащие ферменты, которые широко распространены в живой природе. Каталазная активность выявлена почти во всех животных клетках и органах, растительных тканях и в большинстве микроорганизмов, кроме облигатных анаэробов. Каталазы предотвращают аккумуляцию в клетках и тканях перекиси водорода, высокая реакционная способность которой представляет угрозу для целостности живых систем. Как было отмечено выше, CAT способна ускорять окисление восстанавливающих агентов и, следовательно, проявляет пероксидазную активность [37].

Точный механизм катализа CAT не установлен. Предполагается, что каталитический процесс протекает в две стадии:



где $\text{Fe(III)}-\text{E}$ представляет собой железосодержащий центр гемовой группы (протопорфирин IX), присоединенной к ферменту (E). Продукт $\text{O}=\text{Fe(IV)}-\text{E}(\cdot+)$ является мезомерной формой $\text{Fe(V)}-\text{E}$, в которой железо не полностью окисляется до +V, но получает стабилизирующую электронную плотность от гемового лиганда (предположительно фенольной группы Tyr357) и обозначается как катион-радикал ($\cdot+$) [38].

Для CAT характерны самые высокие значения одного из основных показателей ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен: каталитической константы скорости (k_{cat}), которая также называется числом оборотов фермента. Число оборотов фермента – это количество молекул субстрата, которое превращается в продукты реакции в единицу времени при полном насыщении фермента субстратом.

Число оборотов большинства ферментов составляет $1-10^4 \text{ c}^{-1}$, например, для химозина, в реакции сычужного свертывания молока, k_{cat} колеблется в диапазоне $2-100 \text{ c}^{-1}$ [39]. Число

оборотов карбоангидразы, второго по данному показателю фермента, достигает $6 \times 10^5 \text{ с}^{-1}$. По данным разных источников, одна молекула САТ катализирует распад $2,8\text{--}40,0 \times 10^6$ молекул H_2O_2 в секунду (!) [40].

Каталаза в молоке обнаружена S.M. Babcock и H.L. Russell в 1897 г. [41]. Авторы исследования показали, что экстракты молочных сепараторных слизей (состоящих из соматических клеток и других органических остатков), усиливали распад перекиси водорода, что указывало на наличие каталазной активности.

Активность САТ в молоке зависит от рациона животного и стадии лактации. Особенно заметно активность фермента возрастает у коров, страдающих маститом. Поэтому довольно продолжительное время каталазу считали потенциальным индикатором этого заболевания [42]. Однако в настоящее время для диагностики коровьего мастита чаще используют подсчет количества соматических клеток, измерение активности N-ацетилглюкозаминидазы или регистрацию электропроводности молока [3].

В молоке каталаза ассоциирована с жировыми глобулами. Каталазная активность в молочных сливках почти в 12 раз выше, чем в обезжиренном молоке. Поэтому в качестве стартового материала для выделения САТ обычно используют препараты мембран жировых глобул молока [5].

Процедура выделения каталазы из коровьего молока разработана О. Ito и R. Akuzawa, которым удалось очистить фермент в 23000 раз, кристаллизовать его и показать, что при гель-фильтрации САТ ведет себя как белок с ММ около 225 кДа [43]. В коровьих молочных сливках идентифицировано три изофермента САТ [3].

Аминокислотная последовательность САТ из печени и эритроцитов коровы опубликована в 1982 г. [44]. По современным данным, САТ синтезируется в виде предшественника, состоящего из 527 а.к. остатков и имеющего ММ 59,915 кДа. В результате процессинга происходит удаление одной N-концевой аминокислоты – Met1. Таким образом, а.к. последовательность зрелой молекулы САТ включает в себя 526 а.к. остатков (рис. 4.3), её ММ, без учета ПТМ, составляет 59,766 кДа.

Первичная последовательность САТ *B. taurus*, а также дополнительная информация о структуре этого белка размещены в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/P00432>). Идентификационный номер каталазы коровы – P00432 (CATA_BOVIN) [45]. ПТМ фермента включают в себя: N-ацетилирование (Ala2, Lys233, Lys449, Lys480, Lys499), фосфорилирование (Ser9, Ser417, Ser434, Thr511, Ser517), N-сукцинилирование (Lys221, Lys449, Lys480 – два последних остатка – альтернативно ацетилированы).

Структура САТ, полученной из печени коровы, исследована методами рентгеновской кристаллографии [46, 47]. Каталаза является тетрамером с ММ около 250 кДа, состоящим из четырех гомологичных субъединиц, которые диссоциируют в присутствии додецилсульфата натрия [3]. Пространственная организация мономера САТ предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P00432>), с высокой (>90%) достоверностью (рис. 4.4).

Каталазу, в силу её относительной термолабильности, можно рассматривать как один из индикаторов «температурной истории молока» [48]. Считается, что сыры, выработанные из сырого молока, созревают быстрее и формируют более интенсивный (хотя и не всегда приятный и желательный) аромат, по сравнению с сырами, изготовленными из пастеризованного молока [5, 49]. По причинам санитарно-эпидемиологического характера и в интересах стандартизации производства в современной сыроделии наиболее широко используется именно пастеризованное молоко. Тем не менее некоторые разновидности сыров по-прежнему вырабатывают из сырого молока. Иногда компромиссом между сырым и пастеризованным моло-

ком для сыроделия считается суб-пастеризация или термизация молока (прогревание в течение 16 секунд при 63–65 °C). При этом индикатором термизации может служить именно CAT, поскольку этот фермент полностью инактивируется при температуре 65 °C за 16 секунд [48].

10	20	30	40	50
MADNRDPASD	QMKHWKEQRA	AQKPDVLT TG	GGNPVGDKLN	SLTVGPRGPL
60	70	80	90	100
LVQDVVFTDE	MAHFDREIRIP	ERVVHAKGAG	AFGYFEVTHD	ITRYSKAKVF
110	120	130	140	150
EHIGKRTPIA	VRFSTVAGES	GSADTVRDPR	GFAVKFYTED	GNWDLVGNNT
160	170	180	190	200
PIFFIRDALL	FPSFIHSQKR	NPQTHLKDPD	MVWDFWSLRP	ESLHQVSFLF
210	220	230	240	250
SDRGIPDGHR	HMNGYGSHTF	KLNVANGEAV	YCKFHYKTDQ	GIKNLSVEDA
260	270	280	290	300
ARLAHEDPDY	GLRDLFNIAIA	TGNYPSTWLY	IQVMTFSEAE	IFPFNPFDLT
310	320	330	340	350
KVWPHGDYPL	IPVGKLV LNR	NPVNYFAEVE	QLAFDPSNMP	PGIEPSPDKM
360	370	380	390	400
LQGR LFAYPD	THRHR LGPNY	LQIPVNC PYR	ARVANYQRDG	PMCMMDNQGG
410	420	430	440	450
APNYYPNSFS	APEHQPSALE	HRTHFSGDVQ	RFNSANDDNV	TQVRTFY LKV
460	470	480	490	500
LNEEQRKRLC	ENIAGHLKDA	QLFIQKKAVK	NFSDVHPEYG	SRIQALLDKY
510	520			
NEEKPKNAVH	TYVQHGS HLS	AREKANL		

Рис. 4.3. Первичная структура каталазы коровы [45]. Зеленым фоном выделен пре-фрагмент (Met1), который удаляется в результате ПТМ, желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелой каталазы (Ala2-Leu527). Лиловым фоном отмечены сайты N-ацетилирования, бирюзовым – фосфорилирования, серым – безальтернативного сукцинирования. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

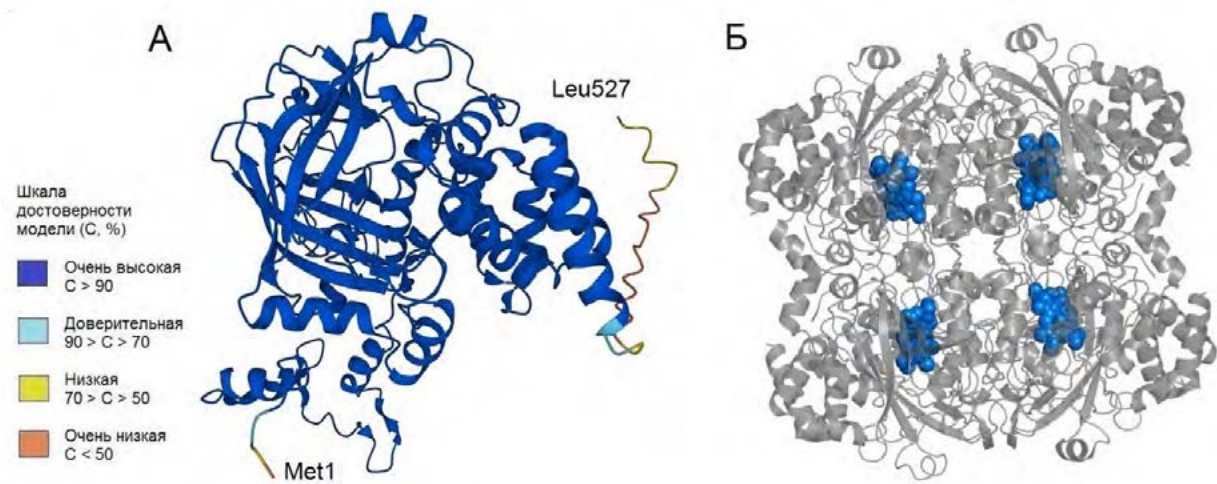


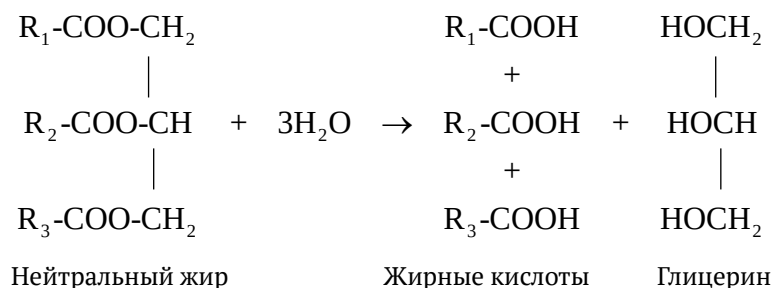
Рис. 4.4. Трехмерная структура каталазы коровы. А. Модель мономера каталазы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P00432>) [21, 22]. Б. Модель тетрамера каталазы, построенная по результатам рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,8 Å (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1TGU>). Синим цветом, на рисунке Б, выделены простетические группы (протопорфирин IX)

В то же время CAT не подходит на роль маркерного фермента в сырах, выработанных из суб-пастеризованного молока, поскольку вторичную каталазную активность в сырах мо-

гут продуцировать некоторые микроорганизмы (в частности, коринобактерии и некоторые дрожжи) [5].

4.4. Липазы

Липазы (эстеразы) катализируют гидролиз нейтральных жиров с образованием одной молекулы глицерина и трех молекул жирных кислот:



С технологической точки зрения липазы являются наиболее важными эндогенными ферментами молока. Активность липаз вызывает формирование гидролитической прогорклости – характерного неприятного привкуса, известного задолго до индустриализации молочного производства [5]. С появлением в 50-х гг. прошлого столетия автоматических доильных аппаратов (pipe-line milking machines, англ.) возникла проблема гидролитической прогорклости молока [50], что стимулировало исследования, направленные на выделение и характеристику молочных липолитических ферментов. Влияние различных факторов на развитие прогорклости молока и молочных продуктов рассмотрено в работах [51–54].

Помимо появления неприятных привкусов, липолиз приводит к снижению пенообразующей способности молока, что, например, ухудшает потребительские свойства кофе капучино [53]. В то же время молочная липаза положительно влияет на вкусовые свойства сыров, выработанных из сырого молока [53, 55].

Впервые предположение о том, что коровье молоко проявляет липолитическую активность, было сделано Е. Мого в 1902 г. [56]. Позднее F.E.Rice и A.L.Markley (1922), используя новые для того времени методы определения липазной активности, представили строгие доказательства наличия липолитических ферментов в молоке [57].

Выяснилось, что в молоке присутствует не менее двух типов липаз, которые значительно различаются по молекулярной массе. В 1957 г. N.P. Tarassuk и E.N. Frankel утверждали, что в молоке, находятся «плазматическая липаза» и «мембранная липаза» [58].

Методами гель-фильтрации и ионообменной хроматографии было показано, что обнаруживаемые в молоке множественные формы липолитических ферментов были вызваны самоассоциацией индивидуальных липаз или их взаимодействием с другими молочными белками [3]. Не менее 90% липаз в молоке связано с мицеллами казеина. Липолитическая активность может быть отделена от казеиновых мицелл обработкой 1 M NaCl, диметилформамидом или гепарином [5].

Низкомолекулярная липаза. В 1963 г. R.C. Chandan и K.M. Shahani сообщили о выделении липазы из молочной сепараторной слизи. Липаза была очищена до 88-кратного увеличения специфической активности и охарактеризована; среди необычных свойств отмечались низкая молекулярная масса (~9 кДа) и то, что фермент ингибировался всеми основными белками молока [59, 60]. Предполагается, что источником этой липазы служат соматические клетки. Низкомолекулярную (~10 кДа) липазу, которая считается минорным липолитическим ферментом молока [5], выделили также из сычужного сгустка [61].

Липопропротеин липаза (ЕС 3.1.1.34). В 1972 г. из молока коровы была выделена липопропротеин липаза (LPL). Было показано, что в молоке LPL находится в виде гомодимера с ММ около 90 кДа [62]. Фермент активируется плазматическим аполипипропротеином С2 (АРОС2) – небольшим белком, стоящим из 79 а.к. остатков, путем прямого липид-независимого связывания [63]. Источником LPL в молоке служат клетки сосудистого эндотелия молочной железы, в которых этот фермент связан с гепарин сульфатом и играет важную роль в метаболизме триглицеридов [64–66].

Поскольку коровье молоко является богатым источником LPL, фермент может быть достаточно просто выделен из него методом аффинной хроматографии на сорбентах с иммобилизованным в качестве лиганда гепарином (например, Heparin Sepharose 4B) [5].

Липопропротеин липаза участвует в биосинтезе липидов молока. Все жирные кислоты С18 и ~ 50% кислот С16 в липидах молока жвачных животных происходят из липидов, получаемых с пищей, которые транспортируются в молочную железу в виде хиломикронов. В маммоцитах жирные кислоты высвобождаются из хиломикронов под действием LPL и впоследствии используются для синтеза триглицеридов [5].

Структура гена и а.к. последовательность LPL коровы установлена в 1987 г. [67]. Первичная последовательность LPL *B. taurus* и дополнительная информация о структуре и некоторых свойствах этого фермента находятся в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P11151/entry#function>). Идентификационный номер коровьей LPL – P11151 (LIPL_BOVIN) [68]. Полипептидная цепь LPL содержит 450 а.к. остатков, её ММ в негликозилированной форме составляет 50,548 кДа. Фермент синтезируется в виде пре-протеина. Сигнальный пептид (пре-фрагмент) состоит из 28 аминокислот. Таким образом, полная последовательность пре-LPL включает в себя 478 а.к. остатков (рис. 4.5), а её ММ равна 53,378 кДа. Структура полипептидной цепи LPL стабилизируется пятью дисульфидными связями в положениях 57–70, 246–269, 294–313, 305–308, 448–468. Участок последовательности Cys246–Cys269 определяет субстратную специфичность фермента. Молекула LPL несет три сайта N-гликозилирования в положениях Asn73, Asn 287 и Asn389. Фермент является щелочным белком с рI 8,91 [5, 68].

Каталитически активная LPL является димером, состоящим из двух идентичных гликозилированных мономеров с ММ около 55 кДа, которые соединяются друг с другом за счет нековалентных взаимодействий [69]. Кроме способности гидролизовать триглицериды, LPL проявляет низкую, но надежно детектируемую фосфолипазную активность (альтернативное наименование фермента – фосфолипаза А¹ (ЕС 3.1.1.32)) [68].

Димеризация LPL с образованием активного ферментного комплекса происходит в ЭР при участии шаперонов и ионов кальция. Показано, что димерная форма LPL нестабильна и легко распадается на каталитически неактивные мономеры. Предполагается, что нестабильность димера является механизмом ограничения продолжительности жизни фермента в эндотелии, где LPL находится «вне досягаемости» обычных систем контроля активности энзимов, таких как, например, протеинкиназозависимое фосфорилирование [69, 70].

Кроме АРОС2, активность LPL регулируется двумя специфическими протеинами – ангиопозтин-подобным белком 4 (ANGPTL4) и гликозилфосфатидилинозитол-несущим белком 1, связывающим липопропротеины высокой плотности (GPIHBP1). Установлено, что ANGPTL4 катализирует раскручивание (анфолдинг) полипептидной цепи N-терминального домена LPL, ответственного за гидролазную активность и, тем самым, ингибирует фермент. Напротив, GPIHBP1, связываясь LPL, делает фермент в значительной степени невосприимчивым к ингибирующему действию ANGPTL4 [71].

Свободная LPL, выделенная из коровьего молока, исключительно термолабильна: её температура плавления (Tm) равна 34,8 °C, но в присутствии GPIHBP1 термоустойчивость фермента повышается, а его Tm увеличивается до 57,6 °C [72].

10	20	30	40	50
MESKALLLLA	LSVCLQSLTV	SRGGLVAA	DR ITGGKDFRDI	ESKFALRTPE
60	70	80	90	100
DTAEDTCHLI	PGVTESVANC	HFNHSSKTFV	VIHGWTVTGM	YESWVPKLVA
110	120	130	140	150
ALYKREPDSN	VIVVDWLSRA	QQHYPVSAGY	TKLVGQDVAK	FMNWMADFN
160	170	180	190	200
YPLGNVHLLG	YSLGAHAAGI	AGSLTNKKVN	RITGLDPAGP	NFEYAEAPSR
210	220	230	240	250
LSPDDADFVD	VLHTFTRGSP	GRSIGIQKPV	GHVDIYPNGG	TFQPGCNIGE
260	270	280	290	300
ALRVIAERGL	GDVDQLVKCS	HERSVHLFID	SLLNEENPSK	AYRCNSKEAF
310	320	330	340	350
EKGLCLSCRK	NRCNNMGYEI	NKVRAKRSSK	MYLKTRSQMP	YKVFHYQVKI
360	370	380	390	400
HFSGTESNTY	TNQAFEISLY	GTVAESENIP	FTLPEVSTNK	TYSFLLYTEV
410	420	430	440	450
DIGELLMLKL	KWISDSYFSW	SNWWSSPGFD	IGKIRVKAGE	TQKKVIFCSR
460	470			
EKMSYLQKGK	SPVIFVKCHD	KSLNRKSG		

Рис. 4.5. Первичная структура **пре-липопротеин липазы** коровы [68]. Зеленым фоном выделен пре-фрагмент (Met1-Ala28), который удаляется при посттрансляционной модификации, желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелой LPL (Asp29-Gly478). Красным фоном выделены N-гликозилированные остатки Asn. Участок Cys246-Cys269, отмеченный бирюзовым фоном, отвечает за субстратную специфичность фермента. Белым фоном и жирным шрифтом с подчеркиванием отмечен Ser162 активного центра. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Липопротеин липаза коровы относится к семейству липаз, которые произошли от одного фермента-предшественника. Кроме LPL в него входят панкреатическая липаза (PL), которая гидролизует эмульгированные триглицериды, и печеночная липаза (HL) [73]. Все ферменты этого семейства активируются специфическими низкомолекулярными белковыми кофакторами. Для проявления активности PL требуется колипаза – белок, содержащий 96 аминокислотных остатков, который позиционирует и удерживает фермент на границе раздела фаз липид/вода [74]; LPL активируется при участии белка APOC2 (79 а.к. остатков); HL активируется аполипопротеином A2, но ингибируется аполипопротеинами A1, C1, C2 и C3 [5, 75–77].

Вторичная и третичная структуры LPL коровы не были определены. Трехмерная структура LPL моделируется по аналогии со структурой PL [78], поскольку эти ферменты имеют высокий уровень гомологии а.к. последовательности. Пространственная модель мономера LPL, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22], представлена на рисунке 4.6. Согласно данным [79–81] LPL состоит из двух структурно различающихся областей: большего N-концевого домена (NTD) и меньшего C-концевого домена (CTD), соединенных подвижным полипептидным участком. Карбокситерминальный домен необходим для связывания с липопротеиновым субстратом, тогда как N-концевой домен является областью, ответственной за катализ.

Липопротеин липаза гидролизует триглицериды молочного жира с образованием свободных жирных кислот (СЖК). Оптимумы pH и температуры для LPL составляют ~9 и 37 оС соответственно. При оптимальных условиях каталитическая константа скорости (число оборотов фермента, k_{cat}) LPL составляет ~3000 с⁻¹ [5].

В молоке коровы содержится 1–2 мг/л (10–20 нМ) LPL. Теоретически этого количества фермента вполне достаточно для того, чтобы вызвать гидролитическую прогорклость молока в течение ~10 с. Тем не менее, в нативном молоке LPL проявляет относительно низкую активность, поскольку отделена от своих триглицерид-содержащих субстратов мембраной молочной жировой глобулы (ММЖГ). Кроме того, в коровьем молоке активность LPL ингибируют СЖК и некоторые протеозопептоны, в частности – РР8. Но если в результате каких-либо технологических операций (встряхивания, пенообразования, охлаждения/нагрева, замораживания/оттаивания, гомогенизации) ММЖГ утрачивает свою целостность, это приводит к активации липолиза, усиленному гидролизу триглицеридов и, как следствие, к появлению прогорклости. Физико-химические факторы, вызывающие усиление липолитической активности, как правило, способствуют переходу LPL из казеиновых мицелл в жировую фазу (молочные сливки) [5, 82, 83].

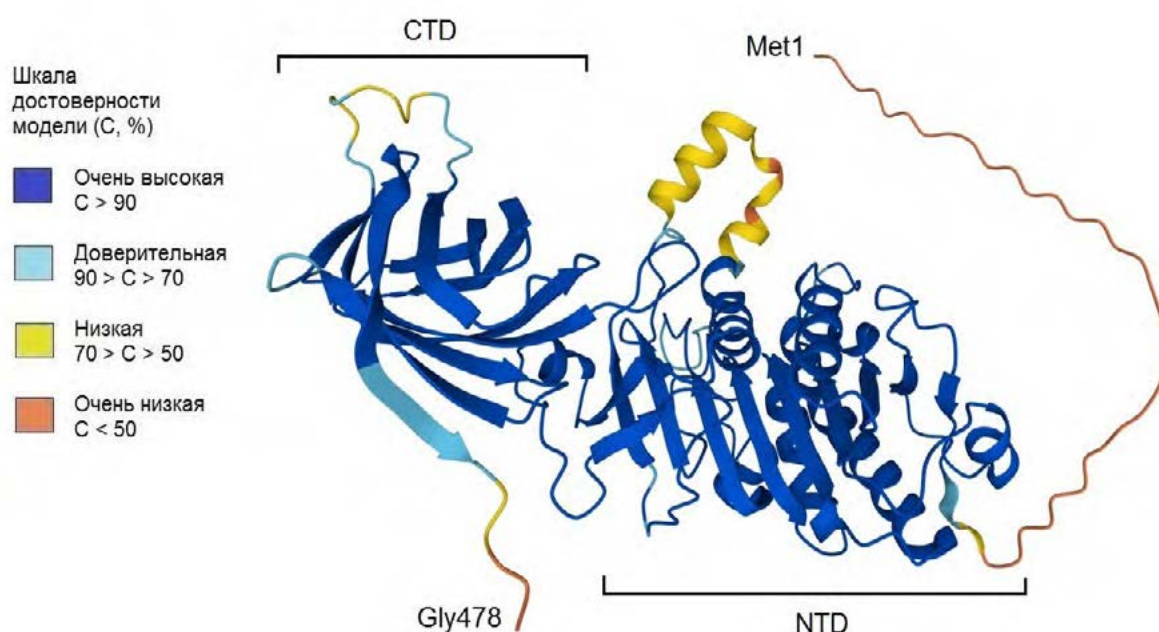


Рис. 4. 6. Модель предполагаемой трехмерной структуры мономера пре-липопротеин липазы коровы по данным сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P11151>) [21, 22]. NTD – N-терминальный домен; CTD – C-терминальный домен

В некоторых случаях в индивидуальных образцах молока наблюдается усиленный спонтанный гидролиз триглицеридов молочного жира, что связывают с повышенным уровнем активатора ЛПЛ – аполипопротеина С2 – или низкой концентрацией РР8 [54].

Как уже было сказано, в молоке LPL связана с казеиновыми мицеллами, поэтому, попадая в сычужный сгусток, фермент может вызывать липолитическую прогорклость сыра. К счастью, LPL практически полностью инактивируется при термообработке и поэтому не оказывает негативного влияния на сыры, приготовленные из пастеризованного молока. Но при производстве сыра из непастеризованного молока неинактивированная LPL попадает в сгусток и ускоряет гидролиз молочного жира, что может вызвать появление прогорклости в готовом продукте [4].

Козье молоко содержит два изофермента LPL и проявляет только ~4% от липолитической активности коровьего молока [84]. В области сигнального пептида гена LPL козы обнаружен полиморфизм, который связан с молочной продуктивностью [85].

В отличие от коровьего молока, в котором большая часть (~80%) LPL связана с мицеллами казеина, а менее 10% приходится на фазу сливок, в молоке козы <10% LPL связано с мицеллами, а на сливки и сыворотку приходится, приблизительно, по 45% LPL. Такие особенности распределения LPL объясняют как высокую подверженность козьего молока к спонтанному липолизу, так и характерный вкус, который обусловлен наличием жирных кислот с разветвленной цепью: 4-метил- и 4-этилоктановой кислоты [5]. Различные аспекты липолитической системы козьего молока представлены в работах Y. Chilliard и соавторов [86, 87].

Овечье молоко содержит только ~10% от липолитической активности коровьего молока [88]. Структура гена и особенности овечьей LPL рассматриваются в работах W.D. Edwards и соавторов [89] и M. Bonnet и соавторов [90].

Молоко лошади и коровы проявляет примерно одинаковую липолитическую активность, обусловленную присутствием LPL [91].

Фосфолипазы. Фосфолипазы катализируют гидролиз одной или нескольких сложноэфирных связей в фосфолипидах. Вопрос о наличии в молоке фосфолипаз является дискуссионным. По данным T.P. Shukla и J. Tobias, сырое молоко проявляет значительную активность фосфолипазы D, что, по их мнению, предотвращает окислительную прогорклость [92]. В то же время C.Chen и соавторам не удалось выявить активность фосфолипазы D в молоке [93]. В 1972 году J.P. O'Mahony и W.F. Shipe сообщали о присутствии в молоке фосфолипазы C, которая, по мнению этих авторов, способна предотвращать окисление липидов молока [94].

Эстеразы. Эстеразы катализируют разрыв эфирных связей. В отличие от липаз, эстеразы атакуют не эмульгированные, а растворимые субстраты. В ранних исследованиях не делалось различий между этими двумя ферментами. Между тем молоко содержит несколько различных эстераз: арилэстеразу (ЕС 3.1.1.7), холинэстеразу (ЕС 3.1.1.8), карбоксилэстеразу (ЕС 3.1.1.1) [95]. Арилэстераза (салолаза) была одним из первых ферментов, открытых в молоке [56]. Высокая активность арилэстеразы наблюдается в молозиве и в молоке маститных животных, однако, по современным представлениям, какой-либо технологической значимости этот фермент не имеет [3].

4.5. Амилаза (α -Амилаза ЕС 3.2.1.1., β -Амилаза ЕС 3.2.1.2)

Амилаза (диастаза) гидролизует внутренние α -1,4-связи крахмала с образованием мальтозы, мальтотриозы и α -декстрина. Амилазная активность в коровьем молоке и сырах обнаружена в 1920 г. M. Sato [96], который также предположил, что фермент синтезируется непосредственно в молочной железе. Впоследствии G.A. Richardson и C.L. Hankinson установили, что амилаза является эндогенным ферментом молока и присутствует в нем в двух формах – α -амилазы (основной фермент) и β -амилазы (минорный фермент) [97]. В основном активность амилазы присутствует в обезжиренном молоке и молочной сыворотке.

Последнее сообщение о получении высококонцентрированного препарата α -амилазы из коровьей молочной сыворотки датировано 1958 г. [98]. По-видимому, никаких дальнейших работ по выделению этого фермента из коровьего молока не проводилось.

В 2009 г. опубликованы результаты работ по выделению, очистке и характеристике β -амилазы из молока одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) [99]. Было показано, что удельная активность амилазы в верблюжьей молочной сыворотке равна 59,9 U/мг белка. Молекулярная масса β -амилазы верблюжьего молока составляет ~61 кДа. Фермент проявлял максимальную активность при pH 7,0 и температуре 30–40 °C, термостабилен в диапазоне 10–40 °C, но после прогревания при ≥ 50 °C быстро инактивировался. Значение константы Михаэлиса, полученное при использовании в качестве субстрата крахмала, равнялось 13,6 мг/л. Фермент

проявлял более высокое сродство к амилозе и растворимому крахмалу, чем к гликогену, амилопектину, декстрану и пуллулану. Хлориды магния, кальция и натрия стимулировали активность β -амилазы, в то время как хелатирующие агенты (ЭДТА, ЭГТА) её подавляли. Активность верблюжьей молочной β -амилазы повышалась в присутствии неионных детергентов Тритона X-100 и Тритона X-114. Ингибитор сериновых протеиназ – фенилметилсульфонил фторид – не оказывал никакого влияния на активность фермента. Вместе с тем активность β -амилазы подавлялась мочевиной, додецилсульфатом натрия, 5',5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислотой), йодацетамидом, N-этилмалеимидом, аprotинином и ингибитором трипсина. Бэта-амилаза верблюжьего молока воздействовала на крахмал с образованием мальтозы и продемонстрировала способность разрушать гранулы крахмала различного происхождения (картофеля, кукурузы, маниоки и риса).

Термоинаktivация молочной амилазы при температурах выше 60 °C была предложена в качестве надежного показателя интенсивности тепловой обработки молока [100].

Молоко коровы не содержит крахмал или другие олигосахариды в сколько-нибудь значимых концентрациях, поэтому функция амилазы в нем не совсем понятна. Учитывая способность амилазы гидролизовать полисахариды клеточной стенки бактерий, можно предполагать, что фермент играет антибактериальную роль [3].

В молоке человека, во фракциях IgG и IgA, выявлены абзимы (антитела, проявляющие ферментативную активность) с амилалитической активностью [101].

4.6. Протеиназы

Ферменты этой группы гидролизуют различные типы пептидных связей в белках и пептидах. Первое упоминание о протеолитической активности молока в научной литературе следует, вероятно, отнести к работе W.K. Sullivan (1859), который сообщил, что в процессе хранения асептического молока казеин «превращается» в «сывороточные белки», не преципитирующие при кислых значениях pH [102]. Скорее всего, «превращение казеина в сывороточные белки» происходило под действием плазмينا.

В 1897 г. уже упоминавшиеся нами S.M. Babcock и H.L. Russell, кроме каталазной активности, обнаружили в богатых лейкоцитами экстрактах сепараторной слизи трипсиноподобную протеазу, которую назвали «галактазой» («происходящий из молока», от греческого gala – молоко) и предположили, что она может участвовать в процессе созревания сыров [41]. По-видимому, «галактаза» была одним из катепсинов лейкоцитарного происхождения, а не плазмином, который ассоциирован с казеиновыми мицеллами, но не соматическими клетками [3]. В 1898 г. всё тот же S.M. Babcock с соавторами показали, что молоко коровы, козы, овцы осла, бизона, свиньи и человека обладает протеолитической активностью [103]. Позднее (в 1917 г.) R.W. Thatcher и A.C. Dahlberg также сообщили об обнаружении эндогенной протеиназы молока в образцах сепараторной слизи [104].

Несмотря на это, присутствие эндогенных протеиназ в коровьем молоке долгие годы оставалось предметом дискуссий; считалось, в частности, что их источником могут быть бактерии. Вопрос оставался открытым даже после публикации R.G. Warner и E. Polis (1945), которые сообщили о протеолитической активности «кислого казеина», вызывавшего уменьшение вязкости растворов казеината натрия при хранении, что сопровождалось увеличением относительного содержания азотистой фракции, растворимой при pH=4,6 [105]. В 1960 г. точку в дискуссии поставили W.J. Harper и соавторы, доказавшие, что асептическое молоко с добавленными в него антибиотиками обладает слабой протеолитической активностью, следовательно, содержит эндогенные протеиназы [106].

Плазмин (ЕС 3.4.2.17). Плазмин (фибринолизин) является основной эндогенной (нативной) протеиназой молока. В организме млекопитающих, кроме фибринолитической активности (способности лизировать фибриновые сгустки), плазмин (PLMN) участвует в процессах миграции клеток (включая реакции на воспаление), метастазирования, ремоделирования тканей (включая ангиогенез), роста аксонов нервных клеток и заживления ран [107].

Структура гена и а.к. последовательность плазминогена (PLG) коровы установлены в 1985–1995 гг. [108–109]. Первичная последовательность коровьего PLG, а также разнообразная информация о структуре и некоторых свойствах этого фермента находятся в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P06868/entry>). Идентификационный номер PLG коровы – P06868 (PLMN_BOVIN) [110]. Фермент синтезируется в виде предшественника – пре-плазминогена, состоящего из 812 а.к. остатков (вычисленная ММ равна 91,216 кДа). Сигнальный пептид состоит из 26 аминокислот (рис. 4.7). Посттрансляционные модификации включают в себя образование 24 внутримолекулярных дисульфидных связей, фосфорилирование по остатку Ser600 и гликозилирование Asn315 (сайт N-гликозилирования) и Ser365 (сайт O-гликозилирования) [110].

10	20	30	40	50	60
MLPASPKMEH	KAVVFLLLLF	LKSGLGDLLD	DYVNTQGASL	LSLSRKNLAG	RSVEDCAAKC
70	80	90	100	110	120
EEETDFVCRA	FQYHSKEQQC	VVMAENSKNT	PVFRMRDVIL	YEKRIYLLEC	KTGNGQTYRG
130	140	150	160	170	180
TTAETKSGVT	CQKWSATSPH	VPKFSPEKFP	LAGLEENYCR	NPDNDENGPW	CYTTPDPKRY
190	200	210	220	230	240
DYCDIPECED	KCMHCSGENY	EGKIAKTMSG	RDCQAWDSQS	PHAHGYIPSK	FPNKNLKMNY
250	260	270	280	290	300
CRNPDGEPRP	WCFTTDPQKR	WEFCDIPRCT	TPPPSSGPKY	QCLKGTGKNY	GGTVAVTESG
310	320	330	340	350	360
HTCQRWSEQT	PHKHNRTPEN	FPCKNLEENY	CRNPNGEKAP	WCYTTNSEVR	WEYCTIPSCE
370	380	390	400	410	420
SSPLSTERMD	VPVPPEQTPV	PQDCYHGNGQ	SYRGTSSTTI	TGRKCQSWSS	MTPHRHLKTP
430	440	450	460	470	480
ENYPNAGLTM	NYCRNPDADK	SPWCYTTPR	VRWEFCNLKK	CSETPEQVPA	APQAPGVENP
490	500	510	520	530	540
PEADCMIGTG	KSYRGKKATT	VAGVPCQEWA	AQEPHQHSIF	TPETNPQSGL	ERNYCRNPDG
550	560	570	580	590	600
DVNGPWCYTM	NPRKPFDYCD	VPQCESSFDC	GKPKVEPKKC	SGRTVGGCVS	KPHSWPWQVS
610	620	630	640	650	660
LRRSSRHFCG	GTLISPKWVL	TAAHCLDNIL	ALSFYKVILG	AHNEKVREQS	VQEIPVSRLF
670	680	690	700	710	720
REPSQADIAL	LKLSRPAIIT	KEVIPACLP	PNYMVAARTE	CYITGWGETQ	GTFGEGLLKE
730	740	750	760	770	780
AHLPVIENKV	CNRNEYLDGR	VKPTELCAGH	LIGGTDSCQG	DSGGPLVCFE	KDKYILQGV
790	800	810			
SWGLGCARP	KPGVYVRVSP	YVPWIEETMR	RN		

Рис. 4.7. Первичная структура **пре-плазминогена** коровы [110]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид (Met1–Gly26), желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого плазминогена (Asp27–Asn812). Черным жирным шрифтом выделены кринглы 1 (110–188), 3 (282–359), 5 (485–564); красным шрифтом обозначены кринглы 2 (192–269), 4 (384–461). Черным фоном выделены аминокислоты, образующие активный центр фермента – His624, Asp667 и Ser762. Лиловым фоном отмечен сайт Arg583–Phe584, гидролиз которого приводит к превращению плазминогена в плазмин. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Молекула плазима коровы – это одноцепочечный гликопротеин, состоящий из 786 аминокислотных остатков, с вычисленной ММ 88,092 кДа. Полипептидная цепь PLMN образует пять дисульфидно-связанных петлеобразных структур, состоящих из 77–79 а.к., получивших название «кринглы» (от англ. cringle – кренгельс – кольцо в парусе, в которое продевается веревка). Главная функция кринглов – взаимодействие с субстратами, ингибиторами, кофакторами и рецепторами [108, 111, 112]. Трехмерная структура пре-плазминогена, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. [21,22], и схема доменной организации фермента представлены на рисунке 4.8.

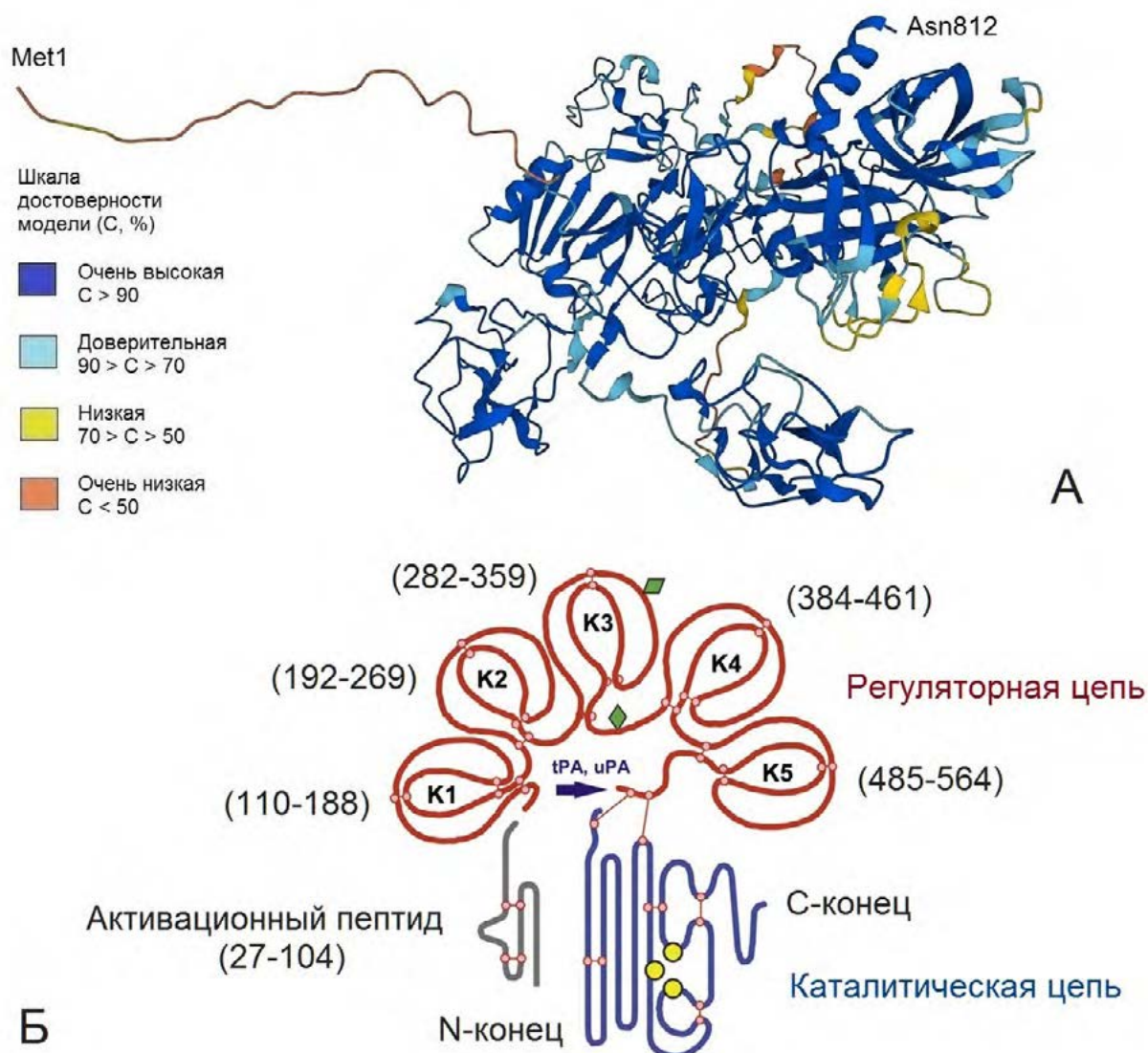


Рис. 4.8. Структура плазминогена коровы. А. Модель пре-плазминогена, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P00432>) [21, 22]. Б. Схема структуры молекулы плазминогена (по данным [112]). В круглых скобках указаны последовательности аминокислот, буквами K1-K5 обозначены кринглы, каталитический центр обозначен кружками желтого цвета, зелеными ромбами указаны сайты О- и N-гликозилирования, дисульфидные мостики обозначены маленькими кружками, соединенными линиями. Стрелкой указан сайт гидролиза полипептидной цепи тканевым активатором плазминогена (tPA) и урокиназой (uPA). Серым, коричневым и синим цветом обозначены активационный пептид, регуляторная цепь с кринглами и каталитическая цепь соответственно

Фактически в молоке присутствуют все компоненты плазминовой системы: плазминоген (зимоген), плазмин и его ингибиторы, активаторы плазминогена и ингибиторы активаторов плазминогена (рис. 4.9), которые попадают в молоко из плазмы крови [113].

Зимоген превращается в плазмин в результате ограниченного протеолиза по связи Arg583-Ile584 (нумерация пре-плазминогена) под действием двух специфических протеиназ – урокиназы и тканевого активатора плазминогена.

В присутствии ингибитора PLMN активация включает только гидролиз связи Arg583-Ile584, в результате чего образуются две цепи: тяжелая, или регуляторная, которая несет кринглы и имеет ММ около 60 кДа, и легкая, или каталитическая, с ММ порядка 25 кДа. Тяжелая и легкая цепи удерживаются вместе двумя дисульфидными связями. В отсутствие ингибитора PLMN дополнительно происходит удаление активационного пептида (фрагмент 27–104), расположенного на N-конце тяжелой цепи (рис. 4.8) [110, 112].

Концентрация плазминогена в молоке коровы примерно в 8 раз выше, чем концентрация плазмина. Поскольку источником плазминовой системы является сыворотка крови, активность PLMN возрастает в ситуациях, когда наблюдается повышенный приток компонентов крови в молоко, например, во время мастита и в конечной фазе лактации [108].

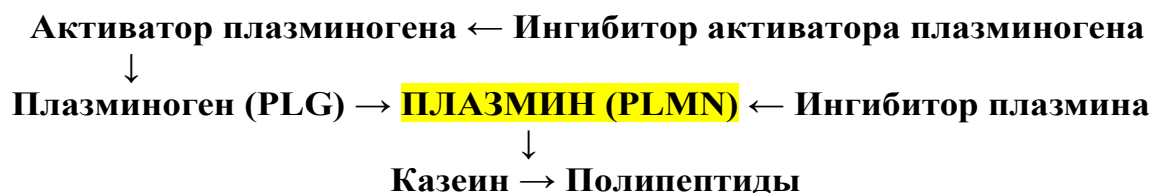


Рис. 4.9. Схема плазминовой системы молока [113]

Возможно, активность плазмина оказывает влияние на процессы, связанные с физиологией секреции молока. В частности, было показано, что продукт гидролиза бета-казеина плазмином – протеозо-пептон 8f (β -CN f1-28) – способен подавлять секрецию молока в молочной железе коров [5, 114].

В молоке плазмин, плазминоген и активаторы плазминогена ассоциированы с казеиновыми мицеллами, а ингибиторы плазмина и активаторы плазминогена находятся в сыворотке [115, 116]. Поэтому в сычужный сгусток попадают зимогены и ферменты плазминовой системы, но не их ингибиторы [108].

Плазмин относится к группе сериновых протеиназ, его оптимум pH равен 7,5, а температурный оптимум составляет 37 °С. Фермент проявляет трипсиноподобную специфичность и преимущественно атакует связи по карбоксильным группам лизина и аргинина, имеющим структуру Lys-X и Arg-X (где X – любой аминокислотный остаток) [108].

В результате протеолитической деградации казеинов под действием PLMN образуется широкий спектр низкомолекулярных полипептидных продуктов: γ - и λ -казеины, некоторые протеозо-пептоны и другие пептиды. По эффективности гидролиза плазмином индивидуальные казеины располагаются в следующем порядке: $\beta \approx \alpha s2 \gg \alpha s1$ [111]. Каппа-казеин устойчив к действию PLMN, по-видимому, благодаря высокому содержанию карбогидратных остатков [117]. Плазмин почти не проявляет протеолитическую активность по отношению к β -лактоглобулину и α -лактальбумину. По данным M.B. Grufferty и P.F. Fox β -лактоглобулин даже ингибирует активность плазмина [118].

Молекула основного молочного субстрата плазмина – β -казеина – содержит, в зависимости от генетического варианта, от 15 до 17 пептидных связей, потенциально чувствительных к действию фермента, но только три из них с достаточно высокой скоростью гидролизуются в молоке: Lys28-Lys29, Lys105-Hys106, Lys107-Glu108. Гидролиз этих связей плазмином приво-

дит к образованию гамма-казеинов (С-терминальные фрагменты β -CN): γ 1-CN (β -CN (ф. 29-209)), γ 2-CN (β -CN (ф. 106-209)), γ 3-CN (β -CN (ф. 108-209)) и протеозо-пептонов (N-терминальных фрагментов β -CN): PP8 быстрый (β -CN (ф. 1-28)), PP8 медленный (β -CN (ф. 29-105) и (ф. 29-107)), PP5 (β -CN (ф. 1-105) и (ф. 1-107)) [119].

Белки семейства α 2-казеинов также являются хорошим субстратом для плазмина. В модельных системах PLMN гидролизует α 2-казеин по связям: Lys21-Gln22, Lys24-Asn25, Lys149-Lys150, Lys150-Thr151, Lys182-Thr182, Lys188-Ala189, Lys197-Thr198, Arg114-Asn115 [120, 121]. Достоверно не установлено, происходит ли гидролиз этих связей с образованием соответствующих пептидов непосредственно в молоке или фрагментация полипептидной цепи α 2-казеина под действием плазмина происходит уже в сыре. Наиболее вероятно последнее предположение, поскольку концентрация α 2-казеина, являющегося «плохим» субстратом для химозина, быстро снижается в процессе созревания сыра [122].

Наименее чувствителен к действию плазмина α 1-казеин [123]. Тем не менее D.Le Bars и J.C.Gripon идентифицировали в этом белке семь Lys-X и четыре Arg-X плазмин-чувствительных связи [124]. P.L.H. McSweeney с соавторами расширили этот список (в который вошли и связи, найденные Le Bars и Gripon) до 12 Lys-X и 5 Arg-X связей: Lys3-His4, Lys7-His8, Arg22-Phe23, Lys34-Glu35, Lys36-Lys37, Lys58-Gln59, Lys79-His80, Arg90-Tyr91, Arg100-Leu101, Lys102-Lys103, Lys103-Tyr104, Lys105-Val106, Arg119-Leu120, Lys124-Glu125, Gln131-Lys132, Arg151-Gln152, Lys193-Thr194 [125]. В результате гидролиза указанных связей в молоке могут накапливаться продукты гидролиза α 1-казеина которые называют λ -казеинами. Предполагается, что λ -казеины образуются не только в результате гидролиза α 1-казеина плазмином, но и при участии другой эндогенной протеиназы молока – катепсина D [3, 126].

Активность плазмина ускоряет первичный протеолиз казеинов (особенно β -казеинов) в сырах. Индикатором активности плазмина в сыре считается накопление в нем γ -казеинов. В наибольшей степени этот процесс проявляется в сырах, вырабатываемых с использованием высоких температур второго нагревания, при которых происходит почти полная термоинактивация молокосвертывающих ферментов, остающихся в сгустке [127]. Исследования, выполненные с применением ингибитора плазминогена – 6-аминогексановой кислоты – показали, что плазмин вносит хоть и не основной, но значительный вклад в процессы протеолиза казеинов в сырах типа Чеддар [4].

Повышенная активность PLMN в молоке приводит к снижению выхода сыра, поскольку продукты протеолиза казеинов (прежде всего протеозо-пептоны) не инкорпорируются в сгусток и теряются с сывороткой [128]. Показано, что плазминоген, попадающий в сгусток, может активироваться эндогенными (молочными) или экзогенными активаторами плазмина (например, урокиназой) и тем самым дополнительно усиливать протеолиз при созревании сыров [111, 129].

Активность PLMN в молоке растет по мере увеличения продолжительности лактации, с повышением возраста коровы и при заболевании маститом [108]. В результате плазмин может существенно влиять на некоторые технологические свойства молока. Одной из причин получения так называемого сычужно вялого молока является повышенная активность в нем плазмина. Кроме того, протеозопептоны способны ингибировать активность молокосвертывающих ферментов, что ухудшает сычужное свертывание молока, приводит к нарушению синергизма сгустка и повышенному содержанию влаги в сыре [128, 130].

Благодаря развитию технологий, обеспечивающих снижение бактериальной обсемененности молока, длительность его хранения на фермах и предприятиях возрастает. Поскольку активация плазминогена происходит и в охлажденном молоке [115, 116], учет активности

плазмина, приобретает особую значимость как при длительном хранении молока, так и при созревании изготовленных из него сыров [111, 113].

В ряде современных технологических процессов молоко подвергается воздействию высоких (72–75 °С) и сверхвысоких (130–140 °С) температур. Известно, что термостабильность PLMN исключительно высока, и фермент способен частично сохранять активность даже после обработки молока при сверхвысоких температурах [19, 53]. Термообработка молока влияет на активность плазмينا парадоксальным образом: после пастеризации активность фермента несколько возрастает за счет тепловой инактивации ингибиторов плазмينا и ингибиторов активаторов плазминогена (Рис. 4.1) [3, 111].

Катепсин D (ЕС 3.4.23.5). Обнаруживаемый в коровьем молоке катепсин D (CATD) относится к кислым аспартатным пептидазам семейства А¹ и имеет лизосомальное происхождение [131, 132]. Концентрация катепсина D в молоке коровы составляет, примерно 0,4 мг/л, а в сыворотке – 0,3 мг/мл [23]. Это означает, что основная часть фермента не связана с казеиновыми мицеллами, а в качестве сырья для его выделения может использоваться кислотная сыворотка [133]. Поскольку пепстатин ингибирует ферментативную активность катепсина D, для выделения фермента из молока коровы применяется аффинный хроматографический сорбент Pepstatin-Sepharose [23]. Так же, как и плазмин, CATD является частью комплексной ферментативной системы. Основная часть обнаруживаемого в молоке коровы катепсина D находится в форме неактивного зимогена – прокатепсина D [134].

Первичная последовательность катепсина D коровы и другая информация о структуре и некоторых свойствах фермента размещены в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P80209/entry>). Идентификационный номер катепсина D *B.taurus* – P80209 (CATD_BOVIN) [135]. Фермент синтезируется в виде неактивного предшественника – прокатепсина D. Полипептидная цепь зимогена состоит из 390 а.к. остатков, вычисленная ММ равна 42,491 кДа (рис. 4.10). Про-фрагмент или активационный пептид состоит из 44 аминокислот [136]. Кроме удаления активационного пептида (Val1-Gln44), полипептидная цепь претерпевает ряд ПТМ, которые включают в себя образование четырех внутримолекулярных дисульфидных связей (Cys71-Cys140, Cys90-Cys97, Cys264-Cys268, Cys307-Cys344) и N-гликозилирование остатков Asn114и Asn241[135].

10	20	30	40	50	60
VIRIPLHKFT	SIRRTMSEAA	GXVXXLIAKG	PISKYATGEP	AVRQGPPEL	LKNYMDAQYY
70	80	90	100	110	120
GEIGIGTPPQ	CFTVVFDTGS	ANLWVPSIHC	KLLDIACWTH	RKYNSDKSST	YVKNGTTFDI
130	140	150	160	170	180
HYGSGSLSGY	LSQDTVSVPC	NPSSSSPGGV	TVQRQTFGEA	IKQPGVVFIA	AKFDGILGMA
190	200	210	220	230	240
YPRISVNNVL	PVFDNLMQK	LVDKNVFSFF	LNRDPKAQPG	GELMLGGTDS	KYYRGSLMFH
250	260	270	280	290	300
NVTRQAYWQI	HMDQLDVGSS	LTVCCKGGCEA	IVDTGTSLIV	GPVEEVRELQ	KAIGAVPLIQ
310	320	330	340	350	360
GEYMIPCEKV	SSLPEVTVKL	GGKDYALSPE	DYALKVSQAE	TTVCLSGFMG	MDIPPPGGPL
370	380	390			
WILGDVFIGR	YYTVFDRDQN	RVGLAEAAARL			

Рис. 4.10. Первичная структура **прокатепсина D** коровы [135]. Зеленым фоном выделен активационный пептид, желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого катепсина D. Лиловым фоном выделены Asp77 и Asp273, образующие активный центр фермента, бирюзовым фоном обозначены сайты N-гликозилирования. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

При заболевании коров маститом происходит усиленный перенос лейкоцитов из крови в молоко. В результате в молоке увеличивается содержание соматических клеток, при разрушении которых происходит высвобождение различных лизосомальных ферментов, в том числе и CATD [132, 137].

Ферментативная специфичность CATD близка к специфичности химозина (Хн), но несмотря на это, катепсин D очень плохо свертывает молоко [138, 139]. По-видимому, это объясняется тем, что оптимум ферментативной активности катепсина D сдвинут в кислую сторону, и максимальная протеолитическая активность проявляется при pH=4,0. Температурный оптимум для CATD составляет 37 °C [5].

В молекуле α 1-казеина катепсин D способен гидролизовать следующие связи: Phe23-Phe24, Phe24-Val25, Leu98-Leu99, Leu149-Phe150 [139].

По отношению к β -казеину CATD проявляет специфичность, очень близкую к таковой для химозина. Не удивительно, что и спектр образующихся пептидов близок к качественному составу продуктов гидролиза β -казеина, возникающих в результате действия Хн. В молекуле β -казеина катепсин D атакует не менее 13 пептидных связей: Phe52-Ala53, Leu58-Val59, Pro81-Val82, Ser96-Lys97, Leu125-Thr126, Leu127-Thr128, Trp143-Met144, Phe157-Pro158, Ser161-Val162, Leu165-Ser166, Leu191-Leu192, Leu192-Tyr193, Phe205-Pro206 [119].

Вместе с тем количественные и качественные составы продуктов гидролиза α 2-казеина катепсином D и химозином значительно отличаются друг от друга, что свидетельствует о различиях в специфичности сравниваемых ферментов по отношению к данному субстрату [138]. Связи, потенциально гидролизруемые катепсином D, в молекуле α 2-казеина имеют следующую структуру: Leu99-Tyr100, Leu123-Asn124, Leu180-Lys181, Thr182-Val183 [139].

В отличие от плазмина, катепсин D способен фрагментировать полипептидную цепь каппа-казеина по сайтам: Leu32-Ser33, Leu79-Ser80, **Phe105-Met106** (гидролиз этой связи объясняет коагуляционную способность катепсина D). Кроме казеинов, CATD потенциально может атаковать аминокислотную последовательность денатурированного α -лактальбумина и «резать» её в двух точках: Leu52-Phe53, Trp104-Leu105. В то же время молекула нативного β -лактоглобулина, по-видимому, устойчива к действию катепсина D [5, 139].

Модель трехмерной структуры полноразмерного катепсина D коровы, построенная с использованием программы RIBBONS 2.0 [140], представлена на рисунке 4.11. Молекула фермента состоит из двух доменов (N- и C-терминального), в складке между которыми расположен активный центр, образованный остатками Asp77 и Asp273.

Катепсин D инактивируется примерно на 55% при режимах второго нагревания – 55 °C в течение 30 минут, – используемых при производстве различных видов сыров. При HTST-пастеризации CATD инактивируется на 92%, а полная утрата ферментативной активности наблюдается после прогревания молока при 70 °C в течение 10 минут [141]. При комнатной температуре катепсин D молока выдерживает обработку высоким давлением, но с увеличением температуры терморезистентность фермента снижается и при 650 МПа и 40 °C или 450 МПа и 55 °C его основная часть инактивируется [142].

В процессе выработки сыров катепсин D «отходит» от молочного сгустка вместе с отделяемой сывороткой. Протеолитическая активность химозина и пепсина, удерживаемого сырным сгустком, намного выше активности CATD, остающегося в сырном зерне. Поэтому с учетом перекрестной специфичности этих ферментов сложно судить о вкладе катепсина D в процессы созревания сыров [119].

Другие протеиназы коровьего молока. В соматических клетках (лейкоцитах), попадающих в молоко коровы, содержатся катепсины А (EC 3.4.16.5) и G (EC 3.4.21.20), относящие-

ся к сериновым протеиназам, легумаин (ЕС 3.4.22.34) и эластаза (ЕС 3.4.21.36), а также большая группа пептидаз цистеинового типа: катепсины Н, В (ЕС 3.4.22.1), L (ЕС 3.4.22.1), S (ЕС 3.4.22.27), К (ЕС 3.4.22.38), Т (ЕС 3.4.22.24), О и дипептидил пептидаза I или катепсин С (ЕС 3.4.14.1) [3, 11, 119]. Присутствие в молоке *B. taurus* катепсина В подтверждено иммунологическими методами в 2001 г. [143]. Специфичность катепсина В по отношению к казеинам исключительно широка и имеет некоторое сходство с плазмином и химозином [144].

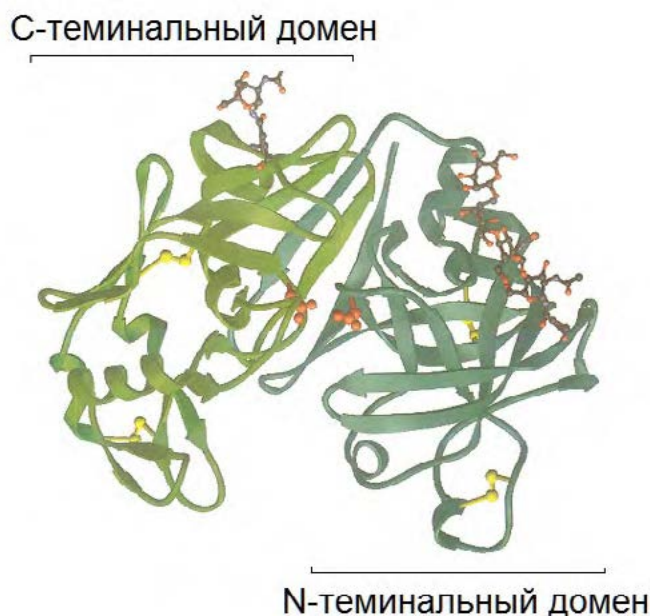


Рис. 4.11. Ленточная модель катепсина D коровы, построенная с использованием программы RIBBONS 2.0 (по данным [136]). Активный центр, образованный остатками Asp77 и Asp273, обозначен сферами красного цвета, дисульфидные связи выделены желтым цветом, а остатки углеводов изображены как сферы меньшего диаметра

Однако наличие в молоке коровы большинства вышеперечисленных ферментов не является установленным фактом и носит предположительный характер [119]. Не исключено, что цистеин-содержащие ферменты присутствуют в молоке, но не проявляют ферментативной активности из-за слишком высокого редокс-потенциала, при котором сульфгидрильные группы активных центров находятся в окисленном состоянии.

4.7. Фосфатазы

Фосфатазы (фосфомоноэстеразы) гидролизуют моноэфиры ортофосфорной кислоты, как алифатические, например, глицерол-1-фосфат, глицерол-2-фосфат, так и ароматические, например, 4-нитрофенолфосфат. Они не действуют на диэфиры и триэфиры фосфорной кислоты.

Различие между ферментами этой группы наблюдается при действии на эфиры, содержащие серу. Щелочная фосфатаза (но не кислая) гидролизует S-замещенные моноэфиры тиофосфатной кислоты, например, цистеамин-S-фосфат. Кислая фосфатаза (но не щелочная) гидролизует O-замещенные моноэфиры тиофосфорной кислоты, например, O-4-нитрофенилфосфат [145]. В коровьем молоке выявлено несколько фосфатаз. Основными являются щелочная и кислая фосфомоноэстеразы [2].

Щелочная фосфатаза (ЕС 3.1.3.1). Щелочная фосфатаза (ALP) – часто встречающийся фермент в макро- и микроорганизмах. Различают четыре основных типа ALP: кишечную, плацентарную, зародышевую и тканевую (не специфическую), которая имеет наибольшее сходство с эндогенной щелочной фосфатазой молока [2]. Щелочная фосфатаза человека яв-

ляется молекулярным маркером различных патологических состояний, поэтому определение активности этого фермента широко используется в клинической лабораторной диагностике.

Щелочную фосфатазу молока открыл F. Demuth в 1925 г. (цитировано по [146]). Активность ALP в коровьем молоке изменяется в широких пределах в зависимости от рациона, генотипа животного и стадии лактации (минимальная – на первой неделе, максимальная – на 28-й).

Интенсивное изучение щелочной фосфатазы началось после того, как выяснилось, что температурно-временные параметры, необходимые для её полной тепловой инактивации (70 °C в течение 16 секунд) лишь незначительно отличаются от таковых для *Mycobacterium tuberculosis*, инактивация которой является одной из основных целей HTST-пастеризации молока (72 °C в течение 15 секунд). Но в настоящее время принято считать, что ALP не совсем подходит на роль маркера HTST-пастеризации по следующим причинам: 1) способность фермента к реактивации (обсуждается ниже), что может затруднять интерпретацию результатов теста; 2) зависимость $\log_{10}$ % начальной активности ALP от режима пастеризации (в единицах пастеризации – Pasteurisation Units (PU)) не является линейной, в отличие от лактопероксидазы (LPO) и γ -глутамилтрансферазы (GGT) [147, 148].

Различные методы выделения и определения активности щелочной фосфатазы из коровьего молока рассмотрены в работах [2, 5].

Тканевая щелочная фосфатаза – мембранносвязанный гликопротеин. Молочная ALP также связана с фосфолипидами мембраны молочной жировой глобулы (ММЖГ) и может быть отделена от них после обработки молока фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазой C. Предполагается, что ALP молока связана с мембраной секреторных клеток молочной железы через фосфатидилинозитол, поскольку это обычный способ присоединения тканевых щелочных фосфатаз к клеточным мембранам млекопитающих [149]. Существуют данные о том, что в молоке содержатся две формы ALP: источником одной из них являются мембраны отмерших миктоэпителиальных клеток, другая происходит из белковой оболочки жировых микрокапель (предшественников молочных жировых глобул) [150].

Аминокислотная последовательность ALP коровы и разнообразная информация о свойствах этого фермента размещены в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P09487/entry>). Идентификационный номер щелочной фосфатазы *B. taurus* – P09487 (PPBT_BOVIN) [151]. Фермент синтезируется в виде пре-проALP, которая состоит из 524 а.к. остатков. Вычисленная ММ пре-проALP составляет 57,193 кДа. Пре-фрагмент или сигнальный пептид содержит 17 аминокислот. Про-фрагмент, расположенный на С-терминальном конце, состоит из 25 аминокислот (рис. 4.12). ПТМ включают в себя удаление сигнального пептида (Met1-Ser17) и про-фрагмента (Ala500-Phe524), образование двух внутримолекулярных -S-S- связей (Cys139-Cys201, Cys489-Cys497), фосфорилирование Ser в положении 110, липидирование Ser499 и N-гликозилирование остатков Asn140, Asn230, Asn271, Asn303 и Asn 430 [151].

Молекула щелочной фосфатазы – гомодимер, состоящий из двух идентичных субъединиц [2]. За исключением сигнального пептида и активационного пептида трехмерная структура мономера щелочной фосфатазы коровы предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P09487>), с высокой (>90%) достоверностью (рис. 4.13).

Щелочная фосфатаза из молока коровы содержит сайты связывания четырех ионов Zn^{2+} , которые являются критическими для проявления ферментативной активности, кроме того, активацию ALP индуцируют ионы Mg^{2+} . Хелатирующие соединения и неорганический фосфат ингибируют активность фермента. Оптимум pH ферментативной активности щелочной фосфатазы зависит от используемого субстрата: для p-нитрофенилфосфата он составляет 10,5, а для казеината – 6,8 [2].

10	20	30	40	50	60
MISPFLLLAI	GTCFASSLVP	EKEKDPKYWR	DQAQQTILKNA	LRLQTLNTNV	AKNVIMFLGD
70	80	90	100	110	120
GMGVSTVTAA	RILKGQLHHS	PGEETKLEMD	KFPYVALSKT	YNTNAQVPDS	AGTATAYLCG
130	140	150	160	170	180
VKANEGTVGV	SAATQRSQCN	TTQGNEVTSI	LRWAKDAGKS	VGIVTTTRVN	HATPSASYAH
190	200	210	220	230	240
SADRDWYSDN	EMPPEALSQG	CKDIAYQLMH	NIKDIEVIMG	GGRKYMFPKN	RTDVEYELDE
250	260	270	280	290	300
KARGTRLDGL	NLIDIWKSFK	PKHKHSHYVW	NRTDLLALDP	HSVDYLLGLF	EPGDMQYELN
310	320	330	340	350	360
RNMATDPSLS	EMVEMAIRIL	NKNPKGFFLL	VEGGRIDHGH	HEGKAKQALH	EAVEMDQAIG
370	380	390	400	410	420
QAGAMTSVED	TLTVVTADHS	HVFTFGGYTP	RGNSIFGLAP	MVSDTDKKPF	TAILYGNPG
430	440	450	460	470	480
YKVVGGEREN	VSMVDYAHNN	YQAQSAVPLR	HETHGGEDVA	VFAKGPM AHL	LHGVHEQNYI
490	500	510	520		
PHVMAYAACI	GANRDHCASA	SSSGSPSPGP	LLLLLLALLPL	GSLF	

Рис. 4. 12. Первичная структура **пре-проALP** коровы [151]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид, лиловым цветом обозначен активационный пептид, желтым фоном выделена а.к. последовательность зрелой щелочной фосфатазы. Бирюзовым фоном выделен Ser110, входящий в состав активного центра фермента, жирным шрифтом с подчеркиванием обозначены сайты N-гликозилирования. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

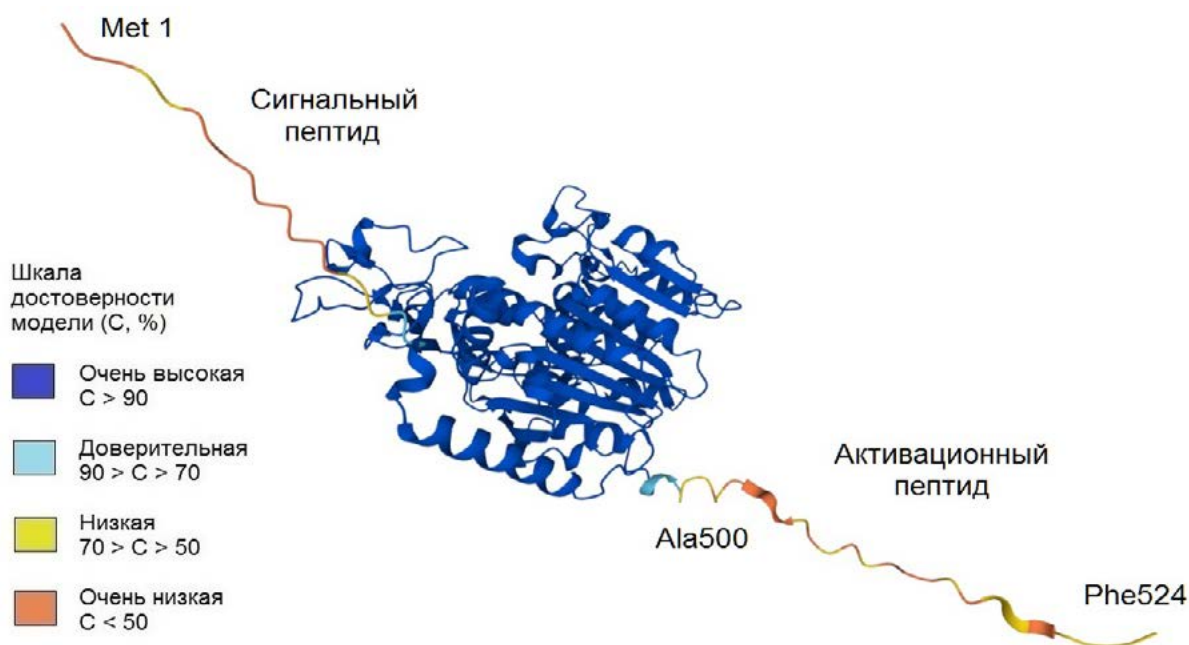
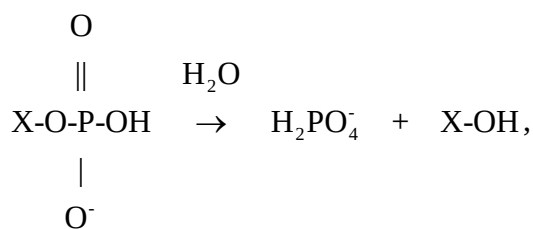


Рис. 4.13. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-проALP коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P09487>) [21, 22]

Классический метод определения активности щелочной фосфатазы в пастеризованном молоке разработан Н.Д. Кау и W.R. Graham еще в 1935 г. [152]. Метод до сих пор широко применяется во всем мире. В качестве субстрата ALP используется фенолфосфат, р-нитрофенолфосфат или фенолфталейн фосфат, который гидролизует, соответственно, до неорганического фосфата и фенола, р-нитрофенола или фенолфталейна:



где X-OH = фенол, р-нитрофенол или фенолфталеин.

Об активности фермента судят по образовавшемуся фенолу или его производным, а фосфат, освободившийся в результате реакции, как правило, не определяют, поскольку его прирост невелик на фоне общего высокого содержания фосфатов в молоке [5].

Со щелочной фосфатазой молока связан феномен так называемой фосфатазной реактивации, обнаруженный R.C. Wright и J. Tramer, в 1953–1956 гг. [153]. Суть феномена в следующем: молоко сразу после обработки при сверхвысокой температуре (СВТ) (130–140 °С, 3–5 секунд) является негативным по ферментативной активности щелочной фосфатазы, но при хранении активность ALP в нем частично восстанавливается. Контаминация микробной щелочной фосфатазой при этом исключена. Если молоко пастеризовать при стандартной HTST-процедуре (72 °С, 15 секунд), реактивации, как правило (в исключительных случаях, только в молоке от индивидуальных животных), не происходит. Пастеризация при стандартных режимах, проводимая после СВТ-обработки, препятствует реактивации. При оптимальной для реактивации температуре хранения – 30 °С – активность ALP появляется примерно через 6 часов и может сохраняться в течение 7 дней. В сливках реактивация ALP происходит интенсивнее, что можно объяснять защитным действием молочного жира на фермент [2].

Предпринимались неоднократные попытки объяснить этот феномен [154–156]. Установлено, что реактивируется только фермент в мембранносвязанной форме, ионы Mg^{2+} и Zn^{2+} усиливают реактивацию, а Sn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} и ЭДТА ингибируют восстановление активности щелочной фосфатазы. Предполагается, что Mg^{2+} и Zn^{2+} вызывают конформационные изменения в денатурированном ферменте, которые способствуют ренатурации. Для реактивации важны сульфгидрильные группы. Роль SH-групп, источником которых могут быть денатурированные сывороточные белки молока, предположительно, состоит в конкурентном хелатировании ионов тяжелых металлов, которые могут связываться с сульфгидрильными группами ALP, экспонируемыми при тепловой денатурации фермента. Однако следует признать, что в настоящее время точный механизм «фосфатазной реактивации» остается не ясным. Процесс реактивации «запускается» в продуктах, прогретых при ~104 °С, при pH около 6,5, в присутствии 64 mM Mg^{2+} , если после нагревания их инкубируют при 30 °С. Гомогенизация препаратов перед их прогреванием снижает степень реактивации ALP [2].

Реактивация щелочной фосфатазы имеет практическое значение, поскольку документация на пастеризованные продукты регламентирует отсутствие в них фосфатазной активности. В связи с этим были даже разработаны методы дифференцирования в стерилизованных молочных продуктах активности ренатурированной и остаточной нативной щелочной фосфатазы, основанные на внесении в исследуемые образцы ионов магния [156]. Однако при исследовании сливок и масла использование этих методов дало противоречивые результаты [157, 158].

Активность молочной ALP выявлена в созревающих сырах типа Grana Padano и Parmigiano Reggiano, выработанных из сырого молока. Как известно, протеолиз казеинов вносит основной вклад в формирование аромата и текстуры сыра. Считается, что наряду с кислой фосфатазой, ALP участвует в дефосфорилировании казеинфосфопептидов и тем самым предшествует

их полной протеолитической деградации. Это дает основание считать, что щелочная фосфатаза молока может вносить определенный вклад в процесс созревания сыров [4, 156].

Кислая фосфатаза (ЕС 3.1.3.2). Первыми об активности кислой фосфатазы (АСР) в молоке сообщили С. Huggins и Р. Talalay в 1948 г. [159]. Через два года J.E.C. Mullen подтвердил эти данные и показал, что кислая фосфатаза молока имеет оптимум при pH 4,0 и является исключительно термостабильным ферментом, так как для его полной инактивации необходимо прогревание при 88 °С в течение 10 минут [160]. В отличие от щелочной фосфатазы, кислая фосфатаза не активируется ионами Mg^{2+} , увеличивает активность в присутствии ионов Mn^{2+} и сильно ингибируется ионами F^- . Некоторое время АСР рассматривалась в качестве индикаторного фермента для выявления суперпастеризованного молока, однако в настоящее время для этой цели используются преимущественно γ -глутамилтрансфераза и лактопероксидаза [147, 148, 161].

Кислая фосфатаза человека является молекулярным маркером карциномы предстательной железы. Активность одной из форм костной АСР может использоваться как биохимический маркер функции остеокластов в процессе резорбции костной ткани [162].

Около 80% АСР обнаруживается в обезжиренном молоке, также специфическая фосфатазная активность выявлена в сливках, что указывает на возможность присутствия в молоке двух изоферментов. Кислая фосфатаза из обезжиренного молока – это гликопротеин с ММ~ 42 кДа и $pI=7,9$, его первичная последовательность богата щелочными аминокислотами. Активность фермента подавляется окислителями, ионами тяжелых металлов, ортофосфатами и полифосфатами, тогда как тиол-восстанавливающие реагенты и аскорбиновая кислота его активируют [163].

В 1999 г. N.K.R. Flynn предпринял попытку очистить кислую фосфатазу из ЖГМ, но даже после обработки ультразвуком и неионными детергентами фермент не удалось отделить от мембран жировых глобул. Годом позже С.М. Fleming выделил АСР из обезжиренного молока и методом ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе разделил её на две фракции (I и II). АСР-I и АСР-II соотносятся как 95:5, имеют близкие физико-химические и биохимические параметры, которые значительно отличаются от кислой фосфатазы из молочных сливок (см. [2]).

Информация о структуре и свойствах АСР коровы представлена в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A6H730/entry>). Идентификационный номер кислой фосфатазы из предстательной железы *B. taurus* – A6H730 (PPAP_BOVIN) [164]. Фермент синтезируется в виде пре-АСР, которая состоит из 387 а.к. остатков. Вычисленная ММ пре-АСР составляет 44,622 кДа. Сигнальный пептид содержит 34 аминокислоты (рис. 4.14). Процессинг включает в себя удаление сигнального пептида (Met1-Ala34), образование трех внутримолекулярных дисульфидных мостиков (Cys163-Cys374, Cys217-Cys315, Cys349-Cys353) и N-гликозилирование трех а.к. остатков: Asn96, Asn222, Asn335 [164].

В коровьем молоке уровень активности кислой фосфатазы составляет примерно 2% от активности щелочной фосфатазы. Через 5–6 дней после родов активность АСР в молоке достигает максимума, после чего снижается и остается на низком уровне до конца лактации [155]. При мастите активность кислой фосфатазы возрастает в 2–4 раза. В маститном молоке найдено три изофермента АСР, два из которых имеют лейкоцитарное происхождение. Лейкоцитарные изоформы менее термостабильны, чем молочная АСР, и инактивируются при стандартных режимах пастеризации [165].

Определение активности АСР проводят при pH 5,0, на тех же субстратах (фенилфосфат, p-нитрофенилфосфат или фенолфталейн фосфат), которые применяют для щелочной фосфатазы [2].

10	20	30	40	50	60
MRNAALLMTR	ATSLRLSLLI	LLSFLPDLDG	GVRAKELRFV	TLVFRHGDERS	PIETFPNDPI
70	80	90	100	110	120
KESSWPQGFG	QLTQLGMAQH	YELGQYIRKR	YENFLNESYK	REQVHVRSTD	IDRTLMSAMT
130	140	150	160	170	180
NLAALFPPEG	ISIWNPSPWP	QPIPVHTVPV	SEDQLLYLPF	RNCPRFQELQ	SETLISEEFQ
190	200	210	220	230	240
KRLQPYKDFI	EVLPKLTGYH	DQDLLGIWSK	VYDPLFCEGV	HNFTLPSWAT	EDTMTKLKEI
250	260	270	280	290	300
SELSLLSLYG	INHKKESKRL	QGGVLINEIL	NHMKSATQPS	NRRKLIMYSA	HDTTVSGLQM
310	320	330	340	350	360
ALDVYNGILP	PYASCHMMEL	YFQDGEYFVE	MYYRNETRYE	PHPLTLPGCT	PSCPLAKFVE
370	380				
LVAPVISQDW	SMECAIRNHK	GTEDIIN			

Рис. 4.14. Первичная структура **пре-АСР** предстательной железы коровы [164]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид, желтым фоном выделена а.к. последовательность зрелой кислой фосфатазы. Бирюзовым фоном выделены His46 и Asp292, входящие в состав активного центра, лиловым фоном обозначены сайты N-гликозилирования. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Нативная кислая фосфатаза – гомодимер. Димеризация является необходимым условием для проявления ферментативной активности [164]. Пространственные структуры мономеров кислой и щелочной фосфатазы похожи (см. рис. 4.13). За исключением сигнального пептида и короткого С-концевого участка (Arg377-Asn387) трехмерная структура мономера кислой фосфатазы предстательной железы коровы предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/A6H730>), с достоверностью >90% (рис. 4.15).

Казеины являются субстратами для содержащейся в молоке кислой фосфатазы, которая в этом случае выступает в роли фосфатазы фосфопротеинов. Любопытно, что казеины в последовательности: $(\alpha 1 + \alpha 2) > \beta > \kappa$, – действуют как конкурентные ингибиторы АСР в тест-системах с применением в качестве субстрата р-нитрофенилфосфата. Скорее всего, это объясняется связыванием части фермента с фосфатными группами казеинов, конкурентоспособность которых коррелирует со степенью фосфорилирования [166].

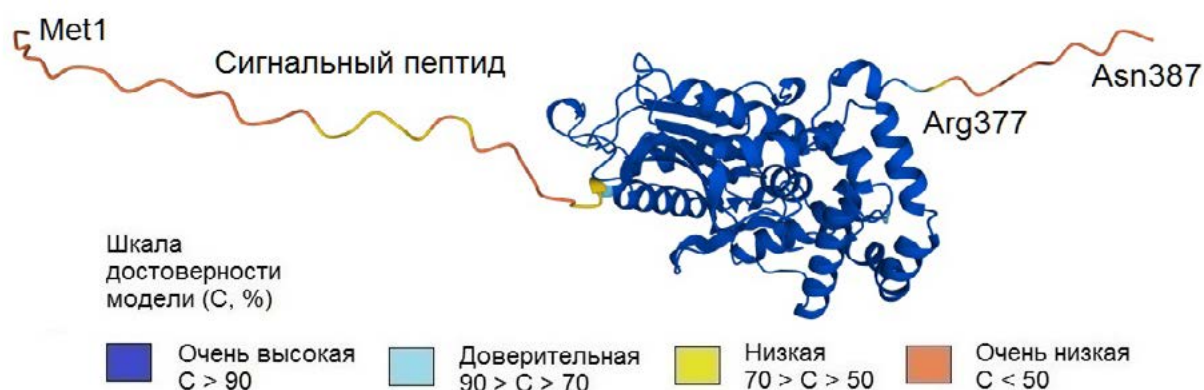


Рис. 4. 15. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-АСР из предстательной железы коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/A6H730>) [21, 22]

Несмотря на то, что концентрация АСР в молоке намного ниже, чем концентрация АЛР, высокая термостабильность и низкое значение рН оптимума позволяют говорить о технологической значимости кислой фосфатазы. Кислая фосфатаза молока выдерживает пастеризацию и, поскольку фермент ассоциирован с мембраной МЖГ, остается в сырном сгустке. Кислые значения рН в созревающих сырах создают благоприятные условия для активности АСР.

Дефосфорилирование α - и β -казеинов снижает их тепловую стабильность, способность связывать ионы Ca^{2+} , взаимодействовать с κ -казеином и формировать мицеллы. Одним из важных свойств сыра, определяющих его пищевую ценность, является антикариесогенная активность, обусловленная Ca^{2+} -связывающими свойствами казеинов и их фосфорилированных фрагментов [167, 168]. С этой точки зрения, активность кислой фосфатазы следует считать негативной, так как дефосфорилирование снижает антикариесогенный эффект. Вместе с тем, поскольку фосфорилированные пептиды плохо поддаются протеолизу, дефосфорилирование необходимо для их полной протеолитической деградаци, в результате которой образуются вещества, необходимые для формирования текстуры сыра и его аромата.

При протеолизе казеинов образуется значительное количество небольших фосфорилированных пептидов. Предположительно, частичное дефосфорилирование пептидов, выделенных из созревающих сыров типа Cheddar, Parmigiano Reggiano и Grana Padano, является результатом активности кислой фосфатазы. Не исключено, однако, что источником фосфатазной активности может быть как эндогенная АСР молока, так и АСР молочнокислых бактерий. Для однозначного ответа на этот вопрос необходимы дополнительные исследования [5].

4.8. Ксантиндегидрогеназа/оксидаза (ЕС 1.17.1.4; 1.17.3.2)

В 1902 г. F. Schardinger сообщил о ферменте из коровьего молока, получившем название «фермент Шардингера» («Schardinger enzyme»), окисляющем альдегиды до кислот, что сопровождалось восстановлением красителя метиленового синего (см. [3]).

Позднее, в 1922 г., E.J. Morgan и соавторы показали, что молоко коровы содержит фермент, способный окислять ксантин и гипоксантин (предшественники мочевой кислоты), что сопровождается восстановлением O_2 до H_2O_2 . Этот фермент называли ксантиноксидазой [169]. Наконец, в 1938 г. V.H. Booth [170] привел убедительные доказательства того, что «фермент Шардингера» – это на самом деле ксантиноксидаза, обнаруженная E.J. Morgan с соавторами. В настоящее время общепринятое название этого фермента – ксантиноксидоредуктаза (XDH, XOR), рекомендуемое международное наименование – ксантиндегидрогеназа/оксидаза (сокращенное наименование XDH/XO) (ЕС 1.17.1.4; 1.17.3.2) [171].

Ферменты, подобные ксантиноксидоредуктазе, найдены в различных животных тканях и у некоторых микроорганизмов [172–174]. Молоко коровы служит богатым источником XDH/XO, которая попадает в молочную железу из крови. Концентрация ксантиндегидрогеназы/оксидазы в молоке коровы составляет примерно 120 мг/л, или 0,2% от общего белка молока. Процедура выделения и очистки ксантиноксидоредуктазы приводится в работе N.Y. Farkye [173]. Активность XDH/XO сосредоточена во фракции мембран МЖГ, где фермент является вторым по количественному содержанию белком (20% от общего белка ММЖГ), уступая только бутирофилину. Естественно, что стартовым материалом для выделения XDH/XO являются сливки.

Аминокислотная последовательность XDH *B. taurus*, а также информация о свойствах этого фермента размещены в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P80457/entry>). Идентификационный номер ксантиндегидрогеназы/оксидазы коровы – P80457 (XDH_BOVIN) [171]. Фермент синтезируется в виде пре-XDH, которая состоит из 1332 а.к. остатков. Вычисленная ММ пре-XDH составляет 146,790 кДа. Пре-фрагмент состоит из одной (инициирующей) а.к. – метионина. При ПТМ происходит удаление Met1 и образование одной внутримолекулярной -S-S- связи (Cys535-Cys992), когда фермент находится в форме ксантиноксидазы (рис. 4.16).

Ксантиноксидоредуктаза – ключевой фермент в катаболизме пуринов. Фермент катализирует окисление гипоксантина до ксантина и окисление ксантина до мочевой кислоты. Кроме того, XDH/XO участвует в образовании активных форм кислорода [171, 175].

10	20	30	40	50	60	70
MTADELVFFV	NGKKVVEKNA	DPETTLLAYL	RRKLGLRGTK	LGCGECCGA	CTVMSKYDR	LQDKIIHFS
80	90	100	110	120	130	140
NACLAPICTL	HHVAVTVEG	IGSTKTRLHP	VQERIAKSHG	SQCGFCTPGI	VMSMYTLLRN	QPEPTVEEIE
150	160	170	180	190	200	210
DAFQGNLCRC	TGYRPILQGF	RTFAKNGGCC	GGNGNNPNCC	MNQKKDHTVT	LSPSLFNPEE	FMPLDPTQEP
220	230	240	250	260	270	280
IFPPELLRLK	DVPPKQLRFE	GERVTWIAS	TLKELDLKA	QHPEAKLVVG	NTEIGIEMKF	KNQLFPMIIC
290	300	310	320	330	340	350
PAWIPELNAV	EHGPEGISFG	AACALSSVEK	TLLEAVAKLP	TQKTEVFRGV	LEQLRWFAGK	QVKSVASLGG
360	370	380	390	400	410	420
NIITASPID	LNPVFMSAGT	KLTIVSRGTR	RTVPMHTFF	PSYRKTLG	EEILLSIEIP	YSREDEFFSA
430	440	450	460	470	480	490
FKQASREDD	IAKVTCGMRV	LFQPGSMQVK	ELALCYGGMA	DRTISALKTT	QKQLSKFWNE	KLLQDVCAGL
500	510	520	530	540	550	560
AEELSLSPDA	PGGMIEFRRT	LTLSEFFKFY	LTVLKKLGKD	SKDKCGKLD	TYTSATLLFQ	KDPPANIQLF
570	580	590	600	610	620	630
QEVPNGQSKE	DTVGRPLPHL	AAAMQASGEA	VYCDIPRYE	NELFLRLVTS	TRAHAKIKSI	DVSEAQKVP
640	650	660	670	680	690	700
FVCFLSADDI	PGSNETGLFN	DETVFAKDTV	TCVGHIIAV	VADTPEHAER	AAHVVKVITYE	DLPAITIED
710	720	730	740	750	760	770
AIKNNFYGS	ELKIEKGLK	KGFSEADNVV	SGELYIGGQD	HFYLETHCTI	AIPKGEEGEM	ELFVSTQNAM
780	790	800	810	820	830	840
KTQSFVAKML	GVPVNRILVR	VKRMGGGFGG	KETRSTLVSV	AVALAAYKTG	HPVRCMLDRN	EDMLITGGRH
850	860	870	880	890	900	910
PFLARYKVG	MKTGTIVALE	VDHYSNAGNS	RDLSHSIMER	ALFHMDNCRY	IPNIRGTGRL	CKTNLSSNTA
920	930	940	950	960	970	980
FRGFGGPQAL	FIAENWMSEV	AVTCGLPAEE	VRWKNMYKEG	DLTHFNQRLE	GFSVPRCWDE	CLKSSQYYAR
990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
KSEVDKFNKE	NCWKRGGLCI	IPTKFGISFT	VPFLNQAGAL	IHVYTDGSVL	VSHGGTEMGQ	GLHTKMVQVA
1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
SKALKIPISK	IYISETSTNT	VPNSSPTAAS	VSTDIYGQAV	YEACQTILKR	LEPFKKKNPD	GSWEDWVMAA
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
YQDRVSLSTT	GFYRTPNLGY	SFETNSGNF	HYFTYGVACS	EVEIDCLTGD	HKNLRTDIVM	DVGSSLNPAI
1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
DIGQVEGAFV	QGLGLFTLEE	LHYSPEGLH	TRGPSTYKIP	AFGSIPTFR	VSLLRDCPNK	KAIYASKAVG
1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
EPPLFLGASV	FFAIKDAIRA	ARAQHTNNNT	KELFRLDSPA	TPEKIRNACV	DKFTTLCVTG	APGNCKPWSL

RV

Рис. 4.16. Первичная структура **пре-ксантиноксидоредуктазы** коровы (по данным [171, 175]). Зеленым фоном выделен Met1. Шрифтом зеленого цвета выделен домен, несущий два [2Fe-2S]-редокс центра, красным шрифтом выделен ФАД-содержащий домен, синим шрифтом обозначен домен, несущий Мо-рt. Бирюзовым фоном выделены Cys535 и Cys992, образующие внутримолекулярный дисульфидный мостик. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Ксантиноксидоредуктаза из молока коровы – гомодимер, с ММ ~290 кДа, который состоит из двух идентичных субъединиц, действующих в процессе катализа независимо. Первичная последовательность ксантиноксидоредуктаз, выделенных из различных видов животных, высококонсервативна. Полипептидная цепь известных XDH/XO содержит около 1330 а.к. остатков, а первичная структура на ~90% гомологична печеночной ксантиндегидрогеназе/оксидазе человека.

Каждая субъединица XDH/XO содержит один молибдоптеринозный (Мо-рt) кофактор, два спектроскопически различающихся [2Fe-2S]-редокс центра и одну молекулу ФАД.

Сравнительное выравнивание последовательностей различных XDH/XO показало, что два железосернистых центра расположены в N-концевом участке (фрагмент 3-165, с ММ ~20 кДа), ФАД – в промежуточном фрагменте (фрагмент 226-521, с ММ ~40 кДа), а Мо-рt центр на C-концевом участке молекулы (фрагмент 590-1331, с ММ ~85 кДа) (рис. 4.16–4.17).

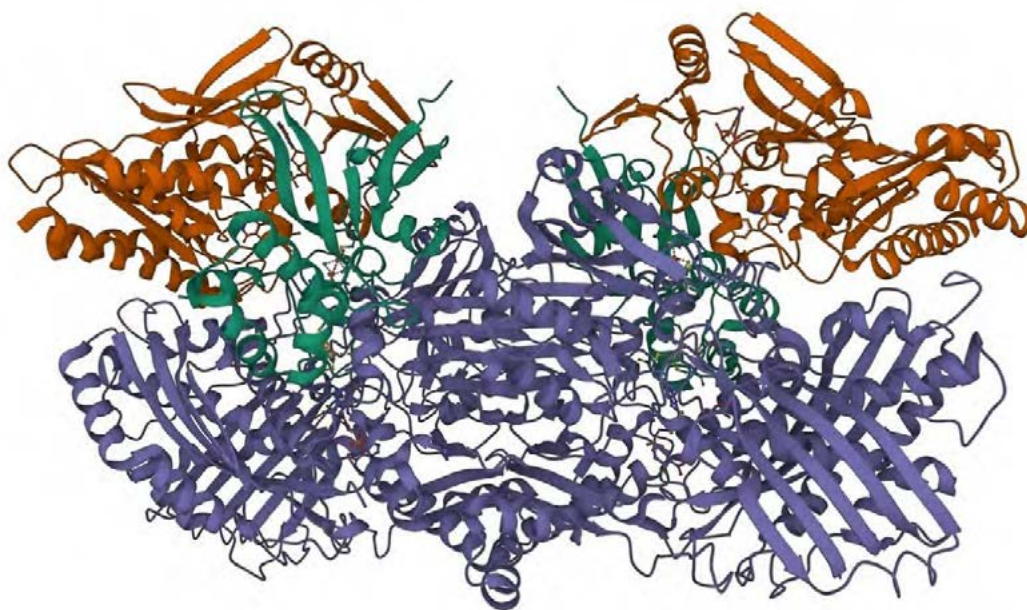


Рис. 4.17. Модель трехмерной структуры димера ксантиндегидрогеназы/оксидазы из коровьего молока (по данным [175]). Два мономера имеют симметричные домены, которые обозначены различными цветами: зеленым – домен, содержащий два редокс-центра [2Fe-2S]; красным – FAD-несущий домен; фиолетовым – домен, связывающий Mo-pt

Окисление ксантина происходит при участии Mo-pt кофактора [175]. Молибден критичен для проявления активности фермента – у коров, содержащихся на Mo-дефицитных рационах, активность ксантиноксидоредуктазы снижается [3].

В реакциях, катализируемых XDH/XO, в качестве восстановителя используется НАДН, а продуктами являются H_2O_2 и супероксидный анион (O_2^-). Образующаяся под действием XDH/XO перекись водорода является субстратом для системы лактопероксидаза- H_2O_2 -тиоцианат, которая обладает мощным бактерицидным действием [3]. Фактически XDH/XO существует в виде двух ферментов: ксантиндегидрогеназы (ЕС:1.17.1.4, катализирует реакции 1-2) и ксантиноксидазы (ЕС:1.17.3.2, катализирует реакцию 3):



Ксантиндегидрогеназа (XD) и ксантиноксидаза (XO) способны взаимопревращаться друг в друга при действии сульфгидрильных реагентов и окислении SH-групп. Кроме того, возможно необратимое превращение XD в XO в результате специфического протеолиза. Четвертичная структура XD и XO, а также механизм взаимопревращения этих ферментов подробно исследованы С. Enroth с соавторами [171, 175].

Ферментативная активность XDH/XO измеряется манометрически – по потреблению O_2 , потенциометрически – с использованием платинового электрода, полярографически и спектрофотометрически. Последний метод включает в себя окисление бесцветного трифенилтетразолий хлорида с образованием продукта, имеющего красную окраску, или превращение ксантина в мочевую кислоту и её количественное определение по поглощению при 290 нм [3, 176].

До начала 60-х гг. прошлого столетия считалось, что в молоке человека XDH/XO отсутствуют. Однако в 1960 г. P.L. Bradley и M. Gunther [177] доказали наличие XDH/XO в грудном молоке и отметили, что концентрация фермента заметно меняется во время лактации. Более поздние исследования установили, что низкая активность XDH/XO в молоке человека объясняется тем, что основной пул молекул фермента (95–98%) находится демолибдо-форме и не содержит Mo-pt, а фермент в форме XO является дефицитным по 2Fe-2S редокс-центрам [178, 179]. Хотя XDH/XO является одним из основных белков в ММЖГ коз и овец, её активность в молоке этих животных носит следовой характер из-за того, что фермент находится в демолибдо-форме [180–183]. Активность XDH/XO в человеческом, овечьем и козьем молоке можно увеличить, повышая в рационе этих видов концентрацию Mo [5]. По данным [184] активность XDH в молоке одnogорбого верблюда регистрируется, но на очень низком уровне. Ксантиндегидрогеназа/оксидаза была идентифицирована в препаратах ММЖГ, полученных из молока кобылиц [185], но об уровне активности фермента не сообщалось.

Так же, как и щелочная фосфатаза, ксантиноксидоредуктаза входит в состав микросом, выделяемых из обезжиренного молока. Микросомы образуются из мембран МЖГ, частичная дезинтеграция которых происходит при хранении молока или в процессе различных технологических операций – встряхивании, перекачке, гомогенизации. Микросомы в молочной сыворотке представляют собой везикулы диаметром ~100 нм, которые можно выделить методом центрифугирования при 105000 g в течение 30 минут. Термин «микросомы» предложен R.K. Morton [186] из-за сходства везикул, образующихся из ММЖГ, с фермент-содержащими липопротеиновыми комплексами, выделяемыми из животных тканей.

Технологические процедуры, при которых происходит повреждение, изменение структуры или дезинтеграция мембран жировых глобул молока, способствуют попаданию фермента в водную фазу и существенно влияют на активность XDH/XO. Хранение молока при 4 °C в течение 24 часов, нагревание до 70 °C в течение 5 минут, гомогенизация, – увеличивают активность КОР на 50–100% [3].

Тепловая стабильность XDH/XO зависит от того, входит фермент в состав мембраны МЖГ или диспергирован в водной фазе молока. В наибольшей степени ксантиноксидоредуктаза термостабильна в сливках, в наименьшей степени – в обезжиренном молоке. Гомогенизация концентрированного молока, приготовленного из прогретого сырья (90,5 °C в течение 15 секунд) приводит к частичному восстановлению активности XDH, которая сохраняется при последующем высушивании или концентрировании, в то же время восстановления активности не наблюдается при более высоких температурах прогрева молока (93 °C в течение 15 секунд). Вероятно, гомогенизация приводит к высвобождению потенциально активной, не денатурированной ксантиноксидоредуктазы из ММЖГ. При исследовании термостабильности XDH установлено, что фермент не полностью инактивируется при прогревании молока в течение 120 секунд при 80 °C [3, 161].

В результате активности ксантиндегидрогеназы/оксидазы возможно превращение стабильного триплетного кислорода ($3O_2$) в синглетный ($1O_2$), который является прооксидантом и способен инициировать перекисное окисление липидов молока. В индивидуальных образцах коровьего молока со спонтанной оксидативной прогорклостью (не вызванной загрязнением металлами или воздействием света), наблюдается десятикратно повышенная активность XDH/XO. Кроме того, внесение в нормальное молоко четырехкратного избытка ферментативно активной ксантиноксидоредуктазы, запускает процесс «спонтанного» окисления липидов. Фермент, подвергшийся тепловой денатурации, или лишенный ФАД, не проявляет прооксидантной активности [5, 187].

При выработке Голландского, Швейцарского и некоторых других видов сыров, для того чтобы предотвратить рост бактерий *Clostridium tyrobutyricum*, в молоко вносят нитрат натрия. Ксантиноксидоредуктаза молока катализирует превращение нитратов (NO_3^-) в нитриты (NO_2^-), которые в сырах подавляют рост бактерий, относящихся к роду *Clostridium* и *Escherichia*. Предполагается, что XDH/XO вносит вклад в последующее разложение нитритов в сырах до NO и N_2 . Дегградация NO_3^- и NO_2^- важна с токсикологической точки зрения, поскольку взаимодействие нитратов и нитритов с аминокислотами может приводить к образованию нитрозаминов, обладающих канцерогенным действием [3, 4].

Наиболее важной ролью XDH/XO считается участие в выделении жировых глобул секреторными клетками молочной железы. Триглицериды молока синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), который расположен вблизи базальной мембраны секреторных клеток. В ЭР скопления триглицеридов образуют микроскопические липидные капли, покрытые монослойной фосфолипидной мембраной, которая содержит специфический белок – адипофилин. Липидные микрокапли транспортируются к апикальной мембране секреторных клеток. Предположительно, транспорт происходит при участии микротубулярной (микрофиламентной) системы. В процессе транспортировки микрокапли сливаются друг с другом, образуя секреторные гранулы, которые также покрыты монослоем фосфолипидов, содержащим цитоплазматические белки и адипофилин. На апикальной мембране адипофилин образует дисульфидно-связанные комплексы с двумя другими протеинами, – бутирофилином (трансмембранным белком апикальной мембраны) и цитозольной ксантиноксидоредуктазой. В конечном счете, секреторная жировая гранула «отшнуровывается» от апикальной мембраны и попадает в альвеолярный просвет (alveolar lumen) молочной железы [188, 189].

До недавнего времени предполагалось, что именно XDH/XO запускает механизм отпочковывания формирующейся жировой глобулы от апикальной мембраны секреторной клетки. Если это предположение верно, то в механизме секреции жировых глобул ксантин дегидрогеназы/оксидазы, вероятно, функционирует не как фермент, а как белок, выполняющий структурные и секреторные функции. Косвенно об этом свидетельствует наличие ферментативно-неактивной XDH/XO в молоке человека. Существует и противоположная точка зрения: по данным Н. Robenek и соавторов, секреция молочных жировых глобул контролируется только основным белком ММЖГ – бутирофилином [190].

Интересен взгляд на роль XDH/XO в эволюции млекопитающих. Активные формы ксантиноксидоредуктазы, источником которых служит XDH/XO, играют важную роль в механизмах защиты от различных патогенов. Поэтому ксантин дегидрогеназа/оксидаза считается важным компонентом врожденной иммунной системы [191–194]. По мнению С. Vorbach и соавторов [195–197], эволюция молочных желез (и, следовательно, млекопитающих) стала возможной благодаря участию XDH/XO в механизме секреции жировых глобул молока. Есть основания предполагать, что другой компонент врожденной иммунной системы – лизоцим, – эволюционировал, превратившись в α -лактальбумин, эффективный регулятор синтеза лактозы. Таким образом, происхождение основных источников энергии в молоке – липидов и лактозы – может быть результатом эволюции двух компонентов врожденной иммунной системы млекопитающих. Не исключено, что питательная ценность молока и его иммунологические функции развивались параллельно, а предшественником молочных желез стали кожные железы, изначально появившиеся у предков млекопитающих для защиты наружных покровов от инфекций. Можно представить, что старт эволюции молочных желез произошел тогда, когда новорожденный начал слизывать секрет примитивных кожных желез, который содержал молекулы веществ, имеющих протективные и питательные свойства.

Различные аспекты происхождения и структуры ММЖГ, а также возможная роль XDH/XO в секреции молочного жира рассмотрены в работах N. Aoki [198], T.W. Keenan и I.H. Mather [199].

4.9. Рибонуклеаза (Рибонуклеаза 1) (ЕС 4.6.1.18)

Рибонуклеаза (альтернативные названия: рибонуклеаза 1, рибонуклеаза А) катализирует гидролиз фосфодиэфирной связи между 5'-рибозой одного нуклеотида и фосфатной группой, присоединенной к 3'-концу рибозы, связанной с пиримидиновым основанием, с образованием 2',3'-циклического фосфата, который затем гидролизуется до соответствующего 3'-нуклеотидфосфата. Фермент действует как на одноцепочечную, так и на двухцепочечную РНК. Рибонуклеаза (RNASE1) способна дестабилизировать или раскручивать спираль ДНК путем образования комплекса с одноцепочечной ДНК; этот комплекс возникает в результате расширенного многоузлового катион-анионного взаимодействия между остатками Lys и Arg фермента и фосфатными группами нуклеотидов [2, 200].

Рибонуклеазы образуют суперсемейство ферментов, обнаруженных в различных тканях и секретах, в том числе в коровьем молоке [201–203]. Панкреатическая рибонуклеаза коровы вошла в историю биохимии как первый фермент, для которого в 1963 г. установили полную аминокислотную последовательность [204].

Фосфодиэстеразную активность коровьего молока по отношению к РНК открыли С.А. Zittle и E.S. DellaMonica в 1952 г. [205]. Первое углубленное исследование эндогенной рибонуклеазы молока выполнили E.W. Bingham и С.А. Zittle в 1962 г. Было установлено, что в молоке коровы содержится 11–40 мг/л рибонуклеазы, что гораздо больше (примерно в 3–100 раз), чем в крови, сыворотке или моче человека, крысы и морской свинки. Указанные авторы показали, что практически вся рибонуклеазная активность регистрируется в молочной сыворотке, и сделали вывод о том, что коровье молоко является потенциальным сырьем для получения рибонуклеазы [206]. Позднее было установлено, что концентрация RNASE1 в молоке коровы примерно в три раза выше, чем в человеческом, козьем и овечьем молоке, а также намного превышает этот показатель для свиного молока [2]. Общая рибонуклеазная активность молозива в три раз выше, чем в зрелом молоке. Предполагается, что RNASE1 молока участвует в антибактериальной защите новорожденных. При мастите активность молочной RNASE1 удваивается одновременно с увеличением активности тканевых рибонуклеаз [207, 208].

Информация о структуре и свойствах панкреатической рибонуклеазы *B. taurus* доступна в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P61823/entry>). Идентификационный номер фермента – P61823 (RNASE1_BOVIN) [200]. Рибонуклеаза синтезируется в виде пре-RNASE1, которая состоит из 150 а.к. остатков. Вычисленная ММ пре-RNASE1 равна 16,461 кДа. Сигнальный пептид содержит 26 а.к. Полипептидная цепь зрелой рибонуклеазы 1 состоит из 124 а.к., её вычисленная ММ составляет 13,683 кДа [209]. При процессинге происходит удаление сигнального пептида (Met1-Gly26), N-гликозилирование по остаткам Lys27, Lys33, Asn60, Lys63, Lys67 и образование четырех внутримолекулярных -S-S- мостиков (Cys52-Cys110, Cys66-Cys121, Cys84-Cys136, Cys91-Cys98) (рис. 4.18) [200].

Пространственная модель панкреатической пре-рибонуклеазы 1, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22], представленная на рисунке 4.19, за исключением пре-фрагмента, имеет очень высокую степень достоверности.

Молочная и панкреатическая рибонуклеазы имеют много общего. Так же, как фермент из поджелудочной железы, RNASE1 молока демонстрирует максимальную активность при pH 7,0–7,5 [209]. Фермент проявляет более высокую термостабильность в кислой, чем в нейтраль-

ной или щелочной среде. В кислой сыворотке, доведенной до pH 7,0, при 90 °C рибонуклеаза инактивируется на 50 и 100%, соответственно, за 5 и 20 минут. При той же температуре, но при pH 3,5, после 20 минут прогревания RNASE1 сохраняет 100% активность.

10	20	30	40	50	60
MALKSLVLLS	LLVLVLLLV	VQPSLGKETA	AAKFERQHMD	SSTSAASSSN	YCNQMMKSRN
70	80	90	100	110	120
LTKDRCKPVN	TFVHESLADV	QAVCSQKNVA	CKNGQTNCYQ	SYSTMSITDC	RETGSSKYPN
130	140	150			
CAYKTTQANK	HIIVACEGNP	YVPVHF ^H DASV			

Рис. 4.18. Первичная структура панкреатической **пре-рибонуклеазы 1** коровы [200]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид, желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого фермента. Красным фоном обозначены сайты N-гликозилирования, бирюзовым – остатки Cys, образующие внутримолекулярные дисульфидные связи. Жирным черным подчеркнутым шрифтом выделены His38 и His145, образующие активный центр RNASE1. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

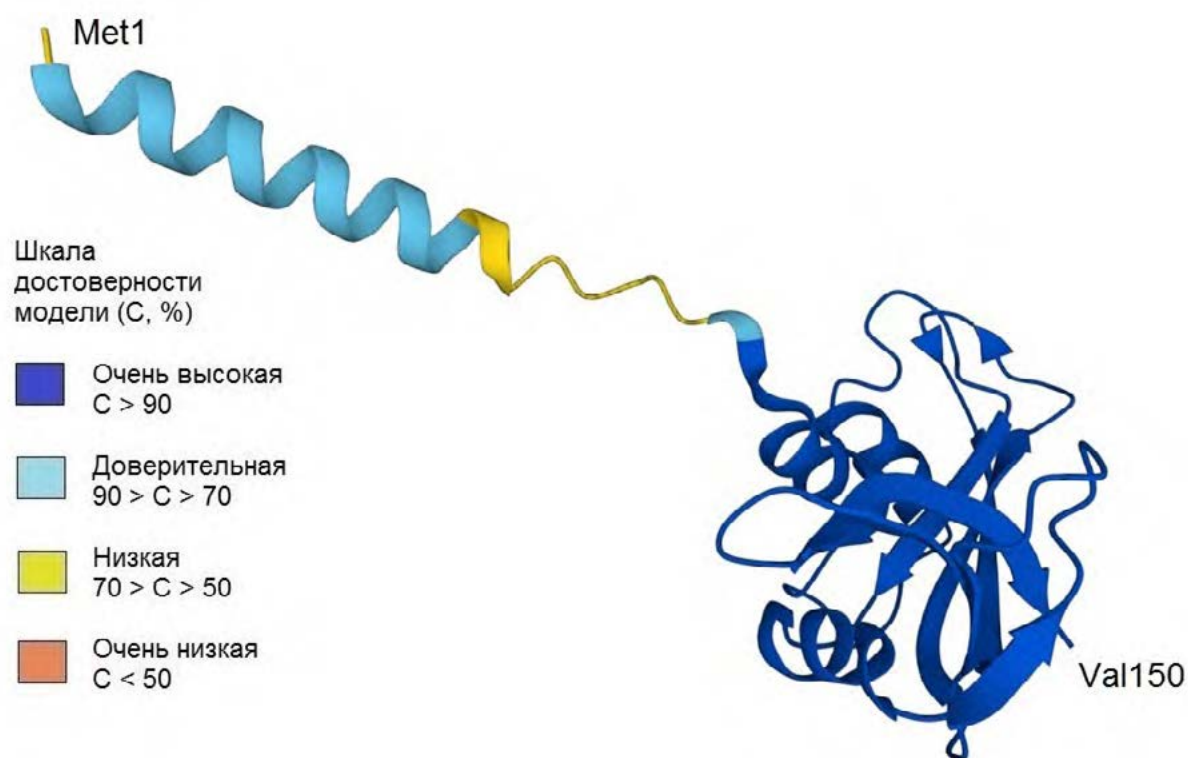


Рис. 4.19. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-рибонуклеазы 1 из поджелудочной железы коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P61823>) [21, 22]

Как и панкреатическая RNASE1, молочная рибонуклеаза может быть разделена на два, различающихся по степени гликозилирования изофермента – А и В – соотношение которых составляет примерно 4 : 1. Аминокислотная последовательность, электрофоретические и иммунологические свойства двух ферментов очень похожи. Это позволило предположить, что RNASE1, обнаруживаемая в молоке, имеет панкреатическое происхождение и способна проникать через кишечную стенку в кровь, а оттуда – в молоко. Такое предположение подтверждается данными о том, что белки с ММя, как у RNASE1 (~13,7 кДа), способны проникать в кровь путем абсорбции в кишечной стенке. Более высокая концентрация рибонуклеазы 1 в молоке, чем в крови, возможно, объясняется наличием механизмов активного транспорта этого фермента [206].

В 1987 г. D.H. Meyer и соавторы, выделили из молока коровы минорный изофермент, получивший название рибонуклеаза II-I, который отличался от вариантов А и В рибонуклеазы 1 более высокой термостабильностью и неспособностью гидролизовать полицитидилаты [207]. Заметим, что для классификации рибонуклеазы II-I авторы использовали иммунологические свойства, а это противоречит принципам номенклатуры Международного биохимического союза (International Union of Biochemistry), в соответствии с которыми панкреатическая и молочная рибонуклеазы называются «рибонуклеаза 1».

Стерилизация молочных продуктов при СВТ (130–40 °С, 3-5 секунд), полностью подавляет активность RNASE1, но ~60% активности сохраняется при нагревании до 72 °С в течение 120 секунд [207] или 80 °С в течение 15 секунд [161]. Рибонуклеазная активность в сыром или пастеризованном молоке не изменяется при многократном замораживании-оттаивании, а в замороженных образцах сохраняется на постоянном уровне не менее одного года [207].

В конце XX в. интерес к рибонуклеазе усиливается в связи с её возможной антивирусной и противоопухолевой активностью. В 1993 г. в ходе исследования, проведенного в Индии группой Н. Ramaswamy и соавторов, установлено, что частота рака молочной железы у женщин коррелирует с пониженным уровнем активности рибонуклеазы в их молоке [210]. После появления данных о том, что рибонуклеаза спермы быка усиливает противоопухолевое действие, находясь в димерной форме. R. Piccoli с соавторами методами генной инженерии сконструировали димерную (мутантную) форму человеческой панкреатической рибонуклеазы [211]. Димерная рибонуклеаза обладала ферментативной активностью и проявляла цитотоксическое действие по отношению к клеткам различных опухолевых культур человека. Рибонуклеаза, выделенная из амфибий и получившая название «онконаза», или «протеин Р-30», дала положительные результаты при проведении клинических испытаний с участием больных, страдающих различными раковыми заболеваниями [212, 213].

Еще в 1974 г. J.J. McCormick и соавторы доказали, что молочная рибонуклеаза подавляет активность вирусной РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы), тем самым блокирует репликацию вирусов [214]. Позже было установлено, что RNASE1, выделенная из мочи беременных женщин (точнее, из препаратов хориогонического гонадотропина), ингибирует активность вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ, тип I) [215]. Получены данные о том, что и панкреатическая рибонуклеаза 1 способна блокировать репликацию ВИЧ [2].

Предполагается, что рибонуклеаза может ингибировать размножение бактериофагов, поражающих стартерные культуры для сыроделия. Однако для подтверждения или опровержения такого предположения требуется проведение дополнительных исследований.

Высокая структурная гомология рибонуклеазы и ангиогенина (белка, стимулирующего рост кровеносных сосудов) позволила М. Roman и соавторам предположить, что биологическая роль рибонуклеазы в молоке и молозиве заключается в стимулировании роста капилляров у новорожденных [203, 208]. Однако ангиогенная активность рибонуклеазы I до настоящего времени не обнаружена.

Таким образом, несмотря на то, что рибонуклеаза коровьего молока не имеет очевидного технологического значения, этот фермент обладает важными биологическими свойствами, которые могут быть использованы в биотехнологии и медицине [23].

4.10. Бэта-N-ацетилгексозаминидаза (ЕС 3.2.1.52)

Фермент β-N-ацетилглюкозаминидаза гидролизует терминальные невосстанавливающие остатки N-ацетил-β-D-глюкозамина от N-ацетил-β-D-глюкозоаминид, включая гликопротеины и фрагменты хитина. По мнению J.C. Cabezas, поскольку β-АГ специфична еще и по

отношению к остаткам N-ацетил-β-D-галактозамина, фермент следует называть N-ацетил-β-D-гексозаминидаза (EC 3.2.1.52) [216]. В дальнейшем мы будем называть этот фермент так, как рекомендовано на портале UniProt – β-N-ацетилгексозаминидаза (HEXD) [217].

В молоке источником β-N-ацетилгексозаминидазы, которая является лизосомальным ферментом [218], служат главным образом эпителиальные клетки молочной железы и соматические клетки (лейкоциты) [2].

Первое сообщение о HEXD в молоке коровы сделано в 1968 г., в работе A. Mellors, который выделил и частично очистил (до ~10-кратного увеличения специфической активности) этот фермент из сепараторной молочной слизи [219]. Именно A. Mellors предположил, что активность фермента может считаться приемлемым индикатором инфекционных заболеваний молочной железы. Эффективность β-N-ацетилгексозаминидазы как молекулярного индикатора мастита у коров позднее была подтверждена многочисленными исследованиями и в настоящее время является общепризнаной [219–223]. Разработан экспресс-метод выявления мастита по активности HEXD в молоке и молозиве, с использованием хромогенного субстрата – N-ацетил-β-D-глюкозамин-р-нитрофенола, который гидролизуетсся с образованием р-нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание [220].

Информация о структуре и свойствах β-N-ацетилгексозаминидазы *B. taurus* – скудна. Идентификационный номер фермента в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/F1MED7/entry>) – F1MED7 (F1MED7_BOVIN) [217]. Полипептидная цепь HEXD состоит из 475 аминокислот (рис. 4.20), вычисленная ММ равна 53,688 кДа. Данные о структуре синтезируемой полипептидной цепи β-N-ацетилгексозаминидазы и её ПТМ отсутствуют.

Пространственная модель β-N-ацетилгексозаминидазы предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] с высокой достоверностью (рис. 4.21).

10	20	30	40	50	60
MSGSSPFKMR	LVHLDLKGAP	PKVCYLSEIF	PLFRALGANG	ILIEYEDMFP	YEGHLRLLRA
70	80	90	100	110	120
KHAYSPSEIK	EILHLATLNE	LEVIPLVQTF	GHMEFVLKHE	ALAHGREVAR	FPNTLNPHKE
130	140	150	160	170	180
ESLALVTAMI	DQVMELHPGA	RWFHVGCDDEV	YYLGEGETSR	QWLQQEPNSK	AKLCLSHMEA
190	200	210	220	230	240
VASHMRARYP	TTTTPLMWDDM	LRDIPEDQLS	GSRVPQLVEP	VLWDYGADLD	LHGKALLVEK
250	260	270	280	290	300
YRKSGFSWLW	AASAFKGATG	VNQSLTPIEH	HLRNHLQWLQ	VAGSVPADTL	RGIILTGWQR
310	320	330	340	350	360
YDHFVSLCEL	LPVGIPSLAV	CLQALLHGDF	AENVKARVEN	FLGISSLEEM	SFRSEGAGSF
370	380	390	400	410	420
PGSDILALVT	QVSLHLCSSV	DALLERDRYV	TGWFSPYHRR	RKLIHPVMIE	HIQPQALSLL
430	440	450	460	470	
ARWNALAGEL	EAALQRIFYP	DTVEEWLEEN	VHPSLQRLQA	LLQDLALTGE	PERGT

Рис. 4.20. Первичная структура β-N-ацетилгексозаминидазы *B. taurus* [217]

Максимальная ферментативная активность β-N-ацетилглюкозаминидазы проявляется при 50 °C и pH 4,2. Более 95% активности HEXD находится в обезжиренном молоке, точнее, в сывороточной фракции (82% от общей активности) [221]. Из молочной сыворотки HEXD может быть выделена различными хроматографическими методами. В.Ж. Kitchen и С.Ж. Masters получили из молочной железы коровы два изофермента β-N-ацетилгексозаминидазы – А и В – с молекулярными массами, соответственно, 118 и 234 кДа [224].

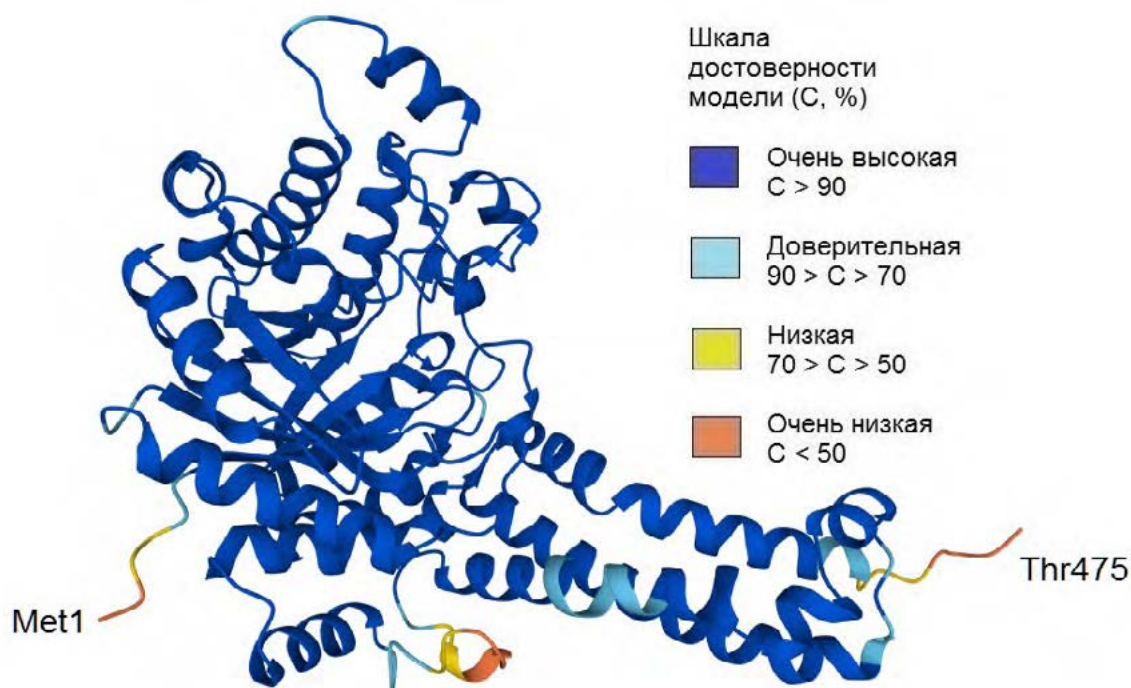


Рис. 4.21. Модель предполагаемой трехмерной структуры β -N-ацетилгексозаминидазы коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/F1MED7>) [21, 22]

Поскольку HEXD инактивируется при 70–71 °C в течение 15–18 секунд, А.Т. Andrews и соавторы предложили использовать этот фермент как маркер тепловой обработки молока в диапазоне 65–75 °C в течение 15 секунд [225].

В связи с необходимостью разработки теста для определения «температурной истории» молока для сыроделия, Y. Ardo и соавторы сравнили характеристики термоинактивации трех потенциально пригодных для этого ферментов: щелочной фосфатазы, β -N-ацетилгексозаминидазы и γ -глутамилтрансферазы [226]. Исследование показало, что щелочная фосфатаза слишком термочувствительна, γ -глутамилтрансфераза – излишне стабильна, а β -N-ацетилгексозаминидаза является наилучшим индикатором термообработки молока в диапазоне 65–75 °C.

4.11. Лизоцим (ЕС 3.2.1.17)

Первыми сообщениями о присутствии естественных антибактериальных веществ в свежесвыдоенном коровьем молоке следует считать работы Kitasoto (1889) и Fokker (1890) (цитировано по [5]). В настоящее время антибактериальные факторы молока (лизоцим, лактопероксидазу и др.) называют лактенинами [2].

В 1922–1929 гг. А. Fleming обнаружил антибактериальный агент в выделениях носовых ходов, слезах, слюне, мокроте и других секретах, который вызывал лизис различных типов бактерий (в тестах использовался в основном *Micrococcus lysodeikiticus*). А. Fleming выделил и идентифицировал это вещество как фермент, который назвал лизоцимом, и установил, что его наиболее богатым источником служит белок куриного яйца [227, 228]. Позднее, в 1932 г., он же сообщил о наличии лизоцима в коровьем молоке [229]. Лизоцим легко поддается выделению и очистке и в настоящее время служит модельным белком для исследования закономерностей динамической структуры и фолдинга протеинов [230, 231].

Лизоцим (LYZ) (синонимы: мурамидаза, мукопептид N-ацетил-муранил гидролаза) широко распространен в природе, его физиологическая роль заключается в антибактериальном

действию. Лизоцим гидролизует β (1 $\rightarrow$ 4)-гликозидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и остатками N-ацетил-D-глюкозамина в пептидогликанах клеточной стенки бактерий, что вызывает лизис бактериальных клеток. Лизоцимы, которые находятся в тканях и жидкостях организма, связаны с моноцитарно-макрофагальной системой и усиливают активность иммуноагентов [232].

Традиционно активность фермента определяют турбидиметрически по способности исследуемого препарата лизировать культуру *Micrococcus lysodeikiticus* [233]. Возможно определение активности LYZ методом обращенно-фазной высокоэффективной хроматографии с использованием флуоресцентного детектора [234], методами иммуноферментного анализа [235] и методами масс-спектрометрии [236].

Лизоцим из молока коровы выделен и охарактеризован в 60–70-х гг. прошлого столетия [237–240].

Информация о структуре и свойствах лизоцима коровы размещена в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/F2X047/entry>). Идентификационный номер фермента – F2X047 (F2X047_BOVIN) [232]. Лизоцим синтезируется в виде пре-фермента, полипептидная цепь которого состоит из 148 а.к. остатков. Вычисленная ММ пре-LYZ равна 16,476 кДа. Сигнальный пептид насчитывает 18 а.к. (рис. 4.22). ПТМ включают в себя удаление пре-фрагмента (Met1-Gly18) и образование четырех внутримолекулярных -S-S- связей (Cys24-Cys146, Cys48-Cys134, Cys83-Cys99, Cys95-Cys113).

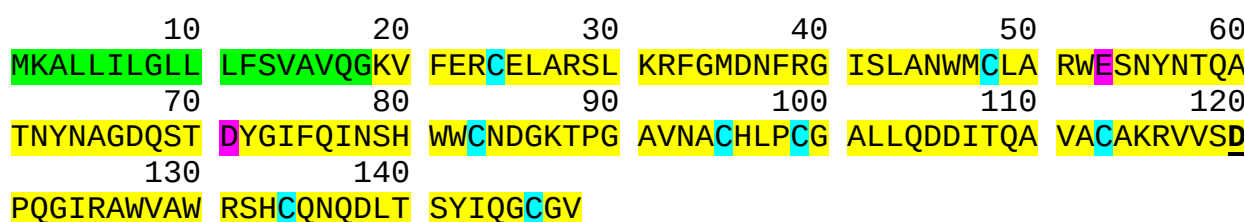


Рис. 4.22. Первичная структура **пре-лизоцима** коровы [232]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид, желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого фермента. Бирюзовым фоном обозначены остатки Cys, образующие внутримолекулярные дисульфидные связи. Лиловым цветом выделены Glu53 и Asp71, входящие в состав активного центра. Жирным подчеркнутым шрифтом обозначен Asp120, участвующий в связывании субстрата. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Представленная на рисунке 4.23 предполагаемая трехмерная модель коровьего лизоцима, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22], за исключением сигнального пептида, имеет степень достоверности >90%.

Оптимум ферментативной активности LYZ находится при pH 6,35, изоэлектрическая точка (pI) равна 10,6 [237, 239]. Первичная структура и основные биохимические свойства лизоцима из молока коровы отличаются от свойств лизоцимов, полученных из куриного белка и секретов молочных желез человека, лошади и овцы [241–243].

Лизоцим относится к лизосомальным ферментам и находится в секретируемых жидкостях в растворимой форме. Концентрация LYZ в коровьем молоке, по сравнению с молоком других млекопитающих, невелика и составляет ~0,13 мг/л (что в 3000 и 6000 меньше, чем в молоке человека и лошади, соответственно). Сырьем для получения молочного лизоцима, как и других лизосомальных ферментов молока (например, катепсина D), служит молочная сыворотка [2].

При pH молока (6,6 $\pm$ 0,1) лизоцим термостабилен, с повышением pH (>7,0) термостабильность фермента снижается. В коровьем молоке сохраняется более 75% активности LYZ при его нагревании до 75 °C в течение 15 минут или при 80 °C в течение 15 секунд. Лизоцимы челове-

ческого и коровьего молока инактивируются β -меркаптоэтанолом (сульфгидрильный реагент, вызывающий восстановление -S-S- мостиков). Инактивированные таким способом ферменты могут быть реактивированы путем обессоливания препаратов и удаления β -меркаптоэтанола. Активность реактивированного лизоцима из молока коровы и человека, по сравнению с нативными формами, составляет 33 и 84% соответственно [244].

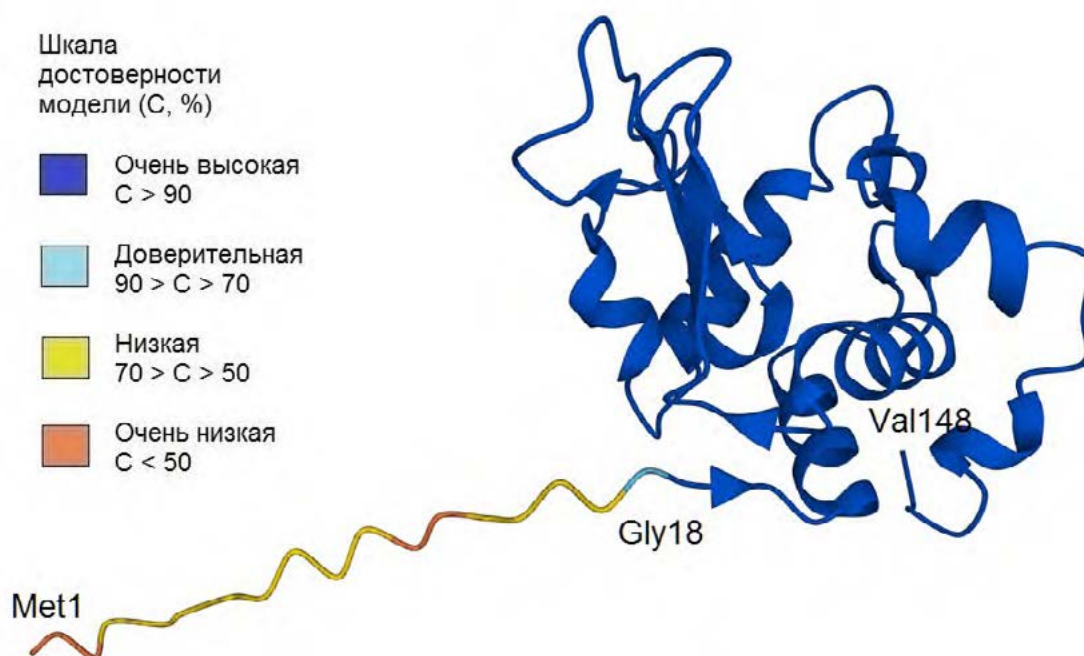


Рис. 4.23. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-лизоцима коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/F2X047>) [21, 22]

Структуры лизоцима и α -лактальбумина (регуляторный компонент лактозосинтазы) коровьего молока имеют много общего [245, 246]. Из 123 остатков лизоцима и 123 остатков α -лактальбумина по меньшей мере 40 идентичны в соответствующих положениях, а 27 представлены консервативными замещениями. Кроме того, у двух белков четыре дисульфидных мостика расположены в одинаковых положениях. Такая высокая степень гомологии указывает на то, что оба белка возникли путем дупликации гена-предшественника (лизоцима), причем один из них продолжает кодировать лизоцим, а другой в результате мутации кодирует α -лактальбумин. Это наглядный пример близких структурных «отношений» двух белков, возникших путем дупликации генов, один из которых является ферментом и катализирует гидролиз β (1 $\rightarrow$ 4)-гликозидной связи, а другой участвует в синтезе такой связи. Вероятно, лактозо-синтазный комплекс, в состав которого входит α -лактальбумин, возник на более позднем этапе эволюции и именно с этим связано появление лактозы в секретах молочных желез млекопитающих [231, 245–247].

На завершающих стадиях созревания в сырах типа Gouda, Edam, Emmental, Parmigiano Reggiano могут развиваться бактерии рода *Clostridium* (прежде всего *Clostridium tyrobutyricum*). В результате деятельности этих бактерий в толще сырной массы накапливается газовая смесь, которая вызывает вспучивание сырной головки и способствует появлению неприятного привкуса и запаха. Для подавления клостридий в молоко вносят нитраты натрия или калия (калий азотнокислый, E252), которые превращаются в нитриты под действием ксантиноксидоредуктазы. Взаимодействие нитратов и нитритов со свободными аминокислотами может приводить к образованию нитрозаминов, обладающих канцерогенной активностью [3, 4].

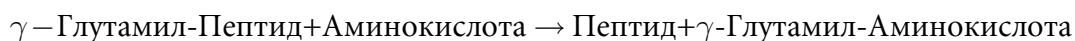
Для борьбы с поздним повреждением (поздним вспучиванием) сырных головок бактериями рода *Clostridium* в качестве альтернативы нитратам используется внесение экзогенного лизоцима, который оказывает мощное антикlostридиальное действие. В отличие от нитратов, лизоцим не ингибирует молочнокислые бактерии, не изменяет органолептические свойства сыра и переносится организмом человека лучше, чем яичный белок (доза вызывающая острое отравление не определена). При внесении в молоко и молочные продукты лизоцим продлевает сроки их годности, подавляя бактерии рода *Clostridium*, не реагирующие на другие антибиотики, поэтому в сыроделии лизоцим считается перспективной и безопасной добавкой [248, 249].

За рубежом лизоцим активно применяется в коммерческом сыроделии. В России единственным сдерживающим фактором, препятствующим широкому применению лизоцима, является его стоимость. Для производства 1 кг твёрдого сыра необходимо ~100 мг лизоцима (торговое название «Клеризим», в ценах 2022 г. ≈4,0 рубля в себестоимости), либо 3,0 г натриевой (калиевой) селитры пищевого качества (в ценах 2022 г. ≈0,25 рублей в себестоимости). Однако после того, как оптовые цены на сыр в 2007 г. перешагнули планку 100 руб./кг, производители постепенно осознают ничтожность ценового аспекта применения лизоцима по сравнению с перспективой резкого улучшения сохранности продукта и его пищевой безопасности (отсутствие нитратов и нитритов).

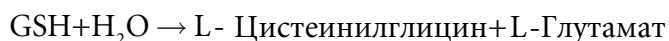
4.12. γ -Глутамилтрансфераза (Глутатионгидролаза) (ЕС 2.3.2.2; ЕС:3.4.19.13)

В клетках млекопитающих γ -глутамилтрансфераза (GGT) является частью механизма антиоксидантной защиты. Основная функция GGT – регуляция уровня глутатиона (γ -глутамилцистеинилглицина) и обеспечение внутриклеточного транспорта аминокислот.

Фермент относится к многочисленному семейству гамма-глутамилтрансфераз и участвует в двух типах реакций. Во-первых, катализирует перенос γ -глутамиловых остатков с γ -глутамил-содержащих пептидов, где действует как γ -глутамилтрансфераза (ЕС 2.3.2.2):



Во-вторых, участвует в метаболизме глутатиона (GSH), где функционирует как глутатионгидролаза (ЕС 3.4.19.13):



Гамма-глутамилтрансфераза является интегральным компонентом мембран различных типов эпителиальных клеток. Фермент является гликопротеином и может быть выделен из детергент-содержащих экстрактов тканей методом аффинной хроматографии на конканавалин-А сорбентах. При изоэлектрофокусировании GGT разделяется на 12 изоферментов [2].

В молоке ~70% активности GGT обнаруживается в материале, содержащем мембраны, а также в препаратах мембран МЖГ, откуда может быть диссоциирована детергентами или органическими растворителями.

Методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия установлено, что фермент, выделенный из ММЖГ имеет ММ~80 кДа и представляет из себя гетеродимер, состоящий из двух субъединиц с молекулярными массами ~57 и ~25 кДа [250]. Оптимум ферментативной активности GGT находится в диапазоне pH=8,5-9,0, температурный оптимум – при 45 °C, pI равна 3,85. Фермент ингибируется диизопропилфлюорофосфатом, иодацетамидом, ионами Fe^{3+} и Cu^{2+} . Активность GGT в коровьем молоке варьирует в течение всего периода лактации, достигая максимума в молозиве [5, 173].

Считается, что GGT может участвовать в транспорте некоторых аминокислот из крови в молочную железу по механизму γ -глутамильного цикла, и таким образом, вовлечена в биосинтез протеинов молока [251, 252].

Структура и свойства γ -глутамилтрансферазы (глутатионгидролазы) *B. taurus* – малоизучены. Идентификационный номер фермента, кодирующегося геном GGT1, в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/G3N2D8/entry>) – G3N2D8 (G3N2D8_BOVIN) [253]. Полипептидная цепь GGT состоит из 568 а.к. остатков (рис. 4.24), её вычисленная ММ равна 60,874 кДа. Данные о структуре синтезируемой полипептидной цепи GGT и её ПТМ отсутствуют.

10	20	30	40	50	60
MKKRSILLAL	GAVVLVLLII	GLCIWLPETS	KPQSHVYPRA	AVAADAKLCS	EIGRDALLDG
70	80	90	100	110	120
GSVDAIAIAA	LLCMGLLNAH	SMGIGGGLFL	TIYNSTMRKA	EVINAREVAP	RLASAGMFNS
130	140	150	160	170	180
SEQSEEGGLS	VAVPGELRGY	ELAHQRHGRL	PWARLFQPSI	ELARQGFPVG	KALAGALQRQ
190	200	210	220	230	240
RETVERHPAL	CEVFCRDGKV	MREGDRVTMP	RLADTLETLA	SEGAQAFYNG	SLTAQIVKDI
250	260	270	280	290	300
QEAGGIVTAE	DLNSYRAELV	EQPLSISLGD	AQLYVPSAPL	SGPVLALIIN	ILKGYNFSRA
310	320	330	340	350	360
SVEMPEQKGL	TYHRIVEAFR	FAYAKRTLLG	DPKFVNVTVEV	VRNMTSEFFA	AQLWARISDS
370	380	390	400	410	420
TTHPASYYP	EFYTPDGGGT	AHLSVSEEDG	SAVSATSTIN	LYFGSKVRSR	VSGILFNDEM
430	440	450	460	470	480
DDFSSPNIIN	QFGVPPSPAN	FIAPGKQPLS	SMCPVIIVGD	DGQVRMVVGA	SGGTQITTST
490	500	510	520	530	540
ALAIINSLWF	GYDAKQAVEE	PRLHNQLLPN	TTVLEKGIDQ	AVVAALKTRH	HAIEETSTYI
550	560				
AVVQAVVRTA	GGWAAASDSR	KGGEPAAGY			

Рис. 4.24. Первичная структура γ -глутамилтрансферазы (глутатионгидролазы) *B. taurus* [253]

Большинство представителей семейства γ -глутамилтрансфераз претерпевают посттрансляционное фосфорилирование и N-гликозилирование. По аналогии с другими гамма-глутамилтрансферазами активация GGT коровы может осуществляться путем аутокаталитического расщепления исходной полипептидной цепи на две субъединицы (цепи). В результате образуется активная форма GGT, которая является гетеродимером, состоящим из двух цепей – тяжелой и легкой. Активный центр фермента локализован в легкой цепи (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q0V8L2/entry>).

Пространственная модель GGT, изображенная на рисунке 4.25, предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] с высокой достоверностью (>90%), за исключением последовательности Met1-Ser34, которая, вероятно, является сигнальным пептидом.

Для определения ферментативной активности γ -ГТ в качестве субстрата используют γ -глутамил-р-нитроанилин. Высвобождающийся в ходе реакции р-нитроанилин оценивают по поглощению при 444 нм, или по реакции с нафтилэтилендиамином с последующим измерением поглощения при 540 нм [254].

Характеристики термостабильности GGT таковы, что этот фермент представляет определенный интерес в качестве маркера термообработки молока. Основываясь на характеристиках термоинактивации различных эндогенных ферментов молока А.Т.Аnderws с соавторами сделали вывод о пригодности GGT для мониторинга температурной обработки молока при 70–80 °С в течение 16 секунд [225].

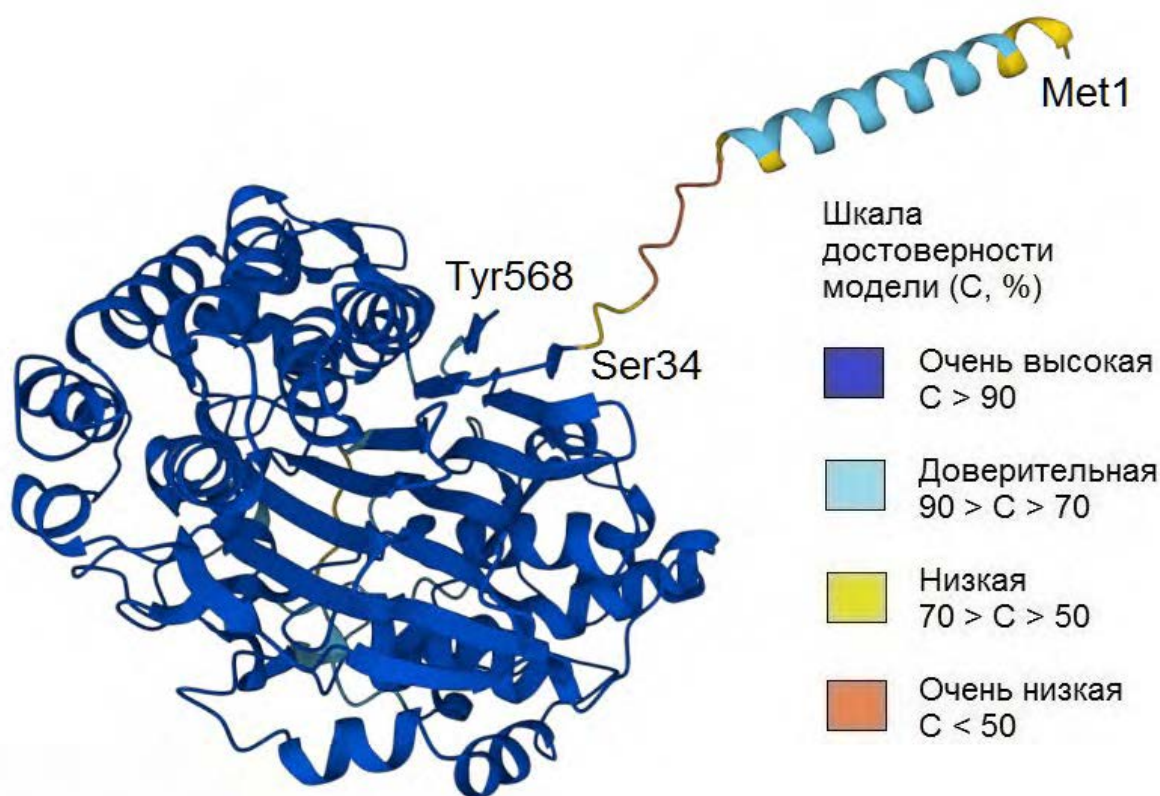


Рис. 4.25. Модель предполагаемой трехмерной структуры γ -глутамилтрансферазы (глутатионгидролазы) коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/G3N2D8>) [21, 22]

Впоследствии этот вывод нашел практическое подтверждение при проведении исследований на пилотной установке по термообработке молочного сырья. В цельном или обезжиренном молоке GGT полностью инактивируется при 78 °C за 15 секунд или при 77 °C за 16 секунд [255, 256]. Не было выявлено сезонной вариации активности или эффекта реактивации GGT после прогревания [254]. Зависимость между процентом термоинактивации и пастеризационной нагрузкой для γ -глутамилтрансферазы имеет более выраженную линейную зависимость, чем для щелочной фосфатазы, что, возможно, объясняется большим количеством изоферментов в случае GGT [147]. Таким образом, γ -глутамилтрансфераза может использоваться для контроля за термообработкой молока при температуре 72–77 °C в течение 15 секунд [2].

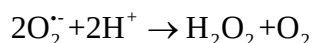
Пептиды, содержащие γ -глутаминовые остатки, были обнаружены в сырах типа Comté [257], Gouda и Blue [258]. Но поскольку казеины не содержат γ -глутаминовых групп, для доказательства того, что молочная GGT проявляет активность в сырах, необходимо проведение дальнейших исследований.

4.13. Супероксиддисмутаза [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)

Реакция восстановления кислорода (образования воды) требует четыре электрона. Если этот процесс идет последовательными одноэлектронными стадиями, то в качестве промежуточных продуктов образуются надпероксидный (супероксидный) анион ($O_2^{\cdot -}$), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксидный радикал ($OH\cdot$). Все эти вещества обладают очень высокой реакционной способностью и представляют потенциальную окислительную угрозу для живых систем. Особую опасность представляют $O_2^{\cdot -}$ и $OH\cdot$, которые входят в группу мутагенных радикалов, образующихся под действием ионизирующей радиации. Организмы, использующие кислород, неизбежно сталкиваются с угрозой внутриклеточного образования $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 . Защитой от этих

соединений служат различные ферменты, одним из которых является супероксиддисмутаза (SOD) [259].

Супероксиддисмутаза катализирует преобразование супероксидного радикала в перекись водорода, согласно реакции:



Образующаяся в этой реакции H_2O_2 разрушается до H_2O и O_2 при участии каталазы, пероксидазы или подходящего восстанавливающего агента (донора водорода).

Белки, способные инактивировать («тушить») $\text{O}_2^{\cdot-}$, известны достаточно давно. Но их протекторная роль стала понятна только после опубликования в 1968–1969 гг. работ J.M. McCord и I. Fridovich, которые показали, что тушитель супероксидных радикалов является ферментом. Этот фермент назвали супероксиддисмутазой [260, 261]. Методы определения активности SOD рассмотрены в работе Н. Нара с соавторами [261].

Известно четыре изоформы супероксиддисмутазы: внеклеточная SOD, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD. Наиболее распространенный изофермент – Cu/Zn-SOD – выделен из различных типов клеток, в том числе из бычьих эритроцитов [2].

Супероксиддисмутаза из коровьего молока выделена и охарактеризована в 1975–1980 гг. [262, 263]. Она оказалась идентична Cu/Zn-SOD из эритроцитов быка.

Структура гена и а.к. последовательность Cu/Zn-SOD коровы установлена в 1990 г. [264]. Первичная последовательность Cu/Zn-SOD *B. taurus* и дополнительная информация о структуре и некоторых свойствах этого фермента находятся в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00442/publications>). Идентификационный номер коровьей Cu/Zn-SOD – P00442 (SODC_BOVIN) [265]. Полипептидная цепь Cu/Zn-SOD содержит 152 а.к. остатка, её ММ составляет 15,683 кДа. Фермент синтезируется в виде пре-фермента. Сигнальный фрагмент представлен одной аминокислотой – метионином (рис. 4.26).

10	20	30	40	50	60
MATKAVCVLK	GDGPVQGTIH	FEAKGDTVVV	TGSITGLTEG	DHGFHVHQFG	DNTQGC ^{CS} TSAG
70	80	90	100	110	120
PHFNPLSKKH	GGPKDEERHV	GDLGNVTADK	NGVAIVDIVD	PLISLSGEYS	IIGRTM ^{CS} VVHE
130	140	150			
KPDDLGRGGN	EESTK ^{CS} TGNAG	SRLACGVIGI	AK		

Рис. 4.26. Первичная структура **пре-Cu/Zn-SOD** коровы [265]. Зеленым фоном выделен иницирующий Met1, желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелой супероксиддисмутазы (Ala2-Lys152). Бирюзовым фоном обозначены Cys56 и Cys145, красным фоном отмечены Lys4, Lys10, Lys90, Lys121 и Lys135, серым фоном выделен пальмитоилированный Cys7. Жирным подчеркнутым шрифтом показан сайт N-ацетилирования – Ala2. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Процессинг включает в себя удаление иницирующего Met1, образование одного внутримолекулярного -S-S- мостика (Cys56-Cys145), N-ацетилирование Ala2, липидирование (S-пальмитоилирование) Cys7, N6-сукцинирование Lys4, Lys10, Lys90, Lys121 (альтернативно: N6-ацетилирование), Lys135 (альтернативно: N6-ацетилирование), фосфорилирование Ser104 и Ser106 [265, 266].

Трехмерная структура Cu/Zn-SOD коровы исследована методами рентгеноструктурного анализа с разрешением 1,65Å, 2,0Å и 2,3Å [266–270]. Молекула функциональной Cu/Zn-SOD – гомодимер с ММ ~32 кДа. Субъединицы димера соединяются друг с другом за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий [266]. Пространственная организация мономера – пре-SOD – предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P00442>), с высокой (>90%) достоверностью (рис. 4.27).

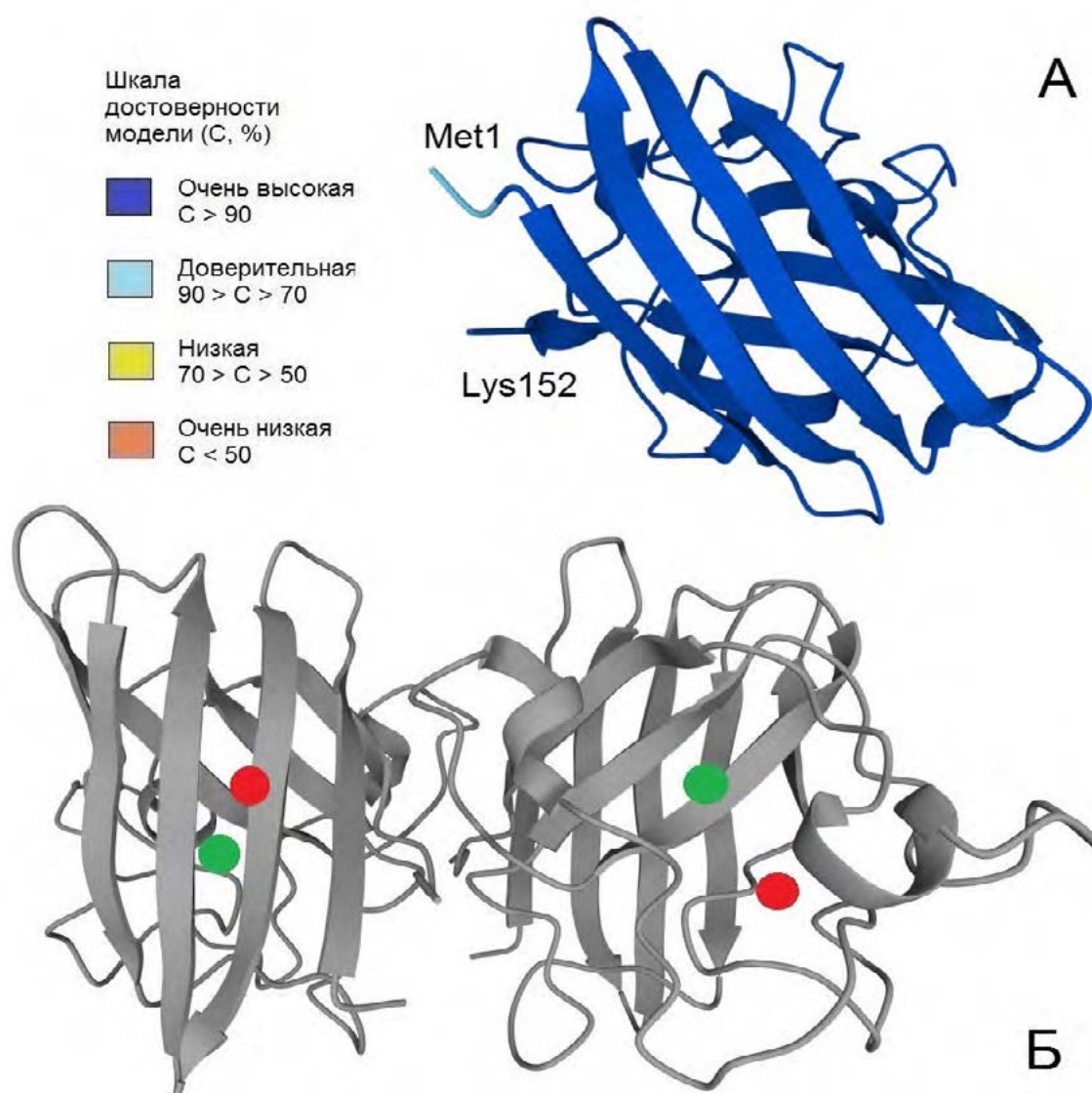


Рис. 4. 27. Трехмерная структура Cu/Zn-супероксиддисмутазы коровы. А. Модель мономера, пре-SOD, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P00442>) [21, 22]; Б. Модель гомодимера Cu/Zn-SOD, построенная по результатам рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,3 Å (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00442/entry#structure>). Зеленым цветом обозначены ионы меди, красным – ионы цинка

Концентрированные препараты фермента имеют сине-зеленую окраску, что обусловлено присутствием ионов меди (один Cu^{2+} на мономер). Удаление меди при помощи ЭДТА приводит к потере активности, которая восстанавливается при внесении в препараты SOD ионов Cu^{2+} . В состав каждого мономера входит и один ион Zn^{2+} , который не критичен для проявления ферментативной активности. При нейтральных значениях pH фермент стабилен в 9М моче-вине (сильный хаотропный агент) [2].

В молоке коровы SOD присутствует исключительно в обезжиренной фракции. Активность SOD в коровьем молоке варьирует у разных пород и индивидуальных животных и составляет в среднем 0,83–1,10 U/мл, что примерно в 100 раз ниже, чем в крови [271, 272].

В модельных системах, SOD ингибирует перекисное окисление липидов. В молоке активность SOD изменяется параллельно изменению активности ксантиноксидоредуктазы (но только на более низком уровне). Это позволило предположить, что SOD может дополнять про-оксидантную активность ксантиноксидоредуктазы. Однако попытки установить зависимость между устойчивостью молока к развитию оксидативной прогорклости и активностью эндо-

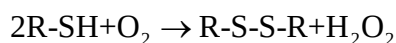
генной SOD не увенчались успехом [273]. По-видимому, окислительная устойчивость молока зависит от баланса и активности различных про- и антиоксидантов, нежели одной только SOD.

В молоке SOD более термостабильна, чем в изолированной высокоочищенной форме. Фермент сохраняет активность при прогревании молока до 71 °С в течение 30 минут, но при температуре >71 °С быстро её теряет [274]. Таким образом, даже небольшие изменения температуры пастеризации могут оказаться критическими для сохранения активности SOD.

Рассматривалась возможность использования экзогенной SOD для того, чтобы затормозить или подавить окисление липидов в молочных продуктах. При этом наблюдалось значительное повышение окислительной стабильности молока даже при внесении минимальных доз фермента [275]. К сожалению, по сравнению с используемыми коммерческими антиоксидантами препараты SOD слишком дороги, поэтому говорить об их широком практическом применении, по-видимому, рано.

4.14. Оксидаза сульфгидрильных групп (ЕС 1.8.3.2)

Фермент оксидаза сульфгидрильных групп (SH-оксидаза) катализирует окисление свободных сульфгидрильных групп цистеина, глутатиона или белков до дисульфидов [276]:



Фермент широко распространен и обнаруживается в различных тканях и органах, включая молочную железу, поджелудочную железу, почки и кишечник.

В молоке коровы SH-оксидаза открыта F. Kiermeier и E. Petz, в 1967 г. [268–270]. Позднее, в 1975–1987 гг., H.E. Swaisgood и его коллеги провели ряд исследований оксидазы сульфгидрильных групп (SOX), которую они выделили из коровьего молока [271–273]. Фермент был охарактеризован как металл-зависимая SH-оксидаза (Met-SOX), мембранносвязанный железосодержащий (~0,5 атома железа на мономер) гликопротеин (~10% углеводов). Момеры фермента (ММ~89 кДа) легко образуют высокомолекулярные самоассоциаты. Это позволяет эффективно выделять SH-оксидазу методами гель-фильтрации на крупнопористых носителях – агарозных матрицах или пористом стекле. Оптимум ферментативной активности оксидазы SH-групп находится при 35 °С и pH~7, ингибиторами фермента служат SH-блокирующие реагенты и хелаторы металлов (1 mM ЭДТА полностью подавляет активность Met-SOX). Фермент был секвенирован и клонирован. Важным вкладом серии этих новаторских работ стало предположение, что SOX может играть важную роль в окислительном фолдинге белков молока [271–274].

Долгое время Met-SOX считалась основной оксидазой SH-групп в молоке коровы [2].

Однако в 2007 г. была опубликована работа J. Jaje и соавторов, в которой было показано, что растворимая оксидаза сульфгидрильных групп с ММ ≈62 кДа, связанная с FAD и абсолютно нечувствительная к ЭДТА, по-видимому, является доминирующей формой SOX в обезжиренном коровьем молоке [274]. В отличие от Met-SOX, FAD-зависимая оксидаза SH-групп (FAD-SOX) не связана с мембранами. Секвенирование очищенного фермента и последующий анализ его первичной последовательности установил, что FAD-SOX относится к семейству квиесцин-сульфгидрилоксидаз (quiescin-sulfhydryl oxidase, QSOX).

Семейство ферментов QSOX образовалось в результате слияния тиоредоксиновых доменов и FAD-связывающих доменов (ERV1/ALR) белков. FAD-зависимая оксидаза SH-групп из коровьего молока обладает высокой активностью в отношении восстановленной рибонуклеазы, глутатиона и дитиотреитола. Было установлено, что FAD-SOX способна эффективно окислять восстановленные тиоловые группы панкреатической рибонуклеазы и, тем самым, восстанавли-

ливать её ферментативную активность [275]. Это подтверждает предположение Н.Е. Swaisgood и соавторов о том, что одной из физиологических ролей SH-оксидазы является формирование специфических дисульфидных связей в процессе фолдинга белков.

Предпочтительным источником FAD-SOX является не молоко, а подсырная или кислотная сыворотка, из которой фермент может быть получен в коммерчески значимых количествах ($\approx 3,3$ мг FAD-SOX на 100 г сывороточного белка) с использованием ионообменной и гидрофобной хроматографии [275].

Первичная последовательность FAD-SOX коровы и дополнительная информация о структуре и свойствах фермента находятся в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A6QQA8/entry>). Идентификационный номер FAD-SOX *B. taurus* – A6QQA8 (A6QQA8_BOVIN) [276]. Полипептидная цепь FAD-SOX содержит 567 а.к. остатков, её ММ составляет 62,975 кДа. Фермент синтезируется в виде пре-FAD-SOX. Сигнальный фрагмент, который «отстригается» при процессинге, состоит из 30 а.к. остатков (рис. 4.28). Данные о других ПТМ отсутствуют.

Метод определения активности SH-оксидазы основан на окислении SH-групп субстрата – глутатиона (GSH) – при pH 7,0. После определенного времени инкубации фермент-субстратной смеси, когда часть GSH превращается в окисленную форму (GS-SG), в неё добавляют реагент Элмана (5,5-дитиобис-2-нитробензоат), который, при взаимодействии с остатками GSH образует окрашенный продукт с максимумом поглощения при 412 нм [2].

10	20	30	40	50	60
MGWCGRGSGP	PPSRLLMLLS	LLLA VRGAGA	APRSALYSSS	DPLTLLRADT	VRSTVLGSSS
70	80	90	100	110	120
AWAVEFFASW	CGHCIAFAPT	WKALANDVKD	WRPALNLAAL	DCAEETNSAV	CRDFNIPGFP
130	140	150	160	170	180
TVRFFKAFSK	TGSGTTLSVA	GADVQTLRER	LIDALESHSD	TWPPACPPLE	PARLEEITGF
190	200	210	220	230	240
FARNNEEYLA	LIFEKEGSYL	GREVTLDLSQ	HQGIARRVL	NTERDVVNRF	GVTNFPSCYL
250	260	270	280	290	300
LSRNGSFSRV	PALTESRSFY	TTYLRKFSGS	TSGAVQTAA	PATTSVAPT	VWKVADRSKI
310	320	330	340	350	360
YMADLESALH	YILRIEVGKF	SVLEGQRLVA	LKKFMAVLAK	YFRGRPLVQN	FLHSMNDWLK
370	380	390	400	410	420
KQQRKKIPYG	FFKNALDSRK	EGTVIAEKVN	WVGCQGSEPH	FRGFPCSLWI	LFHFLTQVAA
430	440	450	460	470	480
QEGVDHPQER	AKAQEVLQAI	RGYVRFFFGC	RECAGHFEQM	ASGSMHRVGS	LNSAVLWFWS
490	500	510	520	530	540
SHNKVNARLA	GAPSEDPQFP	KVQWPPRELC	SACHNELRGT	PVWDLNLIK	FLKTHFSPSN
550	560				
IVLDFPSAGP	GPWRGAERMA	VIPKQLI			

Рис. 4.28. Первичная структура **пре-FAD-SOX** коровы [276]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид (Met1-Ala30). Красным подчеркнутым шрифтом показан тиоредоксиновый домен, синим подчеркнутым шрифтом - FAD-связывающий домен (ERV1/ALR). Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Информация об исследовании структуры ФАД-зависимой оксидазы SH-групп коровы методами рентгеноструктурного анализа отсутствует. Трехмерная структура FAD-SOX предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/A6QQA8>), с высокой (>90%) достоверностью, за исключением сигнального пептида, фрагмента Gly269-Pro289, который находится между тиоредоксиновым и FAD-связывающим доменом, и С-терминального участка Phe545-Ile567 (рис. 4.29).

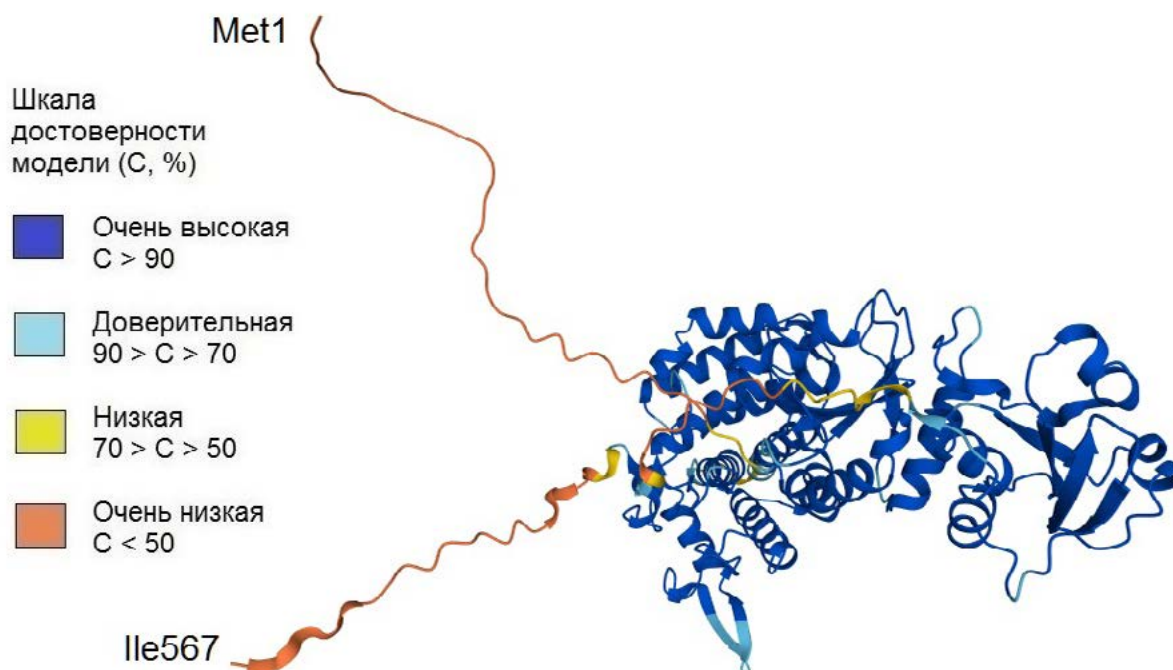


Рис. 4.29. Модель трехмерной структуры пре-FAD-SOX коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/A6QQA8>) [21, 22]

Технологическая значимость SH-оксидазы в молочной промышленности определяется способностью этого фермента окислять экспонируемые в результате высокотемпературной обработки сульфгидрильные группы казеинов (α 2-CN и κ -CN) и сывороточных белков молока, прежде всего β -лактоглобулина. В термоденатурированных белках экспонируемые SH-группы ответственны за формирование специфического «пригоревшего» привкуса («burnt-off» flavour) или вкуса «термообработанной» пищи («cooked» flavour). Показано, что иммобилизованная на стеклянных шариках SH-оксидаза не только устраняет «пригоревший» привкус, но и повышает стабильность СВТ-обработанных молочных продуктов [2, 276]. Предполагается, что этот эффект основан на способности SOX окислять экспонированные SH-группы молочных белков, подвергшихся воздействию высоких температур [277]. Прямое внесение в СВТ-обработанное молоко микробной SOX, в дозировке 9U/литр, полностью устраняет вкус «пригоревшего» продукта [278].

Несмотря на то, что применение SH-оксидаз в молочной промышленности началось еще в 1970-х гг. [279], «сшивающая» активность этих ферментов до сих пор исследована не так подробно, как, например, для трансклутаминаз или тирозиназ [280]. Высказывалось предположение, что катализируемое тирозиназой сшивание белков выигрывает от предварительной обработки продукта SOX [281].

Оксидаза SH-групп находит разнообразное применение в хлебопекарной промышленности. В пшеничном тесте SOX может воздействовать на цистеиновые остатки белков клейковины и, во-первых, образовывать дополнительные дисульфидные связи между белками, тем самым укрепляя структуру матрицы, увеличивая объем и улучшая вязкоупругие свойства продукта, во-вторых, производя H_2O_2 , которая может неферментативно сшивать биополимеры пшеницы [282–284].

Было предложено использовать SOX в комбинации с другими пекарскими ферментами, такими как гемицеллюлазы, целлюлазы или глюкозооксидаза, для замены опасного для здоровья KBr, запрещенного к использованию во многих странах [281, 285]. Сообщалось, что применение SOX и олигосахаридоксидазы в присутствии GSH или Cys представляет собой аль-

тернативу использованию KBr в хлебопечении [286]. Комбинация ферментов, разлагающих целлюлозу, и окислительного фермента, такого как SOX, улучшает обработку теста и свойства конечного выпеченного продукта [287]. Запатентован метод производства печенья с использованием оксидаз SH-групп в сочетании с папаином, поскольку продукция H_2O_2 в реакциях с участием SOX может контролировать излишне интенсивное, и потому негативное, действие протеазы [288].

Способность SOX окислять небольшие и нередко летучие тиоловые соединения используется для стабилизации и контроля запаха пищевых продуктов [279, 289, 290]. Поскольку сульфгидрильные ароматические соединения более стабильны в окисленной форме, обработка SOX может предотвратить их испарение. Показано, что SOX способствует сохранению приятного аромата кофе, чая, какао, шоколада и сыра [289].

В процессе созревания сыров образование и накопление небольших молекул, содержащих сульфгидрильные компоненты, таких как сероводород, метантиол, диметил сульфид, диметил дисульфид, играют негативную роль в формировании аромата продукта. Остающаяся в сгустке SH-оксидаза окисляет небольшие тиол-содержащие соединения обеспечивая их стабильность, что положительно влияет на физико-химические и органолептические показатели сыра [4].

4.15. Альдолаза (EC 4.1.2.13)

Альдолаза (фруктозо-бифосфат альдолаза) – один из ключевых ферментов гликолиза (превращения глюкозы в пируват, с одновременным образованием АТФ). Альдолаза (ALD) катализирует обратимое превращение β -D-фруктозо-1,6-дифосфата в дигидроксиацетонфосфат и D-глицеральдегид-3-фосфат (реакция 1), а также обратимое расщепление фруктозо-1-фосфата на глицеральдегид и дигидроксиацетонфосфат (реакция 2) [291]. Фермент расщепляет 6-углеродный фруктозный сахар на два 3-углеродных продукта и играет важнейшую роль в энергетическом обмене.

Известно три изофермента ALD – A, B и C. У млекопитающих ALD B экспрессируется преимущественно в печени, ALD A синтезируется в мышцах и эритроцитах, а ALD C – в головном мозге. Небольшие различия в структуре изоферментов отражаются на субстратной специфичности: ALD B катализирует реакции 1 и 2, тогда как изоферменты A и C избирают в качестве субстрата преимущественно β -D-фруктозо-1,6-дифосфат (реакция 1).

Для реакций, катализируемых ALD, характерно образование промежуточного соединения – основания Шиффа – с остатком Lys229 в активном центре фермента. После образования основания Шиффа четвертая гидроксильная группа молекулы фруктозы депротонируется при участии R-группы аспартата (Asp34), что приводит к расщеплению альдола. Образование основания Шиффа является ключевым отличительным признаком между ALD класса I (продуцируемыми животными и растениями) и класса II (продуцируемыми грибами).

В 1950 г. R.D. Polis и H.W. Shmukler выделили и частично очистили альдолазу из молока коровы [292]. Активность молочной альдолазы обнаруживается в сливках и препаратах мембран МЖГ [293].

Первичная последовательность альдолазы коровы и дополнительная информация об её структуре и свойствах находятся в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q3ZBY4/entry>). Идентификационный номер ALD *B. taurus* – Q3ZBY4 (Q3ZBY4_BOVIN) [294]. Полипептидная цепь ALD содержит 364 а.к. остатка (рис. 4.30), её вычисленная ММ составляет 39,382 кДа. Информация о посттрансляционном процессинге отсутствует.

Альдолаза, выделенная из мышц кролика, является гомотетрамером с ММ ~161 кДа. Каждая субъединица содержит консервативную белковую структуру, состоящую из восьми

α -спиралей и восьми параллельных β -нитей – так называемую α/β -складку, в который находится активный центр, включающий в себя Lys229 и Asp34 [291].

Трехмерная структура ALD коровы предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0 [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q3ZBY4>) с высокой достоверностью, за исключением короткого С-концевого участка Glu344-Tyr364 (рис. 4.31).

10	20	30	40	50	60
MPHSYPALSA	EQKKELSDIA	LRIVAPGKGI	LAAD ES VGSM	AKRLSQIGVE	NTEENRRLYR
70	80	90	100	110	120
QVLFSADDRV	KKCIGGVIFF	HETLYQKDDN	GVPFVRTIQD	KGIVVGIKVD	KGVVPLAGTD
130	140	150	160	170	180
GETTTQGLDG	LSERCAQYKK	DGADFAKWRC	VLKISERTPS	ALAILENANV	LARYASICQQ
190	200	210	220	230	240
NGIVPIVEPE	ILPDGDHDLK	RCQYVTEKVL	AAVYKALSDH	HVYLEGTL L K	PNMVTPGHAC
250	260	270	280	290	300
AIKYSPEEIA	MATVTALRRT	VPPAVPGVTF	LSGGQSEEEA	SLNLNAINRC	PLPRPWALTF
310	320	330	340	350	360
SYGRALQASA	LNAWRGQQDN	AGAATEEFIK	RAEVNGLAAQ	GKYEKSGEDG	GAAVQSLYIA

NHAY

Рис. 4.30. Первичная структура **альдолазы** коровы [294]. Зеленым фоном выделены Lys229 и Asp34, входящие в состав активного центра (по аналогии с ALD кролика, по данным [291]). Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

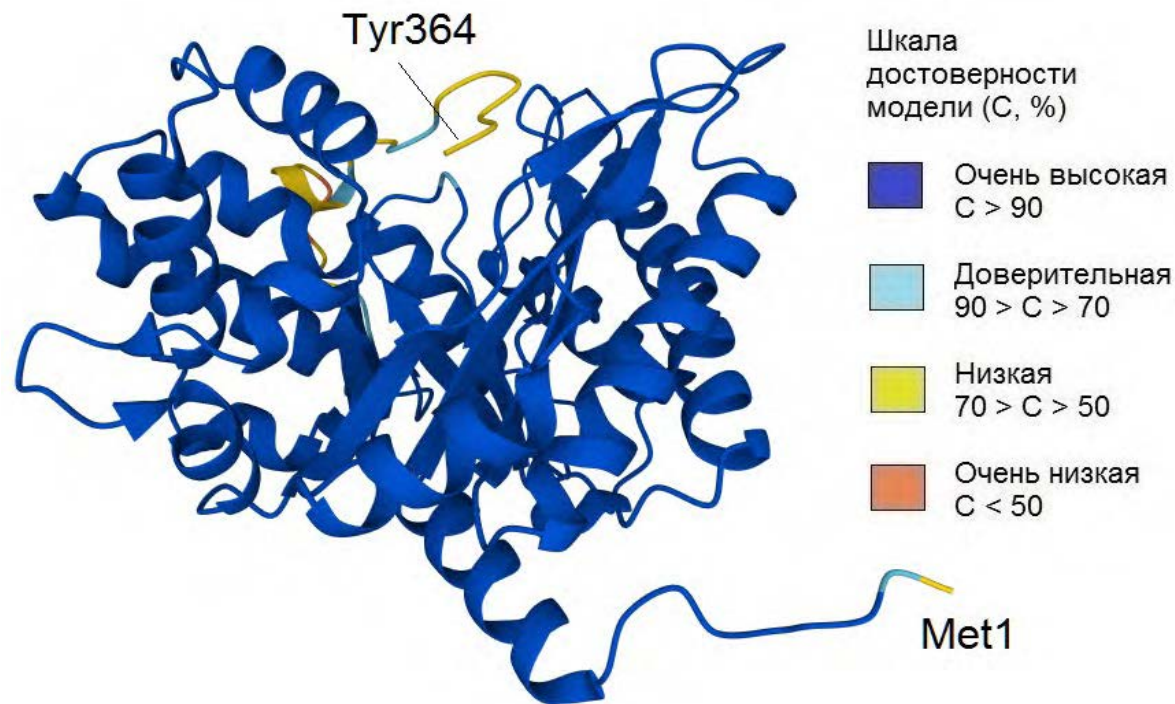


Рис. 4.31. Модель трехмерной структуры ALD коровы, построенная сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0 [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q3ZBY4>)

Альдолаза, обнаруживаемая в молоке, происходит из цитоплазмы клеток молочной железы и, частично, из крови. Оптимумом ферментативной активности ALD находится при pH 7,0. Предполагается, что альдолаза может играть роль в формировании аромата молочных продуктов, однако проверка этого предположения требует проведения специальных исследований [2].

4.16. Глутатионпероксидаза (ЕС 1.11.1.9)

Фермент глутатионпероксидаза (GSH-пероксидаза, GPX) катализирует реакцию:



где GSH – глутатион (γ -Glu-Cys-Gly), а ROOH – перекись, включая и H_2O_2 .

Глутатионпероксидаза встречается в цитоплазме различных типов клеток, в том числе и в эритроцитах, которые служат сырьем для выделения этого фермента. Основная физиологическая функция GSH-пероксидазы, являющейся, наряду с супероксиддисмутазой, частью антиоксидативной системы – защита клеток от повреждающего действия перекисей. У млекопитающих различают две формы GPX: клеточную (цитозольную) и внеклеточную (плазматическую), которые различаются структурно, иммунологически и кинетически [295].

В 1987 г. В. Debski с соавторами сообщали, что в молоке коровы преобладает именно плазматическая форма фермента (>90%), его концентрация составляет 27 нг/мл. Содержание GSH-пероксидазы в молоке зависит от диеты и видовой принадлежности (человек > коза > корова) [173, 296]. Позднее, в 2001 г. Н. Lindmark-Masson и В. Akesson опубликовали данные о выделении и частичной очистке плазматической формы GPX из молока коровы [297]. Фермент выдерживает нагревание до 72 °С в течение двух минут, а при pH молока и температуре 8 °С стабилен в течение нескольких дней [298].

Первичная последовательность плазматической формы GPX и дополнительная информация о структуре и свойствах фермента находятся в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P37141/entry>). Идентификационный номер плазматической GSH-пероксидазы *B. taurus* – P37141 (GPX3_BOVIN) [299]. Полипептидная цепь GPX содержит 226 а.к. остатков, её вычисленная ММ составляет 25,663 кДа. Фермент синтезируется в виде пре-GPX. Сигнальный фрагмент, который удаляется при процессинге, состоит из 24 а.к. остатков (рис. 4.32). Данные о других ПТМ плазматической формы GPX в базе данных не представлены.

Цитозольная GSH-пероксидаза, выделенная из эритроцитов *B. taurus* – тетрамерный белок, состоящий из четырех идентичных субъединиц (ММ~21 кДа), каждая из которых содержит один атом Se, соединенный с остатком цистеина [300, 301]. Данные о пространственной структуре плазматической GPX в базе данных UniProt отсутствуют.

Определение активности GSH-пероксидазы основано на регистрации убыли субстрата (GSH) методом полярографии или (по аналогии с оксидазой сульфгидрильных групп) с использованием реагента Элмана и регистрацией поглощения при 412 нм [2]. Возможно определение активности GSH-пероксидазы методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays) [297].

10	20	30	40	50	60
MARLFRASCL	LSLLLAGFIP	PSQGQEKSKT	DCHAGVGGTI	YEYGALTIDG	EEYIPFKQYA
70	80	90	100	110	120
GKYILFVNVA	SYUGLTGQYV	ELNALQEELE	PFGLVILGFP	CNQFGKQEPG	ENSEILATLK
130	140	150	160	170	180
YVRPGGGFTP	NFQLFEKGDV	NGEKEQKFYT	FLKNSCPPTS	ELLGSPDRLF	WEPMKVHDIR
190	200	210	220		
WNFEKFLVGP	DGIPIMRWYH	RTTVNSVKMD	ILTYMRRRAV	WEAKGK	

Рис. 4.32. Первичная структура плазматической **GSH-пероксидазы** коровы [299]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид (Met1-Gly24), желтым фоном обозначена полипептидная цепь зрелого фермента. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Кроме способности связывать селен (важный, с диетологической точки зрения, микроэлемент), о роли GSH-пероксидазы в молоке ничего не известно.

4.17. Ангиогенин (ЕС 3.1.27)

Ангиогенин («рождающий сосуды», от греческого *angion* – сосуд) – белок, синтезируемый клетками различных опухолей и здоровыми клетками печени, который является мощным индуктором роста кровеносных сосудов *in vivo* [302, 303].

Первоначально ангиогенин (ANG) был выделен из клеток карциномы человека (для получения 1 мг АНГ пришлось переработать около 2000 литров культуральной жидкости) [302]. Позднее ANG был получен из плазмы крови здоровых людей [304]. Показано, что в некоторых случаях уровень экспрессии АНГ положительно коррелирует с развитием опухоли и неблагоприятным прогнозом [305].

Ангиогенин относится к суперсемейству панкреатических рибонуклеаз и проявляет слабую рибонуклеазную активность (гидролизует 28S и 18S рибосомальные РНК), которая тесно связана с его способностью индуцировать рост кровеносных сосудов и ингибировать некоторые виды бактерий [306, 307]. Подавляет синтез белка путем специфического гидролиза клеточных тРНК [308].

В молоке коровы ангиогенин открыт в 1988 г., тогда же была установлена его первичная структура [309]. Концентрация ANG в коровьем молоке почти на порядок выше, чем в сыворотке крови, и составляет в среднем 3–4 мг/л, но может колебаться от 2 до 10 мг/л. Так же, как и в случае с рибонуклеазой, более высокая концентрация ANG в молоке, по сравнению с сывороткой крови, может объясняться существованием механизмов активного транспорта ангиогенина из крови в молоко. Кроме молока и молочной сыворотки, ангиогенин выделен из мембраны жировых глобул молозива [310].

По данным [311], в молоке коровы присутствуют как минимум три молекулярных варианта ANG: ангиогенин-1 (основной вариант, 125 а.к.) [308], ангиогенин-2 (123 а.к., идентичен ангиогенину-1 на 57%) [312, 313] и низкомолекулярный вариант, получивший название лактогенин (73 а.к. остатка) [314]. Изоформы молочного ANG незначительно различаются как по активности, так и по субстратной специфичности. Их ферментативные свойства в основном зависят от пространственного расположения консервативных фрагментов, имеющих решающее значение для активности, а не от первичных структур [311]. В данной монографии термины «ангиогенин» и «ANG» относятся к ангиогенину-1.

Первичная последовательность ангиогенина-1 коровы и другая информация о структуре и свойствах этого белка размещены в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P10152/entry>). Идентификационный номер ангиогенина-1 *B. taurus* – P10152 (ANG1_BOVIN) [308]. Фермент синтезируется в виде пре-ANG, состоящего из 148 а.к. остатков, вычисленная ММ равна 16,970 кДа. ПТМ включают в себя удаление сигнального пептида (Met1-Pro23) и образование трех внутримолекулярных дисульфидных связей (Cys50-Cys105, Cys63-Cys116, Cys81-Cys131) (рис. 4.33) [308].

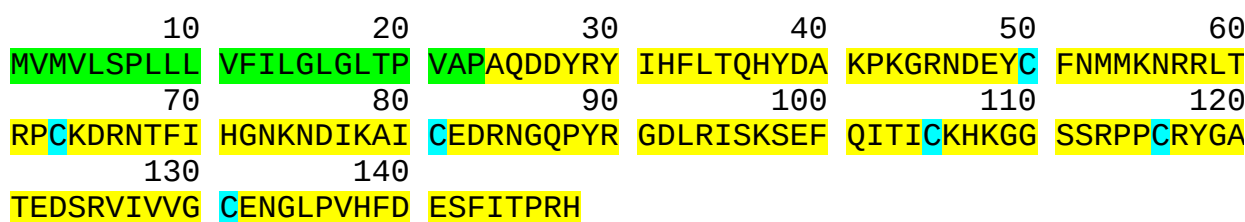


Рис. 4.33. Первичная структура **пре-ангиогенина-1** коровы [308]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид, желтым фоном обозначена полипептидная цепь зрелого ангиогенина-1. Бирюзовым фоном выделены остатки, образующие внутримолекулярные -S-S- связи. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Третичная структура ангиогенина-1 коровы исследована методами рентгеноструктурного анализа с разрешением 1,5 Å [315] и спектроскопии ЯМР [316]. Модель пространственной организации коровьего пре-ангиогенина-1 предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P10152>), с высокой достоверностью ($\geq 90\%$), за исключением сигнального пептида (Met1-Pro23) и короткой С-концевой последовательности (Thr145-His148) (рис. 4.34).

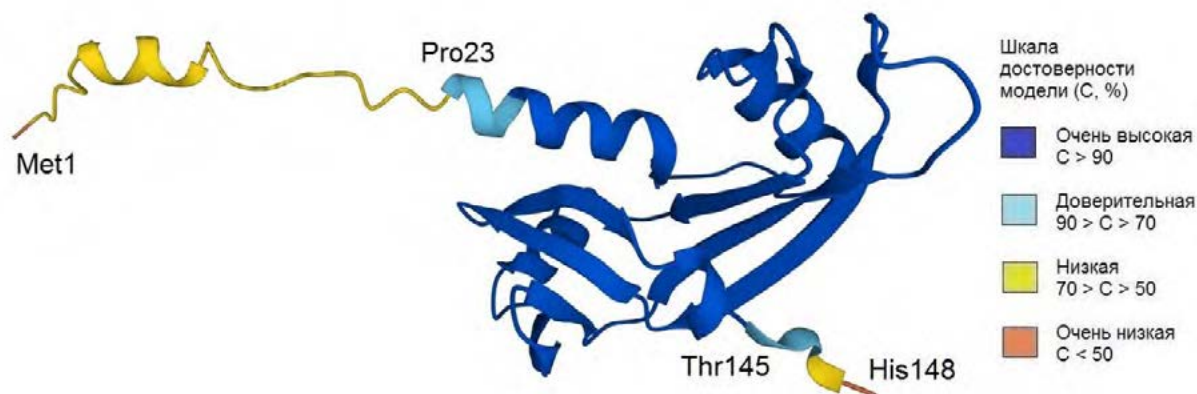


Рис. 4.34. Модель трехмерной структуры пре-ангиогенина-1 коровы, построенная сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0 [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P10152>)

Ангиогенин коровьего молока обладает высокой термоденатурационной стабильностью, устойчив к низким значениям pH и к действию протеолитических ферментов, в том числе к протеазам желудочно-кишечного тракта. Поэтому не только молоко, но и продукты его технологической переработки (подсырная сыворотка, пахта, пермеаты, получаемые при концентрировании белков молока методом ультрафильтрации), подвергавшиеся различным физико-химическим воздействиям, являются богатыми источниками ANG [317, 318].

Наряду с лизоцимом и рибонуклеазой, молочный ANG обладает бактерицидными свойствами [306, 319, 320]. Так же, как и другие низкомолекулярные эндогенные ферменты молока – рибонуклеаза (ММ~14 кДа) и лизоцим (ММ~15 кДа), – ANG проходит через мембраны, на которых концентрируют казеиновые фракции молока. Получаемый при этом пермеат (фильтрат) утилизируется. Для промышленного получения ANG утилизируемую сыворотку или пермеат, полученный при концентрировании казеинов, достаточно сконцентрировать методом ультрафильтрации (УФ), с применением мембран, имеющих отсечку по ММ < 10 кДа. При этом получается концентрат, обогащенный ангиогенином (а также рибонуклеазой и лизоцимом). На получение таким способом 1 мг ANG затрачивается чуть больше литра отходов переработки молока.

Активное исследование физико-химических, ферментативных и биологических свойств ANG коровьего молока проводилось группой специалистов Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук и Московского государственного университета прикладной биотехнологии [311, 317–320, 322–324]. Российскими учеными разработан способ получения из молока коровы электрофоретически чистого нативного препарата ANG [318, 306], а также иммуноферментный метод количественного определения ANG в биологических жидкостях [322, 323].

Для выделения и очистки ANG из молочного сырья используется катионообменная и гидрофобная хроматография [306]. На первом этапе на колонке с КМ-целлюлозой получают фракцию катионных белков, обогащенную ANG (pI > 10,5). Препарат диализуют и наносят на CM-Toyorearl 650S. Элюцию проводят повышающимся градиентом концентрации KCl. На данной стадии происходит эффективная очистка ANG от большинства балластных белков,

но получаемый продукт загрязнен панкреатической РНКазой А. Для очистки от РНКазы используется гидрофобная хроматография на Butyl-Toyopearl 650S. Белки элюируют понижающимся градиентом концентрации сульфата аммония, при этом ANG выходит из колонки четким симметричным отдельным пиком. Обладающие ангиогенной активностью фракции не содержат РНКазу А. В результате получают электрофоретически гомогенный препарат ANG с выходом 49% и степенью очистки 12000 раз [306].

Установлено, что ANG обладает бактериостатическим действием по отношению к условно патогенному штамму *Escherichia coli* (штамм В-125). При концентрации ANG в культуральной среде 12,5 мкг/мл число жизнеспособных бактериальных клеток снижалось в 3–5 раз, а при увеличении дозы в четыре раза – почти на два порядка. Увеличение концентрации ANG до 100 мкг/мл приводило к подавлению роста тест-культуры [306, 319, 320].

Существует возможность производства рекомбинантного ANG [325]. Однако из-за высокой стоимости рекомбинантный ANG вряд ли станет столь же доступным, как молочный, и применяться он будет, скорее всего, только в научных и лечебных целях.

В 1988 г. была показана возможность производства рекомбинантного (генно-инженерного) ангиогенина человека экспрессированного в прокариотической системе (*Escherichia coli*) [325]. Однако при таком способе экспрессии рекомбинантный ангиогенин (rANG) нарабатывался в агрегированной и нерастворимой форме в виде внутриклеточных «телец включения» (*inclusion bodies*, англ.). Для извлечения из них целевого белка и получения ANG в нативной форме требовалась многостадийная процедура ренатурации с последующей очисткой. До недавнего времени стоимость такого препарата была очень высока (~7000\$ за 1 мг). По-прежнему полагали, что человеческий rANG вряд ли станет так же доступен, как молочный, скорее всего, его будут использовать только в научных и лечебных целях.

В 2012 г. был разработан метод продукции rANG человека в эукариотической системе [326]. В качестве продуцента растворимого и, что самое важное, имеющего корректную третичную структуру ангиогенина, использовали дрожжи *Pichia pastoris*. Фрагмент ДНК, кодирующий АНГ человека, встраивали в эукариотический вектор экспрессии, которым трансформировали дрожжевые клетки. Уровень экспрессии rАНГ составлял около 70% от общего количества секретируемого в культуральную жидкость белка. После выделения и очистки rANG методом ионообменной хроматографии на SP Sepharose FF были получены его препараты с электрофоретической чистотой около 90%. Суммарный выход целевого белка составил 30 мг на литр культуральной жидкости. Препараты rANG проявляли широкий спектр биологической активности: индуцировали ангиогенез, стимулировали пролиферацию клеток HeLa, усиливали фосфорилирование сигнальных белков Erk 1/2, регулировали экспрессию гена с-Мус, регулирующего пролиферацию, выживание и подвижность клеток.

Несмотря на успехи и бурное развитие технологий получения рекомбинантных белков, их стоимость остается по-прежнему очень высокой. Поэтому выделение ангиогенина из молока или продуктов его переработки (таких, как подсырная сыворотка), с учетом высокой термостабильности целевого протеина, экономически более выгодно.

В настоящее время ANG рассматривается в качестве одного из факторов пассивного иммунитета, передаваемого с молоком матери потомству. Перенос факторов пассивного иммунитета от матери к новорожденному имеет исключительно важное значение при переходе организма от внутриутробного к внешнему образу жизни. Динамика синтеза ангиогенина в молочных железах и зависимость его содержания в молоке от физиологических факторов, связанных с репродуктивной функцией лактирующих животных, подтверждают участие этого белка в обеспечении иммунной функции новорожденного [311]. Обнаружена способность

ANG коровьего молока проникать в кровь через ЖКТ, при пероральном введении (по-видимому, механизм проникновения ANG аналогичен механизму переноса рибонуклеазы), что также связано с его защитной функцией [306, 324].

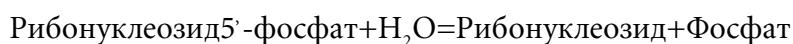
Ангиогенез сопровождает процессы размножения, эмбриогенеза, роста и регенерации поврежденных тканей. Установлено участие ANG в морфологических преобразованиях яичников коров на различных стадиях репродуктивного цикла. Получены данные о положительном влиянии ANG плазмы крови человека на восстановление поврежденной хрящевой ткани мениска кролика. Ангиогенин также считается эффективным фактором формирования костной ткани [311].

Ангиогенин в концентрации 50 мкг/мл является индуктором продукции лейкоцитами человека провоспалительных цитокинов – интерлейкинов (IL-1 β , IL-6) и фактора некроза опухолей (TNF α) – важных молекулярных посредников в механизмах развития иммунного ответа на уровне цитокинового звена. Исследована фармакокинетика ANG при внутривенном введении лабораторным животным. Дольше всего ANG удерживается в тимусе (вилочковой железе), что свидетельствует о возможности его длительного контакта с предшественниками тимус-зависимых иммунокомпетентных клеток. Это позволяет предполагать, что *in vivo* накопление в тимусе ANG функционально связано с его иммуномодулирующим действием [306].

Таким образом, ангиогенины молока – полифункциональны, поскольку играют важную роль в различных системах организма животных и человека. Исследование функций ANG продолжается, и в этой области следует ожидать важных для практического использования (медицина, фармакология, пищевая отрасль) открытий.

4.18. 5'-Нуклеотидаза (EC 3.1.3.5)

Как следует из названия, 5'-нуклеотидаза (5NTD) катализирует гидролиз 5'-нуклеотидов [5]:



Несмотря на то, что изначально фермент идентифицирован как компонент мембраны жировых глобул молока [327], впоследствии 5NTD была получена и из кислой молочной сыворотки [328].

Первичная последовательность 5'-нуклеотидазы из печени коровы и другая информация о структуре и свойствах этого белка размещены в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q05927/entry>). Идентификационный номер 5'-нуклеотидазы *B. taurus* – Q05927 (5NTD_BOVIN) [329]. Фермент синтезируется в виде пре-про5'-нуклеотидазы, состоящей из 574 а.к. остатков (вычисленная ММ – 62,966 кДа). Процессинг включает в себя удаление сигнального пептида (Met1-Pro26) и активационного пептида (Ala550-Gln576), образование четырех внутримолекулярных дисульфидных связей (Cys51-Cys57, Cys353-Cys358, Cys365-Cys387 и Cys476-Cys479), липидирование по остатку Ser549 и N-гликозилирование Asn53, Asn311, Asn333, Asn403 (рис. 4.35) [329].

Данные о кристаллической структуре 5NTD Q05927 (5NTD_BOVIN), которая в активной форме является гомодимером [329], в базе данных UniProt отсутствуют. Трехмерная структура пре-про 5'-нуклеотидазы коровы предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0 [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q05927>), с высокой достоверностью, за исключением сигнального пептида (пре-фрагмента) и активационного пептида (рис. 4.36).

Из фракции мембран МЖГ фермент был выделен с помощью обработки детергентом, фракционирования сульфатом аммония, термической обработки, обработки ультразвуком и хроматографии на Сефарозе-4В. В результате было получено две фракции (обозначенные

как V и VI) с 5'-нуклеотидазной активностью. Два изофермента различаются по субстратной специфичности, содержанию фосфолипидов и кинетическим свойствам [327].

Оптимум ферментативной активности 5NTD находится при pH 7,0–7,5 [327, 328]. Активность 5'-нуклеотидазы может использоваться в качестве маркера при изучении механизмов секреции глобул молочного жира и биогенеза мембран жировых глобул молока [5].

10	20	30	40	50	60
MNPGAARTPA	LRILALGALL	WPAARPWELT	ILHTNDVHSR	LEQTSDDSSK	CVNASRCVGG
70	80	90	100	110	120
VARLATKVHQ	IRRAEPHVLL	LDAGDQYQGT	IWFTVYKGT	VAHFMNALGY	DAMALGNHEF
130	140	150	160	170	180
DNGVEGLIDP	LLKEVNFPIIL	SANIKAKGPL	ASKISGLYSP	YKILTVGDEV	VGIVGYTSKE
190	200	210	220	230	240
TPFLSNPGTN	LVFEDEITAL	QPEVDKCLKTL	NVNKIIALGH	SGFEVDKLI	QKVKGVDDVV
250	260	270	280	290	300
GGHSNTFLYT	GNPPSKEVPA	GQYPFIVTSD	DGRKVPVVQA	YAFGKYLGYL	KVEFDEKGNV
310	320	330	340	350	360
VTSHGNPILL	NSSIPEDPNI	KADINKWRVK	LDNYSTQELG	KTIVYLDGTA	QSCRFRECNM
370	380	390	400	410	420
GNLICDAMIN	NNLRHPDEMS	WNHVSMTILN	GGGIRSPIDE	RNNGTITWEN	LAAVLPFGGT
430	440	450	460	470	480
FDLVQLKGST	LKKAFAHSHVH	RYGQATGEFL	QVGGIHVVYD	ISRNPGRDVR	KLEVLCTQCR
490	500	510	520	530	540
VPSYEPLRMD	KVYKVILPSF	LVSGGDGFQM	IKDEKIKHDS	GDQDINVVSG	YISKMKVLYP
550	560	570			
AVEGRIQFSA	GSHCCGSFSL	IFLSVLAVII	ILYQ		

Рис. 4.35. Первичная структура пре-про 5'-нуклеотидазы коровы [329]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид, лиловым цветом обозначен активационный пептид, желтым фоном выделена а.к. последовательность зрелой 5NTD. Бирюзовым фоном выделены остатки Cys, образующие внутримолекулярные дисульфидные связи, жирным шрифтом с подчеркиванием обозначены сайты N-гликозилирования, липидированный остаток Ser выделен серым фоном. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

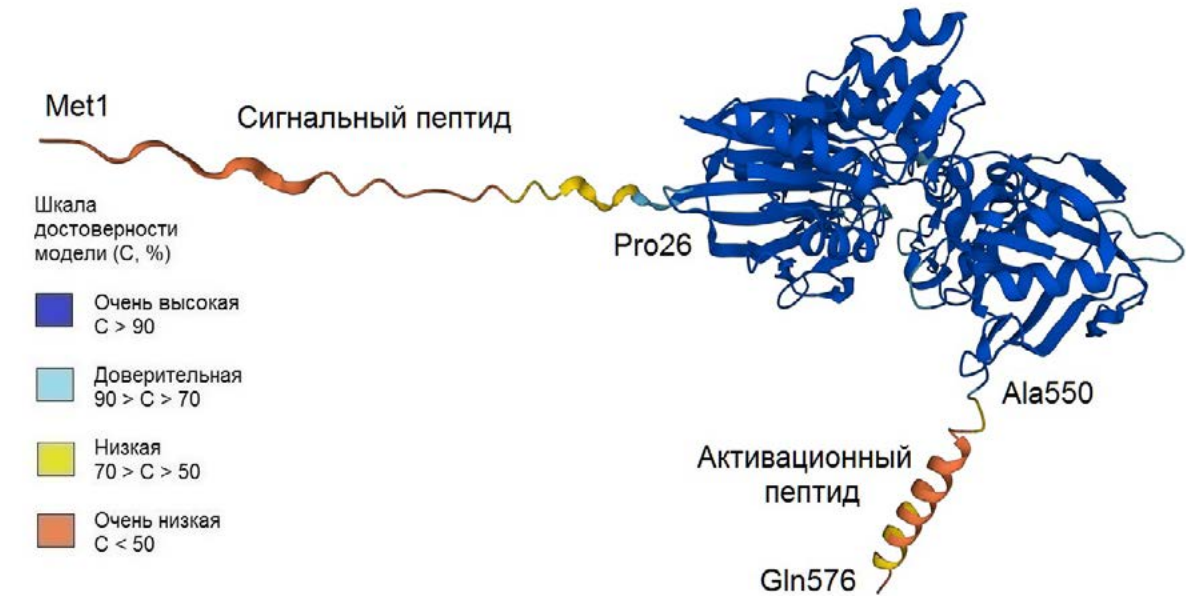


Рис. 4.36. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-про 5'-нуклеотидазы коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q05927>) [21, 22]

Нагревание при 60 °С в течение 30 минут или 75 °С и 80 °С в течение 15 секунд снижает активность 5'-нуклеотидазы на 20, 40 и 97% соответственно [327, 330]. Известно, что молоко содержит 5'-моонуклеотиды (аденозин 5'-монофосфат, цитидин 5'-монофосфат, гуанозин 5'-монофосфат, инозин 5'-монофосфат, уридин 5'-монофосфат), которые могли бы быть субстратами для 5'-нуклеотидазы. Однако по неизвестным причинам эндогенные 5'-моонуклеотиды, по-видимому, устойчивы к дефосфорилированию [331].

4.19. Каталитические антитела (абзимы) с олигонуклеазной активностью

Термин «абзим» (*abzyme* = *antibody* + *enzyme*) используется для описания антител, проявляющих различные виды ферментативной активности, включая нуклеазную активность. Первые каталитические антитела, способные селективно катализировать гидролиз карбонатов и сложных эфиров, были получены в 1986 г. [332]. С тех пор были синтезированы антитела, которые катализируют широкий спектр химических реакций, начиная от перициклических реакций и заканчивая расщеплением пептидных связей. Специфичность реакций, катализируемых антителами, сопоставима со специфичностью ферментативных реакций. Несмотря на то, что в некоторых случаях были достигнуты скорости, приближающиеся к скоростям ферментативных процессов, обычно реакции, катализируемые абзимами, протекают лишь в 10³ до 10⁶ раз быстрее, чем некатализируемая реакция [333–335]. Для сравнения: ферменты увеличивают скорость реакций, примерно, в 10⁵–10¹⁴ раз.

В молоке здоровых женщин было продемонстрировано наличие ДНК- и РНК-гидролизующих антител [336, 337]. Грудное молоко также содержит секреторный иммуноглобулин А (sIgA), который может катализировать гидролиз РНК и ДНК [338, 339]. По данным A.N. Savel'ev et alii, во фракциях IgG и IgA, полученных из молока человека, присутствуют абзимы с амилитической активностью [101]. Предполагается, что иммуноглобулины с олигонуклеазной активностью, присутствующие в грудном молоке, обеспечивают антибактериальную или противовирусную защиту новорожденного, чья иммунная система в раннем постнатальном периоде еще не полностью сформирована [5].

На сегодняшний день информация о каталитических антителах в молоке относится только к *Homo sapiens*. Данные о наличии абзимов в молоке коровы или других видов млекопитающих автором данной работы не обнаружены. Это не мешает предполагать, что абзимы, гидролизующие ДНК и РНК, могут обнаруживаться у тех видов млекопитающих, чье потомство появляется на свет с неполностью сформированной иммунной системой. Как правило, молозиво и молоко таких видов содержит иммуноглобулины и другие защитные белки, а у новорожденных сформированы механизмы, обеспечивающие защиту белковых факторов пассивного иммунитета от протеолитической деградаци и обеспечивающие их прямой трансцеллюлярный перенос в кровь и лимфу, в слизистой оболочке тонкого кишечника [340–344].

Дополнительную информацию о структуре и свойствах каталитических антител можно найти в работах [333, 345–350].

4.20. Второстепенные эндогенные ферменты молока

Кроме рассмотренных выше основных эндогенных ферментов, в молоке обнаруживается множество других энзимов. Назовем их «второстепенными», поскольку, в отличие от основных эндогенных ферментов, большинство из них не были выделены из молока, а идентифицированы в нем только по активности [5]. Некоторые из них даже не имеют номера Комиссии по ферментам (EC). Не исключено, что по мере расширения наших знаний о структуре

и функциях второстепенных ферментов молока, некоторые из них могут перейти в категорию основных. Неполный список второстепенных ферментов, обнаруживаемых в молоке, представлен в Приложении 2.

Библиографический список к главе 4

1. Advanced Dairy Chemistry (Third edition), Vol. I. Proteins. Indigenous enzymes in milk: Lipases in Milk; Indigenous Proteinases in Milk; Indigenous Phosphatases in Milk; Indigenous Nucleases in Milk; Lactoperoxidase; Other Enzymes / P.F. Fox, T. Olivecrona, S. Vilaro, G. Bengtsson-Olivecrona, A.L. Kelly, P.L.H. McSweeney, Shakeel-Ur-Reham, C.M. Fleming, L. Stepaniak, M. Gobetti, A. Corsetti, N.K. Pruitt, N.Y. Farkye.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 465–601.
2. Fox, P.F. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – Part 2 / P.F. Fox, A.L. Kelly // *Int. Dairy J.* – 2006. – V. 16. – P. 517–532.
3. Fox, P.F. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – Part 1 / P.F. Fox, A.L. Kelly // *Int. Dairy J.* – 2006. – V. 16. – P. 500–516.
4. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology (Third edition), Vol. I. General Aspects. Factors that Affect the Quality of Cheese / P.F. Fox, T.M. Cogan; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee, eds. – London, UK: Elsevier Academic Press, 2004. – P. 583–608.
5. Advanced dairy chemistry. Vol. 1a. Proteins: Basic aspects. Indigenous enzymes of milk / J.A. O'Mahony, P.F. Fox, A.L. Kelly.; P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, ed. – New York, NY: Springer, 2013. – P. 337–385.
6. Arnold, C. Einige neue Reactionen der Milch / C. Arnold // *Arc. der Pharmazie.* – 1881. – V. 219. – P. 41–42.
7. Moro, E. Über die Fermente der Milch / E. Moro // *Jarbuch Kinderheilk.* – 1902. – V. 56. – P. 391–420.
8. Advanced Dairy Chemistry, Proteins (2nd edition). Vol. 1. Indigenous enzymes in milk / A.T. Andrews, T. Olivecrona, S. Vilaro, G. Bengtsson-Olivecrona, P.F. Fox, L. Björck, N.Y. Farkye.; P.F. Fox, ed. – London, UK: Elsevier Applied Science, 1992. – P. 285–267.
9. Lysosomes – A Laboratory Handbook. Lysosomal enzymes / A.J. Barrett.; J.T. Dingle, ed. – Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1972. – P. 46–135.
10. Milk Proteins (Third Edition). From Expression to Food. Chapter 2 – Milk proteins: An overview / D.A. Goulding, P.F. Fox, J.A. O'Mahony; M. Boland, H. Singh, ed. – London, UK: Academic Press, 2020. – P. 21–98.
11. Storch, V. Chemical method of ascertaining whether milk has been heated to at least 80°C / V. Storch // *Centra Agrikulturchemie.* – 1898. – V. 27. – P. 711–714.
12. Aurand, L.W. A method for the estimation of peroxidase activity in milk / L.W. Aurand, W.M. Roberts, J.T. Cardwell // *J. Dairy Sci.* – 1956. – V. 39. – P. 568–573.
13. Carmen, M. Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk / M. Carmen, M. Hernandez, B.W. van Markwijk, H.J. Vreeman // *Neth. Milk Dairy J.* – 1990. – V. 44. – P. 213–231.
14. Marín, E. Effect of heat treatment on bovine lactoperoxidase activity in skim milk: kinetic and thermodynamic analysis / E. Marín, L. Sánchez, M.D. Pérez, P. Puyol, M. Calvo // *J. Food Sci.* – 2003. – V. 68. – P. 89–93.
15. Mitchell, I. R. Extraction of lactoperoxidase and lactoferrin from cheese whey using membrane cation exchangers / I.R. Mitchell, G.W. Smithers, D.A. Dionysius, P.A. Grieve, G.O. Regester, E.A. James // Indigenous antimicrobial agents of milk, recent developments, Special Issue 9404 (Brussels, Belgium: International Dairy Federation). – 1994. – P. 89–95.
16. Yoshida, S. Isolation of lactoperoxidase of 89,000 Daltons and globulin of 81,000 Dalton from milk whey / S. Yoshida // *J. Dairy Sci.* – 1988. – V. 71. – P. 2021–2027.

17. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P80025 (PERL_BOVIN) – Lactoperoxidase *Bos taurus* (Bovine) EC: 1.11.1.7. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P80025> (дата обращения: 06.06.2022).
18. Dull, T.J. Molecular Cloning of cDNAs Encoding Bovine and Human Lactoperoxidase / T.J. Dull, C. Uyeda, A.D. Strosberg, G. Nedwin, J.J. Seilhamer // DNA and Cell Biol. – 1990. – V. 9(7). – P. 499–509.
19. Cals, M.-M. Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family / M.-M. Cals, P. Maillart, G. Brignon, P. Anglade, B.R. Dumas // Eur. J. Biochem. – 1991. – V. 198(3). – P. 733–739.
20. Sievers, G. Structure of milk peroxidase. A study using circular dichroism and difference absorption spectroscopy / G. Sievers // Biochim. Biophys. Acta. – 1980. – V. 624. – P. 249–259.
21. Varadi, M. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models / M. Varadi, S. Anyango, M. Deshpande, S. Nair, C. Natassia, G. Yordanova, D. Yuan, O. Stroe, G. Wood, A. Laydon, A. Židek, T. Green, K. Tunyasuvunakool, S. Petersen, J. Jumper, E. Clancy, R. Green, A. Vora, M. Lutfi, M. Figurnov, A. Cowie, N. Hobbs, P. Kohli, G. Kleywegt, E. Birney, D. Hassabis, S. Velankar // Nucleic Acids Research. – 2022. – V. 50. – Iss. D1. – P. D439–D444.
22. Jumper, J. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis // Nature. – 2021. – V. 596. – P. 583–589.
23. Whey Proteins. From Milk to Medicine. Chapter 1 – Whey Proteins: An Overview / H. Deeth, N. Bansal.: H. Deeth, N. Bansal, ed. – London, UK: Academic Press, 2019. – P. 1–50.
24. Cals, M.M. Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family / M.M. Cals, P. Maillart, G. Brignon, P. Anglade, B. Ribadeau Dumas // Eur. J. Biochem. – 1991. – V. 198. – P. 733–739.
25. Sievers, G. Structure of milk peroxidase. A study using circular dichroism and difference absorption spectroscopy / G. Sievers // Biochim. Biophys. Acta. – 1980. – V. 624. – P. 249–259.
26. De Wit, J.N. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems / J.N. De Wit, A.C.M. Hooydonk // Neth. Milk Dairy J. – 1996. – V. 50. – P. 227–244.
27. Watanabe, S. Bovine lactoperoxidase and its recombinant: Comparison of structure and some biochemical properties / S. Watanabe, S. Murata, H. Kumura, S. Nakamura, A. Bollen, N. Moguilevsky // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 2000. – V. 274. – P. 756–761.
28. Seifu, E. Potential of lactoperoxidase to diagnose subclinical mastitis in goats / E. Seifu, E.F. Donkin, E.M. Buys // Small Rum. Res. – 2007. – V. 69. – P. 154–158.
29. Asadpour, R. Correlation between lactoperoxidase activity and somatic cell count for diagnosis subclinical mastitis in early lactation of dairy cows / R. Asadpour, H. Tayefi-Nasrabadi, G.A. Moghadam, K. Nofouzi // J. Anim.Vet. Adv. – 2008. – V. 7. – P. 777–779.
30. Kussendrager, K.D. Lactoperoxidase: Physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications / K.D. Kussendrager, A.C.M. van Hooijdonk // British J. Nutrition. – 2000. – V. 84. – P. S19–S25.
31. Advanced Dairy Chemistry Third edition, Volume I, Proteins. Lactoperoxidase. / N.K. Pruitt.; P.F.Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 563–570.

32. Boulares, M. Effect of thiocyanate and hydrogen peroxide on the keeping quality of ovine, bovine and caprine raw milk / M. Boulares, M. Mankai, M. Hassouna // Int. J. Dairy Technol. – 2011. – V. 64. – P. 52–56.
33. Amornkul, Y. Utilization of micro filtration or lactoperoxidase system or both for manufacture of Cheddar cheese from raw milk / Y. Amornkul, D.R. Henning // J. Dairy Sci. – 2007. – V. 90. – P. 4788–5000.
34. Boulares, M. Effect of activating lactoperoxidase system in cheese milk on the quality of Saint-Paulin cheese / M. Boulares, M. Mankai, M. Hassouna // Int. J. Dairy Technol. – 2011. – V. 64. – P. 75–83.
35. Masud, T. Preservation of raw buffalo's milk by the activation of lactoperoxidase system and its effect on yogurt preparation / T. Masud, S. Khalid, S. Maqsood, A. Bilal // J. Food Proc. Pres. – 2010. – V. 34. – P. 241–254.
36. Watanabe, S. Recombinant bovine lactoperoxidase as a tool to study the heme environment in mammalian peroxidases / S. Watanabe, F. Varsalona, Y.-C. Yoo, J.-P. Guillaume, A. Bollen, K. Shimazaki, N. Moguilevsky // FEBS Letters. – 1998. – V. 441(3). – P. 476–479.
37. Handbook of food enzymology. Catalase / D.W.S. Wong, J.R. Whitaker.; J.R. Whitaker, A.G.J. Vora-gen, D.W.S. Wong, eds. – New York, USA: Marcel Dekker, 2003. – P. 389–401.
38. Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling, 1st Edition. Chapter 4. Catalase. A Versatile Antioxidant in Plants / I. Sharma, P. Ahmad.; P. Ahmad, ed. – New York, NY: Academic Press, 2014. – P. 131–148.
39. Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins, 3rd Edition, Part B. Enzymatic coagulation of milk / D.B. Hyslop.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, NY: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 839–878.
40. Smejkal, G.B. Enzymes and their turnover numbers / G.B. Smejkal, S. Kakumanu // Expert Review Of Proteomics. – 2019. – V. 16(7). – P. 543–544.
41. Babcock, S.M. Unorganised ferments in milk: A new factor in the ripening of cheese / S.M. Babcock, H.L. Russell // Fourteenth annual report of the Wisconsin agricultural experiment station. – 1897. – P. 161–193.
42. Kitchen, B.J. Review of the Progress of Dairy Science, bovine mastitis: Compositional changes and related diagnostic tests / B.J. Kitchen // J. Dairy Res. – 1981. – V. 48. – P. 167–188.
43. Ito, O. Purification crystallisation, and properties of bovine milk catalase / O. Ito, R. Akuzawa // J. Dairy Sci. – 1983. – V. 66. – P. 967–973.
44. Schroeder, W.A. The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase / W.A. Schroeder, J.R. Shelton, J.B. Shelton, B. Robberson, G. Apell, R.S. Fang, J. Bonaventura // Arch. Biochem. Biophys. – 1982. – V. 214(1). – P. 397–421.
45. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P00432 (CATA_BOVIN) – Catalase *Bos taurus* (Bovine) EC: 1.11.1.6; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00432> (дата обращения: 16.06.2022).
46. Murthy, M.R.N. Structure of beef liver catalase / M.R.N. Murthy, T.J. Reid (3rd), A. Sicignano, N. Tanaka, M.G. Rossmann // J. Mol. Biol. – 1981. – V. 152. – P. 465–499.
47. Fita, I. The refined structure of beef liver catalase at 2.5-Å resolution / I. Fita, A.M. Silva, M.R.N. Murthy, M.G. Rossmann // Acta Crystallogr. B. – 1986. – V. 42. – P. 497–515.
48. Hirvi, Y. Milk catalase activity as an indicator of thermization treatments used in the manufacture of Cheddar cheese / Y. Hirvi, M.W. Griffiths // J. Dairy Sci. – 1998. – V. 81. – P. 338–345.
49. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition, Volume I. Cheese: an Overview / P.F. Fox, P.L.H. McSweeney.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee, eds. – London,

- UK: Elsevier Academic Press, 2004. – P. 1–18.
50. Herrington, B.L. Lipase: A review / B.L. Herrington // J. Dairy Sci. – 1954. – V. 37. – P. 775–789.
 51. Deeth, H.C. Lipolysis in dairy products: a review / H.C. Deeth, C.H. Fitz-Gerald // Aust. J. Dairy Technol. – 1976. – V. 31. – P. 53–64.
 52. Advanced Dairy Chemistry. Lipids. Vol. 2. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products / H.C. Deeth C.H. Fitz-Gerald; P.F. Fox, ed. – London, UK: Chapman and Hall, 1995. – P. 247–308.
 53. Advanced Dairy Chemistry, 3rd edn. Lipids. Vol. 2. Lipolytic enzymes and hydrolytic activity / H.C. Deeth C.H. Fitz-Gerald.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Springer, 2006. – P. 481–556.
 54. Deeth, H.C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk / H.C. Deeth // Int. Dairy J. – 2006. – V. 16. – P. 555–562.
 55. Collins, Y.F. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese. A review of current knowledge / Y.F. Collins, P.L.H. McSweeney, M.G. Wilkinson // Int Dairy J. – 2003. – V. 13. – P. 841–866.
 56. Moro, E. Über die Fermente der Milch / E. Moro // Jarbuch Kinderheilk. – 1902. – V. 56 P. 391–420.
 57. Rice, F.E. Proof of the presence of lipase in milk and a new method for detection of the enzyme / F.E. Rice, A.L. Markley // J. Dairy Sci. – 1922. – V. 5. – P. 64–82.
 58. Tarassuk, N.P. The specificity of milk lipase. IV. Partition of the lipase system in milk / N.P. Tarassuk, E.N. Frankel // J. Dairy Sci. – 1957. – V. 40. – P. 418–430.
 59. Chandan R.C. Purification and characterization of milk lipase. I. Purification / R.C. Chandan, K.M. Shahani // J. Dairy Sci. – 1963. – V. 46. – P. 275–283.
 60. Chandan R.C. Purification and characterization of milk lipase. II. Characterization of the purified enzyme / R.C. Chandan, K.M. Shahani // J. Dairy Sci. – 1963. – V. 46. – P. 503–509.
 61. Gaffney, P. Distribution of lipase among components of a water extract of rennet casein / P. Gaffney, W.J. Harper, I.A. Gould // J. Dairy Sci. – 1966. – V. 49. – P. 921–924.
 62. Egelrud, T. The purification of a lipoprotein lipase from bovine milk / T. Egelrud, T. Olivecrona // J. Biol. Chem. – 1972. – V. 247. – P. 6212–6217.
 63. MacPhee, C.E. Apolipoprotein C-II39-62 Activates Lipoprotein Lipase by Direct Lipid-Independent Binding / C.E. MacPhee, D.M. Hatters, W.H. Sawyer, G.J. Howlett // Biochemistry. – 2000. – V. 39(12). – P. 3433–3440.
 64. Advanced Dairy Chemistry Third edition, Volume I, Proteins. Indigenous enzymes in milk – Lipases / T. Olivecrona, S. Vilaro, G. Bengtsson-Olivecrona.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 437–494.
 65. Advanced Dairy Chemistry. Third edition, Volume II, Lipids. Origin of fatty acids in, and influence of nutritional factors on, milk fat / D.L. Palmquist.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2006. – P. 43–92.
 66. Barber, M.C. Lipid metabolism in the lactating mammary gland / M.C. Barber, R.A. Clegg, M.T. Travers, R.G. Vernon // Biochim. Biophys. Acta. – 1997. – V. 1347. – P. 101–126.
 67. Senda, M. Molecular cloning and sequence of a cDNA coding for bovine lipoprotein lipase / M. Senda, K. Oka, W.V. Brown, P.K. Qasba, Y. Furuichi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1987. – V. 84(13). – P. 4369–4373.
 68. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P11151 (LIPL_BOVIN) – Lipoprotein lipase *Bos taurus* (Bovine) EC: 3.1.1.34; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P11151/entry#function> (дата обращения: 05.07.2022).
 69. Zhang, L. Calcium Triggers Folding of Lipoprotein Lipase into Active Dimers / L. Zhang, A. Loo-kene, G. Wu, G. Olivecrona // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280 (52). – P. 42580–42591.
 70. Ranganathan, G. The translational regulation of lipoprotein lipase by epinephrine involves an RNA

- binding complex including the catalytic subunit of protein kinase A / G. Ranganathan, D. Phan, I.D. Pokrovskaya, J.E. McEwen, C. Li, P.A. Kern // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 43281–43287.
71. Mysling, S. The angiopoietin-like protein ANGPTL4 catalyzes unfolding of the hydrolase domain in lipoprotein lipase and the endothelial membrane protein GPIHBP1 counteracts this unfolding / S. Mysling, K.K. Kristensen, M. Larsson, O. Kovrov, A. Bensadoun, T.J. Joergensen, G. Olivecrona, S.G. Young, M. Ploug // *eLife*. – 2016. – V. 5. – e20958. DOI: 10.7554/eLife.20958.
 72. Winther, A.-M.L. Expression and one-step purification of active LPL contemplated by biophysical considerations / A.-M.L. Winther, K.K. Kristensen, A.Kumari, M. Ploug // *J. Lipid Res.* – 2021. – V. 62. – 100149. DOI: 10.1016/j.jlr.2021.100149.
 73. Borgström, B. Lipases / B. Borgström, H.L. Brockman. – Elsevier Science Publishers; Amsterdam, New York, Oxford, 1984. – 527 p.
 74. Handbook of food enzymology. Lipase / D.W.S. Wong.; J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, D.W.S. Wong, eds. – New York, USA: Marcel Dekker, 2003. – P. 667–680.
 75. Jahn, C.E. Activation of the lipolytic activity of lipoprotein lipase by apolipoprotein A-II / C.E. Jahn, J.C. Osborne, Jr., E.J. Schaefer, H.J.B. Brewer, Jr. // *Eur. J. Biochem.* – 1983. – V. 131. – P. 25–29.
 76. Perret, B. Hepatic lipase, structure/function relationship, synthesis and regulation / B. Perret, L. Mabile, L. Martinez, R. Barbras, X. Collet // *J. Lipid Res.* – 2002. – V. 43. – P. 1163–1169.
 77. Jansen, H., Verhoeven, J.M. and Sijbrands, J.G. (2002). Hepatic lipase: a pro- or anti- atherogenic protein? / J. Hansen, J.M. Verhoeven, J.G. Sijbrands (2002). // *J. Lipid Res.* – 2002. – V. 43. – P. 1352–1362.
 78. Winkler, K. Structure of human pancreatic lipase / K. Winkler, A. D'Arcy, W. Hunzicker // *Nature*. – 1990. – V. 343. – P. 771–774.
 79. van Tilbeurgh, H. Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase X-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis / H. van Tilbeurgh, A. Roussel, J.M. Lalouel, C. Cambillau // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 4626–4633.
 80. Yang, C.Y. Structure of bovine milk lipoprotein lipase / C.Y. Yang, Z.W. Gu, H.X. Yang, M.F. Rohde, A.M. Gotto Jr., H.J. Pownall // *J. Biol. Chem.* – 1989. – V. 264. – P. 16822–16827.
 81. Mead, J. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease / J. Mead, S. Irvine, D. Ramji // *J. Mol. Med.* – 2002. – V. 80 (12). – P. 753–769.
 82. Cartier, P. Lipase redistribution in cows' milk during induced lipolysis. I. Activation by agitation, temperature change, blood serum and heparin / P. Cartier, Y. Chilliard // *J. Dairy Res.* – 1989. – V. 56. – P. 699–709.
 83. Cartier, P. Lipase redistribution in cows' milk during induced lipolysis. II. Activation by pH adjustment / P. Cartier, Y. Chilliard, T. Bout // *J. Dairy Res.* – 1989. – V. 56. – P. 711–718.
 84. De Foe, A.A. Purification and partial characterization of caprine milk lipoprotein lipase / A.A. De Foe, P.S. Dimick, A. Kilara // *J. Dairy Sci.* – 1982. – V. 65. – P. 2308–2316.
 85. Badaoui, B. Short communication. Identification of two polymorphisms in the goat lipoprotein lipase gene and their association with milk production traits / B. Badaoui, J.M. Serradilla, A. Tomas, B. Urrutia, J.L. Ares, J. Carrizosa, A. Sanchez, J. Jordana, M. Amills // *J. Dairy Sci.* – 2007. – V. 90. – P. 3012–3017.
 86. Chilliard, Y. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk synthesis and lipolysis / Y. Chilliard, A. Ferlay, J. Rouel, G. Lamberet // *J. Dairy Sci.* – 2003. – V. 86. – P. 1751–1770.
 87. Chilliard, Y. Characteristics of lipolytic system in goat milk / Y. Chilliard, G. Selselet-Attou, P. Bas, P. Morand-Fehr // *J. Dairy Sci.* – 1984. – V. 67. – P. 2216–2223.
 88. Chandan, R.C. Lysozyme, lipase and ribonuclease in the milk of various species / R.C. Chandan, R.M. Parry, Jr., K.M. Shahani // *J. Dairy Sci.* – 1968. – V. 51. – P. 606–607.

89. Edwards, W.D. Cloning and sequencing of a full length cDNA encoding ovine lipoprotein lipase / W.D. Edwards, S.E. Daniels, R.A. Page, C.P. Volpe, P. Kille, G.E. Sweeney, A. Cryer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1993. – V. 1172. – P. 167–170.
90. Bonnet, M. Nucleotide sequence of ovine lipoprotein lipase cDNA / M. Bonnet, C. Leroux, Y. Chillard, P. Martin // *J. Anim. Sci.* – 2000. – V. 78. – P. 2294–2295.
91. Chillard, Y. Characterization of lipase in mare milk / Y. Chillard, M. Doreau // *J. Dairy Sci.* – 1985. – V. 68. – P. 34–39.
92. Shukla, T.P. Presence of phosphatidic acid and phospholipase D in milk / T.P. Shukla, J. Tobias // *J. Dairy Sci.* – 1970. – V. 53. – P. 637.
93. Chen, C.C.W. Evidence for lack of phosphatidic acid and phospholipase D activity in milk / C.C.W. Chen, C.J. Argouldelis, J. Tobias. // *J. Dairy Sci.* – 1978. – V. 61. – P. 1691–1695.
94. O'Mahony, J.P. Hydrolysis of the lipoprotein fraction of milk by phospholipase C / J.P. O'Mahony, W.F. Shipe // *J. Dairy Sci.* – 1972. – V. 55. – P. 408–412.
95. Developments in dairy chemistry. Vol. 3, Lactose and minor constituents. Indigenous milk enzymes / B.J. Kitchen.; P.F. Fox, ed. – London, UK: Elsevier Applied Science Publishers, 1985. – P. 239–279.
96. Sato, M. On the presence of amylase in milk and cheese / M. Sato // *Biochem. J.* 1920. – V. 14. – P. 120–130.
97. Richardson, G.A. Amylase in cow's milk / G.A. Richardson, C.L. Hankinson // *J. Dairy Sci.* – 36. – V. 19. – P. 761–772.
98. Guy, E.J. Separation, concentration and properties of α -amylase from cow's milk / E.J. Guy, R. Jenness // *J. Dairy Sci.* – 1958. – V. 41. – P. 13–27.
99. El-Fakharany, E.M. Purification and characterization of camel (*Camelus dromedarius*) milk amylase / E.M. El-Fakharany, E.A. Serour, A.M. Abdelrahman, B.M. Haroun, E.M. Redwan // *Prep. Biochem. Biotechnol.* – 2009. – V. 39. – P. 105–123.
100. Gould, B.S. The detection of inefficiently pasteurized milk based on a modification of the new Rothen-Fusser test / B.S. Gould // *J. Dairy Sci.* – 1932. – V. 15. – P. 230–241.
101. Savel'ev, A.N. Human antibodies with amylolytic activity / A.N. Savel'ev, A.A. Kulminskaya, D.R. Ivanen, G.A. Nevinsky, K.N. NeustroeV. // *Trends Glycosci. Glycotechnol.* – 2004. – V. 16. – P. 17–31.
102. Sullivan, W.K. On the nature of lactic fermentation, and on an apparent conversion of casein into albumen which accompanied the production of lactic acid in milk excluded from air / W.K. Sullivan // *Philosophical Magazine Series B* 4. – 1859. – P. 203–212.
103. Babcock, S.M. Properties of galactase: a digestive ferment in cows' milk. Distribution of galactase in cows' milk. Distribution of galactase in different species of mammalia. / S.M. Babcock, H.L. Russell, A. Vivian // *Fifteenth Annual Report of the Wisconsin Agricultural Experiment Station.* – 1898. – P. 77–97.
104. Thatcher, R.W. Enzymes of milk and butter / R.W. Thatcher, A.C. Dahlberg // *J. Agric. Res.* – 1917. – V. XI. – P. 437–450.
105. Warner, R.G. The presence of a proteolytic enzyme in casein / R.G. Warner, E. Polis // *J. American Chemical Soc.* – 1945. – V. 67. – P. 529–532.
106. Harper, W.J. Observations on milk protease / W.J. Harper, J.A. Robertson, I.A. Gould // *J. Dairy Sci.* – 1960. – V. 43. – P. 1850–1851.
107. Зубаиров, Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования / Д.М. Зубаиров. – Казань : ФЭН, 2000. – 364 с.
108. Berglund, L. Cloning and characterization of the bovine plasminogen cDNA / L. Berglund, M.D. Andersen, T.E. Petersen // *Int. Dairy J.* – 1995. – V. 5(6). – P. 593–603.

109. Schaller, J. Complete amino acid sequence of bovine plasminogen. Comparison with human plasminogen / J. Schaller, P.W. Moser, G.A.K. Danneegger-Muller, S.J. Rosselet, U. Kampf, E.E. Rickli // Eur. J. Biochem. – 1985. – V. 149(2). – P. 267–278.
110. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P06868 (PLMN_BOVIN) – Plasminogen *Bos taurus* (Bovine) EC: 3.4.21.7; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P06868/entry> (дата обращения: 15.07.2022).
111. Advanced Dairy Chemistry. Third edition, Volume I, Proteins. Indigenous proteinases in milk / A.L. Kelly, P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 495–521.
112. Novokhatny, V. Structure and activity of plasmin and other direct thrombolytic agents / V. Novokhatny // Thrombosis Research. – 2008. – V. 122. – P. S3–S8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2008.06.018>.
113. Bastian, E.D. Plasmin in milk and dairy products: an update / E.D. Bastian, R.J. Brown // Int. Dairy J. – 1996. – V. 6. – P. 435–457.
114. Silanikove, N. Physiological role of indigenous milk enzymes: an overview of an evolving picture / N. Silanikove, U. Merin, G. Leitner // Int. Dairy J. – 2006. – V. 16. – P. 533–545.
115. Schroeder, D.L. The effect of raw milk storage temperature on plasmin activity and plasminogen activation in pasteurized milk / D.L. Schroeder, S.S. Nielsen, K.D. Hayes // Int. Dairy J. – 2008. – V. 18. – P. 114–119.
116. Lu, R.R. Effect of various heat treatments on plasminogen activation in bovine milk during refrigerated storage / R.R. Lu, C.D. Stevenson, S.E. Guck, L.A. Pillsbury, B. Ismail, K.D. Hayes // Int. J. Food Sci. Technol. – 2009. – V. 44. – P. 681–687.
117. Doi, H. Susceptibility of κ -casein components to various proteases / H. Doi, N. Kavaguchi, F. Iduki, M. Kanamori // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 1979. – V. 25. – P. 33–41.
118. Grufferty, M.B. Potassium iodate induced proteolysis in ultra heat treated milk during storage: The role of β -lactoglobulin and plasmin / M.B. Grufferty, P.F. Fox // J. Dairy Res. – 1986. – V. 53. – P. 602–613.
119. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition, Volume I: General Aspects. Proteolysis in Cheese during Ripening / V.K. Upadhyay, P.L.H. McSweeney, A.A.A. Magboul, P.F. Fox, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee, eds. – London, UK: Elsevier Academic Press, 2004. – P. 391–433.
120. Le Bars, D. Specificity of plasmin towards bovine α 2-casein / D. Le Bars, J.C. Gripon // J. Dairy Res. – 1989. – V. 56. – P. 817–821.
121. Visser, S. Specificity of bovine plasmin on its action on bovine α 2-casein / S. Visser, C.J. Slanzen, A.C. Alting, H.G. Vreeman // Milchwissenschaft. – 1989. – V. 44. – P. 335–339.
122. Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk, 2nd ed. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening / P.F. Fox, P.L.H. McSweeney; B.A. Law, ed. – London, UK: Chapman & Hall, 1997. – P. 1–49.
123. Andrews, A.T. Proteolysis of caseins and the proteose peptone fraction of bovine milk / A.T. Andrews, E. Alichanidis // J. Dairy Res. – 1983. – V. 50. – P. 275–290.
124. Le Bars, D. Hydrolysis of α 1-casein by bovine plasmin / D. Le Bars, J.C. Gripon // Lait. – 1993. – V. 73. – P. 337–344.
125. McSweeney, P.L.H. Proteolytic specificity of plasmin on bovine α 1-casein / P.L.H. McSweeney, N.F. Olson, P.F. Fox, A. Healy, P. Hojrup // Food Biotechnol. – 1993. – V. 7. – P. 143–158.
126. O’Flaherty, E.P. *Characterisation of Some Minor Caseins and Proteose Peptones of Bovine Milk* / E.P. O’Flaherty // MSc Thesis. – 1997. – National University of Ireland, Cork.

127. Sheehan, J.J. Effect of cook temperature on primary proteolysis and predicted residual chymosin activity of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures / J.J. Sheehan, J.C. Oliveira, A.L. Kelly, P.L.H. McSweeney // *Int. Dairy J.* – 2007. – V. 17. – P. 826–834.
128. Mara, O. The curd-forming properties of milk as affected by the action of plasmin / O. Mara, C. Roupie, A. Duffy, A.L. Kelly // *Int. Dairy J.* – 1998. – V. 8. – P. 807–812.
129. Barrett, F.F. Use exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening / F.F. Barrett, A.L. Kelly, P.L.H. McSweeney, P.F. Fox // *Int. Dairy J.* – 1999. – V. 9. – P. 421–427.
130. Ismail, B. Invited review: plasmin protease in milk: current knowledge and relevance to dairy industry / B. Ismail, S.S. Nielsen // *J. Dairy Sci.* – 2010. – V. 93. – P. 4999 – 5009.
131. Kaminogawa, S. Acid protease of bovine milk / S. Kaminogawa, K. Yamauchi // *Agricultural and Biological Chemistry.* – 1972. – V. 36. – P. 2351–2356.
132. Kaminogawa, S. Degradation of casein components by the acid protease of bovine milk / S. Kaminogawa, K. Yamauchi, S. Miyazawa, Y. Koga // *J. Dairy Sci.* – 1980. – V. 63. – P. 701–704.
133. Larsen, L.B. Bovine milk procathepsin D and cathepsin D, coagulation and milk protein degradation. / L.B. Larsen, C. Benfeldt, L.K. Rasmussen, T.E. Petersen // *J. Dairy Res.* – 1996. – V. 63. – P. 119–130.
134. Hurley, M.J. The milk acid proteinase, cathepsin D: A review. / M.J. Hurley, L.B. Larsen, A.L. Kelly, P.L.H. McSweeney // *Int. Dairy J.* – 2000. – V. 10. – P. 673–681.
135. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P80209 (CATD_BOVIN) – Cathepsin D *Bos taurus* (Bovine) EC: 3.4.23.5; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P80209/entry> (дата обращения: 10.08.2022).
136. Metcalf, P. Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site / P. Metcalf, M. Fusek // *The EMBO Journal.* – 1993. – V. 12(4). – P. 1293–1302.
137. O'Driscoll, B.M. Protease activities in raw milk determined using a synthetic heptapeptide substrate / B.M. O'Driscoll, F.P. Rattray, P.L.H. McSweeney, A.L. Kelly // *J. Food Sci.* – 1999. – V. 64. – P. 606–611.
138. McSweeney, P.L.H. Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: preliminary observations and comparison with chymosin / P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, N.F. Olson // *Int. Dairy J.* – 1995. – V. 5. – P. 321–336.
139. Larsen, L.B. Bovine milk procathepsin D and cathepsin D: coagulation and milk protein degradation / L.B. Larsen, C. Benfeldt, L.K. Rasmussen, T.E. Petersen // *J. Dairy Res.* – 1996. – V. 63. – P. 119–130.
140. Carson, M. Ribbon Models of Macromolecules / M. Carson // *J. Molecular Graphics.* – 1987. – V. 5. – P. 103–106.
141. Hayes, M. Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D / M. Hayes, M.J. Hurley, L.B. Larsen, C.W. Heegaard, A.A.A. Magboul, J.C. Oliveira, A.L. Kelly // *J. Dairy Res.* – 2001. – V. 68. – P. 267–276.
142. Moatsou, G. Effect of high-pressure treatment at various temperatures on indigenous proteolytic enzymes and whey protein denaturation in bovine milk / G. Moatsou, C. Bakopanos, D. Katharios, G. Katsaros, I. Kandarakis, P. Taoukis, I. Politis // *J. Dairy Res.* – 2008. – V. 75. – P. 262–269.
143. Magboul, A.A.A. Cysteine protease activity in bovine milk / A.A.A. Magboul, L.B. Larsen, P.L.H. McSweeney, A.L. Kelly // *Int. Dairy J.* – 2001. – V. 11. – P. 865–872.
144. Considine, T. Hydrolysis of bovine caseins by cathepsin B, a cysteine proteinase indigenous to milk / T. Considine, A. Healy, A.L. Kelly, P.L.H. McSweeney // *Int. Dairy J.* – 2004. – V. 14. – P. 117–124.
145. Диксон, М. Ферменты : в 3-х т. Т.1 / М. Диксон, Э. Уэбб. – М. : Мир, 1982. – 389 с.
146. Whitney, R. The minor proteins of milk / R. Whitney // *J. Dairy Sci.* – 1958. – V. 41. – P. 1303–1323.

147. McKellar, R.C. Predictive modeling of lactoperoxidase and γ -glutamyl transpeptidase inactivation in a high-temperature short-time pasteurizer. / R.C. McKellar, S. Liou, H.W. Modler // Int. Dairy J. – 1996. – V. 6. – P. 295–301.
148. Wernery, U. Evaluation of alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transferase (GGT) and lactoperoxidase (LPO) activities for their suitability as markers of camel milk heat inactivation / U. Wernery, S. Fischbach, B. Johnson, S. Jose // Milchwissenschaft. – 2008. – V. 63. – P. 265–267.
149. Bingham, E.W. Alkaline phosphatase in the lactating bovine mammary gland and the milk fat globule membrane. Release by phosphatidylinositol-specific phospholipase C / E.W. Bingham, E.L. Malin // Comparative Biochem. – 1992. – V. 102. – P. 213–218.
150. Bingham, E.W. Purification and properties of alkaline phosphatase in the lactating bovine mammary gland / E.W. Bingham, K. Garver, D. Powlem // J. Dairy Sci. – 1992. – V. 75. – P. 3394–3401.
151. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P09487 (PPBT_BOVIN) – Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme-*Bos taurus* (Bovine) EC: 3.1.3.1; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P09487/entry> (дата обращения: 12.08.2022).
152. Kay, H.D. The phosphatase test for pasteurised milk / H.D. Kay, W.R. Graham // J. Dairy Res. – 1935. – V. 6. – P. 191–203.
153. Wright, R.C. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment. IV / R.C. Wright, J. Tramer // J. Dairy Res. – 1956. – V. 23. – P. 248–256.
154. Advanced Dairy Chemistry. Third edition, Volume I, Proteins. Indigenous phosphatases in milk / P.Shakeel-ur-Rehman, C.M. Fleming, N.Y.Farkye, P.F. Fox; P.F.Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 523–543.
155. Advanced Dairy Chemistry. 2nd edition, Volume I, Proteins. Indigenous enzymes in milk / A.T.Andrews, T.Olivecrona, S.Vilaro, G.Bengtsson-Olivecrona, P.F.Fox, L.Björck.; P.F.Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – London, UK: Elsevier, 1992. – P. 285–367.
156. Handbook of food enzymology. Significance of indigenous enzymes in milk and dairy products / P.F. Fox.; J.R.Whitaker, A.G.J.Voragen, D.W.S.Wong, eds. – New York, USA: Marcel Dekker, 2003. – P. 255–277.
157. Karmas, R. Determination and interpretation of alkaline phosphatase activity in experimental and commercial butters / R. Karmas, D.H. Kleyn // J. Dairy Sci. – 1990. – V. 73. – P. 584–589.
158. Kwee, W.S. Phosphatase reactivation in cream samples / W.S. Kwee // Australian J. Dairy Technol. – 1983. – V. 38. – P. 160–162.
159. Huggins, C. Sodium phenolphthalein phosphate as a substrate for phosphatase tests / C. Huggins, P. Talalay // J. Biol. Chem. – 1948. – V. 159. – P. 399–410.
160. Mullen, J.E.C. The acid phosphatase of cow's milk / J.E.C. Mullen // J. Dairy Res. – 1950. – V. 17. – P. 288–305.
161. Griffiths, M.W. Use of milk enzymes as indices of heat treatment / M.W. Griffiths // J. of Food Protection. – 1986. – V. 49. – P. 696–705.
162. Minkin, C. Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function / C. Minkin // Calcif. Tissue Int. – 1982. – V. 34. – P. 285–290.
163. Andrews, A.T. Bovine milk acid phosphatase. III. Purification and characterization of the enzyme / A.T. Andrews // Biochim. Biophys. Acta. – 1976. – V. 434. – P. 345–353.
164. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. A6H730 (PPAP_BOVIN) – Prostatic acid phosphatase *Bos taurus* (Bovine) EC: 3.1.3.2; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A6H730/entry> (дата обращения: 14.08.2022).
165. Andrews, A.T. The acid phosphatases of bovine leucocytes, plasma and the milk of healthy and mastitic cows / A.T. Andrews, E. Alichanidis // J. Dairy Res. – 1975. – V. 42. – P. 391–400.

166. Andrews, A.T. Bovine milk phosphatase. II. Binding to casein substrates and heat-inactivation studies / A.T. Andrews // J. Dairy Res. – 1974. – V. 41. – P. 229–237.
167. Kashket, S. Cheese consumption and the development and progression of dental caries / S. Kashket, D.P. DePaola // Nutr. Rev. – 2002. – V. 60. – P. 97–103.
168. Herod, E.L. The effect of cheese on dental caries / E.L. Herod // Aust. Dental J. – 1991. – V. 36. – P. 120–125.
169. Morgan, E.J. On the anaerobic and aerobic oxidation of xanthin and hypoxanthin by tissues and by milk / E.J. Morgan, C.P. Stewart, F.G. Hopkins // Proceedings of the Royal Society London. – 1922. – V. B94. – P. 109–131.
170. Booth, V.H. The specificity of xanthine oxidase / V.H. Booth // Biochem. J. – 1938. – V. 32. – P. 494–502.
171. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P80457 (XDH_BOVIN) – Xanthine dehydrogenase/oxidase *Bos taurus* (Bovine). 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P80457/entry> (дата обращения: 16.08.2022).
172. Harrison, R. Physiological roles of xanthine oxidoreductase / R. Harrison // Drug Metabolism Reviews. – 2004. – V. 36. – P. 363–375.
173. Advanced Dairy Chemistry Third edition, Volume I, Proteins. Indigenous enzymes in milk; other enzymes / N.Y. Farkye.; P.F.Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 571–603.
174. Massey, V. Milk xanthine oxidoreductase: The first one hundred years / V. Massey, C.M. Harris // Biochem. Society Transactions. – 1997. – V. 25. – P. 750–755.
175. Enroth, C. Crystal structures of bovine xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion / C. Enroth, B.T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, T. Nishino, E. Pai // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – V. 97. – P. 10723–10728.
176. Carter, H.D. Assessment of the heat treatment of ice cream mixes by enzyme assay. / H.D. Carter, C.F. Cavanagh, L. Higgins, R.A. Wilbey // J. of the Society of Dairy Technol. – 1990. – V. 43. – P. 67–68.
177. Bradley, P.L. The xanthine oxidase of human milk and colostrum / P.L. Bradley, M. Gunther // Proc. Biochem. Soc. – 1960. – V. 74. – 15 p.
178. Godber, B.L.J. $\geq 98\%$ of xanthine oxidase in human milk is present in the demolybdo form, lacking molybdopeterin / B.L.J. Godber, S. Sanders, R. Harrison, R. Eisinger, R.C. Bray // Biochem. Soc. Trans. – 1997. – V. 25. – 519 s. DOI:10.1042/bst025519s.
179. Godber, B.L.J. Molecular characterization of human oxidoreductase; the enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron sulphur centres / B.L.J. Godber, G. Schwartz, R.R. Mendel, J.J. Lowe, R. Bray, R. Eisinger, R. Harrison // Biochem. J. – 2005. – V. 388. – P. 501–508.
180. Cebo, C. Major proteins of the goat milk fat globule membrane / C. Cebo, H. Caillet, F. Bouvier, P. Martin // J. Dairy Sci. – 2010. – V. 93. – P. 868–876.
181. Atmani, D. Goat's milk xanthine oxidoreductase is greatly deficient in molybdenum / D. Atmani, M. Benboubetra, R. Harrison // J. Dairy Res. – 2004. – V. 71. – P. 7–13.
182. Benboubetra, M. Physiochemical and kinetic properties of purified sheep's milk xanthine oxidoreductase / M. Benboubetra, A. Baghiani, D. Atmani, R. Harrison // J. Dairy Sci. – 2004. – V. 87. – P. 1580–1584.
183. Gonzalez-Ronquillo, M. Changes in milk xanthine-oxidoreductase activity during lactation: dairy cows and goats / M. Gonzalez-Ronquillo, J. Balcells, N. Pescador Salas // Milchwissenschaft. – 2010. – V. 65. – P. 311–313.

184. Al-Seeni, A.E. Tissue distribution of molybdenum hydroxylases, aldehyde oxidase and xanthine oxidase, in male and female camels / A.E. Al-Seeni // Global J. Biotechnol. Biochem. – 2009. – V. 4. – P. 43–46.
185. Barello, C. Analysis of major proteins and fat fractions associated with mare's fat globules / C. Barello, L.P. Garoffo, G. Montorfano, S. Zava, B. Berra, A. Conti, M.G. Guiffrida // Mol. Nutr. Food Res. – 2008. – V. 52. – P. 1448–1456.
186. Morton, R.K. The lipoprotein particles of cow's milk / R.K. Morton // Biochem. J. – 1954. – V. 57. – P. 231–237.
187. Aurand, L.W. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation / L.W. Aurand, N.H. Boone, G.G. Giddings // J. Dairy Sci. – 1977. – V. 60. – P. 363–369.
188. McManaman, J.L. Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: Evidence of a role in lipid secretions / J.L. McManaman, C.A. Palmer, R.M. Wright, M.C. Neville // J. Physiol. – 2002. – V. 545. – P. 567–579.
189. Vorbach, C. The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: Gene sharing in the lactating mammary gland / C. Vorbach, A. Scriven, M.R. Capecchi // Genes and Development. – 2002. – V. 16. – P. 3223–3235.
190. Robenek, H. Butyrophilin controls milk fat globule secretion / H. Robenek, O. Hofnagel, I. Buers, S. Lorkowski, M. Schnoor, M.J. Robenek, H. Heid, D. Troyer, N. J. Severs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – V. 103(27). – P. 10385–10390.
191. Бедина, С.А. Ксантиноксидоредуктаза лимфоцитов: зависимость активности от внесуставных проявлений при ревматоидном артрите / С.А. Бедина, Е.Э. Мозговая, А.С. Трофименко, С.С. Спицына, М.А. Мамус, А.И. Зборовская // Доктор.Ру. – 2022. – Т 21 (2). – С. 67–71.
192. Furuhashi, M. New insights into purine metabolism in metabolic diseases: role of xanthine oxidoreductase activity / M. Furuhashi // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabolism. – 2020. – V. 319(5). – P. E827–E834. DOI:10.1152/ajpendo.00378.2020.
193. Battelli, M.G. The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome / M.G. Battelli, M. Bortolotti, L. Polito, A. Bolognesi // Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease. – 2018. – V. 1864(8). – P. 2557–2565.
194. Polito, L. Xanthine oxidoreductase: A leading actor in cardiovascular disease drama / L. Polito, M. Bortolotti, M. Giulia Battelli, A. Bolognesi // Redox Biology. – 2021. – V. 48. – P. 102195. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102195.
195. Vorbach, C. The housekeeping gene Xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene sharing in the lactating mammary gland / C. Vorbach, A. Scriven, M.R. Capecchi // Gene Dev. – 2002. – V. 16. – P. 3223–3235.
196. Vorbach, C. Evolution of the mammary gland from the innate immune system? / C. Vorbach, M.R. Capecchi, J.M. Penninger // BioEssays. – 2006. – V. 28. – P. 606–616.
197. Vorbach, C. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system / C. Vorbach, R. Harrison, M.R. Capecchi // Trends Immunol. – 2003. – V. 24. – P. 512–517.
198. Aoki, N. Regulation and functional relevance of milk fat globules and their components in the mammary gland / N. Aoki // Biosci. Biotech. Biochem. – 2006. – V. 70. – P. 2019–2027.
199. Advanced Dairy Chemistry, 3rd edn. Intracellular origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane / T.W. Keenan, I.H. Mather.; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, eds., New York, NY: Kluwer Academic-Plenum Publishers, 2006. – P. 137–171.
200. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P61823 (RNAS1_BOVIN) – Ribonuclease pancreatic *Bos taurus* (Bovine) EC: 4.6.1.18; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P61823/entry> (дата обращения: 18.08.2022).

201. Handbook of food enzymology. Ribonuclease / J.J. Beintema, W. Zhao.; J.R. Whitaker, A.G.J. Vorage, D.W.S. Wong, eds. – New York, USA: Marcel Dekker, 2003. – P. 979–991.
202. Beintema, J. J. Introduction: the ribonuclease A superfamily / J.J. Beintema // Cellular and Molecular Life Science. – 1998. – V. 54. – P. 763–832.
203. Advanced Dairy Chemistry. 3rd edn., Volume I, Proteins. Nucleases in milk / L. Stepaniak, C.M. Fleming, M. Gobetti, A. Corsetti, P.F. Fox.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. – P. 545–561.
204. Smyth, D.G. The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: Revisions and confirmations / D.G. Smyth, W.H. Stein, S. Moore // J. Biological Chemistry. – 1963. – V. 238. – P. 227–234.
205. Zittle, C.A. Use of butanol in the purification of the alkaline phosphatase of bovine milk / C.A. Zittle, E.S. Della Monica // Arch. Biochem. Biophys. – 1952. – V. 35. – P. 321–325.
206. Bingham, E.W. Ribonuclease in bovine milk / E.W. Bingham and C.A. Zittle // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1962. – V. 7. – P. 408–413.
207. Meyer, D.H. Ribonuclease activity and isoenzymes in raw and processed cows' milk and infant formulas / D.H. Meyer, A.S. Kunin, J. Maddalena, W.L. Meyer // J. Dairy Sci. – 1987. – V. 70. – P. 1797–1803.
208. Roman, M. Changes in ribonuclease concentration during lactation in cows' colostrum and milk / M. Roman, L. Sanchez, M. Calvo // Neth. Milk Dairy J. – 1990. – V. 44. – P. 207–212.
209. Kartha, G. Tertiary structure of ribonuclease / G. Kartha, J. Bello, D. Harker // Nature. – 1967. – V. 213. – P. 862–865.
210. Ramaswamy, H. Purification of high molecular weight ribonuclease from human milk / H. Ramaswamy, C.V.B. Swamy, R.M. Das // J. Biol. Chemistry. – 1993. – V. 268. – P. 4181–4187.
211. Piccoli, R. A dimeric mutant of pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity towards malignant cells / R. Piccoli, S. Di Gaetano, C. De Lorenza, M. Grauso, C. Monaco, D. Spalletti-Cernia // Proc. Natl. Acad. Sci., USA. – 1999. – V. 96. – P. 7768–7773.
212. Mikulski, S.M. Phase 1 human clinical trial of onconase (P-30 protein) administered intravenously on a weekly schedule in cancer patients with solid tumour. / S.M. Mikulski, A.M. Grossmann, P.W. Carter, K. Shogen, J.J. Costanzi // Int. J. Oncology. – 1993. – V. 3. – P. 57–64.
213. Saxena, S.K. Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family / S.K. Saxena, R. Sirdeshmukh, W. Ardelt, S.M. Mikulski, K. Shogen, R.J. Youle // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – P. 15142–15146.
214. McCormick, J.J. RNase inhibition of reverse transcriptase activity in human milk / J.J. McCormick, L.J. Larson, M.A. Rich // Nature. – 1974. – V. 251. – P. 737–740.
215. Lee-Huang, S. Lysozyme and RNase as anti-HIV components in β -core preparations of human chorionic gonadotropin / S. Lee-Huang, P.L. Huang, Y.T. Sun, P.L. Huang, H.F. Kung, D.L. Blithe // Proc. Natl. Acad. Sci., USA. – 1999. – V. 96. – P. 2678–2681.
216. Cabezas, J.C. Some comments on the type references of the official nomenclature (IUB) for β -N-acetylglucosaminidase, β -N-acetylhexosaminidase and β -N-acetylgalactosaminidase. / J.C. Cabezas // Biochem. J. – 1989. – V. 261. – P. 1059–1061.
217. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. F1MED7 (F1MED7_BOVIN) – Beta-N-acetylhexosaminidase *Bos taurus* (Bovine) EC: 3.2.1.52; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F1MED7/entry> (дата обращения: 18.08.2022).
218. Sellinger, O.Z. Tissue fractionation studies. 15. Intracellular distribution and properties of β -N-acetylglucosaminidase and β -galactosidase in rat liver / O.Z. Sellinger, H. Beaufay, P. Jacques, A. Doyen, C. de Duve // Biochem. J. – 1960. – V. 74. – P. 450–456.

219. Mellors, A. β -N-acetylglucosaminase in bovine milk / A. Mellors // Canadian J. Biochem. – 1968. – V. 46. – P. 451–455.
220. Kitchen, B.J. Enzymatic methods for the estimation of the somatic cell count in bovine milk. II. N-Acetyl- β -d-glucosaminidase test for routine estimation of the somatic cell count in milk / B.J. Kitchen, G. Middleton // J. Dairy Res. – 1976. – V. 43. – P. 491–494.
221. Kitchen, B.J. Bovine milk N-acetyl- β -d-glucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions / B.J. Kitchen, G. Middleton, M. Salmon // J. Dairy Res. – 1978. – V. 45. – P. 15–20.
222. Kitchen, B.J. Review of the progress of dairy science, bovine mastitis: Compositional changes and related diagnostic tests / B.J. Kitchen // J. Dairy Res. – 1981. – V. 48. – P. 167–188.
223. Pyörälä, S. Accuracy of methods using somatic cell count and N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine clinical mastitis / S. Pyörälä, E. Pyörälä // J. Dairy Sci. – 1997. – V. 80. – P. 2820–2825.
224. Kitchen, B.J. Purification and properties of bovine mammary gland N-acetyl- β -d-glucosaminidase / B.J. Kitchen, C.J. Masters // Biochim. Biophys. Acta. – 1985. – V. 831. – P. 125–132.
225. Andrews, A.T. A study of the heat stabilities of a number of indigenous milk enzymes / A.T. Andrews, M. Anderson, P.W. Goodenough // J. Dairy Res. – 1987. – V. 54. – P. 237–246.
226. Ardo, Y. Study of methods to routinely monitor heat load to cheese milk / Y. Ardo, O. Lindblad, K.B. Qvist // Int. Dairy J. – 1999. – V. 9. – P. 547–552.
227. Fleming, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions / A. Fleming // Proc. Royal Society, London, UK, Series B. 1922. – V. 93. – P. 306–317.
228. Fleming, A. Lysozyme. A bacteriolytic ferment found normally in tissues and secretions / A. Fleming // The Lancet. – 1929. – V. 2. – P. 217–220.
229. Fleming, A. Lysozyme / A. Fleming // Proc. Royal Soc. Medicine. – 1932. – V. 26. – P. 71–84.
230. Handbook of food enzymology. Lysozyme / A. Kato.; J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, D.W.S. Wong, eds. – New York, USA: Marcel Dekker, 2003. – P. 971–978.
231. Watanabe, M. Effect of hydrostatic pressure on conformational changes of canine milk lysozyme between the native, molten globule and unfolded states / M. Watanabe, T. Aizawa, M. Demura, K. Nitta / Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – V. 1702. – P. 129–136.
232. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. F2X047 F2X047_BOVIN – Lysozyme *Bos taurus* (Bovine) EC: 3.2.1.17; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F2X047/entry> (дата обращения: 20.08.2022).
233. Manas, P. Interaction of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures / P. Manas, D. Munoz, S. Condon // Enzyme Microb. Technol. – 2006. – V. 39. – P. 1177–1182.
234. Pellegrino, L. A sensitive HPLC method to detect hen's egg white lysozyme in milk and dairy products / L. Pellegrino, A. Tirelli // Int. Dairy J. – 2000. – V. 10. – P. 435–442.
235. Schneider, N. Development and validation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of lysozyme in cheese / N. Schneider, C.M. Becker, M. Pisschetsrieder // J. Agric. Food Chem. – 2010. – V. 58. – P. 76–81.
236. Schneider, N. Analysis of lysozyme in cheese by immuno-capture mass spectrometry / N. Schneider, C.M. Becker, M. Pisschetsrieder // J. Chrom. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci. – 2010. – V. 878. – P. 201–206.
237. Chandan, R.C. Purification and some properties of bovine milk lysozyme / R.C. Chandan, R.M. Parry Jr., K.M. Shahani // Biochim. Biophys. Acta. – 1965. – V. 110. – P. 389–398.
238. Dalaly, B.K. Simultaneous isolation of human milk ribonuclease and lysozyme / B.K. Dalaly, R.R. Eitenmiller, J.R. Vakil, K.M. Shahani // Anal. Biochem. – 1970. – V. 37. – P. 208–211.

239. Eitenmiller, R.R. Relationship between composition and stability of bovine milk lysozyme / R.R. Eitenmiller, B.A. Friend, K.M. Shahani // J. Dairy Sci. – 1976. – V. 59. – P. 834–839.
240. Eitenmiller, R.R. Immunological studies on human and bovine lysozymes / R.R. Eitenmiller, B.A. Friend, K.M. Shahani, E.M. Ball // J. Food Sci. – 1974. – V. 39. – P. 930–933.
241. White Jr., F.H. Studies on a partially purified bovine milk lysozyme / F.H. White Jr., H.A. McKenzie, D.C. Shaw, R.J. Pearce // Biochem. International. – 1988. – V. 16. – P. 521–528.
242. McKenzie H.A. The amino acid sequence of equine milk lysozyme / H.A. McKenzie, D.C. Shaw // Biochem. International. – 1985. – V. 10. – P. 23–31.
243. Ito, Y. The primary structures and properties of non-stomach lysozymes of sheep and cow, and implications for functional divergence of lysozyme / Y. Ito, H. Yamada, M. Nakamura, A. Yoshikawa, T. Ueda, T. Imoto // Eur. J. Biochem. – 1993. – V. 213. – P. 649–658.
244. Friend, B.A. Reduction and reactivation of human and bovine milk lysozymes / B.A. Friend, R.R. Eitenmiller, K.M. Shahani // Arch. Biochem. Biophys. – 1972. – V. 149. – P. 435–440.
245. Tada, M. Stabilization of protein by replacement of a fluctuation loop: Structural analysis of a chimera of bovine α -lactalbumin and equine lysozyme / M. Tada, Y. Kobashigawa, M. Mizuguchi, K. Miura, T. Kouno, Y. Kumaki // Biochemistry. – 2002. – V. 41. – P. 13807–13813.
246. McKenzie, H.A. Lysozyme and α -lactalbumin, structure, function, and interrelationships / H.A. McKenzie, F.H. White Jr. // Advanced Prot. Chemistry. – 1991. – V. 41. – P. 173–315.
247. Уайт, А. Основы биохимии. В 3-х т. Т.2. / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман. – М. : Мир, 1981. – 617 с.
248. Fox, P.F. Exogenous enzymes in dairy technology / P.F. Fox // J. Food Biochem. – 1993. – V. 17. – P. 173–199.
249. Fox, P.F. Enzymes in cheese technology / P.F. Fox, L. Stepaniak // Int. Dairy J. – 1993. – V. 3. – P. 509–530.
250. Baumrucker, C.R. Purification and identification of γ -glutamyl transpeptidase of milk membranes / C.R. Baumrucker // J. Dairy Sci. – 1980. – V. 63. – P. 49–54.
251. Baumrucker, C.R. γ -Glutamyl transpeptidase in lactating mammary secretory tissue of cow and rat / C.R. Baumrucker, P.A. Pocius // J. Dairy Sci. – 1978. – V. 61. – P. 309–314.
252. Meister, A. On the enzymology of amino acid transport / A. Meister // Science. – 1973. – V. 180. – P. 33–39.
253. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. G3N2D8 (G3N2D8_BOVIN) – Glutathione hydrolase *Bos taurus* (Bovine) EC: 2.3.2.2, EC: 3.4.19.13; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F2X047/entry> (дата обращения: 21.08.2022).
254. McKellar, R.C. Gamma-glutamyl transpeptidase in milk and butter as an indicator of heat treatment / R.C. McKellar, D.B. Emmons, J. Farber // Int. Dairy J. – 1991. – V. 1. – P. 241–251.
255. Carter, H.D. Assessment of the heat treatment of ice cream mixes by enzyme assay / H.D. Carter, C.F. Cavanagh, L. Higgins, R.A. Wilbey // J. Soc. Dairy Technol. – 1990. – V. 43. – P. 67–68.
256. Patel, S.S. Heat exchanger performance: γ -Glutamyl transpeptidase assay as a heat treatment indicator for dairy products / S.S. Patel, R.A. Wilbey // J. Soc. Dairy Technol. – 1989. – V. 42. – P. 79–80.
257. Roudot-Algaron, F. Isolation of γ -glutamyl peptides from Comté cheese / F. Roudot-Algaron, L. Kerhoas, D. Le Bars, J. Einhorn, J.-C. Gripon // J. Dairy Sci. – 1994. – V. 77. – P. 1161–1166.
258. Toelstede, S. Kokumi-active glutamyl peptides in cheeses and their biogenesis by *Penicillium roqueforti* / S. Toelstede, T. Hofmann, // J. Agric. Food Chem. – 2009. – V. 57. – P. 3738–3748.
259. Уайт, А. Основы биохимии : в 3 т. Т.1 / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман. – М. : Мир, 1981. – 534 с.

260. Superoxide and superoxide dismutases. Superoxidase dismutase: A history / J.M. McCord, I. Fridovich.; A.M. Michelson, J.M. McCord, I. Fridovich, eds. – London, UK: Academic Press, 1977. – P. 1–10.
261. Handbook of food enzymology. Superoxide dismutase / H. Hara, T. Adachi, K. Hirano.; J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, D.W.S. Wong, eds. – New York, USA: Marcel Dekker, 2003. – P. 503–508.
262. Keen, C.L. Superoxide dismutase isoenzymes in bovine and human milk / C.L. Keen, B. Lonnerdel, T.N.B. Stein // Biol. Trace Element Res. – 1980. – V. 2. – P. 221–227.
263. Hill, R.D. Superoxide dismutase activity in bovine milk / R.D. Hill // Australian J. Dairy Technol. – 1975. – V. 30. – P. 26–28.
264. Gibbs, L.S. Nucleotide sequence of bovine copper/zinc superoxide dismutase cDNA generated by the polymerase chain reaction / L.S. Gibbs, J.B. Shaffer // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18(23). P. 7171. DOI: 10.1093/nar/18.23.7171.
265. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P00442 (SODC_BOVIN) – Superoxide dismutase [Cu-Zn] *Bos taurus* (Bovine) EC: 1.15.1.1; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00442/entry> (дата обращения: 23.08.2022).
266. Hough, M.A. Structure of Fully Reduced Bovine Copper Zinc Superoxide Dismutase at 1.15 Å. / M.A. Hough, S.S. Hasnain // Structure. – 2003. – V. 11(8). – P. 937–946.
267. Hough, M. A. Crystallographic structures of bovine copper-zinc superoxide dismutase reveal asymmetry in two subunits: functionally important three and five coordinate copper sites captured in the same crystal / M.A. Hough, S.S. Hasnain // J. Mol. Biol. – 1999. – V. 287(3). – P. 579–592.
268. Ascone, I. Flexibility of the Cu,Zn superoxide dismutase structure investigated at 0.57 GPa / I. Ascone, C. Savino, R. Kahn, R. Fourme // Acta Crystallograph. Section D, Biol. Crystallograp. – 2010. – V. 66(6). – P. 654–663.
269. Tainer, J.A. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase / J.A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson // Nature. – 1983. – V. 306. – P. 284–287.
270. Tainer, J.A. Determination and analysis of 2Å structure of copper zinc superoxide dismutase / J.A. Tainer, E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson, D.C. Richardson // J. Mol. Biol. – 1982. – V. 160. – P. 181–217.
271. Holbrook, J. Variation of superoxide dismutase of bovine milk / J. Holbrook, C.L. Hicks // J. Dairy Sci. – 1978. – V. 61. – P. 1072–1077.
272. Granelli, K. The variation of superoxide dismutase and xanthine oxidase activities in milk using an improved method to quantitate SOD activity / K. Granelli, L. Bjorck, L. Appelqvist // J. Sci. Food Agric. – 1995. – V. 67. – P. 85–91.
273. Holbrook, J. Variation of superoxide dismutase of bovine milk / J. Holbrook, C.L. Hicks // J. Dairy Sci. – 1978. – V. 61. – P. 1072–1077.
274. Hicks, C.L. Occurrence and consequences of superoxide dismutase in milk: A review / C.L. Hicks // J. Dairy Sci. – 1980. – V. 63. – P. 1199–1204.
275. Aurand, L.W. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation / L.W. Aurand, N.H. Boone, G.G. Giddings // J. Dairy Sci. – 1977. – V. 60. – P. 363–369.
276. Handbook of food enzymology. Mammalian sulphhydryl oxidase / H.E. Swaisgood.; J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, D.W.S. Wong, eds. – New York, USA: Marcel Dekker, 2003. – P. 539–546.
268. Kiermeier, F. A sulfhydryl group-oxidizing Enzyme in milk. I. isolation and characterization of the enzyme / F. Kiermeier, E. Petz // Z. Lebensm. Unters. Forsch. – 1967. – V. 132. – P. 342–352.
269. Kiermeier, F. A Sulfhydryl group-oxidizing Enzyme in milk: II Influence of heating on milk and whey / F. Kiermeier, E. Petz // Z. Lebensm. Unters. Forsch. – 1967. – V. 134. – P. 97–102.

270. Kiermeier, F. A Sulfhydryl group-oxidizing Enzyme in milk: III. Effect of heating temperature and heating time / F. Kiermeier, E. Petz // *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* – 1967. – V. 134. – P. 149–156.
271. Janolino, V.G. Isolation and characterization of sulfhydryl oxidase from bovine milk / V.G. Janolino, H.E. Swaisgood // *J. Biol. Chem.* – 1975. – V. 250. – P. 2532–2538.
272. Janolino, V.G. Sulfhydryl oxidase-catalyzed formation of disulfide bonds in reduced ribonuclease / V.G. Janolino, H.E. Swaisgood // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1987. – V. 258. – P. 265–271.
273. Janolino, V.G. Catalytic effect of sulfhydryl oxidase on the formation of three-dimensional structure in chymotrypsinogen A / V.G. Janolino, M.X. Sliwowski, H.E. Swaisgood, H.R. Horton // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1978. – V. 191. – P. 269–277.
274. Jaje, J. A Flavin-Dependent Sulfhydryl Oxidase in Bovine Milk / J. Jaje, H.N. Wolcott, O. Fadugba, D. Cripps, A.J. Yang, I.H. Mather, C. Thorpe // *Biochemistry.* – 2007. – V. 46(45). – P. 13031–13040.
275. US patent no.: US 7,652,733 B2. Isolation of quiescin-sulfhydryl oxidase from milk (2009). C. Thorpe, J. Jaje.
276. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. A6QQA8 (A6QQA8_BOVIN) – Sulfhydryl oxidase *Bos taurus* (Bovine) EC: 1.8.3.2; Gene: QSOX1 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F2X047/entry> (дата обращения: 24.08.2022).
277. Swaisgood, H.E. Sulphydryl oxidase: properties and applications / H.E. Swaisgood // *Enzyme Microb. Technol.* – 1980. – V. 2. – P. 265–272.
278. US patent no.: 06/738764. Microbial sulfhydryl oxidase. (1986). Starnes R.L., Katkocin D.M., Miller C.A., Strobel Jr. R.J.
279. US patent no.: US 4,053,644. Process of removing the cooked flavour from milk. (1977). Swaisgood H.E.
280. Buchert, J. Crosslinking Food Proteins for Improved Functionality / J. Buchert, D. Ercili Cura, H. Ma, C. Gasparetti, E. Monogioudi, G. Faccio, M. Mattinen, H. Boer, R. Partanen, E. Selinheimo, R. Lantto, K. Kruus // *Ann. Rev. Food Sci. Technol.* – 2010. – V. 1(1). – P. 113–138.
281. Faccio, G. Sulfhydryl oxidases: sources, properties, production and applications / G. Faccio, O. Nivala, K. Kruus, J. Buchert, M. Saloheimo // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – V. 91(4). – P. 957–966.
282. Kaufman, S.P. Evaluation of sulfhydryl oxidase as a strengthening agent for wheat flour dough / S.P. Kaufman, O. Fennema // *Cereal Chem.* – 1987. – V. 64. – P. 172–176.
283. Nicolas, J. Interactions between lipoxygenase and other oxidoreductases in baking / J. Nicolas, J. Potus // 2nd European Symposium on Enzymes in Grain Processing. – 1999. – V. 207. – P. 103–120.
284. European patent no.: EP2103220. Method for manufacturing a laminated dough comprising sulfhydryl oxidase enzyme. (2009). Popper L.
285. US patent no.: 07/341389. Enzyme product and method of improving the properties of dough and the quality of bread. (1991). Haarasilta S., Pillinene T., Vaisanen S., Tammersalo-Karsten I.
286. Japanese patent no.: JP11056219. Dough modifier for baked product and production of baked product by using same (1999). Tanaka N., Sato K.
287. US patent no.: 07/341389. Enzyme product and method of improving the properties of dough and the quality of bread. (1991). Haarasilta S., Pillinene T., Vaisanen S., Tammersalo-Karsten I.
288. European patent no.: EP0705538A1. A novel enzyme combination. (1997). Soupe J.
289. US patent application no.: 20100015276. Increased stability of flavor compounds. (2010). Silanekenny F.J., Degenhardt A.
290. Methods in enzymology. Vol 136. Continuous treatment of ultrahigh-temperature sterilized milk using immobilized sulfhydryl oxidase / H.E. Swaisgood, V.G. Janolino, P.J. Skudder.; K. Mosbach, ed. – New York, USA: Academic Press Inc., 1987. – P. 423–431.

291. Pezza, J. A. Spatial Clustering of Isozyme-specific Residues Reveals Unlikely Determinants of Isozyme Specificity in Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase / J.A. Pezza, K.H. Choi, T.Z. Berardini, P.T. Beernink, K.N. Allen, D.R. Tolan // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278(19). – P. 17307–17313.
292. Polis, R.D. Aldolase in bovine milk / R.D. Polis, H.W. Shmukler // J. Dairy Sci. – 1950. – V. 33. – P. 619–622.
293. Advanced Dairy Chemistry. Third edition, Volume II, Lipids (3rd ed.). Intracellular origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane / T.W. Keenan, I.H. Mather.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2006. – P. 137–171.
294. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. Q3ZBY4 Q3ZBY4_BOVIN – Fructose-bisphosphate aldolase *Bos taurus* (Bovine) EC: 4.1.2.13; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00442/entry> (дата обращения: 25.08.2022).
295. Avissar, N. Partial sequence of human plasma glutathione peroxidase and immunologic identification of milk glutathione peroxidase as the plasma enzyme / N. Avissar, J.R. Slemmon, I.S. Palmer, H.J. Cohen // J. Nutrition. – 1991. – V. 121. – P. 1243–1249.
296. Debski, B. Selenium content and distribution of human, cow and goat milk / B. Debski, M.F. Picciano, J.A. Milner // J. Nutr. – 1987. – V. 117. – P. 1091–1097.
297. Lindmark-Masson, H. Purification and immunological assay of bovine extracellular glutathione peroxidase / H. Lindmark-Masson, B. Akesson // Int. Dairy J. – 2001. – V. 11. – P. 649–655.
298. Lindmark-Masson, H. The effect of storage and heat treatment on glutathione peroxidase in bovine milk and whey / H. Lindmark-Masson, J. Chen, H. Paulsson, G. Alden, B. Ren, R. Ladenstein, B. Akesson // Int. Dairy J. – 2001. – V. 11. – P. 71–81.
299. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P37141 (GPX3_BOVIN) – Glutathione peroxidase 3 *Bos taurus* (Bovine) EC: 1.11.1.9; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00442/entry> (дата обращения 27.08.2022).
300. Epp, O. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxide at 0.2-nm resolution / O. Epp, R. Ladenstein, A. Wenden // Eur. J. Biochem. – 1983. – V. 133. – P. 51–69.
301. Handbook of food enzymology. Glutathione peroxidase / J.-Q. Liu, G.-M. Luo.; J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, D.W.S. Wong, eds. – New York, USA: Marcel Dekker, 2003. – P. 413–424.
302. Fett, J.W. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells / J.W. Fett, D.J. Strydom, R.R. Lobb, E.M. Alderman, J.L. Bethune, J.F. Riordan, B.L. Vallee // Biochemistry. – 1985. – V. 24. – P. 5480–5486.
303. Adams, S.A. The angiogenins: emerging family of ribonuclease related proteins with diverse cellular functions / S.A. Adams, V. Subramanian // Angiogenesis. – 1999. – V. 3. – P. 189–199.
304. Shapiro, R. Isolation of angiogenin from normal human plasma / R. Shapiro, D.J. Strydom, K.A. Olson, B.L. Vallee // Biochemistry. – 1987. – V. 26. – P. 5141–5146.
305. Eberle, K. The expression of angiogenin in tissue samples of different brain tumors and cultured glioma cells / K. Eberle, A. Oberpichler, C. Trantakis, W. Krupp, M. Knupfer, H. Tschesche, V. Seifert // Anticancer Res. – 2000. – V. 20. – P. 1679–1684.
306. Рустамьян, Ю.Л. Исследование биологических свойств ангиогенина молока – полифункциональной рибонуклеазы : автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.04: защищена 25.10.05 / Юлия Леонидовна Рустамьян. – М., 2005. – 26 с. – Библиогр.: с. 24–26.
307. Shapiro, R. Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin / R. Shapiro, J.F. Riordan, B.L. Vallee // Biochemistry. – 1986. – V. 25. – P. 3527–3532.
308. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P10152 ANG1_BOVIN – Angiogenin-1 *Bos taurus* (Bovine) EC: 3.1.27; Gene: ANG1 (ANG), 148 amino acids 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00442/entry> (дата обращения 29.08.2022).

309. Maes, P. The complete amino acid sequence of bovine milk angiogenin / P.Maes, D. Damart, C.Rommens, J.Montreuil, G.Spik, A.Tartar // FEBS Lett. – 1988. – V. 241. – P. 41–45.
310. Hironaka, T. Identification of a heparin-binding growth factor isolated from bovine colostral fat globule membrane / T. Hironaka, H. Ohishi, T. Araki, T. Masaki // Milchwissenschaft. – 1997. – V. 52. – P. 508–510.
311. Комолова, Г.С. Ангиогенин молока / Г.С. Комолова, Т.В. Федорова // Прикл. биохимия и микробиол. – 2002. – Т. 38. – № 3. – С. 229–236.
312. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P80929 (ANG2_BOVIN) – Angiogenin-2 *Bos taurus* (Bovine) EC: 3.1.27; Gene: ANG2, 123 amino acids 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00442/entry> (дата обращения: 29.08.2022).
313. Strydom, D. J. An Angiogenic Protein from Bovine Serum and Milk – Purification and Primary Structure of Angiogenin-2 / D.J. Strydom, M.D. Bond, B.L.Vallee // Eur. J. Biochem. – 1997. – V. 247(2). – P. 535–544.
314. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P59761 (LGEN_BOVIN) – Lactogenin *Bos taurus* (Bovine) EC: 3.1.27; 73 amino acids 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00442/entry> (дата обращения: 29.08.2022).
315. Acharya, K.R. Crystal structure of bovine angiogenin at 1.5 Å resolution / K.R. Acharya, R. Shapiro, J.F. Riordan, B.L. Vallee // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – V. 92. – P. 2949–2953.
316. Lequin, O. Solution structure of bovine angiogenin by 1 H nuclear magnetic resonance spectroscopy / O. Lequin, C. Albaret, F. Bontems, G. Spik, J.Y. Lallemand // Biochem. – 1996. – V. 35. – P. 8870–8880.
317. Шалыгина, А.М. Выделение ангиогенина из молочного сырья / А.М. Шалыгина, Н.А. Тихомирова, Ю.Л. Рустамьян, Г.С. Комолова // Молочная промышленность. – 1995. – № 4. – С. 22–23.
318. Рогов, И.А. Очистка ангиогенина из коровьего молока / И.А. Рогов, А.М. Михайлов, А.М. Шалыгина, Н.А.Тихомирова, Ю.Л. Рустамьян, Г.С. Комолова // Прикл. биохимия и микробиол. – 1997. – Т 33. – № 1. – С. 107–110.
319. Тихомирова, Н.А. Влияние катионной фракции белков молока на бактерии группы кишечной палочки / Н.А. Тихомирова, А.М. Шалыгина, В.И. Ганина, Е.А. Алякина, Г.С. Комолова, Ю.Л. Рустамьян // Молочная промышленность. – 1999. – № 11. – С. 31–33.
320. Тихомирова, Н.А. Влияние ангиогенина коровьего молока на бактерии группы кишечной палочки / Н.А. Тихомирова, А.М. Шалыгина, В.И. Ганина, Е.А. Алякина, Ю.Л. Рустамьян, Г.С. Комолова // Иммунология. – 2002. – Т 23. – № 2. – С. 105–106.
321. Shapiro, R. Expression of Met-(1) angiogenin in Escherichia coli: conversion to the authentic Glu-1 protein / R. Shapiro, J.W. Harper, E.A. Fox, H.W. Jansen, F. Hein, E. Uhlmann // Anal. Biochem. – 1988. – V. 175. – P. 450–461.
322. Рогов, И.А. Количественное определение ангиогенина быка / И.А. Рогов, А.М. Шалыгина, Н.А. Тихомирова, Ю.Л. Рустамьян, О.В. Скоробогатько, А.М. Михайлов, Е.В. Степанова, Г.С. Комолова // Биохимия. – 1995. – Т. 60. – В. 8. – С. 1344–1348.
323. Рустамьян, Ю.Л., Иммуноферментный анализ ангиогенина в молоке коров / Ю.Л. Рустамьян, А.М. Шалыгина, Н.А. Тихомирова, М.Л. Рабинович, А.Н. Плешанов, Г.С. Комолова // Прикл. биохимия и микробиол. – 1999. – Т. 35. – № 1. – С. 105–108.
324. Рустамьян, Ю.Л. Проникновение в кровь мышей вводимого перорально ангиогенина из коровьего молока / Ю.Л. Рустамьян, Г.С. Комолова // Известия АН. Серия биологическая. – 2002. – № 2. – С. 224–227.
325. Shapiro, R. Expression of Met-(1) angiogenin in Escherichia coli: conversion to the authentic Glu-1 protein / R. Shapiro, J.W. Harper, E.A. Fox, H.W. Jansen, F. Hein, E. Uhlmann // Anal. Biochem. – 1988. – V. 175. – P. 450–461.

326. Xia, W.-R. Expression, Purification and Characterisation of Recombinant Human Angiogenin in *Pichia pastoris* / W.-R. Xia, W.-L. Fu, L. Cai, X. Cai, Y.-Y. Wang, M.-J. Zou, D.-G. Xu // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2012. – V. 76. – No. 7. – P. 1384–1388.
327. Huang, C.M. Preparation and properties of 5'-nucleotidase from bovine milk fat globule membranes / C.M. Huang, T.W. Keenan // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1972. – V. 274. – P. 246–257.
328. Caulini, G. Preliminary results on 5' nucleotidase in milk / G. Caulini, I. Binotti, M. Alessandrini, P.L. Ipata, G. Magni // *Bull. Soc. Italiana Biol. Sperimentale.* – 1972. – V. 48. – P. 890–893.
329. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. Q05927 (5NTD_BOVIN) – 5'-nucleotidase *Bos taurus* (Bovine) EC: 3.1.3.5; 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00442/entry> (дата обращения: 30.08.2022).
330. Andrews, A.T. A study of the heat stabilities of a number of indigenous milk enzymes / A.T. Andrews, M. Anderson, P.W. Goodenough, P.W. // *J. Dairy Res.* – 1987. – V. 54. – P. 237–246.
331. Gill, B.D. Development and application of a liquid chromatographic method for analysis of nucleotides and nucleosides in milk and infant formulas / B.D. Gill, H.E. Indyk // *Int. Dairy J.* – 2007. – V. 17. – P. 596–605.
332. Pollack, S. Selective chemical catalysis by an antibody / S. Pollack, J. Jacobs, P. Schultz // *Science.* – 1986. – V. 234(4783). – P. 1570–1573.
333. Lerner, R.A. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies / R.A. Lerner, S.J. Benkovic, P.G. Schultz // *Science.* – 1991. – V. 252. – P. 659–667.
334. Janda, K.J. Catalytic antibodies and enzyme inhibitors / K.J. Janda // *Pure Appl. Chem.* – 1994. – V. 66. – P. 703–708.
335. Shchurov, D.V. Catalytic antibodies / D.V. Shchurov. // *Mol. Biol.* – 1997. – V. 31. – P. 1–19.
336. Kanyshkova, T.G. DNA- and RNA-hydrolysing antibodies in human milk and their possible biological role / T.G. Kanyshkova, D.V. Semenov, A.V. Vlassov, D.Y. Khlimankov, A.G. Baranovshii, M.V. Shipitsyn, V.I. Yamkovo, V.N. Buneva, G.A. Nevinskii // *Mol. Biol.* – 1997. – V. 31. – P. 927–934.
337. Buneva, V.N. Catalytic DNA- and RNA-hydrolysing antibodies from milk of healthy mothers / V.N. Buneva, T.G. Kanyshkova, A.V. Vlassov, D.V. Semenov, D.Y. Khlimankov, L.R. Breusova, G.A. Nevinsky // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1998. – V. 75. – P. 63–76.
338. Kit, Y.Y. Protein kinase activity of sIgA antibodies from human milk: catalytically active antibodies in normal humans? / Y.Y. Kit, D.V. Semenov, G.A. Nevinsky // *Mol. Biol.* – 1995. – V. 29. – P. 519–526.
339. Nevinsky, G.A. Secretory immunoglobulins A from healthy human mothers' milk / G.A. Nevinsky, T.G. Kanyshkova, D.V. Semenov, A.V. Vlassov // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2000. – V. 83. – P. 115–129.
340. Lopes-Marques, M. Unusual loss of chymosin in mammalian lineages parallels neo-natal immune transfer strategies / M. Lopes-Marques, R. Ruivo, E. Fonseca, A. Teixeira, L. F. C. Castro // *Mol. Phylogenetics and Evolution.* – 2017. – V. 116. – P. 78–86.
341. Mokhber-Dezfooli, M.R. Effect of abomasal emptying rate on the apparent efficiency of colostrum immunoglobulin G absorption in neonatal Holstein-Friesian calves / M.R. Mokhber-Dezfooli, M. Nouri, M. Rasekh, P.D. Constable // *J. Dairy Sci.* – 2012. – V. 95 (11). – P. 6740–6749.
342. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd Edition. Milk: Milk of Monotremes and Marsupials / J.A. Sharp, K. Menzies, C. Lefevre, K.R. Nicholas; J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – Atlanta, GA, USA: Elsevier Ltd., Academic Press. – 2011. – P. 553–562.
343. Bessi, R. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. I. Estudo no intestino delgado proximal / R. Bessi, P. Pauletti, R.D. d'Arce, R. Machado Neto // *Revista Brasileira de Zootecnia.* – 2002. – V. 31. – P. 2314–2324.

344. Borghesi, J. Immunoglobulin Transport during Gestation in Domestic Animals and Humans – A Review / L.C. Mario, M.N. Rodrigues, P.O. Favaron, M.A. Miglino // *Open J. Animal Sci.* – 2014. – V. 4. – P. 323–336.
345. Benkovic, S.J. Catalytic antibodies / S.J. Benkovic // *Annu. Rev. Biochem.* – 1992. – V. 61. – P. 29–54.
346. Suzuki, H. Recent advances in abzyme studies / H. Suzuki // *J. Biochem.* – 1994. – V. 115. – P. 623–628.
347. Kirby, A.J. The potential of catalytic antibodies / A.J. Kirby // *Acta Chem. Scand.* – 1996. – V. 50. – P. 203–210.
348. *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1 – Proteins*, 3rd edn. Nucleases in milk / L. Stepaniak, C.M. Fleming, M. Gobbetti, A. Corsetti, P.F. Fox.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA : Kluwer Academic-Plenum Publishers, 2003. – P. 545–561.
349. Planque, S. Catalytic antibodies to HIV: Physiological role and potential clinical utility / S. Planque, Y. Nishiyama, H. Taguchi, M. Salas, C. Hanson, S. Paul // *Autoimmun. Rev.* – 2008. – V. 7(6). – P. 473–479.
350. Tolmacheva, A.S. Essential Protective Role of Catalytically Active Antibodies (Abzymes) with Redox Antioxidant Functions in Animals and Humans / A.S. Tolmacheva, G.A. Nevinsky // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23(7). – 3898. DOI: 10.3390/ijms23073898.

Глава 5. Номенклатура и свойства белков мембраны молочной жировой глобулы

За последние несколько десятилетий сформировалось понимание того, что белковые и липидные компоненты мембраны молочной жировой глобулы (ММЖГ) обладают важными технологическими и функциональными свойствами и, в перспективе, могут использоваться в пищевой и фармацевтической промышленности, косметологии и медицине [1–3]. Всестороннему изучению количественного и качественного состава ММЖГ также способствует формирование новой концепции в области создания искусственных молочных смесей, в состав которых входят компоненты MFGM & milk fat (мембраны жировых глобул молока и молочный жир) [4].

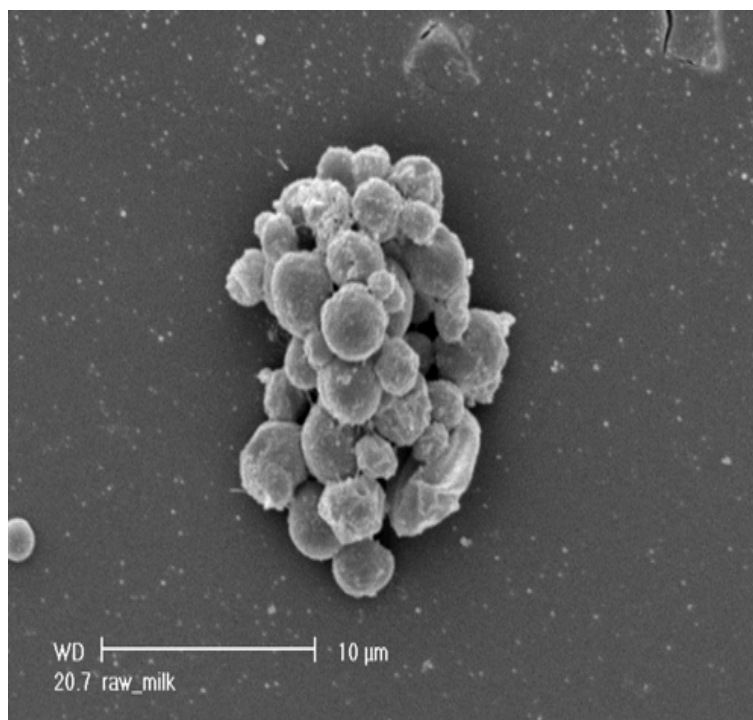


Рис. 5.1. Микрофотография кластера молочных жировых глобул цельного коровьего молока (сканирующая электронная микроскопия) [4]

Коровье молоко содержит приблизительно 3–5% (масса/объем) жира. Более 95% жировой фракции находится в виде молочных жировых глобул (МЖГ) диаметром 0,–15,0 мкм (рис. 5.1), которые эмульгированы в водной фазе. МЖГ состоит из ядра, содержащего, главным образом, триглицериды (до 95% от общих жиров глобулы), и биофункциональной оболочки толщиной 10–20 нм, которая называется мембраной молочной жировой глобулы. Оболочка МЖГ заряжена отрицательно (ζ -потенциал в свежесвыдоенном молоке – около 12 mV), что стабилизирует жировую эмульсию молока, по аналогии с отрицательным поверхностным зарядом казеиновых мицелл. Масса ММЖГ составляет 2–6% от массы нативной жировой глобулы, её основными компонентами являются белки (25–60%), фосфолипиды (до 25%), цереброзиды (~3%), холестерол (~2%), а также минорные органические соединения и минеральные вещества [1–8].

5.1. Генез и структура молочной жировой глобулы

Молочные жировые глобулы, содержащие преимущественно триглицериды и стеролы [1], секретируются эпителиальными клетками молочной железы. Внутриклеточными предшественниками МЖГ являются первичные жировые скопления, которые образуются между слоями (листками, от англ. *leaflet*) мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭР) [9–12]. Увели-

чиваясь в размерах, скопления жира способствуют вздутию (выпячиванию) одного из листков мембраны ЭР, обращенного к цитоплазме, и отпочковываются от него в виде жировых капель, окруженных монослоем фосфолипидов, который несет трансмембранные и периферические мембранные белки (рис. 5.2).

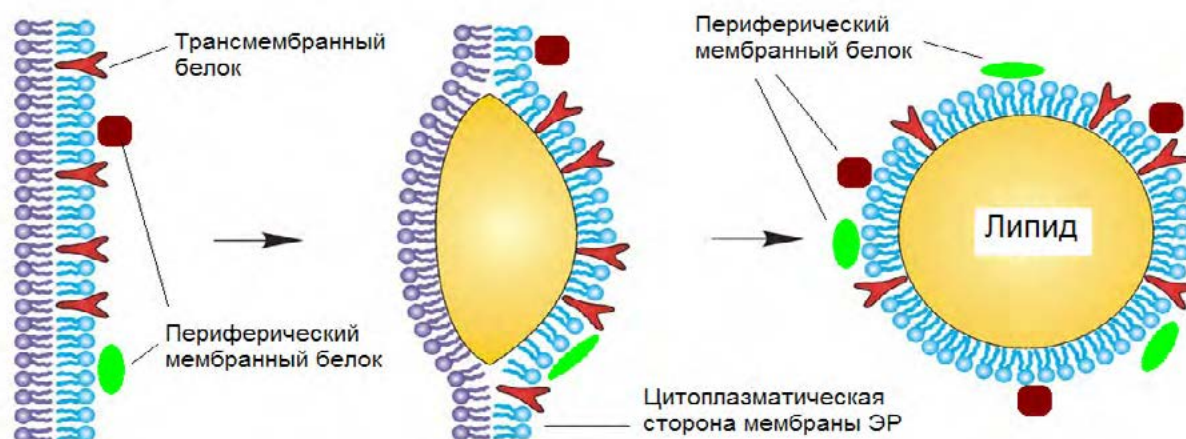


Рис. 5.2. Схема образования жировой капли в мембране эндоплазматического ретикулаума

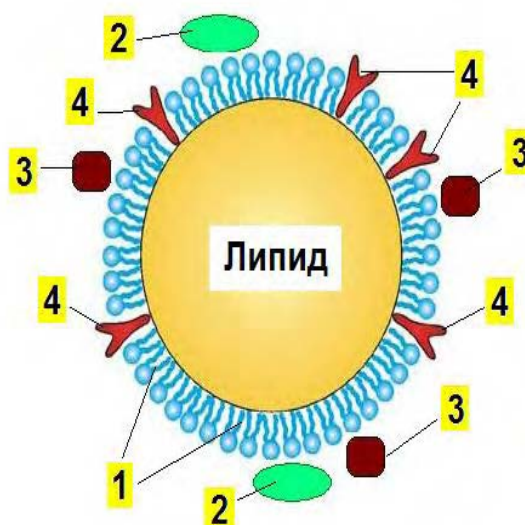


Рис. 5.3. Схема строения секреторной гранулы (цитоплазматической жировой капли). Условные обозначения: 1 – монослой фосфолипидов, образующийся из цитоплазматического листка мембраны эндоплазматического ретикулаума; 2, 3 – периферические мембранные белки; 4 – трансмембранный белок

Подобным образом происходит образование жировых капель в ЭР адипоцитов (основной тип клеток жировой ткани) и некоторых других типов клеток [11]. Несмотря на то, что происхождение жировых капель из мембраны ЭР можно считать доказанным, остается ряд вопросов, связанных с механизмом этого процесса. В чем особенность сайтов возникновения первичных скоплений триглицеридов? Существуют ли факторы, индуцирующие «аккрецию» триглицеридов между листками мембраны ЭР и каковы механизмы регуляции образования липидных капель? В цитоплазме часть мелких липидных капель сливаются, образуя крупные цитоплазматические жировые капли (секреторные гранулы), которые также покрыты монослоем фосфо-

липидов (являющихся частью цитоплазматического листка мембраны ЭР), несущим связанные с ним периферические и трансмембранные белки [12]. Схема строения цитоплазматической жировой капли представлена на рисунке 5.3.

Цитоплазматические жировые капли транспортируются к апикальной мембране секреторной клетки и отпочковываются от неё в альвеолярное пространство, «прихватывая» дополнительную двухслойную фосфолипидную оболочку из плазматической мембраны (рис. 5.4 и 5.5Б).

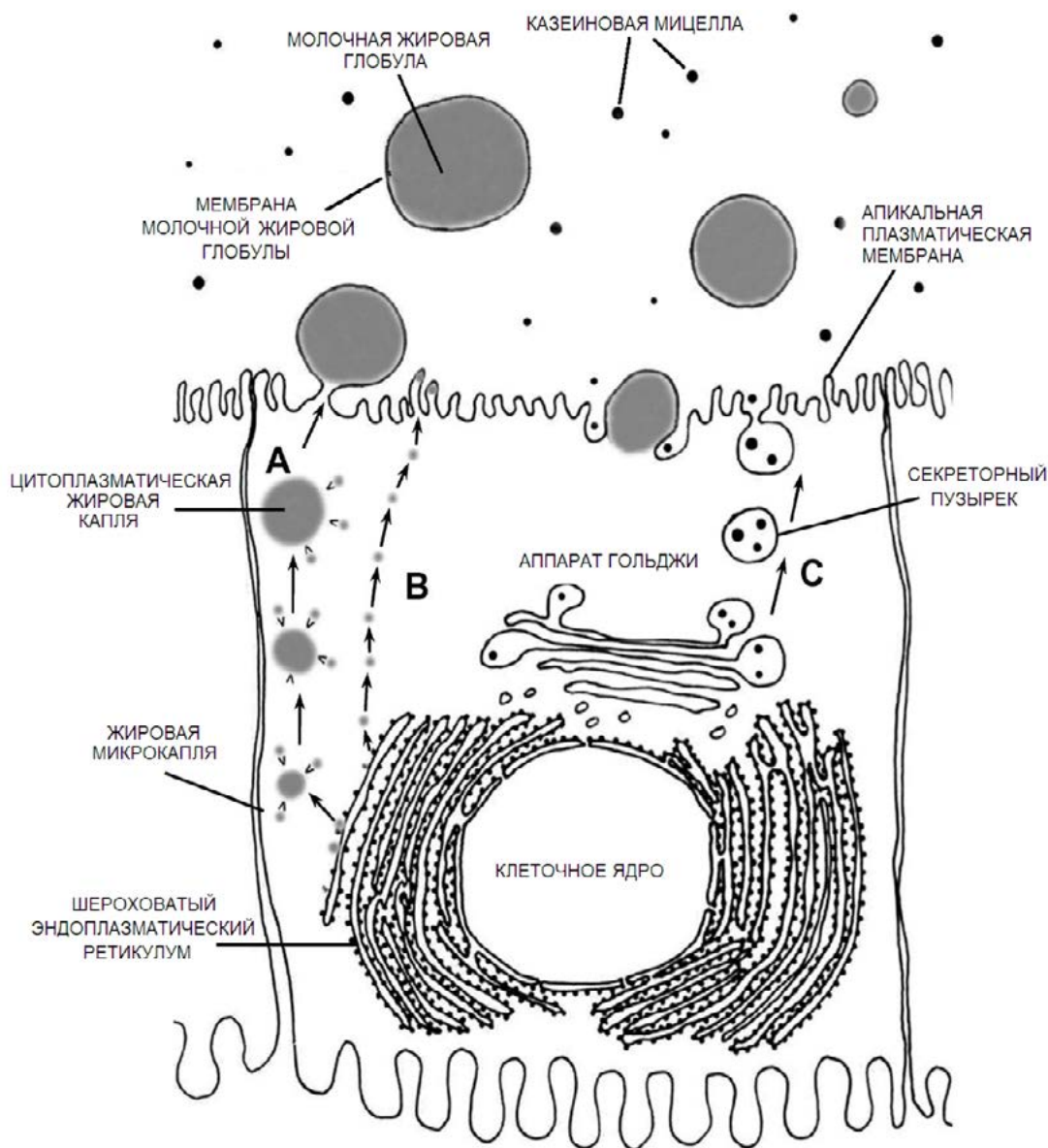


Рис. 5.4. Основные секреторные пути эпителиальной клетки в лактирующей молочной железе [9]. А. Путь образования липидных капель; В. Путь образования липидных микрокапель; С. Путь секреции основных белковых компонентов молока

Таким образом, мембрана зрелой МЖГ оказывается сформированной из трех фосфолипидных слоев (рис. 5.5). Первый, внутренний монослой состоит из цитоплазматического листка мембраны ЭР, а два наружных слоя – это классическая бислойная фосфолипидная клеточная мембрана, которая может нести симметричные и асимметричные домены, содержащие сфингомиелины и холестеролы (рис. 5.6).

Между внутренним монослоем и наружным бислоем фосфолипидов часто остаются участки, заполненные цитоплазмой секреторной клетки (так называемые «рогалики» или «полу-

месяцы», от англ. *crescents*), в которых находятся цитозольные (цитоплазматические) белки и ферменты.

Исторически сложившийся термин «мембрана молочной жировой глобулы» является не вполне точным, поскольку не отражает её комплексную, многослойную структуру. В связи с этим Н. Robenek и соавторы предлагают называть фосфолипидные слои, окружающие молочную жировую глобулу, не «мембраной», а «оболочкой» (*envelope*, англ.) [12].

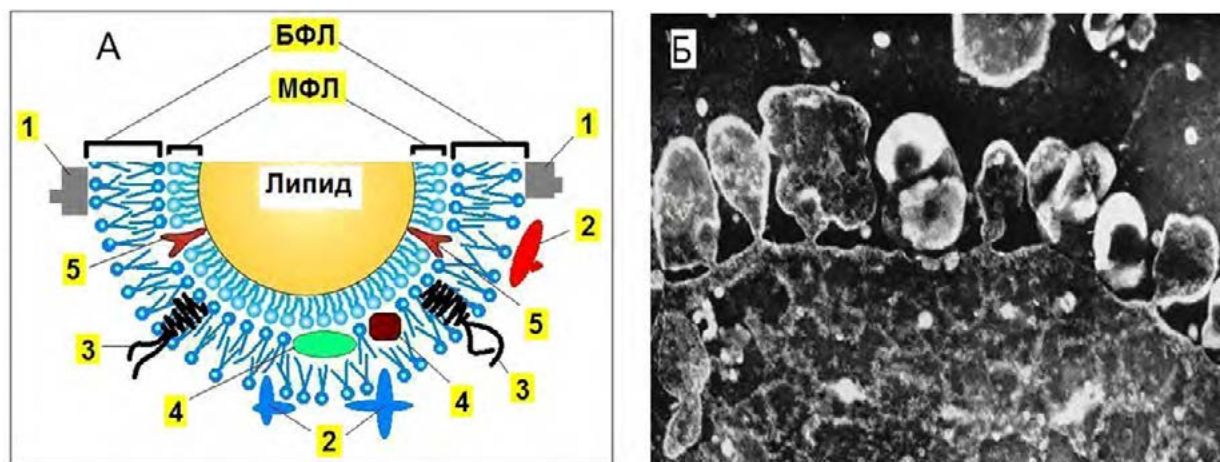


Рис. 5.5. Схема строения молочной жировой глобулы (А) и секрция жировых глобул (Б). Условные обозначения: А. МФЛ – монослой фосфолипидов, образующийся из цитоплазматического листка мембраны ЭР; БФЛ – бислойная фосфолипидная мембрана, являющаяся частью апикальной плазматической мембраны секреторной клетки; 1, 2 – периферические белки апикальной мембраны, 3 – трансмембранный белок апикальной мембраны; 4 – периферические белки цитоплазматического листка ЭР; 5 – трансмембранный белок цитоплазматического листка ЭР; Б. Электронная микрофотография апикальной мембраны секреторной клетки молочной железы [52]

5.2. Принципы номенклатуры белков ММЖГ

Каждый из слоев мембраны молочной жировой глобулы (ММЖГ) несет мембранносвязанные (периферические) и трансмембранные белки.

Исторически белки ММЖГ классифицировались по относительной электрофоретической подвижности в полиакриламидных гелях (ПААГ) в присутствии денатурирующего агента – додецилсульфата натрия (ДСН). Полосы белков выявляли и идентифицировали путем окрашивания универсальным (неспецифическим) красителем Coomassie Brilliant Blue (CBB) или с применением специфического реагента на гликопротеины – периодной кислоты/основания Шиффа (PAS – *periodic acid/Schiff*, англ.). Окрашенные белковые полосы нумеровали, как правило, начиная от вершины (старта) геля. При этом применялись разные способы нумерации (арабскими или латинскими цифрами) и ПААГ различной концентрации, что приводило к запутыванию и неоднозначности результатов, особенно при исследовании минорных белков и белков с низкой электрофоретической подвижностью.

Несопоставимость экспериментальных данных усиливалась при сравнении результатов, полученных на различных видах млекопитающих. Для того, чтобы устранить эти проблемы, Комитет по номенклатуре разработал специальную классификационную схему, регламентировавшую концентрацию ПААГ, методы окраски, определения молекулярной массы (ММ) и электрофоретической подвижности [14, 15], которая, однако, не получила широкого распространения.

В настоящее время, в соответствии с рекомендациями, одобренными Комитетом по номенклатуре белков молока (Milk Protein Nomenclature Committee, англ.) при ADSA (*American*

Dairy Science Association, англ.), идентификация, наименование и классификация новых белков ММЖГ (так же, как и других белков молока) должны проводиться на основании результатов молекулярного клонирования или определения аминокислотной последовательности (секвенирования) полипептидной цепи протеина. Начиная с 2000 г. практика присвоения номенклатурных названий новых белков ММЖГ, основанная на определении молекулярной массы (ММ), электрофоретической подвижности или характера взаимодействия с различными красителями, должна быть прекращена. Электрофоретические параметры и особенности взаимодействия с красителями могут быть использованы для описания ранее не охарактеризованных белковых компонентов ММЖГ [16].

Согласно современной номенклатуре основными белками ММЖГ являются: **бутирофилин**, **ксантиндегидрогеназа/оксидаза**, **адилофилин**, **муцин 1**, **белок PAS III (муцин 15)**, **белок CD 36**, **белок PAS 6/7** и **белок, связывающий жирные кислоты**. Кроме того, с ММЖГ ассоциировано не менее 25 ферментов [17].

Схема расположения белков в мембране (оболочке) МЖГ представлена на рисунке 5.6.

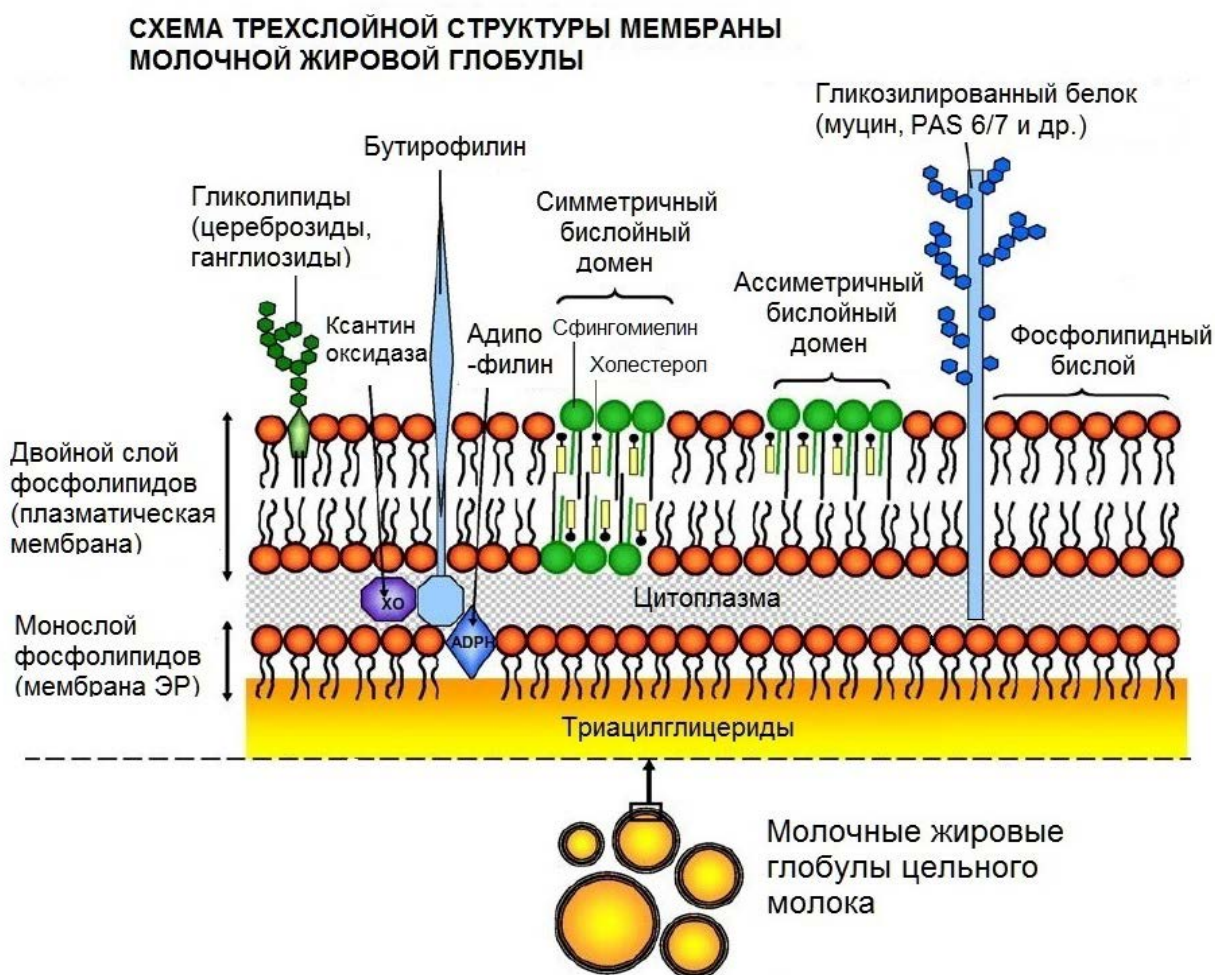


Рис. 5.6. Схема расположения белков в оболочке (мембране) молочной жировой глобулы [10]

Список современных официальных названий и аббревиатур белков оболочки жировой глобулы молока, а также ранее использовавшиеся и устаревшие названия, которые всё еще можно встретить в научной литературе по данной проблематике, представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1

Номенклатура основных белков мембраны
молочной жировой глобулы молока коровы [2, 16]

Название белка, рекомендованное ADSA (английское название, аббревиатура)	Ранее использовавшиеся и устаревшие синонимы	Источник
Муцин 1 (Mucin 1, MUC1)	Гликопротеин А	[32]
	Компонент I	[19]
	Полоса I, II	[33]
	PAS 1	[34]
Ксантиндегидрогеназа / оксидаза (Xanthine dehydrogenase/oxidase, XDH/XO)	Полоса I	[32,35]
	Компонент II	[36,37]
	Компонент 3	[19]
	Полоса 2	[33]
Муцин 15 или PAS III (Periodic acid /Schiff III, MUC15 или PAS III)	Гликопротеин С	[32]
	Гликопротеин 4	[37]
	Компонент II	[19]
	PAS3	[34]
Кластер дифференцировки 36 (Cluster of Differentiation 36, CD36)	Полоса III/ гликопротеин D	[32,35]
	PAS IV	[38]
	Компонент III	[36]
	Компонент III/IV/Гликопротеин 5	[37]
	Компонент 10/III или 11	[19]
	Полоса 3/IV	[33]
	CB4/PAS 4	[34]
Бутирофилин (Butyrophilin, BTN)	Полоса IV/Гликопротеин E	[32,35]
	Компонент IV	[36]
	Компонент V/Гликопротеин 6	[37]
	Компонент 12/IV	[19]
	Полоса 4/V	[33]
	CB5/PAS 5	[34]
Адилофилин (Adipophilin, ADPH)	Компонент 14	[19]
	Полоса 6	[33]
	CB6	[34]
Белок 6/7, окрашиваемый периодной кислотой / основанием Шиффа (Periodic acid / Schiff 6/7, PAS 6/7)	Полоса V/Гликопротеин F	[32,35]
	MGP 57/53	[39]
	Гликопротеин В	[40]
	Коровий мукопротеин (BAMP)	[41,42]
	Компонент VI	[36,37]
	Компоненты 15/16/V	[19]
	CB7 & 8 (PAS 6 and 7)	[34]
Белок, связывающий жирные кислоты (Fatty-acid binding protein, FABP)	Ингибитор роста из молочной железы (MDGI)	[43]

5.3. Получение препаратов ММЖГ

Мембраны молочных жировых глобул (МЖГ) коровьего молока могут быть получены с использованием несложной четырехстадийной процедуры [18–28]:

- 1) неочищенную фракцию молочных жировых глобул (сливки) выделяют из цельного молока путем сепарирования или центрифугирования;
- 2) полученную фракцию МЖГ грубой очистки несколько раз промывают при комнатной температуре физиологическими буферными растворами для удаления сывороточных белков;
- 3) мембраны отделяют от жировых глобул физическими (понижение температуры до $<10^{\circ}\text{C}$, встряхивание или гомогенизация, замораживание/оттаивание) или химическими (экстракция неионными детергентами, солями желчных кислот, органическими растворителями) методами;
- 4) фракцию ММЖГ осаждают различными физико-химическими методами (центрифугирование в течение 60 минут при 90000–100000 g, преципитация при низких значениях pH, высаливание сульфатом аммония).

В осадке, получаемом на четвертой стадии, присутствуют все основные белки ММЖГ, вне зависимости от применяемых вариантов промежуточных стадий (2–3) очистки. Что касается минорных белков ММЖГ и периферических белков, слабо связанных с мембраной жировых глобул, то их выход и степень контаминации сывороточными белками молока, напротив, целиком и полностью зависит от второй и третьей стадий очистки [18, 20, 21, 23, 29].

На первой стадии получения ММЖГ исключительно важно сепарировать сливки из максимально свежего, еще теплого молока, поскольку мембраны МЖГ претерпевают структурные изменения в процессе его охлаждения и длительного хранения [16].

Для исследования структуры мембран интактных МЖГ используется метод S. Patton и G.E. Huston, согласно которому небольшое количество сливок получают в процессе флотации молочного жира через слой буферного раствора при малых скоростях центрифугирования [30]. Повреждение жировых глобул и изменение топографии основных белков ММЖГ при этом – минимально [31].

Для рутинных исследований ММЖГ рекомендуется трехразовая промывка фракции МЖГ (стадия 1) буферными растворами для удаления белков обезжиренного молока. Особое внимание следует уделить максимально полной очистке от казеиновых мицелл, поскольку с ними связан плазминоген – зимоген основной эндогенной протеиназы молока [15, 23, 44].

Вне зависимости от используемого метода выделения, мембранный материал, «снимаемый» с поверхности жировой глобулы (который называется «масляное молоко», от англ. *buttermilk*), при центрифугировании разделяется на две основные фракции. Первая фракция – растворимый супернатант (надосадочная жидкость), вторая фракция – нерастворимый осадок мембран. В супернатанте содержится от 5 до 20% белков, выделяемых из молочных сливок. В дальнейшем мы будем называть растворимую часть фракции МЖГ супернатантом, а нерастворимый осадок мембран – ММЖГ.

5.4. Общая характеристика основных белков ММЖГ и супернатанта

При одномерном электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ЭФ) белковый материал ММЖГ разделяется на 7 или 8 основных полос (рис. 5.7). Большинство этих полос представлены единичным белковым компонентом, которые являются продуктом одного гена.

При двумерном электрофорезе (в первом направлении белки разделяются в соответствии с изоэлектрическими точками (pI) методом изоэлектрофокусирования (ИЭФ), а во втором –

методом ДСН-электрофореза, в соответствии с ММ, каждая из этих полос разделяется на несколько изоэлектрических вариантов.

При одномерном ДСН-ЭФ, белки мембраны МЖГ, в направлении от старта геля к финишу, располагаются в следующем порядке: муцин 1 (MUC1) [45], редокс фермент ксантиндегидрогеназа/оксидаза (XDH/XO) [46], малоизученный гликопротеин MUC15 или PAS III [47], кластер дифференцировки 36 (CD36) [48], основной белок мембран – бутирофилин (BTN) [12, 19, 31], белок 6/7, окрашиваемый периодной кислотой/основанием Шиффа (PAS 6/7) [28, 50] и белок, связанный с дифференцировкой адипоцитов, адипофилин (ADPH) [51] (рис. 5.7, треки 1,3, 5). Белковая полоса, которая движется с фронтом лидирующего красителя в зависимости от концентрации ПААГ, состоит из нескольких протеинов. В ПААГ с концентрацией < 10% основным компонентом этой полосы является белок, связывающий жирные кислоты (FABP) [52] (сравните: рис. 5.7, трек 1,5).

Из восьми основных белков ММЖГ шесть – XDH/XO, CD36, BTN, ADPH, PAS 6/7, FABP, эффективно окрашиваются универсальным белковым красителем Coomassie Brilliant Blue (рис. 5.7, трек 1,5).

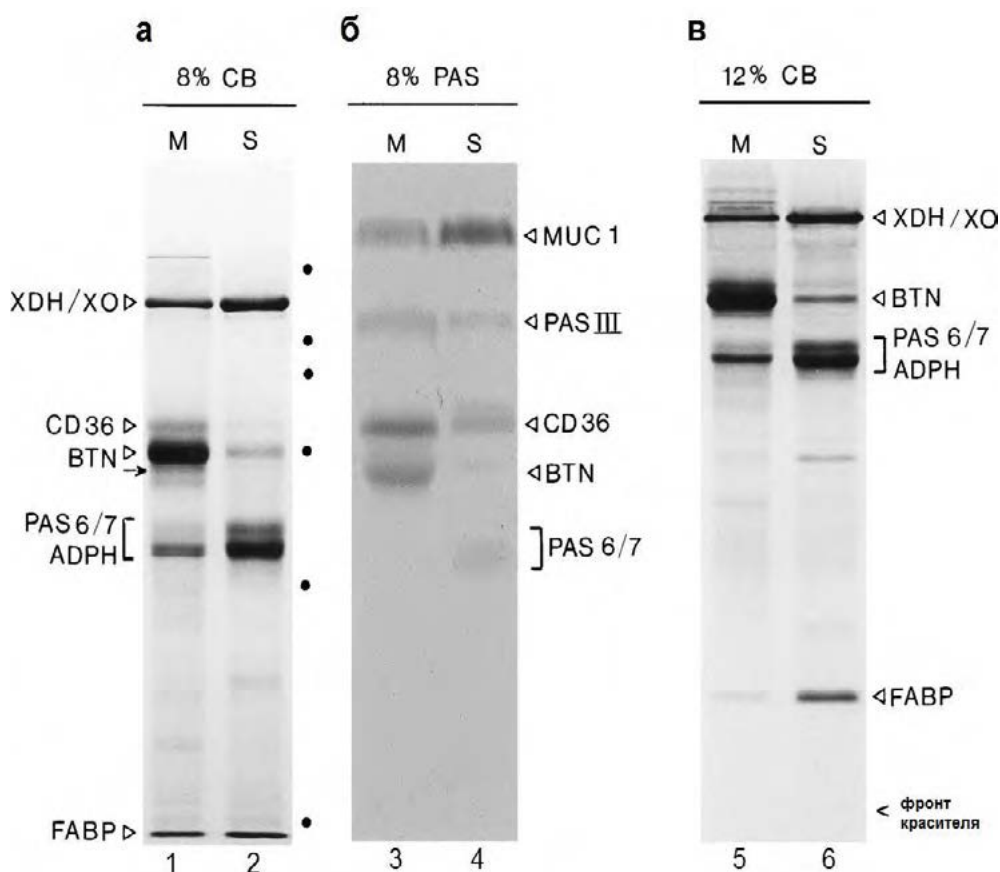


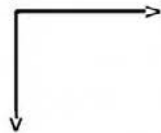
Рис. 5.7. Фракционирование белков ММЖГ методом ДСН-электрофореза [16].

Условные обозначения: М – ММЖГ (треки 1, 3, 5), S – супернатант (треки 2, 4, 6). На вершине панелей а-в указана концентрация ПААГ – 8% (панели а, б) и 12% (панель в) и метод окрашивания: СВ – СВВ, PAS – периодная кислота/основание Шиффа. Справа от панели а точками указано положение маркеров молекулярной массы (ММ), сверху вниз: 200,0 кДа, 116,3 кДа, 97,4 кДа, 66,2 кДа, 45,0 кДа, 31,0 кДа. Слева и справа от панелей а-в указаны международные аббревиатуры белков ММЖГ, которые используются в основном тексте. Протеолитически деградированный фрагмент бутирофилина (BTN) обозначен маленькой стрелкой слева от панели а (трек 1)

Использование высокочувствительного метода окрашивания ионами серебра позволяет детектировать на двумерных белковых картах множество минорных полипептидных компонентов, структура и функции которых не изучены (рис. 5.8).

Изоэлектрофокусирование
(первое направление)

pH=5,0 pH=7,0



ДДС-электрофорез
(второе направление)

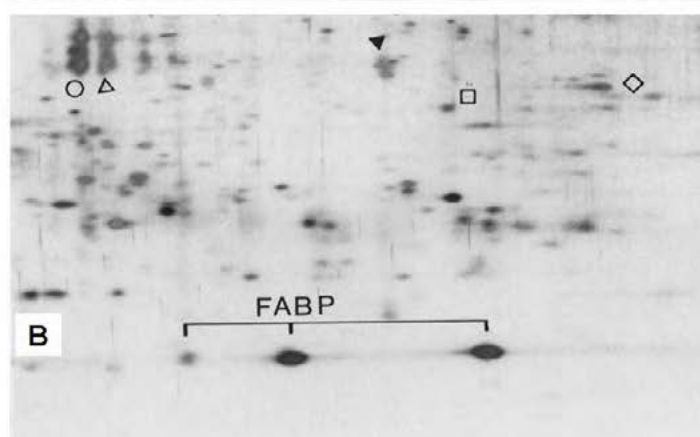
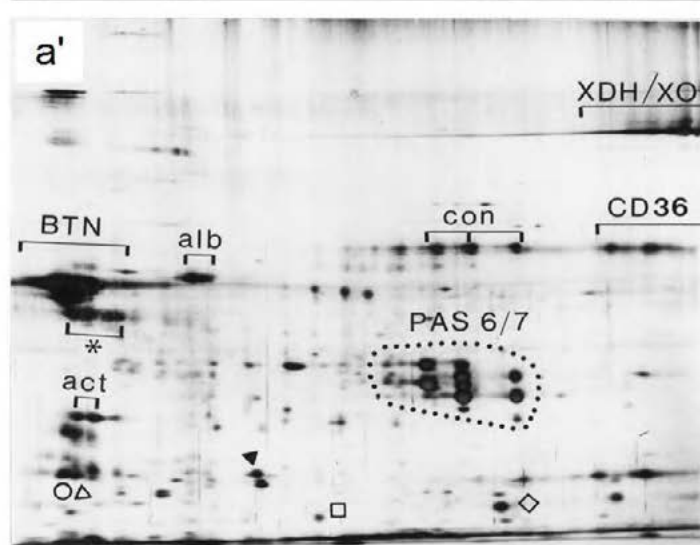
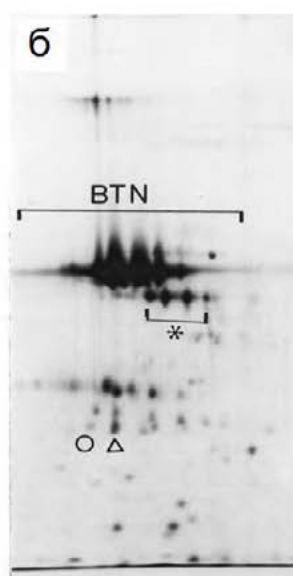
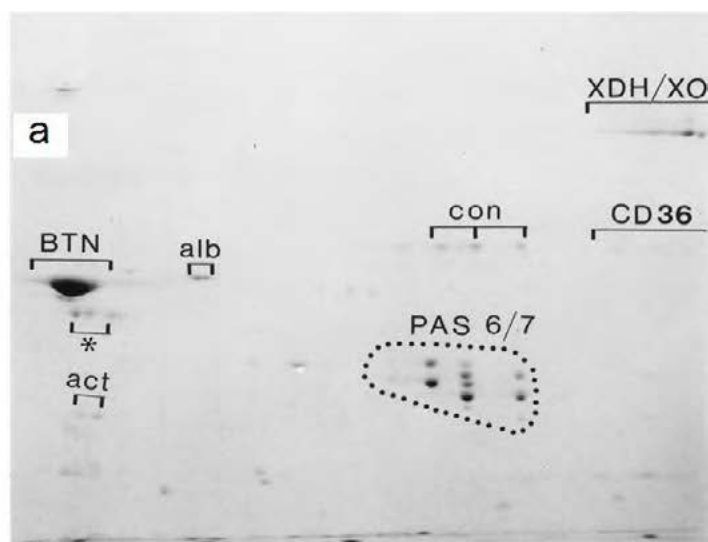


Рис. 5.8. Разделение белков ММЖГ методом двумерного электрофореза [16]. Обозначения. Панели а, а': 1-е направление – ИЭФ в диапазоне pH~5,0-7,0, в присутствии 8М мочевины и 2% NP-40, 2-е направление – ДДС-ЭФ в 8% ПААГ. Гели окрашены СВВ (а) и серебром (а'). Маркеры pI и MM: кональбумин (con) (pI=6,0, 6,3, 6,6; MM=76 кДа), сывороточный альбумин (alb) (pI= 5,4, 5,6; MM=66 кДа), актин (act) (pI=5,0, 5,1; MM=43 кДа). Панель б – разделение кислых белков при более высоком разрешении: в 1-м направлении – ИЭФ, в диапазоне pH~4,5-5,5, во 2-м – 12% ПААГ. Панель в – разделение низкомолекулярных белков при более высоком разрешении: в 1-м направлении – ИЭФ, в диапазоне pH~5,0-7,0, во 2-м – 12% ПААГ. Одни и те же белки, на панелях а, б, в, обозначены одинаковыми символами (◻, Δ, ▼, ◊, ○). Протеолитически деградированные фрагменты BTN, на панелях а, а', б обозначены звездочкой (*). Белки MUC1 и PAS III (MUC15), при данных условиях не выявляются, поскольку имеют pI<4,5

Два гликопротеина, – MUC1 и MUC15 (PAS III), – не связывают СВВ и выявляются только при использовании специфического реагента – периодной кислоты/основания Шиффа (PAS) (рис. 5.7, трек 3) или при окрашивании серебром [53] (рис. 5.8).

Двумерный электрофорез белков ММЖГ в сочетании с окрашиванием серебром позволяет дополнительно выявить множество неизвестных минорных белков ММЖГ (рис. 5.8), структуру и функции которых еще только предстоит установить.

Несмотря на то, что белки супернатанта составляют до 20% от всех белков ММЖГ, эта фракция исследована в гораздо меньшей степени. Идентификация компонентов супернатанта строилась на сравнении электрофоретической подвижности, характеристик взаимодействия с красителями и ограниченным числом специфических антител [16, 18, 52, 54]. Основными компонентами этой фракции являются MUC1, XDH/XO, PAS 6/7, FABP, ADPH (рис. 5.7, треки 2, 4, 6).

Поскольку обнаруживаемые в супернатанте XDH/XO, PAS 6/7 и FABP не содержат в своей структуре гидрофобных (трансмембранных) доменов, они считаются периферическими белками ММЖГ [28, 55, 56], которые хоть и связаны с фосфолипидным бислоем, но в основном контактируют с водной фазой и отделяются от ММЖГ в процессе выделения [16]. Предполагается, что супернатантные XDH/XO, PAS 6/7 и FABP идентичны белкам фракции ММЖГ, однако строгих доказательств этого в настоящее время не существует.

5.5. Муцин 1 (MUC1)

Муцин 1 (MUC1) – интегральный белок мембраны молочной жировой глобулы большинства жвачных, грызунов и приматов [22, 45]. Благодаря высокому содержанию углеводов (сахаров), муцины окрашиваются PAS-реагентами [57] и модифицированными серебряными красителями [58], но практически не выявляются универсальным белковым красителем – СВВ [16, 59–61]. При ДСН-электрофорезе белков ММЖГ в 8% ПААГ, муцин 1 – мигрирует как белковая полоса с $M_r > 200 \text{ кДа}$, интенсивно окрашиваемая PAS-реагентом (рис. 5.7, треки 3, 4). Название «муцин» происходит от латинского *mucus* – слизь.

Для обозначения муцинов коровы (и человека) использовались различные термины, которые отражали электрофоретическую подвижность или характер взаимодействия с моноклональными антителами и красителями (табл. 5.1). В ретроспективе использование электрофоретического поведения в качестве критерия идентификации муцина следует признать неудачным, поскольку полиморфные формы MUC1 в препаратах ММЖГ от гетерозиготных животных получали разные номера на том основании, что их считали разными гликопротеинами (например, полосы I и II в работе [33], скорее всего, были просто разными генетическими формами MUC1). В ходе расшифровки генома человека номенклатура муцинов и муцин-подобных гликопротеинов была упрощена: гены муцинов и кодируемые ими белки получали номенклатурные «имена» по порядку открытия и описания: MUC1, MUC2 и т.д. Вслед за практикой, сложившейся при картировании генов человека, Комитет по номенклатуре белков молока ADSA (American Dairy Science Association), рекомендовал распространить эту процедуру на муцины коровы, а название MUC1 закрепить за основным высокомолекулярным гликопротеином (муцином) ММЖГ [16].

В ММЖГ коровы преобладает муцин 1, родственный белку мембраны жировых глобул молока человека [45, 62]. Отличительной особенностью молекулярного строения MUC1 в ряду млекопитающих является наличие одиночного «анкерного» трансмембранного участка, ответственного за связывание с плазматической мембраной, высокогликозилированного экзоплазматического домена, который содержит варьирующее число tandemных повторов и короткого цитоплазматического «хвоста» (рис. 5.9) [45, 62, 63].



Рис. 5.9. Схематическое изображение структуры муцина 1 (по данным [16]). Условные обозначения: SS – сигнальная последовательность; TR – tandemные повторы; exo – эктоплазматический (внеклеточный) домен; TM – трансмембранный домен («анкерный» участок); cyto – цитоплазматический домен; C – C-терминальный конец; N – N-терминальный конец

Коровий MUC1 идентифицируется в ДСН-электрофоретическом профиле протеинов ММЖГ как окрашиваемая PAS или серебром белковая полоса (или полосы), мигрирующие в 6–8% ПААГ, с наименьшей скоростью (рис. 5.7, треки 1, 3). Вследствие аллельного полиморфизма MUC1 могут проявляться в виде диффузной полосы окрашенного материала в образцах пулированного (смешанного, сборного) молока от нескольких коров как одна или две отдельные полосы в образцах от индивидуальных животных [58, 64, 65].

Каждая аллель MUC1 кодирует tandemные повторяющиеся последовательности из 20 аминокислот, различной длины (у большинства людей, населяющих Северную Европу, – от 21 до 125 tandemных повторов [66]). Аллели экспрессируются кодоминантно, так, что под контролем каждого гена синтезируется одинаковое количество белков [64]. В 4–6% ПААГ, муцин 1 гомозигот движется одной полосой, а две полиморфные формы гетерозигот четко разделяются на две полосы (рис. 5.10) [58].

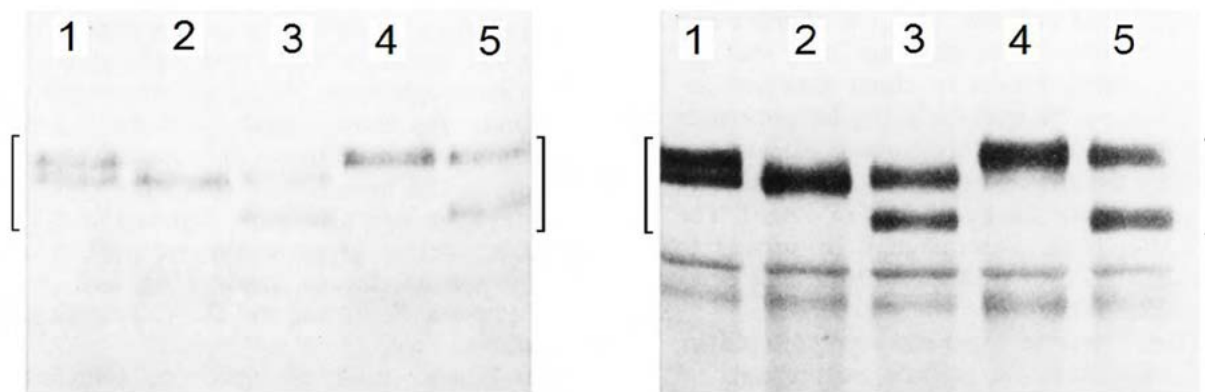


Рис. 5.10. Фракционирование коровьего муцина (MUC1) из ММЖГ от 5 индивидуальных животных породы Holstein, методом ДСН-электрофореза [58]. Белки разделяли в 6% ПААГ и окрашивали красителем PAS (периодная кислота / основание Шиффа) (левая панель, 100 мкг белка/трек) и серебром (правая панель, 20 мкг белка/трек). Полиморфные формы муцина выделены квадратными скобками, треки 1, 3, 5 – гетерозиготные особи, треки 2, 4 – гомозиготные

У коров породы US Holstein идентифицировано пять аллелей гена MUC1 с ММ ~160–200 кДа [67, 68]. В пулированном молоке большинства коммерческих пород преобладают муцины с ММ ~177–189 кДа [68]. Животные пород Jersey, Ayrshire, Brown Swiss экспрессируют две преобладающие формы MUC1 с ММ ~170 кДа и ~200 кДа [65]. В ММЖГ итальянских пород коров идентифицировано пять аллелей муцина 1 с ММ от ~120 до ~220 кДа [69]. Таким образом, MUC1 может рассматриваться как удобный полиморфный маркер для генотипирования сельскохозяйственных животных как на геномном, так и на белковом уровне [67].

Высокая степень полиморфизма муцина 1 подтверждена при исследовании методом ПЦР геномной ДНК, полученной от 630 коров различных пород. Для участков гена MUC1, кодирующих тандемные повторы, идентифицировано 9 аллельных вариантов, охватывающих от 7 до 23 повторяющихся последовательностей, каждая из которых кодирует по 20 аминокислот. Наиболее распространенными являются три аллели: G, E и D – с количеством тандемных повторов – 11, 14 и 16 соответственно (рис. 5.11). Статистический анализ указывает на наличие слабой зависимости между вариантом аллели и содержанием соматических клеток, а также концентрацией белка и жира в молоке коров породы Holstein-Friesian [70].

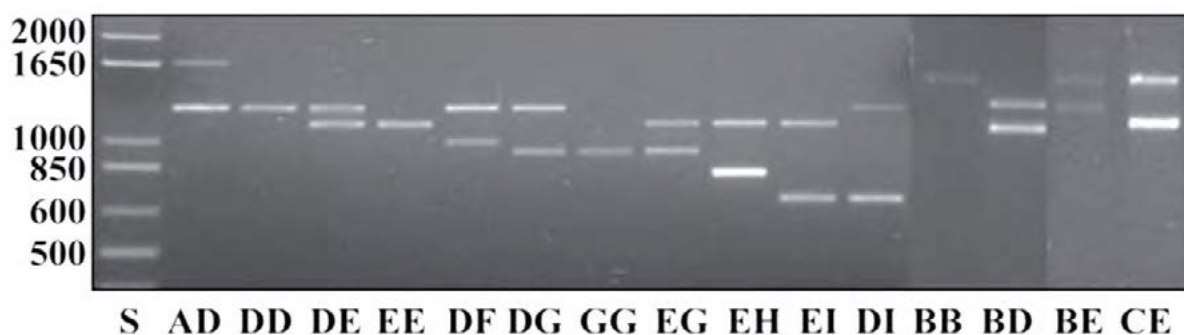


Рис. 5.11. Генетические варианты аллелей, кодирующих тандемные последовательности MUC1 коровы [70]. Представлены результаты электрофореза амплифицированных ПЦР-продуктов препаратов геномной ДНК, полученных от индивидуальных животных. Индивидуальные аллели обозначены латинскими буквами от А до I. Каждый электрофоретический трек соответствует генотипу индивидуального животного. Буквой S указан трек ДНК-маркеров в диапазоне 2000–500 пар оснований

Последовательности тандемных повторов в гене MUC1 (а также в генах других муцинов) локализованы, как правило, в гипервариабельных «минисателлитных» участках ДНК и являются редким примером полиморфных последовательностей, которые, тем не менее, транскрибируются и транслируются [56, 62].

Каждый тандемный повтор в молекуле коровьего MUC1 имеет ММ 2055 Да [62] и несет эквивалентное количество углеводов [58, 68]. Размеры аллелей, идентифицированных у коров породы Holstein, указывают на то, что молекулы MUC1 у этой породы содержат от 25 до 35 тандемных повторов, их вклад в общую ММ может составлять ~100–145 кДа (ММ полиморфных форм MUC1 у животных породы Holstein составляет ~156–193 кДа) [68].

Основным сырьем для получения MUC1 служат сливки или фракция мембран обезжиренного молока. Среднее содержание этого белка в молоке коровы составляет ~40 мг/л [45]; в молоке человека муцина 1 намного больше (в группе из 41 добровольца его концентрация составила 729–805 мг/л) [72]. Такие технологические операции, как охлаждение и перемешивание молока, приводят к частичному высвобождению MUC1 из жировых глобул.

При определенных условиях MUC1, который считается периферическим мембранным белком, ведет себя как растворимый протеин. Кроме того, описаны формы MUC1, лишенные мембранного «анкера» [16]. Возможно, поведение MUC1 как растворимого белка объясняется наличием нитчатых мембранных структур (филаментов) на поверхности секретируемых жировых глобул [45, 73]. Филаменты выступают над поверхностью ММЖГ и при различных физико-химических воздействиях могут отрываться от поверхности глобулы. Оторвавшиеся филаменты, содержащие MUC1, могут быть выделены из супернатантной фракции как «растворимый» муцин 1. Известно, что в сыром коровьем молоке, хранившемся в течение ночи, значительная часть MUC1 переходит в сыворотку [73]. Этим же, вероятно, объясняется и боль-

шая концентрация MUC1 в супернатанте, по сравнению с мембранами, при выделении ММЖГ из «масляного молока» (сравните треки 3 и 4 на рисунке 5.7).

Несмотря на большой массив данных о физико-химических свойствах MUC1, его биологические функции не ясны. Муцины экспрессируются на апикальной мембране многих типов эпителиальных клеток [22, 45, 58, 61, 74, 75]. Молекулы муцина 1 включаются в ММЖГ в процессе отпочковывания жировых капель от апикальных плазматических мембран секреторных клеток молочной железы. Экзоплазматический домен MUC1 выступает над поверхностью апикальной мембраны на 0,2–0,5 мкм. Считается, что благодаря этому MUC1 защищает поверхность секреторной клетки от физического повреждения [45, 73, 76–79]. Кроме того, MUC1 может играть иммунопротекторную роль путем связывания и изолирования патогенных микробов в кишечнике новорожденного, питающегося молоком [73, 78, 80]. В настоящее время объектом пристального внимания является MUC1 человека, поскольку экспрессия этого белка (как в нормальной форме, так и с нарушениями в степени гликозилирования) многократно усиливается при раке молочной железы, что связывают с возможностью модулирования иммунного ответа при развитии опухоли [60, 63, 76, 81–84].

В последнее десятилетие появились данные, свидетельствующие о том, что MUC1 является важным компонентом врожденного иммунного ответа, который снижает тяжесть протекания респираторных вирусных инфекций [85, 86]. *In vitro* очищенный коровий MUC1 связывает флюоресцентно меченные клетки *Escherichia coli* (штамм K-12) и ингибирует их взаимодействие с эпителиальными клетками молочной железы. Показано, что липополисахариды клеточной стенки бактерий значительно усиливают экспрессию MUC1 эпителиальными клетками молочной железы. Таким образом, MUC1 можно рассматривать как индуцибельный иммунноэффектор и важный компонент системы защиты эпителиальных клеток молочной железы и кишечника новорожденного от бактериальной инвазии [70].

Предполагалось, что MUC1 участвует в образовании тканевых микроканалов и полостей в процессе эмбриогенеза [74]. Возможно, выступающие экзоплазматические домены MUC1 создают стерические препятствия для межклеточных контактов, что приводит к уменьшению адгезии эпителиальных клеток [77]. В то же время мыши с «нокаутированным» геном MUC1 нормально развиваются и репродуцируются без каких-либо заметных фенотипических нарушений [87].

Высокогликозилированные белки и, в частности, MUC1 – являются важными элементами слизистого противомикробного барьера, что обусловлено их способностью конкурентно ингибировать связывание патогенных микроорганизмов с эпителиальными клетками кишечника [80, 88]. Установлено, что MUC1 участвует в защите слизистой оболочки желудка от колонизации *Helicobacter pylori* и подавляет инфекции, вызванные кампилобактериями (*Campylobacter jejuni*) [89, 90]. В экспериментах *in vitro* показано, что препараты коровьих молочных жировых глобул, богатые муцином 1, и очищенный MUC1 вызвали дозозависимое ингибирование адгезии *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (серотип *Typhimurium*), *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* к клеткам кишечного эпителия человека. В наибольшей степени антиадгезионный эффект MUC1 проявлялся по отношению к Грам(-) микроорганизмам [88]. Эти данные указывают на перспективу использования препаратов коровьего MUC1 в качестве функциональных пищевых компонентов для предотвращения кишечных заболеваний, вызываемых грамотрицательными энтеропатогенами.

Структура кДНК и а.к. последовательность MUC1 коровы расшифрованы в 2001 г. [91]. Первичная структура MUC1 *Bos taurus*, а также дополнительная информация о свойствах этого белка размещены в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8WML4/entry>). Идентификационный номер коровьего MUC1 – Q8WML4 (MUC1_BOVIN) [92].

Полипептидная цепь муцина 1 состоит из 580 а.к. остатков и имеет вычисленную ММ (без учета посттрансляционных модификаций), равную 58,092 кДа. Белок синтезируется в виде предшественника – пре-MUC1 (рис. 5.12). Структура коровьего MUC1 включает в себя: N-терминальный сигнальный пептид, состоящий из 22 а.к., внеклеточный домен (фрагмент 23-489) с повторяющимися тандемными последовательностями, короткий трансмембранный (гидрофобный) домен (фрагмент 490–510), называемый также мембранным «анкером», и цитоплазматический домен (фрагмент 511–580).

10	20	30	40	50	60
MTPDIQAPFL	SLLLFPVLT	VANVPTLTTS	DSINPRRTTP	VSTTQSSPTS	SPTKETSWST
70	80	90	100	110	120
TTTLLTASSP	APSPAA ^{SPGH}	DGASTPTSSP	APSPAASPGH	DGASTPTSSP	APSPAASPGH
130	140	150	160	170	180
DGASTPTSSP	APSPAASPGH	DGASTPTSSP	APSPAASPGH	NGTSSPTGSP	APSPAASPGH
190	200	210	220	230	240
DGASTPTSSP	APSPAASPGH	NGTSSPTGSP	APSPAASPGH	DGASTPTSSP	APSPAASPGH
250	260	270	280	290	300
NGTSSPTGSP	APSPTASPGH	DSAPSLTSSP	APSPTASPGQ	HGASSPTSSD	TSSMTTRSMS
310	320	330	340	350	360
SSMVTSAHKG	TSSRATMTPV	SKGTPSSVPS	SETAPTAASH	ITRTAASSPS	IALSTSSNPK
370	380	390	400	410	420
TSQQLSVRVS	LYFLSFRITN	LQFN ^{SSLENP}	QTSYYQELQR	SIWGLILQIY	KQRDFLGLSE
430	440	450	460	470	480
IKFRPGSVVV	ELTLAFREGT	TAEWVKAQFS	QLEAHAASY ^N	LTISGVSVYS	APFPSSAQAG
490	500	510	520	530	540
SGVPGWGIAL	LVLVCVLVAL	AIYYLIALVV	CQCGRKKCEQ	LDVFPTLDAY	HPMSEYSTYH
550	560	570	580		
THGRYVPPGS	TKRSPYEEVS	AGNGGSNLSY	TNLAATSANL		

Рис. 5.12. Первичная структура **пре-муцина 1** коровы [92]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид (Met1-Ala22), желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого MUC1. Красным шрифтом выделена последовательность внеклеточного домена (Asn23-Ala489), черным подчеркнутым – трансмембранного (Leu490-Val510) домена, черным – цитоплазматического (Cys511-Leu580) домена. Бирюзовым фоном выделены сайты потенциального фосфорилирования, лиловым – S-пальмитоилированные остатки Cys, синим фоном обозначены сайты потенциального N-гликозилирования, черным – сайты потенциального O-гликозилирования. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Посттрансляционный процессинг включает в себя удаление сигнального пептида, фосфорилирование Tyr530, Tyr539, Tyr545, Tyr556, Tyr570, Thr551, Ser554, липидирование (S-пальмитоилирование) Cys511 и Cys513, N-гликозилирование остатков Asn161, Asn201, Asn241, Asn384, Asn460 и O-гликозилирование боковых групп Ser73, Ser77, Ser84, Thr85, Thr87, Ser88, Ser89 [92]. Отметим, что все данные о ПТМ MUC1 коровы являются предположительными, т.е. сделаны «по аналогии» – на основании сходства структуры, или а.к. последовательности с муцинами других видов млекопитающих [92].

В настоящее время полностью установлены структуры генов MUC1 коровы, козы, овцы, речного буйвола, человека [91, 93–95], гиббона [62], мыши [96], кролика, хомяка, морской свинки [16] и некоторых других видов позвоночных животных (<https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=MUC1>). Сравнение а.к. последовательностей MUC1 в ряду млекопитающих указывает на то, что наиболее консервативными участками являются трансмембранные и цитоплазматические домены: межвидовая гомология этих участков составляет примерно 90% [62, 94].

Цитоплазматический домен несет граничащую с трансмембранным «анкером» консервативную последовательность Cys511-Gln512-Cys513, которая участвует в белок-белковых взаимодействиях и, по-видимому, необходима для экспрессии MUC1 на поверхности эпителиальной клетки [97, 98]. Кроме того, цитоплазматический домен MUC1 включает в себя несколько сайтов фосфорилирования по остаткам Ser, Thr и Tug (рис. 5.12) при участии специфических протеинкиназ [71, 97, 99]. Показано, что фосфорилирование цитоплазматического домена может регулировать связывание MUC1 с белками цитоскелета [100, 101]. Несколько остатков Tug цитоплазматического участка MUC1 входят в состав последовательностей, ответственных за взаимодействия с сигнальными киназами и линкерными белками. Это позволяет предполагать, что MUC1 выполняет функции сигнального рецептора [62, 96, 97].

Участок MUC1, содержащий tandemные повторы, доминирует в экзоплазматическом домене и имеет очевидное функциональное значение – в нем расположены основные сайты гликозилирования. Tandemные повторы MUC1 рассматриваются как модулирующие участки, способные ковалентно связывать большие количества карбогидратов [16].

Повторяющиеся tandemные последовательности в коровьем MUC1 состоят из 20 аминокислот и имеют структуру: APSPAASPGH DGASTPTSSP. Высокое содержание в tandemных повторах пролина (20-25%), указывает на то, что эти участки могут иметь особенную пространственную организацию, так называемую, «поли(L-пролин) II (PP II) спираль», характерную для белков с нативно-неупорядоченной структурой, к которым, например, относятся казеины [102]. Спираль типа PP II не образует водородных связей, поэтому протяженные участки полипептидной цепи, несущие остатки Pro, придают белковой молекуле пластичные, подвижные свойства и делают пространственную структуру белка более открытой, или «рыхлой» [102–104].

По-видимому, при изучении трехмерной структуры MUC1 мы сталкиваемся с теми же проблемами, что и в случае казеинов (см. главу 1 «Номенклатура и свойства казеинов»). Данные о результатах исследования MUC1 коровы методами рентгеноструктурного анализа отсутствуют в базе UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8WML4/entry#structure>). За исключением трансмембранного домена и участка Val369-Ser470, формирующего несколько α -спиралей и β -складок, трехмерная структура пре-MUC1 коровы, предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q8WML4>) с очень низкой достоверностью (рис. 5.13).

Молекула коровьего MUC1 содержит ~50% (вес/вес) карбогидратов, основными из которых являются фукоза, галактоза, манноза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин и сиаловая кислота [105]. Именно высоким содержанием сиаловой кислоты объясняется низкая изоэлектрическая точка MUC1 ($pI < 5,0$) [33]. Основная часть сахаров ковалентно присоединяется к R-группам Ser и Thr, входящих в состав tandemных повторов. Кроме того, как минимум один сайт N-гликозилирования может быть расположен на границе между экзоплазматическим доменом и трансмембранным «анкером» [16]. Исследование высокоочищенного MUC1 из коровьего молока указывает на высокую степень гликозилирования, в первую очередь O-связанным сиализированным T-антигеном – [Neu5Ac($\alpha 2-3$)-Gal($\beta 1-3$)-GalNAc $\alpha 1$] и в меньшей степени N-связанными олигосахаридами.

По данным L. Sando и соавторов, в сумме O- и N-связанные с молекулой MUC1 сахара составляют примерно 60% его молекулярной массы [70]. При анализе MUC1 человека идентифицированы линейные и разветвленные последовательности поли-N-ацетиллактозамина, связанные с полипептидной цепью через остатки N-ацетилгалактозамина [106].

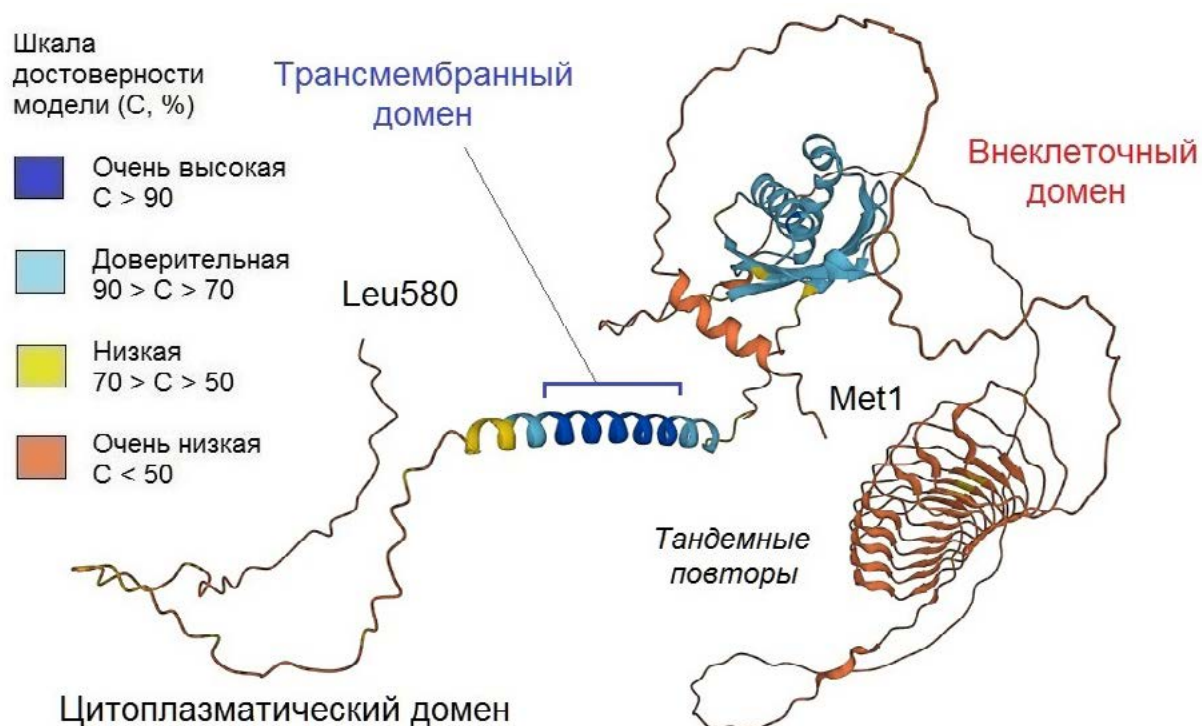
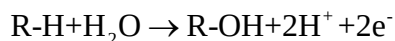


Рис. 5.13. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-MUC1 коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q8WML4>) [21, 22]

5.6. Ксантиндегидрогеназа/оксидаза (XDH/XO)

Ксантиндегидрогеназа/оксидаза – основной компонент белковой полосы, соответствующей ММ ~155 кДа и интенсивно окрашиваемой СВВ при ДСН-электрофорезе белков препаратов мембран МЖГ в 8–12% ПААГ (рис. 5.7, треки 1, 5). До момента окончательной идентификации [46, 56, 107], этому белку присваивались различные номера и наименования (табл. 5.1) [32–37].

Ксантиндегидрогеназа/оксидаза (XDH/XO) – молибденсодержащий, окислительно-восстановительный (редокс) фермент, имеющий комплексную структуру и играющий ключевую роль в деградации пуринов. Катализирует превращение гипоксантина в ксантин и окисление последнего до мочевой кислоты. Способствует образованию активных форм кислорода [1, 2, 16, 108–111]. Субстратами XDH/XO могут быть разнообразные пурины. Реакция, в ходе которой кислород воды встраивается в субстрат, а высвобождаемые восстанавливающие эквиваленты переносятся на редокс-центры XDH/XO, имеет следующий вид:



Молекула XDH/XO – гомодимер, с ММ ≈300 кДа. Мономер (субъединица) состоит из 1332 аминокислотных остатков, его вычисленная ММ равна 146,8 кДа, расчетная pI составляет 7,7. Каждая субъединица несет один Мо-связывающий участок (молибдоптериновый кофактор), два железосерных кластера (2 x [2Fe-2S]) или редокс-центра и одну молекулу кофермента флавинадениндинуклеотида (ФАД) (рис. 5.14). Предполагается, что мономеры XDH/XO каталитически не зависимы и проявляют активность как ксантиндегидрогеназы (EC 1.17.1.4), так и ксантиноксидазы (EC 1.17.3.2). Пурины взаимодействуют с XDH/XO при участии молибдоптеринового и флавинового сайтов, NAD⁺ и кислорода. Кроме того, фермент может «работать» как оксидаза НАДН при участии флавинового кофактора [110, 112–115].

Ксантиндегидрогеназа/оксидаза – один из основных белковых компонентов мембраны МЖГ. Массовая доля XDH/XO составляет ~20% от массы белков ММЖГ [56]. В процессе выделения ~50% XDH/XO обнаруживается в супернатантной фракции [33, 56, 116, 117]. Около 60% фермента, связанного с ММЖГ, может быть выделено с использованием неионных детергентов и солевых растворов с высокой ионной силой [117, 118], при этом остальные 40% остаются в мембране МЖГ.

Такого рода дуализм (растворимость/нерастворимость при одних и тех же условиях) отражает периферическую мембранную природу XDH/XO в секретируемых молочных жировых глобулах. Предположительно, ксантиндегидрогеназа/оксидаза связана с периферическими участками внутренней мембраны МЖГ, происходящей из цитоплазматического листка ЭР (рис. 5.6).

На то, что XDH/XO – именно периферический мембраносвязанный белок, а не транс-мембранный (или «анкерный»), указывает отсутствие длинных последовательностей, богатых неполярными аминокислотными остатками, а также тот факт, что фермент достаточно легко может быть отделен от ММЖГ. Показано, что при охлаждении или встряхивании молока XDH/XO переходит из фракции ММЖГ в молочную сыворотку, где происходит её активация [16].

У млекопитающих XDH/XO существует в двух формах – дегидрогеназы (D-форма) и оксидазы (O-форма). В D-форме восстанавливающие эквиваленты переносятся, главным образом, на НАД⁺, с образованием НАДН + H⁺. Для XDH/XO в D-форме в отсутствие НАД⁺ в роли акцептора электрона может также выступать кислород. Если фермент находится в O-форме, восстанавливающий эквивалент переносится на молекулярный кислород, с образованием перекиси водорода (H₂O₂) и супероксидного радикала (O₂⁻) [16, 108, 119].

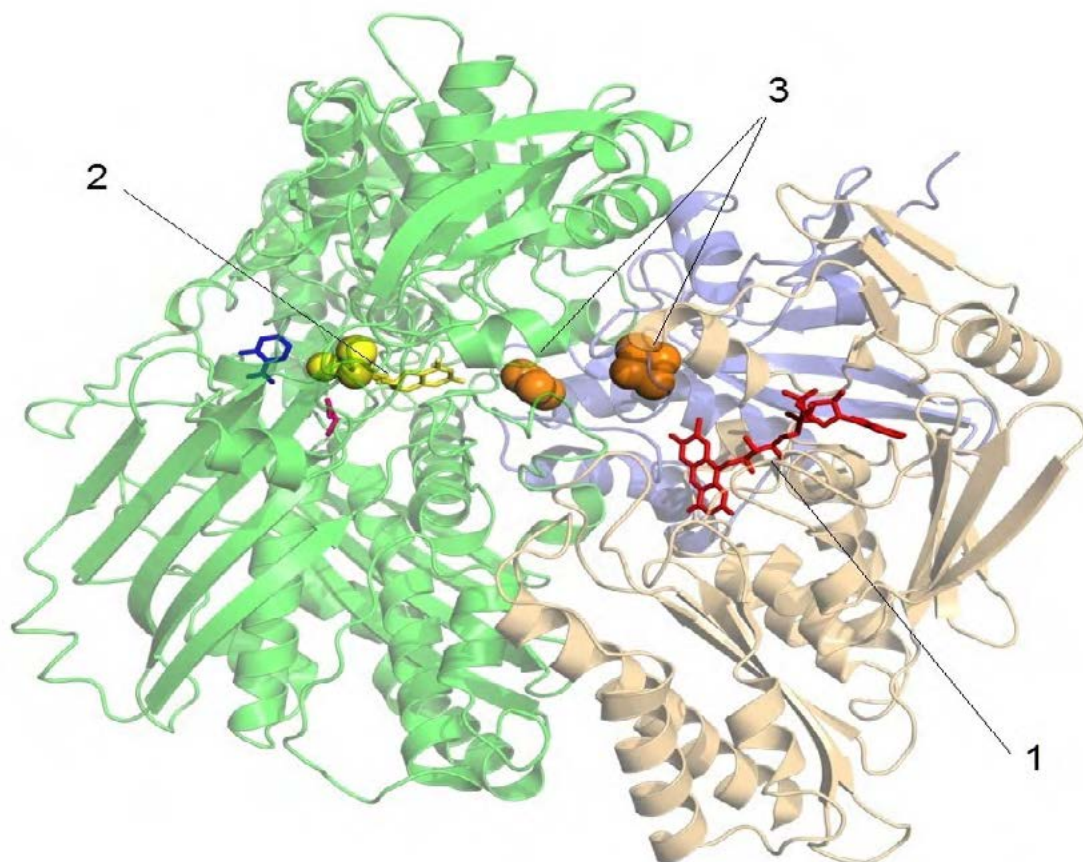


Рис. 5.14. Модель третичной структуры субъединицы ксантиндегидрогеназы/оксидазы коровы с кофакторами и лигандами (по данным [110, 114]). Условные обозначения кофакторов и кластеров: 1 – ФАД (красный); 2 – молибдоптеринный кофактор (желтый); 3 – два кластера [2Fe-2S] (оранжевые)

В тканях млекопитающих фермент экспрессируется преимущественно в виде ксантиндегидрогеназы (D-формы) и превращается в О-форму (ксантиноксидазу) двумя способами: (1) путем ограниченного протеолиза или (2) в результате окисления специфических остатков цистеина [119, 120]. Как правило, в процессе выделения XDH/XO относительное содержание оксидазной формы возрастает за счет окисления остатков Cys кислородом воздуха и образования дисульфидных мостиков. Если оксидазную форму, образовавшуюся за счет окисления SH-групп цистеина, можно превратить в дегидрогеназную, путем добавления тиол-восстанавливающих реагентов, то в результате ограниченного протеолиза фермент превращается в О-форму необратимо [119]. В свежесвыдоенном молоке коровы, относительное содержание оксидазной формы составляет 50–75% [121]. Считается, что относительно высокий уровень О-формы эндогенной XDH/XO молока обусловлен окислением тиоловых групп ксантиндегидрогеназы другим эндогенным ферментом – оксидазой сульфгидрильных групп, ассоциированной с ММЖГ [115, 122, 123].

Известно несколько инактивированных форм XDH/XO. В основном это демоблибдо-форма, образующаяся в результате утраты ферментом атомов Мо, и десульфо-форма, в которой критическая для ферментативной активности сульфо-группа в молибдоптериновом активном центре ($\text{Mo}=\text{S}$), заменена на окси-группу ($\text{Mo}=\text{O}$). Количество демоблибдо-формы, секретируемой в молоко коровы, обратно пропорционально доступности Мо в диете животного. Из-за присутствия неактивных форм (30–40% демоблибдо-формы и 20–30% десульфо-формы), ксантиндегидрогеназа/оксидаза, выделяемая из коровьего молока, может быть больше чем на 60% функционально неактивна [16]. Активная XDH/XO может быть отделена от неактивной десульфо-формы методом хроматографии на Folate-Sepharose 4B [124].

Несмотря на более чем вековую историю изучения [125], физиологические функции XDH/XO до конца не выяснены. У большинства организмов, фермент участвует в заключительных стадиях метаболизма пуриновых азотистых оснований, катализируя окисление гипоксантина до ксантина и ксантина до мочевой кислоты. Исключительная роль XDH/XO в метаболизме пуринов контрастирует с низкой, меньше 50 мкМ, концентрацией мочевой кислоты в молоке. У многих видов млекопитающих фермент широко распространен в клетках и тканях. Значительные количества XDH/XO ассоциированы с мембраной жировых глобул молока, что предполагает существование других функций этого фермента, выходящих за рамки метаболизма пуринов [109, 115]. Поскольку активность фермента является источником перекиси водорода для лактопероксидазной системы, XDH/XO считается одним из компонентов антибактериального комплекса молока [16].

В последнее время тканевая XDH/XO рассматривается как сигнальная молекула, ответственная за генерирование активных форм кислорода, включая перекись водорода (H_2O_2) и супероксидный радикал ($\text{O}_2^{\cdot -}$), а также нитраты и нитриты (NO_3^- и NO_2^-), которые воздействуют на самые разные метаболические мишени, включая факторы транскрипции [109]. Активные формы кислорода являются потенциальными регуляторами экспрессии генов и модуляторами иммунного ответа. Генерируемые при участии XDH/XO активные формы кислорода могут вызывать повреждение клеток и усиливать воспалительный ответ или индуцировать экспрессию генов, кодирующих белки адгезии, клеточные рецепторы и компоненты иммунной системы, которые влияют на регенерацию тканей. Весьма вероятно, что ксантиндегидрогеназа/оксидаза участвует в развитии воспалительных реакций, поскольку экспрессия гена и ферментативная активность XDH/XO регулируется цитокинами и стероидными гормонами [109, 126–132].

Высокая концентрация XDH/XO в ткани молочной железы и в ММЖГ может быть обуслов-

лена тем, что экспрессия гена этого фермента усиливается на поздних стадиях беременности и достигает максимума сразу после родов [131]. Уровень антигена и активности XDH/XO в лактирующей молочной железе коровы является наивысшим, по сравнению с другими органами и тканями, включая печень [16, 133].

Считается, что ксантиндегидрогеназа/оксидаза играет структурно-функциональную роль в формировании ММЖГ за счет связывания цитоплазматического домена бутирофилина (BTN) [134], что приводит к образованию белкового комплекса, взаимодействующего с липидным ядром МЖГ (смотрите раздел, посвященный бутирофилину) [55].

Рассматривая функции XDH/XO в молоке, нельзя не остановиться на парадоксальных случаях наследственной ксантинурии человека, при которой в клетках и тканях фермент полностью отсутствует (антиген XDH/XO не выявляется) [135, 136]. Исследование этого заболевания показало, что оно связано с мутацией, приводящей к сдвигу рамки считывания гена XDH/XO [136]. Во многих случаях наследственная ксантинурия протекает бессимптомно, без видимых нарушений метаболизма пуринов, таких как низкая концентрация мочевой кислоты и высокая концентрация ксантина в сыворотке крови, нарушение работы почек и образование ксантиновых камней [135]. Можно предположить, что если XDH/XO обладает дополнительными функциями, не имеющими отношения к метаболизму пуринов, то должны существовать физиологические механизмы, компенсирующие «выключение» (утрату) этого фермента.

Ограниченный протеолиз трипсином или субтилизином «режет» молекулу ксантиндегидрогеназы/оксидазы на три фрагмента с ММ ~20, ~40 и ~85 кДа (рис. 5.15), которые после протеазной атаки остаются ассоциированными в единый комплекс, распадающийся только в присутствии детергентов и хаотропных агентов [137, 138]. Образующиеся в результате ограниченного протеолиза фрагменты представляют три основных домена XDH/XO.

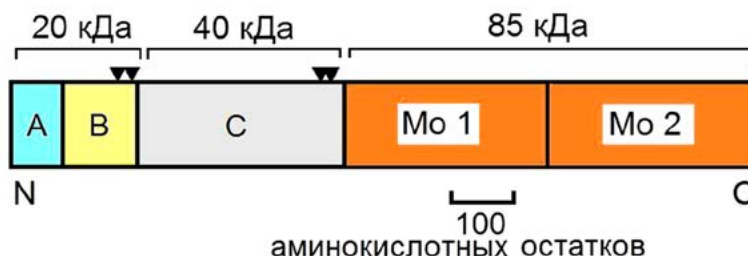


Рис. 5.15. Схематическое изображение структуры субъединицы ксантиндегидрогеназы/оксидазы (XDH/XO) (по данным [16]).

Условные обозначения: А, В – участки N-терминального домена (20 кДа), связывающего железосерные кластеры [2Fe-2S]; С – домен (40 кДа) предполагаемого связывания ФАД и НАД⁺; Мо1 и Мо2 – участки С-терминального домена (85 кДа), ответственные за связывание молибдоптеринового кофактора. Стрелками (▼) указаны сайты протеолиза XDH/XO трипсином

Посттрансляционные изменения XDH/XO изучены не в полной мере. В молекуле ксантиндегидрогеназы/оксидазы не выявлена распознаваемая гидрофобная сигнальная последовательность. Вероятно, это указывает на то, что фермент синтезируется в цитоплазме на свободных полирибосомах [16]. Информация о гликозилировании XDH/XO – отсутствует. Есть данные о том, что с XDH/XO связаны средне- и длинноцепочечные насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты (ЖК) [139]. Вероятно, из-за наличия ацилированных остатков ЖК или в результате модификаций невыясненного генеза XDH/XO из ММЖГ коровы разделяется на несколько микрогетерогенных форм при ИЭФ [33, 54, 140]. Достоверно установленные изоэлектрические точки XDH/XO имеют значения от 6,9 до 7,6 [33], что хорошо согласуется с вы-

численной (по данным а.к. последовательности) pI, равной 7,7 [138].

Препараты ММЖГ коровы содержат минорные полипептидные компоненты с ММ ~130, ~140 и ~90 кДа, которые являются продуктами частичной протеолитической деградации XDH/XO [54,141]. Размеры фрагментов указывают на то, что они образуются в результате ограниченного протеолиза на участках, расположенных между основными доменами фермента. Для точной идентификации сайтов ограниченного протеолиза, а также ответа на вопрос, происходит это *in situ* или *in vitro* в процессе выделения XDH/XO, необходимы дополнительные исследования. Кроме того, в препаратах изолированного и очищенного фермента постепенно накапливаются полипептидные компоненты с ММ ~20, ~40 и ~60 кДа [16, 46].

Полиморфизм гена XDH/XO практически не изучен. В одной ранней работе при исследовании активности XDH/XO в молоке 92 коров породы Guernsey и 39 животных породы Holstein, были идентифицированы две формы энзима – «низко-» и «высокоактивная» [142]. Действительно ли это продукты двух аллельных генов или, в данном случае, авторы просто разделили активную и неактивную (демолибдо- или десульфо-) формы XDH/XO, остается неясным и требует специальных исследований.

Дополнительные сведения о структуре и свойствах XDH/XO можно найти в Главе 4 «Эндогенные ферменты молока».

5.7. Муцин 15 (MUC15), или белок PAS III (PAS III)

Муцин 15 (MUC15), или белок PAS III (PAS III) коровы – малоизученный гликопротеин мембраны МЖГ и супернатантной фракции, который при ДСН-ЭФ мигрирует в виде диффузной полосы с ММ ≈120 кДа (рис. 5.7, трек 3). Поскольку MUC15 (PAS III) содержит большое количество углеводов – около 37%, – этот белок, так же, как и муцин 1, четко выявляется при окрашивании PAS-реагентами, но не связывает СВВ (сравните рис. 5.7, треки 1,2 и 3,4) [16]. Ранее, основываясь на электрофоретической подвижности и особенностях окрашивания, этому белку присваивали несколько различных названий, основным из которых было PAS III [16]. В настоящее время Комитеты по номенклатуре ADSA (American Dairy Science Association) и HUGO (Human Genome Organisation) рекомендуют использовать название MUC 15, а название PAS III может использоваться в качестве альтернативного наименования этого белка [16, 59, 143, 144].

Последовательность а.к. коровьего MUC15 установлена в 2002 г. [144]. Информация о структуре и свойствах этого белка размещена в открытой базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8MI01/entry>). Идентификационный номер MUC15 *B. taurus* – Q8MI01 (MUC15_BOVIN) [143]. Полипептидная цепь муцина 15 состоит из 330 а.к. остатков и имеет вычисленную ММ (без учета ПТМ), равную 35,715 кДа. Белок синтезируется в виде предшественника – пре-MUC15 (рис. 5.16).

Структура MUC15 включает в себя сигнальный пептид, состоящий из 23 а.к., внеклеточный домен (фрагмент 24–232), короткий трансмембранный (гидрофобный) домен (фрагмент 233–253) и цитоплазматический домен (фрагмент 254–330). При процессинге происходит удаление сигнального пептида и N-гликозилирование остатков Asn30, Asn44, Asn54, Asn71, Asn79, Asn89, Asn94, Asn122, Asn138, Asn147, Asn154, Asn162, Asn175, Asn214, Asn221 [143].

ВоткрытойбазеданныхUniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8MI01/entry#structure>) нет информации о результатах исследования MUC15 коровы методами рентгеноструктурного анализа. За исключением пре-фрагмента и трансмембранного домена (Gly233–Gly253), формирующего короткий α-спиральный участок, трехмерная структура пре-MUC15 коровы предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q8MI01>) с очень низкой достоверностью (рис. 5.17). Сравнивая модели трехмерной организа-

ции MUC1 (рис. 5.13) и MUC15, можно предполагать, что структура последнего также является реоморфной.

10	20	30	40	50
MLTSAKILLI	SILSSLLLF	SHGEEGQKT	TTESTAEDLK	TMENQSVPLE
60	70	80	90	100
SKANLTSDKE	NRETSNPKAS	NFSFEDPS	THETGFYS	STDNSSRSPS
110	120	130	140	150
LMPTLSRSP	STHSFVSKLP	WNSSIADNSL	LPASAPP	VPVSSEFTL
160	170	180	190	200
SSIINDTMKAP	DNSSITVSNL	PSGPNTTSVT	PMVTEGWPTT	TRESMEGFTV
210	220	230	240	250
YQETTLHPTL	KFTNSKIFP	NTSDPQEENR	NTGVVFGAIL	GAILGASLLS
260	270	280	290	300
LVGYLLCGKR	KTDSFSHRRL	YDDRNEPVLR	LDNAPEPYDM	SFGNSSYYNP
310	320	330		
TANDSSTSAG	GENAHSIPM	DDIPPLRTSV		

Рис. 5.16. Первичная структура **пре-MUC15** коровы [143]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид, желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого MUC15. Синим фоном обозначены сайты N-гликозилирования. Серым фоном выделена последовательность трансмембранного («анкерного») домена. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

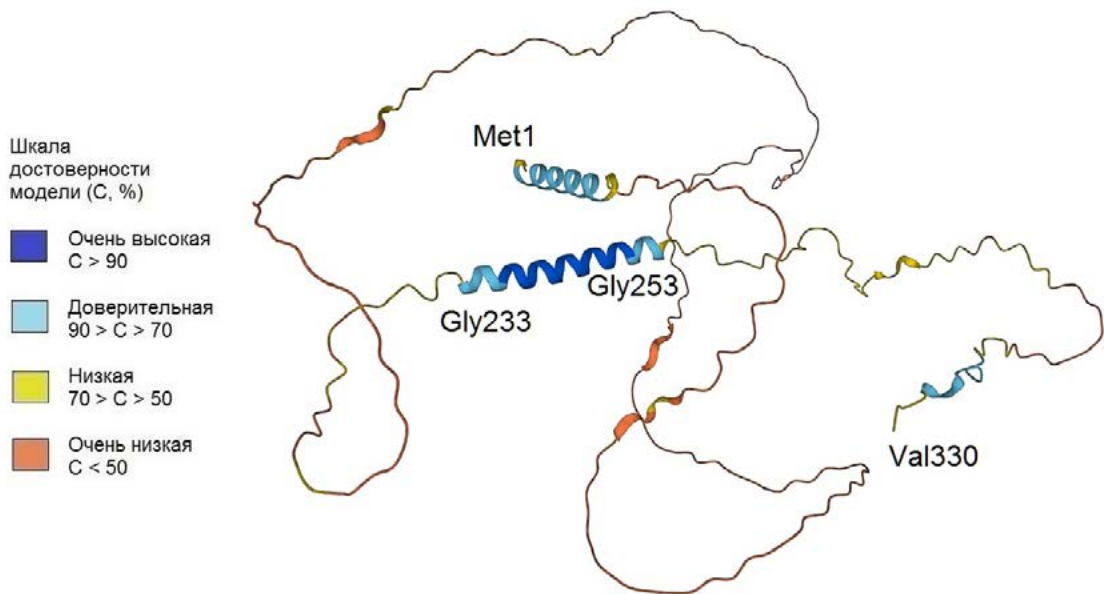


Рис. 5.17. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-MUC15 коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q8WML4>) [21, 22]

Поликлональные и моноклональные антитела, специфически реагирующие с полосой PAS III (MUC15) из молока коровы, связываются с белком аналогичной ММ из ММЖГ козы, но не проявляют специфичности по отношению к белкам мембраны МЖГ человека, лошади и морской свинки. В то же время антитела против PAS III (MUC15) не взаимодействуют с коровым и козьим муцином 1 (MUC1). Это указывает на то, что MUC1 и PAS III не являются родственными белками [47].

Белок PAS III (MUC15) концентрируется на апикальной мембране секреторных клеток молочной железы в прелактационный и лактационный период [22, 47, 144].

Структура и функции MUC15 требуют дальнейшего изучения.

5.8. Кластер дифференцировки 36 (CD36)

Белковый компонент ММЖГ – кластер дифференцировки 36 (CD36) – идентифицируется на ДСН-ПААГ как минорный СВВ-позитивный протеин, с ММ 76-78 кДа (рис. 5.7, трек 1) [38, 48]. Его содержание составляет ~5% от общего количества белков, ассоциированных с мембраной МЖГ [33, 48]. Белок CD36 интегрирован в мембрану МЖГ [145] и может быть выделен из «масляного молока» путем осаждения фракции ММЖГ методом центрифугирования (рис. 5.7, треки 1,3). Из-за высокого содержания сахаров (нейтральные сахара составляют ~24% от массы CD36 [146]) белок эффективно окрашивается PAS-реагентами (рис. 5.7, треки 3,4). Другим эффективным способом визуализации CD36 является применение модифицированных серебряных красителей (рис. 5.8, панель а).

Изначально, коровий CD36 получил несколько альтернативных названий [32–38] (табл. 5.1). В дальнейшем этот белок был безоговорочно идентифицирован как кластер дифференцировки 36 (CD36) [48, 146, 147] и Комитет по номенклатуре ADSA рекомендовал отказаться от ранних названий, основанных на электрофоретической подвижности и характере взаимодействия с красителями [16]. Термин «кластер дифференцировки» (*cluster of differentiation, cluster designation* – англ.; сокращённо – CD) относится к номенклатуре поверхностных мембранных белков (дифференцировочных антигенов) лейкоцитов человека, предложенной в 1982 г.

В 1985 г. этот протеин был выделен из коровьего молока как интегральный белок мембраны МЖГ – PAS IV [38], и лишь позднее, в 1990 г., идентифицирован как CD36, путем сравнения с аутентичными белками (CD36) из сердечной мышцы быка и тромбоцитов человека [48, 147]. С использованием моноклональных антител человеческий CD36 распознан как дифференцирующий антиген (кластер дифференцировки) моноцитов и тромбоцитов [148]. Исследования с применением моно- и поликлональных антител, позволили установить, что CD36 – широко распространенный белок мембраны моноцитов, макрофагов, эритробластов, тромбоцитов, эндотелиальных клеток капилляров [148–151], адипоцитов [152], эпителиальных клеток молочной железы [38], а также различных культур клеток [145].

Аминокислотная последовательность CD36 из мембраны МЖГ коровы установлена в 1996 г. [146]. Первичная структура и дополнительная информация о свойствах CD36 коровы размещены в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P26201/entry>). Идентификационный номер CD36 *B. taurus* – P26201 (CD36_BOVIN) [153]. Полипептидная цепь CD36 состоит из 472 а.к. остатков и имеет вычисленную ММ, равную 52,940 кДа.

В *de novo* синтезированном CD36, по-видимому, отсутствует сигнальная последовательность. Тем не менее, можно считать, что белок синтезируется в виде пре-CD36, поскольку при ПТМ происходит удаление N-концевого Met (рис. 5.18) [146]. Другие ПТМ включают в себя липидирование (S-пальмитоилирование) Cys3, Cys7, Cys464 и Cys466, N-гликозилирование остатков Asn79, Asn102, Asn172, Asn205, Asn235, Asn247, Asn321, Asn417 и образование трех дисульфидных связей – Cys243-Cys311, Cys272-Cys333 и Cys313-Cys322 [153]. Изоэлектрическая точка CD36 равна 7,93 [16]. Анализ аминокислотной последовательности и мембранной топологии белков семейства CD36 позволил выявить несколько характерных особенностей [145].

Структура CD36 содержит несколько топологических доменов (здесь и далее – нумерация последовательности пре-CD36): два коротких цитоплазматических (Gly2-Cys7 и Ser462-Asn472), два спиральных трансмембранных (Gly8-Val29 и Leu440-Ile461) и один протяженный экстрацеллюлярный (Gly30-Asn439) (рис. 5.19) [153].

Таким образом, вблизи N- и C- терминальных концов полипептидной цепи CD36 имеются непрерывные протяженные участки гидрофобных R-групп. Поскольку мутантная фор-

ма CD36, лишенная С-терминальной гидрофобной последовательности остается связанной с ММЖГ, очевидно, что N-терминальный гидрофобный участок является трансмембранным «анкером» [154].

10	20	30	40	50	60
<u>M</u> G <u>C</u> NRN <u>C</u> GLI	AGAVIGAVLA	<u>V</u> FGGILMPVG	DMLIEKTIKK	EVVLEEGTIA	FKNWVKTGTD
70	80	90	100	110	120
VYRQFWIFDV	QNPDEVTVNS	SKIKVKQRGP	YTYRVRYLAK	<u>E</u> NITQDPETH	TVSFLQPNGA
130	140	150	160	170	180
IFEPSLSVGT	EDDTFTILNL	AVAAAPQLYP	NTFMQGILNS	FIKKSKSSMF	<u>Q</u> NRTLKELLW
190	200	210	220	230	240
GYTDPFLNLV	PYPITTTIGV	FYPY <u>N</u> NTADG	IYKVFNGKDD	ISKVAIIDTY	KGRK <u>N</u> LSYWS
250	260	270	280	290	300
SY <u>C</u> DLI <u>N</u> GTD	AASFPPFVEK	TRVLQFFSSD	<u>I</u> CRSIYAVFG	AEINLKGPV	YRFILPSFAF
310	320	330	340	350	360
ASPFQNPDNH	<u>C</u> FCTEKIISK	<u>N</u> CTLYGVLDI	GKCKEGKPVY	ISLPFLHGS	PELAEPISL
370	380	390	400	410	420
SPNEEEHSTY	LDVEPITGFT	LRFKRLQVN	MLVKPAKKIE	ALKNLKHNYY	VPILWL <u>N</u> ETG
430	440	450	460	470	
TIGDEKAEMF	RNQVTGKINL	LGLVEIVLLS	VGVMFIAFM	ISY <u>C</u> ACRSKR	VN

Рис. 5.18. Первичная структура **пре-CD36** коровы [153]. Зеленым фоном выделен иницирующий Met1, желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого белка. Подчеркнутым шрифтом выделены последовательности N- и С-концевых трансмембранных доменов. Бирюзовым фоном выделены остатки Cys, образующие дисульфидные связи, красным – липидированные (S-пальмитоилированные) остатки Cys, синим фоном обозначены сайты N-гликозилирования. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

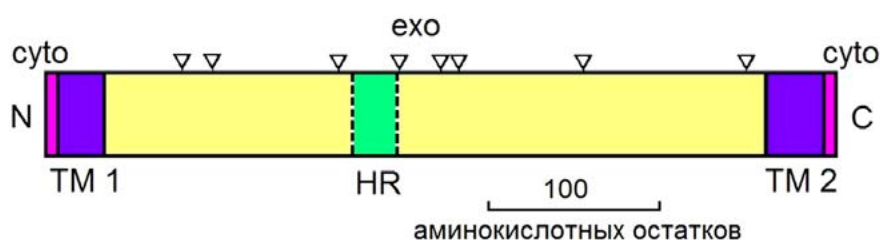


Рис. 5.19. Схема структуры кластера дифференцировки 36 (CD36) [16, 145]. Условные обозначения: TM 1 и TM 2 – трансмембранные домены; экзо – эктоплазматический домен; HR – гидрофобный участок; cyto – короткие цитоплазматические хвосты; сайты N-гликозилирования (последовательности Asn-X-Ser/Thr) коровьего CD36 указаны треугольными стрелками

В базе данных UniProt отсутствуют данные об исследовании CB36 коровы методами рентгеноструктурного анализа (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P26201/entry#structure>). За исключением коротких цитоплазматических участков трехмерная структура пре-CB36 коровы, предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0 [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P26201>) с достоверной и очень высокой достоверностью (рис. 5.20).

Выдвигалось предположение, что гидрофобный N-терминальный фрагмент выполняет не только роль трансмембранного участка, но и является не удаленной сигнальной последовательностью [48], которая «направляет» полипептидную цепь CD36 к мембране эндоплазматического ретикула в процессе синтеза этого белка. Тогда С-терминальная гидрофобная последовательность может играть роль сигнала остановки переноса (*stop-transfer signal*, англ.).

Остатки Cys3 и Cys7 на N-конце и Cys464 и Cys466 на С-терминальном участке CD36 пальмитоилированы [153, 154] при участии ацилтрансферазы, являющейся цитоплазматическим ферментом [155]. Это позволяет сделать вывод о том, что N- и С-терминальные концы мо-

лекулы CD36 обращены к цитоплазме секреторной клетки, и оба они являются мембранными «анкерами» [154]. В пользу такого предположения следует отнести тот факт, что большинство белков семейства CD36 связаны с плазматическими мембранами как шпилькообразные структуры, с двумя трансмембранными «точками крепления», короткими цитоплазматическими участками и протяженными эктоплазматическими доменами [16].

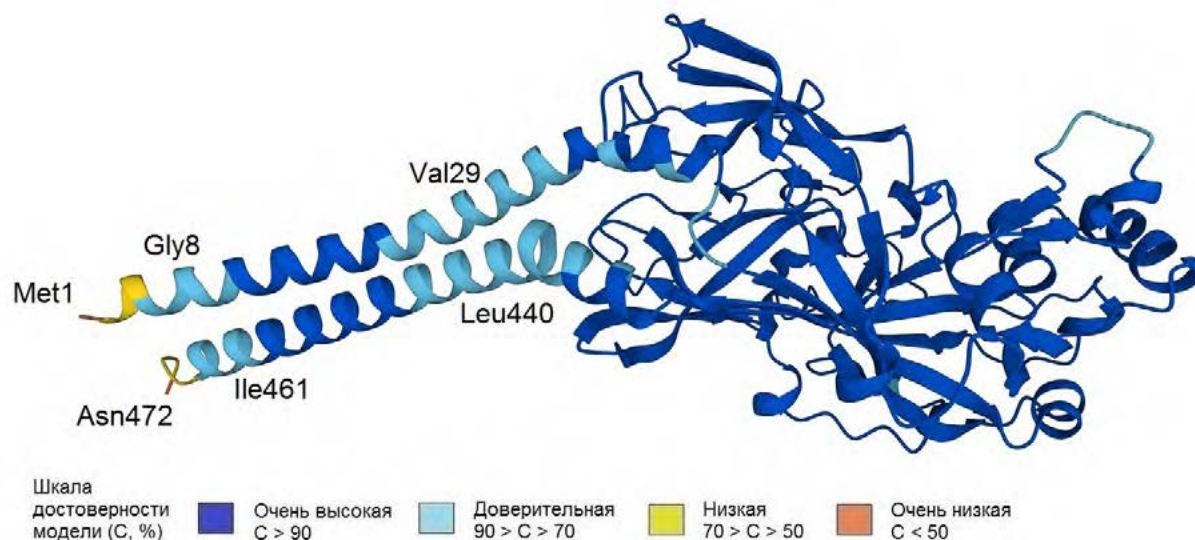


Рис. 5.20. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-CD36 коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q8WML4>) [21, 22]. Показаны а.к. остатки, ограничивающие трансмембранные («анкерные») топологические домены (Gly8-Val29 и Leu440-Ile461)

Эктоплазматический домен CD36 содержит несколько консервативных последовательностей, состоящих из неполярных аминокислотных R-групп, которые могут формировать гидрофобные «карманы» в молекуле зрелого белка. Возможно, что одна из таких последовательностей – Leu178-Tyr204 – контактирует с эктоплазматической стороной липидной бислойной мембраны [145, 146]. Участок Leu178-Tyr204 условно делит эктоплазматический отрезок полипептидной цепи CD36 на два функциональных домена: N- и C-терминальный. N-терминальный домен несет консервативный участок, ответственный за связывание тромбоспондина-1 (адгезивный гликопротеин опосредует межклеточные взаимодействия) [156] и не содержит остатков цистеина. C-терминальный домен содержит последовательность Cys243-Pro412, богатую Pro, на которой также находятся все 6 эктоплазматических остатков цистеина [145]. Тромбоспондин-узнающий мотив (последовательность) N-терминального домена включает в себя короткий участок Gly89-Pro-Tyr-Thr-Tyr-Arg94, взаимодействующий с протеинкиназой C. Предполагается, что фосфорилирование Thr92 ингибирует связывание тромбоспондина с CD36 [156].

В молекуле CD36 коровы шесть остатков цистеина образуют три внутримолекулярных дисульфидных мостика. Считается, что образование внутримолекулярных -S-S- связей необходимо для экспорта CD36 из эндоплазматического ретикулума и внутриклеточного транспорта по аппарату Гольджи к плазматической мембране [157, 158].

Все белки семейства CD36 млекопитающих несут две очень короткие цитоплазматические N- и C-терминальные последовательности, каждая из которых содержит по два остатка Cys [16]. Цитоплазматические отрезки CD36 разных видов могут варьировать по длине и аминокислотному составу. Два остатка Cys, расположенные на C-терминальной части, входят в состав специфического мотива, – Cys-X-Cys (где X – любая аминокислота), ответственного за связывание тирозинкиназы, молекула которой также несет два близко расположенных остат-

ка цистеина. Связывание тирозинкиназы и CD36 осуществляется за счет координации четырех R-групп Cys (по две в каждом белке) ионом металла [159].

Одной из особенностей экзоплазматического домена CD36-родственных белков является большое количество сайтов гликозилирования. В молекуле коровьего CD36 насчитывается 8 сайтов потенциального N-гликозилирования на последовательностях Asn-X-Ser/Thr (рис. 5.18). Значительное число N-связанных карбогидратов предохраняет белки семейства CD36 от протеолитической деградации лизосомальными ферментами [145]. В тромбоцитах человека и ММЖГ коровы CD36 гликозилированы, соответственно, на 26 и 24% [16, 146]. Межвидовые различия в ММ CD36 могут объясняться именно различным содержанием N-связанных карбогидратов [48, 146]. Удаление остатков сахаров с использованием эндогликозидазы F приводит к снижению ММ CD36 человека и коровы с 76–88 кДа до 57 кДа [48], которое в наибольшей степени соответствует значению 53 кДа, вычисленному по аминокислотной последовательности [16, 48, 146].

Гликаны, связанные с молекулами CD36 из ММЖГ коровы, достаточно полно охарактеризованы. По данным N. Nakata и соавторов, одна молекула коровьего CD36 содержит шесть молей Asn-связанных карбогидратов [160]. В то же время анализ 8 пептидов, содержащих сайты потенциального связывания карбогидратов, показал, что каждый из них – гликозилирован [146]. Следовательно, все сайты потенциального гликозилирования могут нести остатки сахаров, тем не менее, пул CD36 микрогетерогенен по содержанию карбогидратов. Гликаны, входящие в состав CD36 из ММЖГ коровьего молока, представлены маннозой, а также сложными сахарами, содержащими гибридные и комплексные цепи, состоящие из 2-х, 3-х и 4-х ветвей, многие из которых несут остатки сиаловой кислоты [16, 160]. Около 28% аспарагин-связанных гликанов, выделенных из CD36 коровы, являются структурами типа GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc. Карбогидратные последовательности такого состава выделены из других гликопротеинов коровы, в частности, из протеинов ММЖГ – бутирофилина и белка PAS 6/7 [28, 161, 162]. Содержание терминальных структур типа GalNAc в гликанах, связанных с CD36 и другими гликопротеинами молока коровы, возрастает на ранних стадиях лактации, по двум причинам: во-первых, из-за сиализации, во-вторых, в силу абсолютного увеличения GalNAc-содержащих карбогидратов [163, 164].

Необычные маннозосодержащие последовательности, обнаруженные в CD36 и других гликопротеинах молочной железы коровы, имеют следующий состав: «стволовые» цепи Mana1 $\rightarrow$ 2Mana1 $\rightarrow$ 3Mana1 $\rightarrow$ 6Man, от которых отходят «ветви» Mana1 $\rightarrow$ 6. В «ветвях» гликаны необычной структуры могут гибридизироваться с карбогидратами типа Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc или GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc [160, 162].

Общий компонентный анализ сахаров, связанных с пептидами CD36, несущими сайты гликозилирования, показывает, что некоторые остатки аспарагина селективно гликозилируются определенными типами олигосахаридов. В сахарах, связанных с остатками Asn205, Asn247 и Asn417, преобладает манноза, реже встречается галактоза или GalNAc. Напротив, боковые группами Asn79, Asn102, Asn172, Asn321 и Asn417, преимущественно гликозилируются остатками GalNAc, к которым через β 1 $\rightarrow$ 4 связи присоединены участки GlcNAc, в комплексе с гибридными олигосахаридными цепочками [146, 160]. Биохимический смысл такого сайт-селективного или сайт-специфического гликозилирования не ясен, и для его объяснения необходимы дополнительные исследования.

В ходе посттрансляционной модификации к остаткам цистеина, локализованным в цитоплазматических участках молекулы CD36, через тиоэфирную связь, присоединяется пальмитиновая кислота. Методом сайт-направленного мутагенеза CD36 человека, показано, что все 4 остатка Cys (по 2 на цитоплазматических N- и C-терминальных участках) – ацилированы

[154]. Ацилированные аминокислотные остатки Cys расположены в непосредственной близости от трансмембранных «анкеров», что способствует стабилизации связи CD36 с липидным бислоем. Можно предполагать, что и в молекуле CD36 коровы R-группы N- и C-концевых цистеинов также ацилированы, поскольку их положение в обоих белках консервативно [16].

Белок CD36 участвует в разнообразных функциях гемопоэтической (кроветворной) и васкулярной (сосудистой) систем [145]. В качестве рецептора коллагена [165] и тромбоспондина [150] CD36 вовлечен в процессы активации и агрегации тромбоцитов [166], межклеточной адгезии [167] и тромбоспондин-опосредуемого ингибирования ангиогенеза [168].

При острых воспалениях CD36 выступает в роли нейтрализующего рецептора («мусорщика»), связывая апоптозные (апоптоз – запрограммированная гибель клетки) клетки и клеточные фрагменты, что приводит к их поглощению фагоцитами и уничтожению [169]. CD36 сорбирует отшелушивающиеся наружные сегменты палочек (фоторецепторных клеток), что способствует их фагоцитозу клетками пигментного эпителия сетчатки [170]. Кроме того, CD36 взаимодействует с анионным фосфолипидом (фосфатидилсерин), экспонируемым на эктоплазматической поверхности некротирующих клеток [171, 172], что приводит к их распознаванию и элиминации системой иммунитета. Нейтрализующей функцией CD36, локализованного на поверхности макрофагов, является его способность связывать окисленные липопротеины низкой плотности с последующим эндоцитозом, что приводит к удалению этих молекул из системного кровотока [173–175]. По данным [176] повышенная экспрессия печеночного CD36 имеет отношение к накоплению липидов в печени молочных коров на поздних сроках беременности.

Несмотря на такое разнообразие функций, в настоящее время не совсем понятно, зачем CD36 экспрессируется на поверхности эпителиальных клеток молочной железы и входит в состав ММЖГ? Поскольку тромбоспондин секретируется в молозиво и молоко [177], можно предполагать, что CD36 выступает в роли его эпителиального рецептора, что способствует транцитозу тромбоспондина через мембрану секреторной клетки [48]. Другой возможной функцией CD36 в молочной железе может быть связывание и транспорт длинноцепочечных жирных кислот [16], хотя и в этом случае не совсем понятно, почему белок локализован именно на апикальной, а не на базальной или латеральной мембране.

5.9. Бутирофилин (BTN)

Основной белок ММЖГ коровы – бутирофилин (BTN) – идентифицируется на СВВ окрашенных ДСН ПААГ как широкая полоса с ММ ~66–67 кДа (рис. 5.7, треки 1,5) [19, 33, 37]. Молекула зрелого BTN содержит примерно 5% сахаров. По данным денситометрического анализа, бутирофилин составляет 34–43% от общего белка ММЖГ в молоке коров породы Holstein [33, 178] и порядка 20% у животных породы Jersey [178].

Название белка происходит от греческих *butyros/philos*, что в буквальном переводе означает «имеющий сродство (аффинность) к масляному жиру» и отражает его концентрирование в глобулах молочного жира. Бутирофилин – белок специфичный только для лактирующей молочной железы [179].

В качестве синонимов термина «бутирофилин» использовали различные названия: «полоса IV/гликопротеин Е» [32,35], «компонент IV» [36], «компонент V/гликопротеин 6» [37], «компонент 12/IV» [19], «полоса 4/V» [33], «СВ 5/PAS 5» [34] (табл. 5.1), несмотря на то, что функции BTN в ММЖГ и молочной железе до конца не установлены, название «бутирофилин» получило широкое распространение для обозначения этого белка и его гомологов в молоке коровы и других видов млекопитающих [180–183]. Комитет по номенклатуре белков молока (ADSA) рекомендует, чтобы название «бутирофилин» применялось (для различных видов животных)

только в том случае, если имеются данные о аминокислотной последовательности этого белка, а также чтобы из его названия были исключены римские или арабские цифры [16].

Основная масса BTN связана с отмытыми жировыми глобулами и выделяется в осадке ММЖГ при фракционировании «масляного молока» методом центрифугирования (рис. 5.7, треки 1,5). Минорная часть BTN остается в супернатанте, возможно, в виде белковых агрегатов или в составе небольших фрагментов ММЖГ (рис. 5.7, треки 2,6). Бутирофилин прочно связан с ММЖГ и не отделяется от неё в присутствии хаотропных агентов и даже детергентов [56, 184], включая 1% ДСН [185]. Отделение BTN от мембраны ММЖГ происходит только в присутствии ДСН и тиол-восстанавливающих реагентов [37]. Такие условия выделения предполагают, что BTN является трансмембранным (интегральным) белком и дисульфидные мостики играют важную роль в стабилизации его связи с липидным бислоем [55]. Трансмембранный характер бутирофилина и его локализация в апикальной мембране секреторных клеток молочной железы подтверждены методами молекулярного клонирования [49] и топологическими исследованиями [186].

Аминокислотная последовательность BTN была установлена в 1990 г. при клонировании кДНК лактирующей молочной железы коровы [49].

Актуальная информация о первичной структуре и свойствах BTN *Bos taurus*, размещена в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P18892/entry>). Идентификационный номер коровьего BTN – P18892 (BT1A1_BOVIN) [187]. Полипептидная цепь BTN содержит 526 а.к. остатков и имеет вычисленную ММ, равную 59,277 кДа. Белок синтезируется в виде предшественника – пре-BTN (рис. 5.21).

10	20	30	40	50	60
MAVFPNSCLA	GCLLIFILLQ	LPKLDSAPFD	VIGPQEPILA	VVGEDAELPC	RLSPN [■] VSAKG
70	80	90	100	110	120
MELRWFREKV	SPAVFVSREG	QEQEGEEMAE	YRGRVSLVED	HIAEGSVAVR	IQEVKASDDG
130	140	150	160	170	180
EYRCFFRQDE	NYEEAIVHLK	VAALGSDPHI	SMKVQESGEI	QLE [■] CTSVGWY	PEPQVQWRTH
190	200	210	220	230	240
RGEEFPSMSE	SRNPDEEGLF	TVRASVIIRD	SSMK [■] NVSCCI	RNLLL [■] GQEKE	VEVSIPASFF
250	260	270	280	290	300
PRLTPWMVAV	AVILVVLGLL	TIGSIFFTWR	LYKERSRQRR	NEFSSKEKLL	EELKWKRTL
310	320	330	340	350	360
HAVDVTLDPD	TAHPHLFLYE	DSKSVRLEDS	RQKLPEKPER	FDSWPCVMGR	EAFTSGRHYW
370	380	390	400	410	420
EVEVGDRTDW	AIGVCRENVM	KKGFDPMTPE	NGFWAVELYG	NGYWALTPLR	TPLPLAGPPR
430	440	450	460	470	480
RVGVFLDYES	GDIFFYNMTD	GSHIYTFSKA	SFSGPLRPFF	CLWSCGKKPL	TICPVTDGLE
490	500	510	520		
GVMVVADAKD	ISKEIPLSPM	GEDSASGDIE	TLHSKLIPLQ	PSQGV [■] P	

Рис. 5.21. Первичная структура **пре-бутирофилина** коровы [187]. Зеленым фоном выделен сигнальный пептид, желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого BTN. Подчеркнутым шрифтом выделена последовательность трансмембранного домена. Бирюзовым фоном выделены остатки Cys, образующие дисульфидные связи, синим фоном обозначены сайты N-гликозилирования. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Структура BTN коровы включает в себя сигнальный пептид, состоящий из 26 а.к., внеклеточный домен (фрагмент 27–242), трансмембранный домен (фрагмент 243–269) и цитоплазматический домен (фрагмент 270–526). В результате процессинга происходит удаление сигнального пептида, образование двух дисульфидных связей: Cys164-Cys218 и Cys50-Cys124, а также N-гликозилирование остатков Asn55 и Asn215 [187, 188]. Полностью процессированный (зрелый) белок имеет ММ 56,460 кДа и pI 4,96 [49].

Примерно в середине полипептидной цепи бутирофилина расположен одиночный транс-мембранный «анкер» – последовательность 243–269, состоящая из 27 гидрофобных а.к. остатков. Топологический анализ показывает, что BTN – трансмембранный гликопротеин типа I: его N-терминальная последовательность обращена к эктоплазматическому пространству (последовательность 27–242), а С-концевой участок (последовательность 270–526) контактирует с цитоплазмой секреторной клетки и участвует во взаимодействиях с ксантиндегидрогеназой/оксидазой [16, 186]. Такая топология BTN сохраняется и в мембране секретируемых МЖГ (рис. 5.22) [184–186, 189].

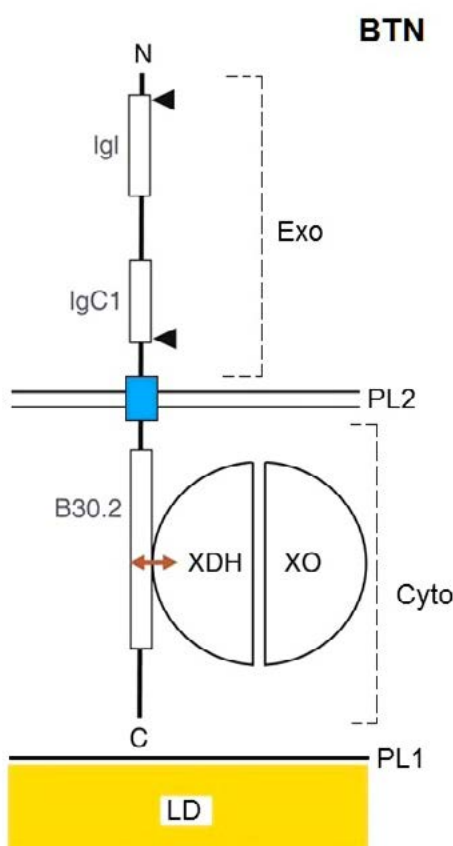


Рис. 5.22. Схема предполагаемой структуры и топографии бутирофилина (BTN) в мембране МЖГ (по данным [189]). Условные обозначения: N – N-конец полипептидной цепи; Exo – экстрацеллюлярный участок (27–242); Cyto – цитоплазматический участок (270–526); IgI, IgC1 – домены Ig-подобной структуры; B30.2 – консервативный домен цитоплазматического участка; ◀ – участки потенциального β-N-ацетилгалактозаминирования (Asn55 и Asn215); PL2 – бислояная фосфолипидная мембрана молочной жировой глобулы; PL1 – монослойная фосфолипидная мембрана липидной капли; LD – липидная капля; XDH/XO – ксантиндегидрогеназа/оксидаза; C – C-конец полипептидной цепи. Прямоугольник синего цвета – гидрофобный трансмембранный участок (243–269)

Бутирофилин относится к белкам суперсемейства иммуноглобулинов (Ig) [190], включающего в себя большую группу адгезивных протеинов, рецепторов и компонентов иммунной системы [191]. Характерным признаком белков этого суперсемейства является наличие Ig-подобных структур в области экстрацеллюлярного домена, состоящих из двух листов антипараллельных β-складок, соединенных дисульфидным мостиком. Сравнительный анализ первичных последовательностей показал, что BTN имеет два Ig-подобных участка: домен IgI, расположенный вблизи N-терминального конца [190], стабилизированный -S-S- мостиком между остатками Cys50 и Cys124 [49], и домен типа IgC1, расположенный рядом с трансмембранным «анкером», который стабилизирован дисульфидной связью между R-группами Cys164 и/или Cys218, Cys219 [183, 192].

В цитоплазматическом домене BTN находится высококонсервативный участок, известный под названием B30.2 или gfr домен [49]. Домен B30.2 состоит из ~170 а.к. остатков и составляет около 70% цитоплазматического «хвоста» BTN, граничащего с трансмембранным участком. По данным компьютерного моделирования, структура домена B30.2 имеет глобулярный характер [193] и состоит из 15 β -складок, образующих два Ig-подобных домена [194]. Ig-подобные домены участка B30.2, в отличие от Ig-подобных экзоплазматических доменов, не стабилизируются дисульфидными связями. Это объясняется тем, что значение цитоплазматического редокс-потенциала способствует поддержанию сульфгидрильных групп большинства цитозольных белков (в том числе и домена B30.2) в восстановленном состоянии [194].

Консервативный домен типа B30.2 обнаружен в С-терминальных участках не менее чем 20 различных белков, которые условно можно разделить на три группы [195, 196].

К первой группе относится антиген А (аутоантиген SS-A/Ro) – протеин с ММ ~52 кДа, который выявлен у больных с синдромом Сьёгрена (Sjögren syndrome) [197], и белок MID 1 [198], в структуре которых присутствуют специфические элементы супервторичной структуры под названием «Zn-палец» [195, 196]. Оба белка локализованы в клеточном ядре и могут взаимодействовать с другими протеинами и нуклеиновыми кислотами [199].

Ко второй группе принадлежат белки, содержащие Ig-подобные домены на N-терминальных участках и имеющие один трансмембранный «анкер», которые, предположительно, являются продуктами нескольких BTN-подобных генов [200]. Так же, как и другие белки суперсемейства Ig, эти протеины могут экспрессироваться на клеточной мембране и функционировать как рецепторы или белки адгезии [191].

В третью группу входят α - и β -субъединицы стонустоксина (stonustoxin) – токсического белка, содержащегося в яде каменной рыбы (*Synanceja horrida*) [201]. Каждая из субъединиц стонустоксина, так же, как и BTN, содержит домен B30.2 [195, 196]. В настоящее время домен B30.2, обнаруживаемый в молекуле BTN, – единственная известная структура, присутствующая в белках со столь разными функциями и локализацией (цитоплазматические и ядерные белки, мембранные рецепторы и белковые токсины).

Консервативность домена B30.2 в белках позвоночных (от рыб до высших млекопитающих) [195, 196] предполагает, что он выполняет некую универсальную функцию, связанную, например, с белок-белковыми взаимодействиями [196]. Два предполагаемых интерактивных объекта таких взаимодействий – белки микротрубочек [202] и ксантиндегидрогеназа/оксидаза (XDH/XO) [134]. В опытах *in vitro* показано, что XDH/XO способна связывать цитоплазматический «хвост» бутирофилина [134]. В течение всего периода лактации молярное соотношение бутирофилина и XDH/XO остается постоянным и составляет, по данным разных авторов, 4 : 1 или 3 : 1 [178, 203]. Возможно, прямое связывание бутирофилина и ксантиндегидрогеназы/оксидазы объясняет, почему концентрация XDH/XO в ММЖГ более чем в 150 раз (!) выше, чем в цитоплазме секреторной клетки [54]. Остается неясным, где находятся XDH/XO-связывающие сайты – внутри домена B30.2, на его периферии или за его пределами.

Образование супермолекулярного комплекса между XDH/XO, BTN и белками на поверхности липидного монослоя жировой капли, таких как адипофин [51, 204], может быть определяющим моментом «сборки» и последующего отрыва МЖГ от мембраны секреторной клетки. В такой схеме XDH/XO может рассматриваться как линкерный (соединительный) белок между BTN бислойной клеточной мембраны и белками на поверхности жировой капли или секреторной гранулы [55].

Бутирофин коровы можно рассматривать как мозаичный протеин, составленный из а.к. последовательностей, характерных для различных белковых семейств. Результаты исследо-

вания родственных генных структур и хромосомных участков предполагают, что семейство генов BTN появилось в результате серии дупликаций и экзонных перестановок [205, 206]. Участвует ли бутирофилин ММЖГ в секреции молочного жира и в других процессах, связанных с лактацией, является ли он компонентом иммунной системы, белком адгезии или мембранным рецептором, еще предстоит выяснить [16].

При амплификации геномной ДНК методом ПЦР и анализе аминокислотной последовательности идентифицировано несколько полиморфных форм гена коровьего BTN. Полиморфные формы включают в себя замены внутри экзонных и интронных участков ДНК, кодирующих экзо- и цитоплазматические домены BTN [16].

Кристаллическая структура цитоплазматического участка (последовательность 27–238) BTN коровы исследована методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,3 Å в 2013 г. [207]. Трехмерная структура полноразмерного BTN коровы предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P18892>) с доверительной и очень высокой надежностью, за исключением сигнального пептида и С-концевой последовательности (Asp477-Pro526) (рис. 5.23).

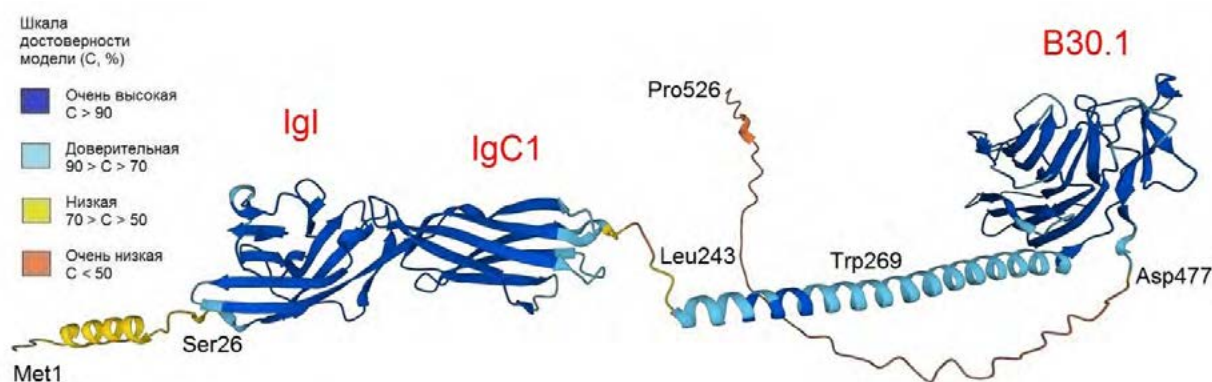


Рис. 5.23. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-CD36 коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P18892>) [21, 22]. Показаны а.к. остатки, ограничивающие сигнальный пептид (1–26), трансмембранный домен (243–269) и С-концевую последовательность (477–526). Красным шрифтом обозначены Ig-подобные структуры (IgI, IgC1) и функциональный домен B30.1, ответственный за связывание с ксантиндегидрогеназой/оксидазой

Наличие нескольких изоэлектрических вариантов BTN, обнаруживаемых методом 2-мерного электрофореза (рис. 5.8, панель б), объясняется влиянием ПТМ, прежде всего различной степенью и качеством N-гликозилирования. Обычно при ИЭФ выявляется от 4 до 6 изоэлектрических вариантов BTN, с pI в диапазоне 5,0–5,4 [179, 180, 186], вне зависимости от того, приготовлен препарат ММЖГ из пулированного молока или из молока индивидуальных животных [16].

Бутирофилин коровы несет три потенциальных сайта N-гликозилирования: Asn55 и Asn215 в N-терминальном, экзоплазматическом домене и Asn437 на С-терминальном, цитоплазматическом домене. Однако *in vivo* гликозилированы только два аминокислотных остатка – Asn55 и Asn215 [162]. Гликаны, связанные с этими аминокислотами, могут состоять из 2–4 карбогидратных цепочек, иногда с такими же необычными компонентами, которые были обнаружены в молекулах CD36 [160, 162].

Гликозилирование каждого из остатков Asn в молекуле BTN является сайт-специфичным. Гликаны, связанные с Asn55, – это комплексные сахара, содержащие как универсальные последовательности: Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc, так и структуры необычного состава: GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc [162]. Оба остатка аспарагина – Asn55 и Asn215 – несут карбогидраты с высоким содержанием ман-

нозы. Боковая группа Asn215 связана с гликанами гибридного типа, содержащими необычные структуры: $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{-Man}\alpha 1 \rightarrow 6$ и $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3$, а также комплексные олигосахариды с цепочками $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$. Гликаны с необычными последовательностями вида: $\text{Gal-NAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$, встречаются только на остатках Asn55 [16].

По-видимому, BTN коровы не содержит О-связанных гликанов, поскольку обработка О-гликаназой не приводит к изменению его электрофоретической подвижности [208]. Среди прочих возможных посттрансляционных модификаций BTN следует назвать фосфорилирование и связывание жирных кислот [204, 209]. В состав BTN входит много остатков Ser, Thr и Tug, которые при участии специфических протеинкиназ [185] являются потенциальными сайтами фосфорилирования. В опытах *in vitro* инкубация препаратов ММЖГ с АТФ приводит к фосфорилированию BTN [204, 209], однако достоверной информации о фосфорилировании бутирофилина коровы *in vivo* – нет. В очищенных препаратах BTN из ММЖГ коровы идентифицированы прочно связанные с белком остатки миристиновой, пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот [17, 185, 204].

Бутирофилин подвержен ограниченной протеолитической деградации, как *in situ*, так и в процессе выделения ММЖГ или при работе с мембранами жировых глобул *in vitro*. Наиболее часто в препаратах ММЖГ обнаруживается фрагмент, имеющий ММ примерно на 4 кДа меньше, чем интактный BTN. Протеолитически деградированный фрагмент BTN четко отделяется от нативного белка как при одномерном ДСН электрофорезе (рис. 5.7, трек 1, стрелка), так и при двумерном фракционировании белков ММЖГ (рис. 5.8, панели а, а', б, звездочка) [16]. Главной мишенью ограниченного протеолиза BTN является С-терминальный конец молекулы бутирофилина. Другие, реже встречающиеся продукты протеолиза BTN, идентифицированы и частично охарактеризованы иммунологическими методами, с использованием последовательность-специфичных противопептидных антител [186].

Для BTN характерно образование агрегатов, как *in situ*, так и в процессе подготовки образцов ММЖГ для ДСН-электрофореза [12, 182]. В ПААГ после ДСН-электрофореза агрегаты BTN идентифицируются как полосы с ММ >150 кДа, которые взаимодействуют с анти-BTN иммуноглобулинами. Молекулярные массы агрегатов указывают на то, что они образованы как интактными, так и протеолитически деградированными формами BTN. Кроме того, вестерн-блоты (*Western blots*) препаратов ММЖГ с антителами к BTN позволяют выделить иммунореактивные компоненты (полосы), которые имеют ММ несколько меньше и несколько больше, чем основной мономерный интактный белок (ММ ~66-67 кДа) [186].

Первичная структура BTN на 46% идентична вариабельным Ig-подобным участкам олигодендроглиального гликопротеина (ОГ) – минорного компонента миелиновой оболочки нервных волокон, который рассматривается как предполагаемый аутоантиген и главная мишень иммунного ответа в патогенезе рассеянного склероза (РС). Известно, что ОГ провоцирует РС-подобное заболевание – экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) – у различных видов лабораторных животных. В модельных экспериментах показано, что инъекции BTN имеют неоднозначный эффект: с одной стороны, они ингибируют ОГ-индуцированный ЭАЭ, с другой – «запускают» воспалительные реакции в ЦНС подопытных лабораторных животных. Кроме того, BTN способен стимулировать ОГ-специфический Т-клеточный иммунный ответ *in vitro*. По-видимому, причиной стимуляции Т-лимфоцитов является «молекулярная мимикрия» BTN и ОГ, обусловленная высокой гомологией отдельных участков этих белков [210–213].

Существуют прямые доказательства того, что BTN и связанная с ним в мембране МЖГ ксантиндегидрогеназа/оксидаза необходимы для нормальной секреции липидов молока.

Эпителиальные клетки молочных желез мышей с одним «выключенным» аллельным геном XDH (XDH+/-) эффективно аккумулировали жировые капли в цитоплазме, но в молоке жировые глобулы находились в виде крупных липидных капель с нарушенными мембранами. Лактацию у мышей с двумя «выключенными» аллелями (XDH-/-) изучить не удалось: животные умерли в течение первых шести недель после рождения. Секреция молочного жира также была нарушена у мышей с частично или полностью заблокированной экспрессией BTN. В обоих случаях в эпителиальных клетках молочной железы накапливалось множество жировых капель, однако при их выходе в альвеолярное пространство происходило разрушение апикальной мембраны, а капли агрегировали в очень большие глобулы, лишь частично окруженные фосфолипидной оболочкой. Эти результаты подтверждают, что XDH и BTN исключительно важны для нормальной секреции жировых глобул молока, однако молекулярные механизмы участия этих белков в секреции молочного жира пока что неизвестны [214, 215].

5.10. Белок PAS 6/7 (PAS 6/7)

Идентификация этого белка имеет длинную и сложную историю. При ДСН-электрофорезе белков ММЖГ коровы, в диапазоне ММ 43-59 кДа выявляются две основные полосы, которые окрашиваются как СВВ, так и PAS-реагентами (рис. 5.7, треки 1–6) [16, 19, 28, 33, 34, 37, 40, 42, 216–219]. С использованием арабских и римских цифр этот белок (белки) обозначали различными терминами, отражавшими их электрофоретическую подвижность и взаимодействие с красителями (табл. 5.1). Поскольку были основания полагать, что это, как минимум, два белка с близкими физико-химическими свойствами, они получили название белки 6 и 7, окрашиваемые периодной кислотой / основанием Шиффа или, сокращенно, PAS 6/7. Коровьи белки PAS 6/7 считались гомологами, открытого в 1990 г. мышинного белка MFG-E8 (белок 8, подобный эпидермальному фактору роста), входящего в состав ММЖГ [50, 220].

Белки PAS 6/7 являются периферическими протеинами ММЖГ, поскольку их легко выделить при промывке жировых глобул водными растворами с высоким содержанием $MgCl_2$, других солей и хаотропных агентов [18, 19, 28, 217, 219]. Компоненты PAS 6/7 входят в пул основных белков супернатантной фракции «масляного молока» (рис. 5.7, треки 2, 4, 6) [18], а также присутствуют в растворимой форме в обезжиренном молоке [41, 42, 221].

Еще в 1980 г. было установлено, что иммунологически белки PAS 6/7 – одинаковы [33], но их окончательная идентификация выполнена только в 90-х гг. XX в. после клонирования и секвенирования кДНК [28, 39]. Длительный период идентификации отчасти объясняется наличием нескольких изоэлектрических вариантов (рис. 5.8, панели а,а) [33, 34, 140, 216, 219] и близостью ММ этих белков и адипофилина [51, 204]. В дополнение ко всему сравнение белков PAS 6/7 из ММЖГ коровы и других животных выявляло их сходство по ММ [22]. В 1994–1996 гг. три независимых исследовательских группы подтвердили, что две основные полосы белка PAS 6/7, имеющие различные ММ и pI , – это **одна и та же полипептидная цепь** (продукт одного гена), подвергшаяся дифференцированной посттрансляционной модификации [28, 39, 216].

В настоящее время очевидно, что PAS 6/7-подобные протеины, – это основные компоненты ММЖГ различных видов млекопитающих и, в подавляющем большинстве случаев, их гетерогенность, включая и гетерогенность по ММ, объясняется разной степенью посттрансляционной модификации **одного и того же белка** [16].

В 1997 г. гомологичный белок человека получил название «лактадгерин» (*lactadherin*), что подчеркивает его «молочное» происхождение и адгезивные свойства [222]. В настоящее время в базе данных UniProtKB рекомендуемое название этого белка *Bos taurus* – лактадгерин, а наименование «гликопротеин PAS-6/PAS-7» приводится как одно из восьми альтернативных

которая связывается с интегринами – поверхностными клеточными белками-рецепторами (взаимодействуют с внеклеточным матриксом и передают различные межклеточные сигналы) [28, 222, 226, 227]. Домены типа C2 несут участки связывания фосфолипидов [16]. Исследование топологии коровьего PAS 6/7 и человеческого гомолога – лактадгерина показало, что они являются экзоплазматическими периферическими белками, которые своими С-терминальными участками связаны с анионными фосфолипидами клеточной мембраны (рис. 5.25) [228, 229].

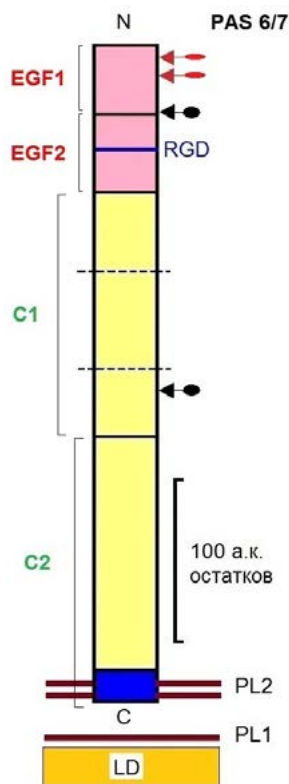


Рис. 5.25. Схема предполагаемой структуры и топографии белка PAS 6/7 в мембране МЖГ (по данным [16, 189, 223]). Условные обозначения: N – N-конец полипептидной цепи; RGD – положение адгезивной последовательности; красные стрелки (↔) – сайты О-гликозилирования; черные стрелки (◀) – сайты N-гликозилирования; горизонтальными пунктирными линиями обозначено положение участка из 52 аминокислотных остатков, отсутствующего в альтернативно сплайсированном варианте белка; EGF1 – домен, последовательность (20-59); EGF2 – домен, последовательность (62-106); C1 – домен, последовательность (109-265); C2 – домен, последовательность (270-427); PL2 – бислоюная фосфолипидная мембрана молочной жировой глобулы; PL1 – монослойная фосфолипидная мембрана липидной капли; LD – липидная капля; C – C-конец полипептидной цепи. Прямоугольник синего цвета – С-терминальная последовательность, связывающая анионные фосфатидилсерин-содержащие участки плазматической мембраны

В молекуле коровьего PAS 6/7, а.к. остатки, следующие за лидерной последовательностью, образуют 2 EGF-подобных домена – EGF1 (Ser20-Asn59) и EGF2 (Glu62-Glu106). Участок (мотив) адгезии расположен внутри второго домена, его составляет последовательность Arg85-Asp87 (адгезивная или RGD-последовательность) (рис. 5.25). В каждом из EGF-доменов, локализованы 6, консервативных для всех исследованных PAS 6/7-подобных белков, остатков Cys, которые образуют внутримолекулярные дисульфидные связи [223].

Следом за EGF-подобными доменами в молекуле PAS 6/7 коровы располагаются домены C1 (Cys109-Cys265) и C2 (Cys270-Cys427). Первичная структура домена C2 на 43 и 38% идентична структуре C2-домена факторов свертывания крови V и VIII, соответственно [28, 228, 229]. Установлено, что домен C2 факторов свертывания крови V и VIII [230] и аналогичные им участки PAS 6/7, с высокой аффинностью связывают анионные фосфатидилсерин-содержащие

участки плазматических мембран [226, 228, 231]. Связывание происходит на С-терминальном участке Pro411-Leu425 [28, 223]. Контакт С-терминального домена PAS 6/7 с фосфолипидным бислоем клеточной мембраны, оставляет значительную часть белковой молекулы свободной, что позволяет PAS 6/7 взаимодействовать с интегриновыми рецепторами через консервативные адгезивные RGD последовательности EGF2-домена [222, 226, 231].

При исследовании кДНК обнаружен альтернативно сплайсированный вариант молекулы PAS 6/7 с «вырезанным» участком из 52 аминокислотных остатков, внутри C1 домена, на участке Gln168---Ple211 (рис. 5.25) [28]. Этот молекулярный вариант детектируется как минорная иммунореактивная полоса при Вестерн блоте электрофоретического профиля белков ММЖГ коровы и, вероятно, является результатом потери одного экзона при синтезе мРНК [232].

Несмотря на то, что все известные PAS 6/7-подобные белки содержат EGF- и C1/C2-подобные домены, существуют и межвидовые различия в структуре этих протеинов. Молекула PAS 6/7 человека утратила первый EGF-подобный домен, но в остальном очень похожа на молекулы гомологичных белков коровы, крысы и свиньи [227, 233]. Гомолог белка PAS 6/7 морской свинки (GP-55), содержит по меньшей мере один EGF-подобный домен и последовательности C1/C2, похожие на аналогичные домены белков коровы, свиньи, крысы и мыши [220]. Функциональная основа межвидовых различий в структуре доменов PAS 6/7 не ясна, хотя все изученные на настоящий момент белки этого семейства содержат адгезивную последовательность в EGF-подобном домене и С-терминальный участок потенциального связывания анионных фосфолипидов [16].

Кристаллическая структура C2 домена (Cys270-Cys427) PAS 6/7 коровы исследована методом дифракции рентгеновских лучей с разрешением 1,67Å и 2,40Å [228,229]. Данные о рентгеноструктурном анализе полноразмерного PAS 6/7 коровы отсутствуют. Модель трехмерной структуры полноразмерного PAS 6/7 коровы, построенная сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q95114>), представлена на рисунке 5.26.

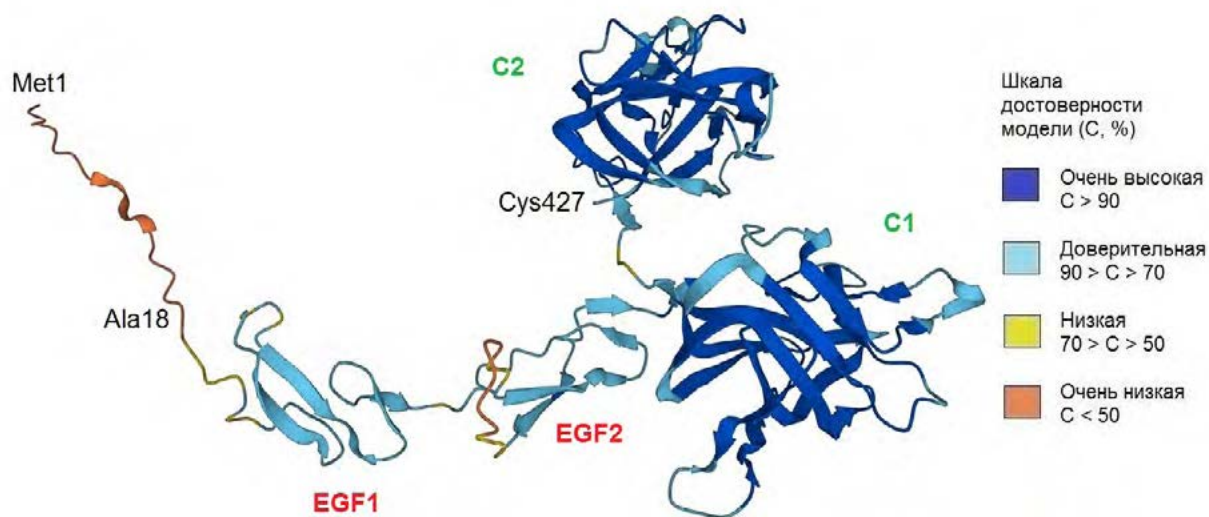


Рис. 5.26. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-PAS 6/7 коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q95114>) [21, 22]. Показаны а.к. остатки, ограничивающие сигнальный пептид (1-18), и структурно-функциональные домены – EGF1, EGF2, C1 и C2

Основным типом посттрансляционной модификации PAS 6/7 является О- и N-гликозилирование. Удаление гликанов превращает изоформы PAS 6/7 в белок с ММ ~50 кДа [216], что достаточно близко к предсказываемому значению ММ основного полипептида – 45,6 кДа.

Изоэлектрические точки различных вариантов PAS 6/7, по данным нескольких исследований групп, лежат в диапазоне 5,6-7,6 (рис. 5.8, панели а, а') [34, 216, 219]. Осво-

бождение белка от остатков сиаловой кислоты с применением нейраминидазы приводит к превращению многокомпонентной смеси микрогетерогенных по заряду белков, в две изоформы с $pI = 6,2$ и $6,5$ [219]. Это означает, что в основе микрогетерогенности препаратов PAS 6/7, лежит модификация белка сиализированными гликанами [16]. Имеются данные, указывающие на то, что состав О- и N-связанных с PAS 6/7 и другими гликопротеинами ММЖГ гликанов значительно варьирует, в особенности на ранних стадиях лактации [164, 216]. Установлено, что гликаны, связанные с белками PAS 6/7 человека, могут взаимодействовать с ротавирусами и предохранять кишечник новорожденного от вирусной инфекции [73, 234, 235].

На сегодняшний день не обнаружено данных о других посттрансляционных модификациях PAS 6/7, таких как ацилирование или фосфорилирование.

Структура, топология и распределение PAS 6/7-подобных белков, предполагает, что они функционируют как протеины адгезии [28, 226]. Белок PAS 6/7 является также компонентом плазматической мембраны сперматозоидов и способен прочно присоединяться к гликопротеинам зона pellucida (гликопротеиновая оболочка вокруг плазматической мембраны яйцеклетки, лат.), что предполагает его возможное участие в процессе оплодотворения [225, 236].

Почему белок PAS 6/7, обладающий высокой адгезивной способностью, экспрессируется на экспонируемой апикальной мембране секреторных клеток молочной железы и на поверхности МЖГ, не ясно. Как уже отмечалось, PAS 6/7 человека (лактадгерин) связывает ротавирусные частицы и может участвовать в защите ЖКТ новорожденного от вирусных инфекций [73, 234, 235]. Per se это означает, что первичной функцией белка PAS 6/7 в молочной железе может быть поддержание иммунного статуса новорожденного, а не участие в физиологии лактации [16].

5.11. Адипофилин (ADPH)

Адипофилин (ADPH) – один из главных белковых компонентов нерастворимой фракции, остающейся после экстракции препаратов мембран МЖГ солевыми растворами и неионными детергентами. Как показал протеомный анализ, ADPH относится к наиболее распространенным белкам изолированных мембран жировых глобул молока различных видов. Точная функция ADPH не установлена. Однако тот факт, что усиление его экспрессии в дифференцирующейся молочной железе коррелирует с появлением, ростом и накоплением цитоплазматических жировых капель (ЦЖК) в секреторных клетках предполагает, что ADPH может быть физиологическим регулятором выработки липидов молока.

Долгое время этот белок выпадал из поля зрения исследователей. Во-первых, из-за очень плохой растворимости в буферных растворах, используемых для приготовления образцов для ДСН-электрофореза, во-вторых, из-за того, что его ММ очень близка ММ одной из основных форм белка PAS 6/7 (рис. 5.7, треки 1, 5) [204]. Кроме того, при ДСН-электрофорезе в 8–16% ПААГ оба белка нередко мигрируют как одна полоса с ММ ~52 кДа [16].

Для полного растворения ADPH необходима продолжительная инкубация экстрагированных препаратов мембран МЖГ при повышенной температуре и относительно высоких (до 10%) концентрациях ДСН [204]. При двумерном электрофорезе в ПААГ адипофилин коровы разделяется на два основных компонента с изоэлектрическими точками в диапазоне 7,5–7,8 [51, 204].

Первоначально адипофилин ММЖГ коровы был идентифицирован как «белок, связанный с дифференцировкой жировой ткани» (*adipose differentiation-related protein* – ADRP, англ.). При этом ~80% а.к. последовательности коровьего белка ММЖГ оказались идентичны первичной структуре гомологичного мышинового протеина, также участвующего в дифференцировке адипоцитов (клеток жировой ткани) [204, 237]. Позднее выяснилось, что ADRP ассоциирован с липид-

ными каплями в клетках различных клеточных культур, включая фибробласты, клетки Лейдига (Leydig) и клетки гепатомы (Hep2). В тканях ADRP распространен менее широко и обнаруживается только в определенных типах клеток, аккумулирующих жировые капли, включая гепатоциты крыс, которым скармливают препараты, подавляющие окисление свободных жирных кислот, например этомоксир и секреторные клетки молочных желез. Наиболее высокий уровень экспрессии ADRP наблюдается на ранних стадиях дифференцировки адипоцитов [51, 238–241].

В 1998 г. Heid и соавторы [51] предложили переименовать ADRP в адипофилин для того, чтобы подчеркнуть его связь с жировыми каплями во многих типах клеток. Это новое и более универсальное название (adipophilin или ADPH, англ.) рекомендовано для широкого использования Комитетом по номенклатуре белков молока ADSA [16]. В базе данных UniProt этот белок фигурирует как перилипин-2 (perilipin-2), а ген, который его кодирует, – «PLIN2». При этом названия «адипофилин» и «ADRP» указываются, соответственно, как альтернативное и сокращенное (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9TUM6>) [242]. В некоторых работах данный протеин обозначается как «адипофилин (ADRP/ADPH/PLIN2)» [243]. В дальнейшем мы будем использовать название «адипофилин» или «ADPH».

Полная аминокислотная последовательность адипофилина установлена в 1992–1999 гг. [207, 210]. Первичная структура ADPH и информация о свойствах этого белка, доступны в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9TUM6/entry>). Идентификационный номер ADPH коровы – Q9TUM6 (PLIN2_BOVIN) [242]. Полипептидная цепь ADPH состоит из 430 а.к. остатков и имеет вычисленную ММ (без учета ПТМ) равную 49,368 кДа (рис. 5.27).

10	20	30	40	50	60
MASVAVEPQL	SVVTRVANLP	LVSSTYDLVS	SAYISRKDQY	PYLKSLCEMA	EKGMTITSV
70	80	90	100	110	120
AVTSALPIIQ	KLEPQIAVAN	TYACKGLDRI	EEKLPILNQP	TNQVVANAKG	AMTGAKDAVT
130	140	150	160	170	180
TTVTGAKDSV	ASTITGVVDR	TKGAVTGSVE	KTKSVVSGSI	NTVLRSRVMQ	LMSSGVENAL
190	200	210	220	230	240
TKSELLVDQY	LPLTKDELEK	EAKKVEGFDM	VQKPSYYVRL	GSLSTKLRSR	AYQQALCRVE
250	260	270	280	290	300
EAKRKGQETI	SQLHSAFNLS	ELARKNVHNA	NQKIQDAQDK	LYLSWLEWKR	SIGYDDTDES
310	320	330	340	350	360
HCAEHIESRT	LAIARNLTQQ	LQTMCHTLLS	NIQGLPQNIQ	DRANHLGVMA	GDIYSVFRNA
370	380	390	400	410	420
ASFKEVSDGL	LASSKGQLQK	MKESLDDVMD	YLVNNTPLNW	LVGPFYPQVT	ESESAQAPGT
430	440	450			
TRRPGRWSRK	HPKPVPVSNA	EGSQPDDSSS			

Рис. 5.27. Первичная структура **пре-адипофилина** коровы [242]. Зеленым фоном выделен иницирующий Met, желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого ADPH. Красным фоном выделен сайт потенциального посттрансляционного ацетилирования. Бирюзовым фоном отмечены, предположительно, фосфорилированные остатки Ser и Tyr. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Белок синтезируется в виде предшественника – пре-ADPH, который несет N-концевой иницирующий Met. При процессинге Met1 удаляется. Предположительно, происходит ацетилирование Ala в положении 2 и фосфорилирование Ser215 и Tyr232 [242].

Межвидовая гомология первичной структуры ADPH высока: аминокислотная последовательность адипофилина коровы на 87 и 80% идентична последовательности белка человека и мыши соответственно [244].

Адипофилин входит в группу гомологичных белков, которые образуют семейство перилипинов [245–248]. Перилипины – это фосфорилированные белки, кодируемые одним геном,

которые концентрируются на поверхности ЦЖК в адипоцитах [246, 247] и стероидогенных клетках [249], но отсутствуют в эпителиальных клетках млекопитающих [247]. Показано, что фактор некроза опухоли стимулирует липолиз в адипоцитах путем уменьшения количества перилипина, связанного с поверхностью липидной капли [250]. При отсутствии физиологических агонистов, перилипины (гомологи адипофилина) могут предохранять липидные капли от ферментативного разрушения [246,250].

Три белка, обнаруживаемые в адипоцитах, – перилипин, адипофилин и TIP 47, – имеющие высокую степень гомологии первичной последовательности, объединяют в подсемейство PAT (PAT – Perilipin, Adipophilin, TIP47, англ.) [248, 251]. Представления о структуре и функциях белков подсемейства PAT изобилуют «белыми пятнами».

Выравнивание а.к. последовательности ADPH с другими членами подсемейства PAT показало, что его самым близким аналогом является белок TIP47 (Tail-Interacting Protein, MM 47 kDa, англ.). Первичные структуры ADPH и TIP47 совпадают на 43% [243, 248]. Белок TIP47, обнаруженный в фосфолипидной монослойной оболочке липидных капель [252], присутствует и в фосфолипидном монослое МЖГ [12]. Однако его функция, ни в оболочке липидной капли, ни в МЖГ, окончательно не установлена.

Предполагается, что ADPH имеет доменную структуру, которая характерна для белков с адаптерной функцией. Согласно современным представлениям, ADPH состоит из 3-х основных доменов (рис. 5.28): домен PAT1, домен связывания с ЦЖК, домен связывания с бислойной фосфолипидной мембраной [253].

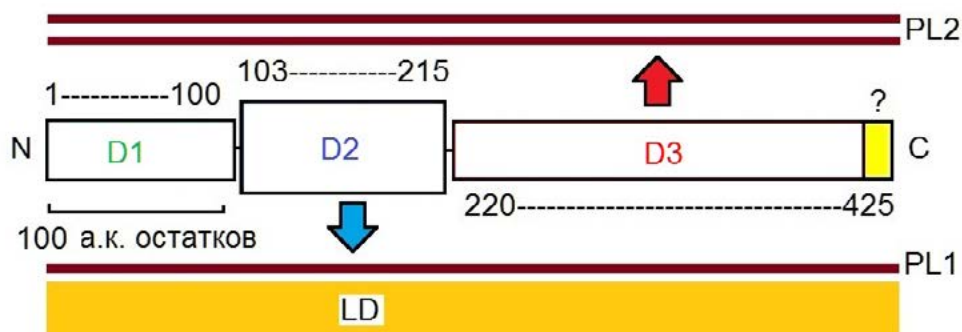


Рис. 5.28. Линейная модель доменной структуры и предполагаемой топографии ADPH (по данным [243, 248]). Условные обозначения: D1 – домен PAT1; D2 – домен связывания с мембраной ЦЖК; D3 – домен связывания с бислойной фосфолипидной мембраной; желтым цветом со знаком «?» обозначен гидрофобный С-концевой участок, функция которого не установлена; N – N-конец полипептидной цепи; С – С-конец полипептидной цепи; PL2 – бислойная фосфолипидная мембрана; PL1 – монослойная фосфолипидная мембрана; LD – липидная капля; стрелками обозначены взаимодействия доменов ADPH с монослойной и бислойной мембраной МЖГ; пунктирными линиями и цифрами показаны а.к. последовательности доменов

N-концевой участок ADPH, обозначается как **домен PAT1** (последовательность 1-100). Среди белков подсемейства PAT, этот домен, включающий в себя ~100 а.к. остатков, является высококонсервативным [248]. До недавнего времени функция домена PAT 1 была не известна, предполагалось, что он отвечает за «узнавание» *de novo* синтезированных белков поверхностью липидной капли [254, 255].

Частично, ответ на вопрос о функции домена PAT 1 был получен в экспериментах по «отключению» гена ADPH. В лактирующих молочных железах мышей, нокаутированных по гену адипофилина, экспрессируется N-терминально усеченная форма белка, в которой отсутствуют участки, кодируемые 2 и 3 экзонами. Такие лабораторные животные называются Δ2,3-

ADPH мышами. Поскольку экзоны 2 и 3 кодируют первые 75 а.к. остатков домена PAT1, такая укороченная форма белка обозначается как ΔPAT-ADPH. Удивительно, но ΔPAT-ADPH обнаруживается и у мышей дикого типа, причем не только в молочной железе, но и в мышечных тканях. Механизм, с помощью которого Δ2,3-ADPH мыши синтезируют ΔPAT-ADPH, не совсем понятен. Возможно, укороченная форма белка появляется в результате существования альтернативных сайтов инициации трансляции, альтернативного сплайсинга или ограниченного протеолиза и может выполнять физиологические функции, отличные от функций полноразмерного ADPH.

В 2008 г. с использованием анти-ADPH антител было показано, что в молочных железах лактирующих Δ2,3-ADPH мышей ΔPAT-ADPH связывается с ЦЖК и обнаруживается в жировых глобулах молока. Другие белки подсемейства PAT – перилипин и TIP47, – лишенные доменов, гомологичных PAT1, также сохраняли способность связываться с мембраной ЦЖК [256]. Таким образом, домен PAT1 не является абсолютно необходимым для связывания ADPH с ЦЖК и, по всей видимости, не задействован в секреции жировых глобул молока.

Нативный ADPH, не связанный с ЦЖК и находящийся в свободной форме в цитоплазме, подвергается быстрой протеасомной деградации. Сайты протеасомной деградации ADPH локализованы в домене PAT1, поэтому ΔPAT-ADPH значительно стабильнее, чем полноразмерный белок, не связанный с ЦЖК [257]. Это свидетельствует о роли домена PAT1 в регуляции внутриклеточной концентрации адипофилина.

Изучение динамики накопления жировых капель в дифференцирующихся секреторных клетках молочной железы показало, что интенсивная индукция синтеза ADPH начинается за 24–48 часов до начала липогенных процессов, приводящих к усиленному накоплению стабильных ЦЖК. В эксперименте, при условии нормального синтеза триглицеридов, искусственное повышение концентрации внутриклеточного ADPH, за счет ингибирования его протеасомной деградации запускает процесс образования и накопления ЦЖК [9]. В то же время, даже сверхэкспрессия ΔPAT-ADPH не приводит к индукции липогенеза и образованию ЦЖК. Это указывает на участие домена PAT1 в индукции биогенеза и стабилизации внутриклеточных жировых капель [254, 257].

Домен связывания с ЦЖК (последовательность 103–215), который следует за доменом PAT1, включает в себя повторяющиеся 11-мерные последовательности спиральной структуры (рис. 5.29). Эксперименты по удалению N- и C-терминальных участков ADPH свидетельствуют о том, что за связывание с ЦЖК отвечают гидрофобные участки, расположенные в 11-мерных спиральных структурах. Полипептидная последовательность домена связывания с ЦЖК образует атипичные и слегка раскрученные α-спирали с тремя полными витками на 11 а.к. остатков (α11/3). Считается, что именно эти элементы третичной структуры обеспечивают взаимодействие ADPH с фосфолипидной мембраной ЦЖК [248, 253].

С-терминальный домен ADPH (последовательность 220–425) включает в себя участок, состоящий из 4-х, собранных в пучок, α-спиралей (рис. 5.29) и прилегающий к ним гидрофобный мотив, образующий характерную α/β складку [243]. На сегодняшний день мало что известно о физиологических функциях С-терминального участка ADPH, но аналогичные структуры многих аполипопротеинов характеризуется как домены обратимого связывания с липидными мембранами [258]. С использованием рекомбинантных участков С-терминального домена мышинного ADPH показано, что последовательность 172–425 взаимодействует с фосфолипидными мембранами искусственных липосом за счет электростатических взаимодействий, а ключевую роль в этом процессе играют а.к. остатки, расположенные в 3 и 4 спиральных участках [259]. С-терминальный конец молекулы ADPH (и других белков PAT)

содержит высоко консервативную гидрофобную последовательность из 14 аминокислотных остатков, которая, предположительно, участвует в связывании адипофилина с фосфолипидным монослоем липидной капли [16].

Данные о результатах исследования ADPH коровы методами рентгеноструктурного анализа в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9TUM6/entry#structure>) – отсутствуют. За исключением α -спиральных участков домена PAT1 и домена связывания с бислойной фосфолипидной мембраной, структура пре-ADPH коровы предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9TUM6>) с низкой и очень низкой достоверностью (рис. 5.29).

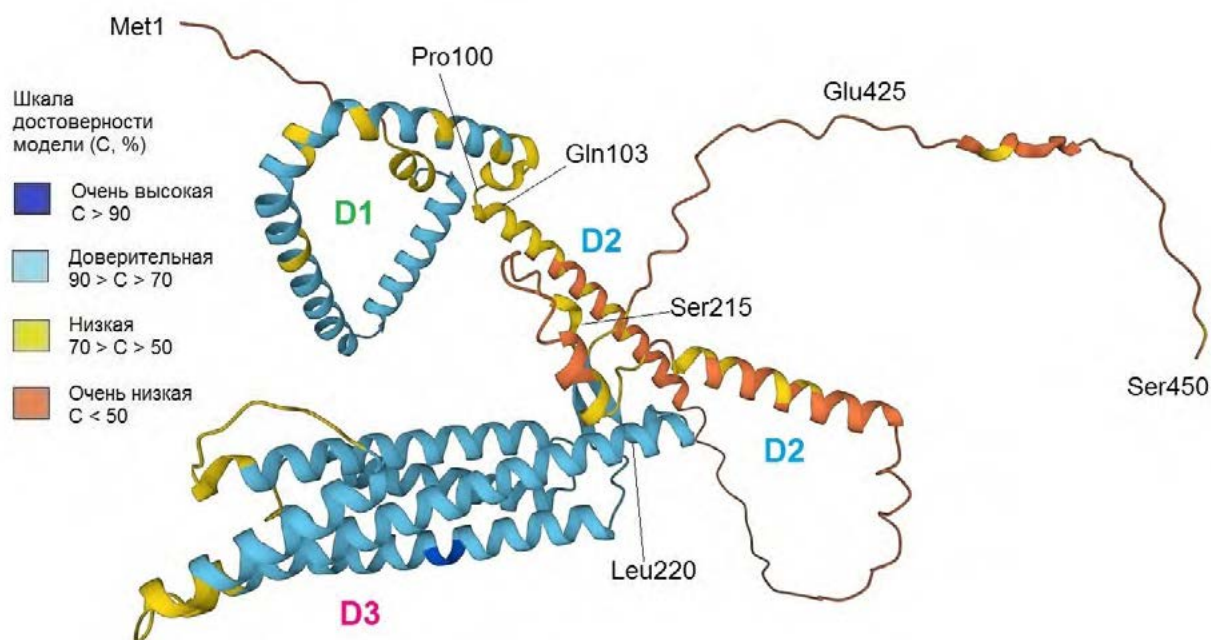


Рис. 5.29. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-адипофилина коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9TUM6>) [21,22]. Показаны а.к. остатки, ограничивающие N-концевой домен PAT1 (D1) – Met1-Pro100, домен связывания с монослойной фосфолипидной мембраной ЦЖК (D2) – Gln103-Ser215 и C-концевой домен связывания с бислойной фосфолипидной мембраной (D3) – Leu220-Glu425

Процессинг ADPH изучен фрагментарно. ADPH не содержит N-концевых сигнальных последовательностей и, скорее всего, синтезируется на свободных полирибосомах адипоцитов [238]. В одном из исследований ADPH, наряду с липидными каплями и ММЖГ, обнаружен во фракции мембран ЭР [204] выделенного из лактирующей молочной железы. Микросомальная форма ADPH имеет ММ ~47 кДа, – это на ~5 кДа меньше, чем молекулярная масса ADPH, связанного с ММЖГ [204], что предполагает его ПТМ. То, что ADPH, локализованный в ММЖГ существует в двух изоэлектрических вариантах (pI 7,5 и 7,8) может быть причиной варибельной ПТМ этого белка [51, 204].

Несмотря на наличие от 2 до 3 сайтов потенциального гликозилирования в ADPH коровы, мыши и человека, ни один из этих белков не содержит N-связанных карбогидратов [51, 204, 237, 244]. Это хорошо согласуется с цитоплазматической локализацией и отсутствием в молекуле ADPH сигнальной последовательности.

Попытки доказать, что ADPH фосфорилирован *in vivo* путем введения крысам радиоактивного фосфата или инкубации радиоактивной метки с тканью молочной железы коровы, успеха не имели [204]. Показано, что ADPH коровы, находящийся в составе ММЖГ, удается

фосфорилировать *in vitro* при инкубации с АТФ [204], однако функциональное значение этой модификации не установлено.

Возможно участие ADPH в клеточном связывании длинноцепочечных жирных кислот [260] и транспорте внутриклеточных липидов [41, 204, 238, 260]. Адипофилин коровы активно связывает миристиновую, пальмитиновую, стеариновую и олеиновую жирные кислоты (ЖК), по 5-6 молей жирной кислоты на моль белка [204]. Жирные кислоты могут быть отделены от ADPH в присутствии 0,5М метанола в щелочной среде. Это предполагает, что ЖК связаны с ADPH эфирными связями. Ацилирование адипофилина жирными кислотами должно заметно усилить его гидрофобные свойства и, вероятно, способствует более эффективному взаимодействию этого белка с нейтральными липидами *in vivo* [16].

Не исключено, что взаимодействие между ADPH, локализованным на поверхности липидной капли, и белками апикальной мембраны с прилегающими к ней участками цитоплазмы, включая ксантиндегидрогеназу/оксидазу (XDH/XO) и бутирофилин (BTN), необходимо для образования ММЖГ и секреции МЖГ [51, 55, 204].

Возможный механизм секреции липидов молока с участием адипофилина в качестве адапторного белка. Данные о том, что С-концевой домен ADPH связывается с искусственными фосфолипидными мембранами [259], предполагают модель секреции липидов молока, в которой ADPH действует как адаптор между поверхностью ЦЖК и внутренним листком апикальной плазматической мембраны. В этой модели С-терминальный домен и домен связывания ЦЖК адипофилина взаимодействуют, соответственно, с плазматической мембраной и поверхность жировой капли (рис. 5.30) [243, 248].

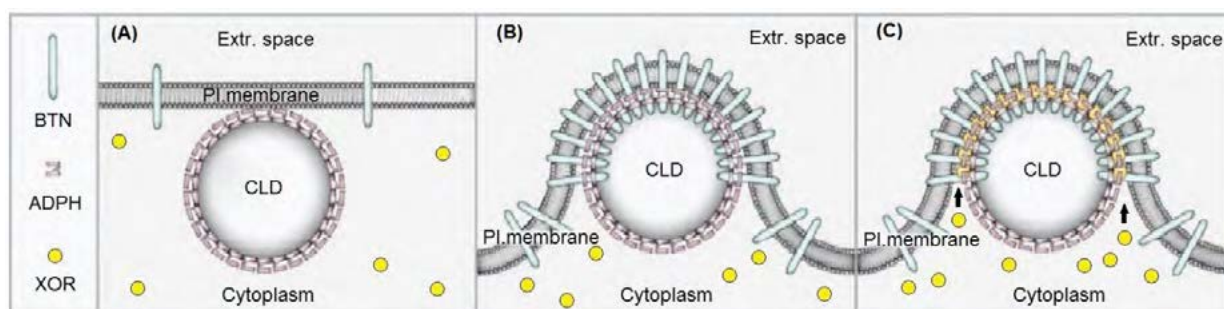


Рис. 5.30. Предполагаемый механизм секреции липидов молока с участием ADPH (по данным [243]). Условные обозначения; BTN – бутирофилин; ADPH – адипофилин; XOR – ксантиноксидоредуктаза; CLD – цитоплазматическая жировая капля; Cytoplasm – цитоплазма секреторной клетки; Pl. membrane – апикальная плазматическая мембрана секреторной клетки; Extr. space – внеклеточное пространство.

А. Контакт жировой капли с цитоплазматическим листком апикальной плазматической мембраны, при участии ADPH (адапторная роль).

В. С-концевые домены ADPH индуцирует искривление плазматической мембраны, скопление и реорганизацию BTN в месте будущей секреции жировой капли.

С. Образование комплекса между XOR и BTN приводит к окончательному обволакиванию жировой капли плазматической мембраной и её отпочковыванию во внеклеточное пространство.

Известно, что присутствующие в третичной структуре белков мотивы спиральных пучков способны вызывать изгибы и деформации плазматических мембран. Индукция искривления и выпячивания мембраны изменяет её текучесть и, как правило, приводит к стягиванию мембранных белков к пятну деформации [261, 262]. В адипофилиновой модели секреции ЦЖК (рис. 5.30), прямая ассоциация четырехспирального пучка ADPH с апикальной плазматической мембраной, предположительно, вызывает её изгиб и локальное повышение концентрации бутирофилина (BTN) в точке будущей секреции ЦЖК. Скопление BTN на участке деформации апикальной мембраны и его взаимодействие с плазматической ксантинокси-

доредуктазой (XOR) завершается образованием тройного белкового комплекса – ADPH-XOR-BTN – и формированием жировой глобулы [243].

Таким образом, значение ADPH, как одного из основных белков ММЖГ, обусловлено тем, что он контактирует как с фосфолипидным монослоем ЦЖК, так и с бислойной мембраной МЖГ. Такая локализация, в сочетании с мембраносвязывающими и мембранодеформирующими свойствами С-терминального домена, хорошо согласуется с представлениями о том, что ADPH может быть медиатором секреции липидов молока, участвуя во взаимодействиях между ЦЖК и плазматической мембраной секреторной клетки.

5.12. Белок, связывающий жирные кислоты (FABP)

Гидрофобные лиганды, такие как жирные кислоты (ЖК) и их производные, выполняют множество биологические функций в клетке. Они служат субстратами и источниками метаболической энергии, а также сигнальными и регуляторными молекулами. Высокоаффинная сорбция и перенос ЖК осуществляется семейством специфических внутриклеточных белков, связывающих жирные кислоты (FABP – fatty acids binding protein, англ.). Белки семейства FABP экспрессируются во многих метаболически-активных тканях и существуют в виде нескольких изоформ.

При ДСН-электрофорезе препаратов ММЖГ, полученных из молока коровы, белок связывающий жирные кислоты, идентифицируется как компонент с ММ ~13 кДа, окрашиваемый СВВ и серебряными красителями, но не PAS-реагентами (рис. 5.7, треки 1, 3, 5; рис. 5.8, панель в). В процессе выделения, значительная часть этого белка выходит в супернатантную фракцию (рис. 5.7, треки 2, 6) [52]. Для выявления FABP в мембране МЖГ методом ДСН-ЭФ необходимо использовать гели, с концентрацией полиакриламида не менее 10%, в противном случае этот белок мигрирует одной полосой вместе с низкомолекулярными компонентами ММЖГ, в зоне лидирующего красителя (сравните треки 1, 2 и 5, 6 на рис. 5.7).

Белок, связывающий ЖК, открыт в 1984 г. группой F. D. Böhmer с соавторами, во время проведения скрининговых исследований, целью которых был поиск ингибиторов роста клеток рака молочной железы. В ходе скрининга было обнаружено, что очищенные супернатантные фракции гомогенатов лактирующей молочной железы коровы содержат белковый ингибитор, способный подавлять рост клеток карциномы молочной железы *in vitro* [263, 264]. Из фракции, обладавшей ингибиторной активностью, выделили, очистили и секвенировали белок с ММ ~13 кДа, который назвали ингибитор роста из молочной железы (MDGI – mammary-derived growth inhibitor, англ.) [43, 263, 264].

Сравнение первичной структуры MDGI с библиотеками а.к. последовательностей показало, что белок принадлежит к семейству протеинов, связывающих ЖК, а его ближайшим структурным гомологом является FABP из клеток сердца (кардиомиоцитов) крысы [43]. Дальнейшие работы по изучению распределения этого белка в ткани молочной железы коровы установили, что MDGI сосредоточен в растворимых клеточных экстрактах и в ММЖГ (как в мембранной, так и в супернатантной фракции), а в молочной сыворотке обнаруживается лишь в следовых количествах [52].

Известно по меньшей мере 9 изоформ ЖК-связывающих протеинов. Во-первых, это белки из молочных желез млекопитающих (коровы, крысы и мыши), которые идентичны FABP из сердечной мышцы [265–269]. Во-вторых, это FABP, выделенные из адипоцитов молочной железы не рожавших мышей [267]. Наличие этого белка в нелактующих молочных железах связывают с наличием в них большого количества жировой ткани. Вместе с тем адипоцитарная форма FABP экспрессируется и во время лактации, например у коровы [270]. В третьих,

кроме адипоцитов и сердечной мышцы, тканеспецифичные FABP были идентифицированы в печени, кишечнике, эпидермисе, миелине, мозге, подвздошной кишке и тестикулах [271–276]. В соответствии с ранней номенклатурой названия белков этого семейства включали буквенное обозначение ткани, для которой они специфичны: печеночные FABP обозначались как L(liver)-FABP, адипоцитарные как A(adipocyte)-FABP, сердечные – H(heart)-FABP и т.п. [271].

Комитет по номенклатуре белков молока (ADSA) рекомендовал использовать для обозначения белка, связывающего жирные кислоты, из ММЖГ коровы аббревиатуру FABP [16]. Однако в связи с пересмотром номенклатуры белков семейства FABP буквенные обозначения тканевой принадлежности были заменены на аббревиатуры FABP (или Fabp) с нумерацией арабскими цифрами, например: FABP3 (или Fabp3) – белок сердечного типа, FABP4 – белок адипоцитарного типа, FABP5 – белок эпидермального типа и так далее [272, 276, 277].

В молочной железе *B. taurus* синтезируются FABP сердечного, адипоцитарного и эпидермального типа – FABP3 (133 а.к.), FABP4 (132 а.к.) и FABP5 (135 а.к.) [277]. Во время лактации экспрессия всех этих белков значительно повышается [271, 278]. По данным [267–270, 278], в процессе лактации в молочных железах крысы, мыши и коровы доминирует сердечная форма FABP.

Первичные структуры FABP3, FABP4 и FABP5 *B. taurus* установлены [277]. Рассмотрим, для примера, структуру FABP4 – белка адипоцитарного типа, который оказывает влияние на концентрацию и соотношение ЖК, молочную продуктивность и содержание белка в коровьем молоке [271, 279, 280]. Аминокислотная последовательность FABP4 коровы и информация о свойствах этого белка, доступны в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P48035/entry>). Идентификационный номер FABP4 *B. taurus* – P48035 (FABP4_BOVIN) [281]. Полипептидная цепь FABP4 состоит из 132 а.к. и имеет вычисленную ММ (без учета ПТМ) равную 14,678 кДа (рис. 5.31). Белок синтезируется в виде предшественника – пре-FABP4, с инициирующим Met1, который удаляется при процессинге. Предположительно, в ходе ПТМ происходит ацетилирование Cys в положении 2, а также фосфорилирование Ser13 и Tyr20 (при участии Туг-киназы [281]).

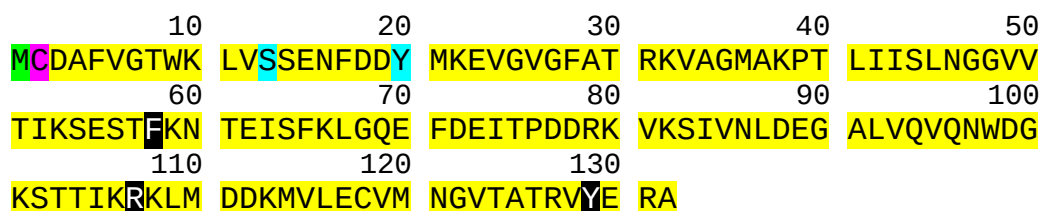


Рис. 5.31. Первичная структура **пре-FABP4** коровы [281]. Зеленым фоном выделен Met1, желтым фоном обозначена а.к. последовательность зрелого FABP4. Лиловым фоном выделен сайт потенциального посттрансляционного ацетилирования. Бирюзовым фоном отмечены, предположительно, фосфорилированные остатки Ser и Tyr. Черным фоном обозначены а.к., участвующие в связывании гидрофобных лигандов [16]. Сокращенные обозначения аминокислот представлены в Приложении 1

Кристаллические структуры по крайней мере 14 белков, включая человеческий FABP из сердечной ткани [282] и мышинный FABP из адипоцитов [283], изучены методом рентгеновской кристаллографии. Данные о результатах исследования FABP4 коровы методами рентгеноструктурного анализа в базе данных 3-D структур белков UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P48035/entry#structure>) отсутствуют. Тем не менее, пространственная модель пре-FABP4 *B.taurus* предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0. [21, 22] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P48035>) с очень высокой достоверностью (>90%) (рис. 5.32).

Пространственная структура большинства изученных белков напоминает бочонок (barrel-like structure, англ.), внутри которого находится полость, образованная двумя участками антипараллельных β-складок [16].

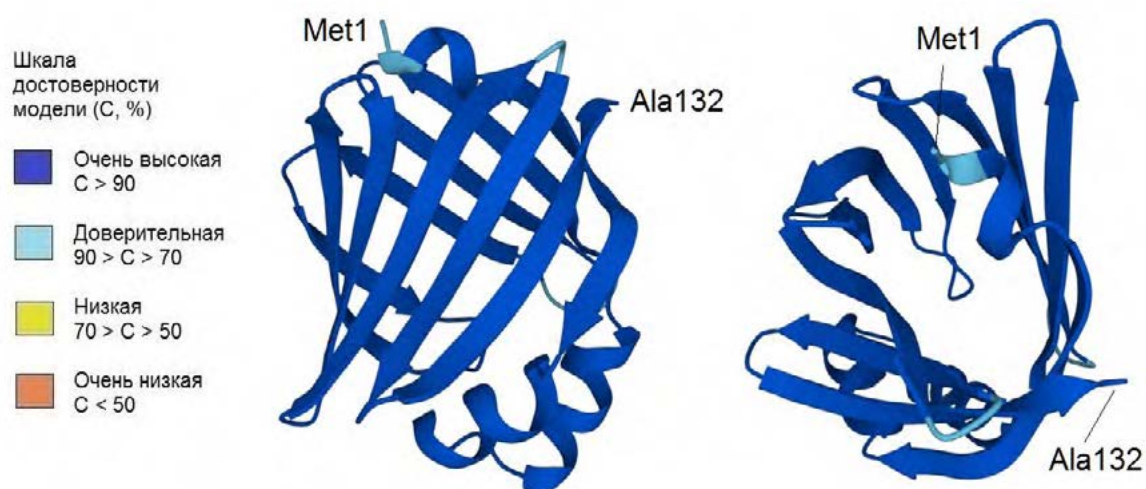


Рис. 5.32. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-FABP4 коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P48035>) [21, 22]. Показаны две проекции модели, на правой видна полость, образованная двумя участками антипараллельных β -складок, которая участвует в связывании липидов

Особенности структуры позволяют разделить семейство FABP-подобных белков на два подсемейства. Характерные структурные признаки внутри каждого подсемейства, строго консервативны, несмотря на то, что в некоторых случаях а.к. состав разных белков имеет низкую степень гомологии.

У внутриклеточных FABP «бочонок» сжат в структуру, которая имеет форму двустворчатого моллюска, а внутренняя полость накрыта последовательностями, которая образует мотив «спираль-поворот-спираль». У всех белков этого подсемейства R-группы гидрофобных а.к. обращены в полость, а гидрофильные аминокислотные остатки β -складок и поворотов, соединяющих антипараллельные β -складки, экспонированы наружу. Положение гидрофобных и гидрофильных а.к. высококонсервативно [284].

У внеклеточных ЖК-связывающих белков или липокалинов «бочонок» раздут до почти сферической формы, а мотив «спираль-поворот-спираль» отсутствует [16]. В отличие от внутриклеточных FABP, состоящих из ≈ 132 а.к., первичная структура белков подсемейства липокалинов (внеклеточных FABP) состоит из ≈ 175 аминокислот. К липокалинам относятся: сывороточный ретинол-связывающий белок, билин-связывающие белки насекомых, $\alpha 2$ -глобулин (основной белок мочи) и, хорошо нам знакомый, β -лактоглобулин из молочной сыворотки [285].

Удивительно, но внутренняя полость в молекулах FABP-подобных белков, участвующая в связывании липидов, не является строго гидрофобной. В ней присутствует некоторое количество упорядоченных молекул воды, а участки полипептидной цепи, обращенные в полость, содержат примерно равное количество гидрофобных и неполярных аминокислотных остатков [16]. В большинстве FABP жирные кислоты и липидные лиганды связываются с определенными полипептидными последовательностями, расположенными ближе к «дну» полости. Ключевыми белковыми группами, критичными для связывания гидрофобных лигандов, считаются консервативные Arg107 и Tyr12 [284]. На «входе» в полость расположен остаток Phe57, консервативный в FABP кардиомиоцитов (FABP3) и адипоцитов (FABP4), который принимает различную конформацию в присутствии, а также отсутствии лиганда (жирной кислоты или липида) [283].

Физиологические функции FABP молочной железы коровы полностью не установлены. В ткани молочной железы FABP может участвовать во внутриклеточном транспорте ЖК, контролировать метаболизм липидов или способствовать слиянию (увеличению размеров) липидных капель в цитоплазме секреторных клеток [16].

Из FABP выделен пептид, обладающий противоопухолевой активностью, который состоит из 11 аминокислот и локализован на С-терминальном участке. И этот пептид, и весь белок MDGI, и FABP из кардиомиоцитов крысы стимулируют дифференцировку клеток молочной железы [286].

Предполагалось, что FABP в молочной железе участвует в процессах развития организма путем ингибирования пролиферации [263, 264] и стимулирования дифференцировки эпителиальных клеток [286]. Есть экспериментальные свидетельства того, что FABP млекопитающих могут регулировать рост и дифференцировку клеток напрямую, через внутриклеточные механизмы [274, 276, 287]. При этом необходимо учитывать, что FABP, секретируемый в составе МЖГ, в основном не способен взаимодействовать с клетками молочной железы, поскольку связан с мембраной, предположительно, через цитоплазматический «хвост» кластера дифференцировки 36 (CD36) [288] или находится в пространстве между внешним фосфолипидным бислоем и внутренней монослойной мембраной [52].

С. Marchitelli и соавторы [279] обнаружили, что активность гена FABP4 связана с содержанием среднепочечных и длиннопочечных ЖК в молоке. Из девяти изученных ими генов-кандидатов по влиянию на состав молочного жира FABP4 является «наиболее важным». R.A. Nafikov и соавторы сообщили, что определенные гаплотипы FABP4 связаны с профилями жирных кислот в молоке, но не с молочной продуктивностью [280]. Напротив, по данным группы Н. Zhou и соавторов, FABP4 может оказывать влияние на два экономически важных признака – молочную продуктивность и содержание белка в молоке. Объектом исследования были 719 коров линии Holstein-Friesian × Jersey с четырьмя гаплотипами FABP4. Показано, что животные гаплотипов AA, AB и AC производили меньше молока, но с более высоким процентом белка, чем коровы гаплотипа BC [272].

При двумерном электрофорезе белков ММЖГ коровы выявляется, по меньшей мере, один минорный и два мажорных изоэлектрических варианта FABP (рис. 5.8, панель в). С использованием антител против FABP коровы показано, что варианты этого белка из ММЖГ имеют рI в диапазоне 5,1–5,9 [288]. Фосфорилирование FABP из миоцитов крысы и адипоцитарного FABP тирозинкиназой инсулинового рецептора, по остатку Tyr20 (последовательность пре-FABP4), превращает эти белки в минорные кислые изоформы [289, 290]. Образование такого же варианта FABP наблюдается при обработке препаратов свежевыделенных клеток молочной железы крысы инсулином [269]. Коровий FABP в составе ММЖГ фосфорилируется эндогенными протеинкиназами при инкубации препаратов мембран с γ 32P-АТФ [209]. Не исключено, что существование различных изоэлектрических форм FABP из ММЖГ коровы (рис. 5.8, панель в) обусловлено различной степенью фосфорилирования полипептидной цепи.

FABP из молочной железы коровы не гликозилирован. Присоединение N-связанных гликанов не характерно для белков, синтезированных в цитоплазме. Известно, что FABP из коровьего сердца содержит один сайт потенциального гликозилирования (Asn-X-Ser/Thr), тем не менее, N- или O-гликозилированные формы очищенных внутриклеточных белков этого семейства не известны [16].

Данных о липидизации FABP из молочной железы коровы нет [16].

5.13. Предполагаемый механизм секреции МЖГ

Известно, что молочные жировые глобулы образуются из секреторных жировых гранул, которые «заворачиваются» в апикальную плазматическую мембрану и отделяются от секреторной клетки [12, 16, 55]. Несмотря на кажущуюся простоту, молекулярный механизм секреции МЖГ млекопитающих до сих пор не установлен [214, 291].

Считается, что «сборка» МЖГ является результатом взаимодействия между специфическими белками плазматической мембраны и поверхностью секреторной гранулы [292]. А именно: бутирофилин (BTN) – трансмембранный протеин клетки секреторного эпителия – связывается с ксантиндегидрогеназой/оксидазой (XDH/XO), образуя белок-белковые комплексы, которые концентрируются на цитоплазматической стороне апикальной мембраны, в том месте, где происходит отпочковывание МЖГ. Комплексы BTN-XDH/XO, в свою очередь, связываются с адипофилином (ADPH), локализованным в монослойной фосфолипидной мембране, окружающей секреторную гранулу. Это вызывает изгибание плазматической мембраны, которая обволакивает секреторную гранулу (на плоскости это подобно тому, как застегивается замок «молния»), с последующим отпочковыванием МЖГ от поверхности секреторной клетки [243].

Данный гипотетический механизм предполагает, что белки, участвующие в этом процессе, расположены в соответствующих (конгруэнтных) положениях, как в монослой фосфолипидов на поверхности секреторных гранул, так и на цитоплазматической стороне апикальной мембраны секреторной клетки. Соответствующая топография BTN, XDH/XO и ADPH должна сохраняться и в молочной жировой глобуле. Сложность заключается в том, что разрешающая способность методов, используемых для детектирования этих белков, не позволяла точно определить их локализацию в ММЖГ относительно друг друга.

Предпринимались попытки определить точные «координаты» BTN, ADPH и XDH/XO путем сравнительного анализа состава субклеточных фракций. Но результаты биохимических исследований, полученные на изолированных субклеточных компонентах, не дали ожидаемого результата [214].

Иммунофлюоресцентная микроскопия позволяет напрямую обнаруживать различные белки в молочных жировых глобулах [253, 293], однако разрешающая способность метода также недостаточна для точного определения локализации BTN, ADPH и XDH/XO в сложной трехслойной фосфолипидной оболочке МЖГ. Кроме того, фиксирующие вещества, детергенты и растворы, используемые в иммунохимических исследованиях, могут необратимо изменять размеры и форму жировых капель, а также распределение связанных с ними белков [294–296]. Таким образом, до недавнего времени не было известно где – в монослойной мембране, фосфолипидном бислое или в остатках расположенной между ними цитоплазмы («рогаликах») – находятся белки, участвующие в образовании и секреции МЖГ.

В 2006 г. Н. Robenek с соавторами методом иммуноцитохимии в сочетании со сканирующей электронной микроскопией образцов, полученных способом замораживания-скальвания, с высокой точностью определили локализацию мембранносвязанных белков в различных участках фосфолипидных слоев МЖГ и предложили молекулярный механизм секреции жировых глобул молока [12]. Для определения топографии ADPH, BTN и XDH/XO в оболочке ММЖГ использовали иммуноаффинную метку – антитела (At), конъюгированные с частицами коллоидного золота (Au-At).

В частности, было показано, что в ММЖГ ADPH связан с мембраной секреторной гранулы. На эктоплазматическом (наружном) листке бислойной мембраны ADPH-метка не регистрируется. Это подтверждает представления о том, что адипофилин является периферическим, а не трансмембранным белком. На участках мембраны секреторной клетки, прилегающих к мембране секреторных гранул, молекулы ADPH образуют скопления (кластеры). Аналогичные кластеры адипофилина и перилипина обнаружены в плазматической мембране, контактирующей с липидными каплями в клетках, не секретирующих молоко [297]. Возможно, кластеры ADPH в мембране секреторной клетки молочной железы не участвуют в секреции жировых глобул, а выполняют иную, пока неизвестную функцию [12].

Бутирофилин, так же, как и адипофилин, идентифицируется как в монослойной, так и в бислойной фосфолипидной мембране МЖГ (рис. 5.33А–В). Однако содержание BTN-метки в монослойной мембране в 3,7 раза выше (в монослое – 138.88 ± 0.12 частиц коллоидного Au/ μm^2 ; в бислое – 38.24 ± 0.12 частиц/ μm^2 , $P < 0,01$), чем в бислойной фосфолипидной оболочке. Одновременное исследование образцов с BTN- и ADPH-метками показало, что участки локализации этих белков в монослойных мембранах (в монослойных оболочках секреторных гранул) не совпадают (рис. 5.33С) [12]. Это частично согласуется с положениями модели секреции МЖГ В.М. Chong и соавторов, согласно которой основной ролью ADPH в механизме секреции МЖГ является индукция изменения вязко-текучих свойств и искривления бислойной фосфолипидной мембраны [243].

На эктоплазматической стороне двухслойной мембраны МЖГ и на фосфолипидном монослое BTN-метки образуют своеобразный «рисунок» в виде нерегулярных сетчатых структур, имеющих форму складок (или бороздок). Важно, что сетка молекул BTN (и сетка бороздок, в которых они расположены) на монослое является зеркальным отражением сетки BTN на бислойной мембране. В местах наложения (совпадения) сеток монослойная и бислойная мембраны находятся в тесном контакте друг с другом [12].

Иммуноаффинные метки XDH/XO и белка TIP47 выявлены на внешней стороне мембраны секреторной гранулы, на эктоплазматической поверхности бислойной мембраны эти белки не обнаруживаются (рис. 5.33D) [12].

Поскольку данные электронной микроскопии свидетельствуют о предполагаемых BTN-BTN взаимодействиях в мембране МЖГ, было проведено исследование самоагрегации бутирофилина методом ДСН-ЭФ. В экспериментах *in vitro* установлено, что очищенный бутирофилин проявляет сильную склонность к самоагрегации, которая усиливается с увеличением времени инкубации образцов при нагревании (рис. 5.33Е). Молекулярные массы наиболее часто образующихся агрегатов BTN составляют ~200 кДа и ~260 кДа.

Доводы «против» существующего механизма секреции МЖГ с участием комплекса BTN-XDH/XO-ADPH, по мнению Н. Robenek и соавторов, заключаются в следующем:

1. Если секреция МЖГ действительно зависит от связывания комплекса BTN-XDH/XO (находящегося на клеточной мембране) и ADPH (расположенного на монослое), то смысл локализации BTN (так же, как и XDH/XO) в монослойной мембране не понятен.

2. Бутирофилин образует в монослойной мембране «рисунок» в виде нерегулярных сетчатых структур, а XDH/XO-метка располагается диффузно. Это позволяет предполагать, что в оболочке МЖГ BTN не образует комплекс с ксантиндегидрогеназой/оксидазой.

3. Диффузное расположение в монослойной мембране ADPH-метки, не совпадает с сеткой молекул бутирофилина. Это свидетельствует о том, что в процессе секреции МЖГ, BTN не связан ни напрямую, ни через комплекс BTN-XDH/XO с адипофилином, локализованным в монослойной мембране секреторной гранулы.

Анализ распределения бутирофилина в МЖГ позволяет предположить следующий механизм его участия в секреции жировых глобул.

В бислойной фосфолипидной оболочке МЖГ бутирофилин образует сеть, расположенную в бороздках (складках), которые спроецированы на поверхность монослойной мембраны секреторной гранулы. Наличие тесного контакта фосфолипидных мембран в местах совпадения сеток бутирофилина монослоя и бислоя предполагает наличие в этих точках бутирофилин-опосредованных сайтов адгезии. Напомним, что BTN принадлежит к семейству адгезивных белков, его аминокислотная последовательность и структура адаптированы для участия в белок-белковых взаимодействиях [195, 196]. Способность бутирофилина к самоагрегации и воз-

мощность образования BTN-олигомеров подтверждена экспериментами *in vitro* (рис. 5.33 Е) [12, 182].

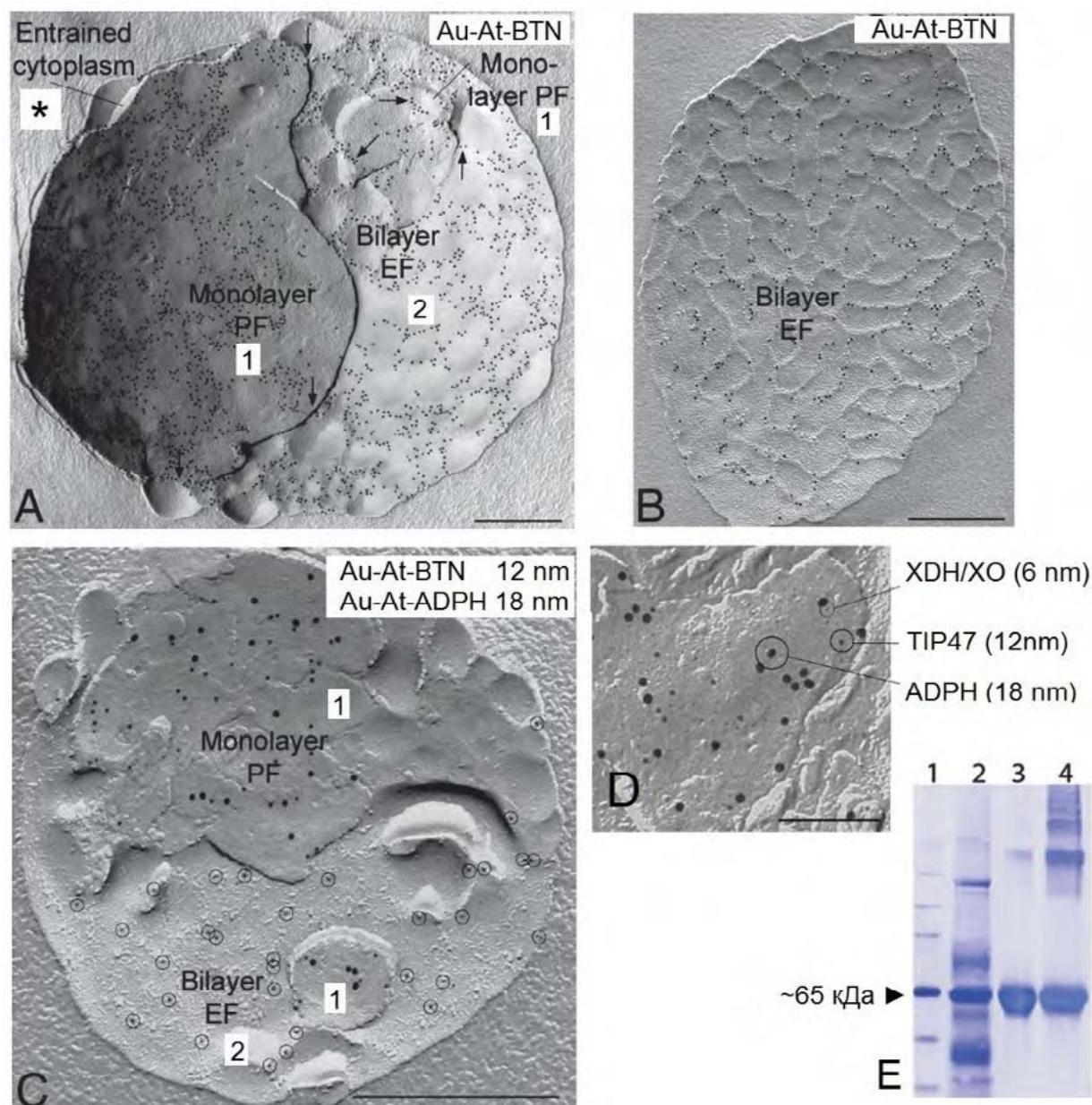


Рис. 5.33. Топография белков оболочки МЖГ коровы [12]. А. Микрофотография оболочки МЖГ, меченой Au-At-BTN. Метка BTN (тёмные точки) локализована на экзоплазматической стороне бислойной мембраны (2) и на монослойной мембране (1). Стрелками отмечены места, где цепочки меток на местах сколов продолжают друг друга на бислойной и монослойной мембранах. Звёздочкой показан «рогалик» – фрагмент цитоплазмы секреторной клетки между монослойной и бислойной мембранами; В. Микрофотография экзоплазматического участка бислойной мембраны МЖГ, меченой Au-At-BTN (тёмные точки); С. Микрофотография оболочки МЖГ, меченой Au-At к BTN (12 nm) и ADPH (18 nm). Метки BTN видны как в монослойной (1), так и в бислойной (2) мембране (обведены кружками). Метки ADPH локализованы только в монослойной мембране; D. Фрагмент монослойной мембраны с тройной Au-At меткой: ADPH (18 nm), XDH/XO (6 nm) и белок TIP47 (12 nm); Е. Исследование самоагрегации BTN методом ДСН-ЭФ. Обозначения треков: 1) маркеры ММ; 2) 10 мкг белков ММЖГ; 3) 10 мкг очищенного BTN, инкубированного при 95 °C в течение одной минуты; 4) 10 мкг очищенного BTN, инкубированного при 95 °C в течение 10 минут. ММ мономеров BTN составляет ~65 кДа (►)

Как молекулы BTN образуют сетчатые структуры в оболочках МЖГ?

Авторы исследования обнаружили, что липидное ядро молочной жировой глобулы не гомогенно, а состоит из множества контактирующих, но не слившихся ядер первичных жировых

капель (в качестве аналогии представьте футбольный мяч, набитый шариками для настольного тенниса). Фактически внешняя поверхность секреторной глобулы – не идеальная сфера, а поверхность, состоящая из небольших возвышенностей и впадин. По мнению исследователей, ядра первичных жировых капель, расположенные под монослойной фосфолипидной оболочкой секреторной гранулы, препятствуют равномерному распределению бутирофилина в монослой и формируют скопления этого белка в бороздках.

Бутирофилин – трансмембранный белок, несущий гидрофильные С- и N-терминальные участки, который «плавает» в слое фосфолипидов. В пространствах между гидрофобными ядрами жировых капель образуются складки монослойной мембраны, в которых молекулы BTN могут скапливаться (и агрегировать?), что приводит к образованию стабильной BTN-сетки в монослойной мембране. При контакте секреторной гранулы с апикальной мембраной, благодаря своим адгезивным свойствам, молекулы бутирофилина (в монослой и бислой) взаимодействуют с образованием комплексов BTN-BTN. Эти комплексы «сшивают» оболочку секреторной гранулы и участок апикальной плазматической мембраны. В результате бислойная клеточная мембрана обволакивает секреторную гранулу, а на поверхности образовавшейся МЖГ формируется зеркальная (монослой) BTN-сетка [12].

Таким образом, согласно точке зрения Н. Robenek и соавторов, именно бутирофилин играет главную роль в образовании жировых глобул молока. Межмолекулярные BTN-BTN взаимодействия запускают механизм «обертывания» секреторной гранулы в апикальную плазматическую мембрану секреторной клетки, который заканчивается отпочковыванием МЖГ. В пользу такого механизма свидетельствует и тот факт, что концентрация BTN в эндоплазматическом ретикулеуме примерно в три раза выше, чем в плазматической мембране [12].

Результаты последних исследований свидетельствуют о значительном вкладе эндоплазматического ретикулуума и казеин-содержащих везикул в формирование структуры мембран МЖГ во время секреции молока. Эти данные указывают на то, что механизм секреции молока гораздо сложнее, чем предполагается в настоящее время [298].

5.14. Минорные белковые компоненты ММЖГ

Кроме рассмотренных нами протеинов, препараты ММЖГ коровы содержат множество других минорных белков. Перечень идентифицированных, выделенных или частично охарактеризованных белковых компонентов ММЖГ представлен в таблице 5.2.

В основном это ферменты, белки основного комплекса гистосовместимости, цитоплазматические белки секреторных клеток, протеины лейкоцитов и полипептидные компоненты обезжиренного молока.

Многие из них могут быть выявлены методами двумерного электрофореза (рис. 5.8) в сочетании с блоттинговыми технологиями и высокочувствительными методами окраски белков [16, 299].

Не вызывает сомнения, что многие присутствующие в следовых количествах белковые компоненты – это периферические, слабо связанные с ММЖГ цитозольные (цитоплазматические) протеины эпителиальной ткани молочной железы и соматических клеток, а также сывороточные белки молока. В некоторых случаях цитоплазматическое происхождение ряда протеинов не очевидно, и их трудно дифференцировать на контаминанты и истинные мембранные белки МЖГ.

Например, 5'-нуклеотидаза и фосфодиэстераза входят в состав клеточных мембран [300] и, вероятно, их следует считать компонентами фосфолипидного бислоя ММЖГ.

Таблица 5.2

Белки и ферменты, выделенные из мембран (или идентифицированные в мембранах)
молочных жировых глобул коровы ¹⁾ [12, 16]

Название белка или фермента	Номер EC
Ацетил-СоА-карбоксилаза ²⁾	6.4.1.2
N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза	3.2.1.52
Кислая фосфатаза	3.1.3.2
Аденозинтрифосфатаза (активируемая K ⁺ /Mg ²⁺)	3.6.1.3
Альдолаза	4.1.2.13
Щелочная фосфатаза ³⁾	3.1.3.1
Ангиогенин ³⁾	3.1.27.
Основной фибробласт-подобный фактор роста	...
Каталаза	1.11.1.6
Холинэстераза	3.1.1.7 (или 8?)
Цитохром b5	...
Цитохром P-420	...
Диафораза (липоамид дегидрогеназа)	1.8.1.4
β-Галактозидаза	3.2.1.23
Галактозилтрансфераза ³⁾	2.4.1.22, 2.4.1.38, 2.4.1.90
Глюкозо-6-фосфатаза	3.1.3.9
β-Глюкозидаза	3.2.1.21
γ-Глютамилтранспептидаза ³⁾	2.3.2.2
ГТФ-связывающие белки	...
УДФ-гликозилгидролаза	3.2.1-
Неорганическая пирофосфатаза	3.6.1.1
НАДФ/цитохром C редуктаза	1.6.99.3
НАДФ-феррицианидредуктаза	1.6.99.3
НАДФН/цитохром c редуктаза	1.6.99.1
5'-Нуклеотидаза ³⁾	3.1.3.5
Нуклеотидпирофосфатаза	3.6.1.9
Фосфатаза фосфатидной кислоты ³⁾	3.1.3.4
Фосфодиэстераза I	3.1.4.1
Плазминоген/плазмин	3.4.21.7
Рибонуклеаза I ⁴⁾	3.1.27.5
Оксидаза сульфгидрильных групп	1.8.3.2
Тиаминфосфодиэстераза (нуклеозиддифосфатаза)	3.6.1.6
Белок TIP 47 (Tail-interacting protein, 47 kDa)	...
Протеозо пептон 3 (PP3)	...

1) За исключением сывороточных белков молока и казеинов;

2) Неактивный фермент, выявлен методом иммуноблоттинга;

3) Белок выделен из ММЖГ или мембраны жировой глобулы молозива;

4) Следы.

Такие ферменты, как фосфатаза и каталаза, содержатся в лизосомах и пероксисомах. Их концентрация повышается в молоке маститных животных и при накоплении в молочных же-

лезах эндотоксинов [301–305]. Источником этих ферментов считаются полиморфноядерные лейкоциты, которые проникают в очаг воспаления молочной железы из системного кровотока [306]. Показано, что лейкоциты могут связываться с МЖГ [27] и, следовательно, флотировать вместе со сливками в процессе выделения жировых глобул, используемых для получения препаратов ММЖГ.

С одной стороны, повышенное содержание кислой фосфатазы и каталазы в ММЖГ может быть обусловлено контаминацией молока маститных коров лейкоцитами. С другой – в сливках из молока здоровых животных лейкоциты встречаются крайне редко, и в этом случае соматические клетки вряд ли можно считать источником кислой фосфатазы и каталазы в ММЖГ.

Мастит может стать причиной повышенного содержания в молоке ферментов и цитозольных белков клеток секреторного эпителия в результате их физического повреждения. Например, при инфекционных заболеваниях вымени основным источником фермента N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы в молоке служат секреторные клетки, а лейкоциты являются минорным «поставщиком» этого фермента [303]. И вновь, как и в случае с кислой фосфатазой и каталазой, в ММЖГ от здоровых животных N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза содержится в очень низкой концентрации и её происхождение не совсем понятно [16].

Внешняя мембрана молочной жировой глобулы может адсорбировать некоторые белки обезжиренной фракции молока. Например, содержание в препаратах ММЖГ плазминогена, связанного с казеиновыми мицеллами, можно снизить в несколько раз, промывая жировые глобулы забуференными солевыми растворами [14, 44].

Источником некоторых минорных белков ММЖГ коровы (например, альдолазы [12]) могут быть участки цитоплазмы, остающейся между внешним фосфолипидным бислоем и мембраной жировой глобулы (называемые «рогаликами» или «полумесяцами») [29, 307].

В то же время степень контаминации ММЖГ цитоплазматическими ферментами зависит от вида животного и является очень низкой у молочных коров [29]. Иногда активность, обнаруживаемая в препаратах ММЖГ, обусловлена последовательным действием нескольких ферментов с близкой субстратной специфичностью, например, гидролаз и редокс ферментов [16].

Комитет по номенклатуре белков молока (ADSA) рекомендует использовать для обозначения идентифицированных и охарактеризованных протеинов, связанных с ММЖГ, названия, соответствующие их международной классификации и номенклатуре.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (номер темы FZMW-2020-0002, «Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия»).

Библиографический список к главе 5

1. Harjinder, S. The milk fat globule membrane – A biophysical system for food applications / S. Harjinder // Curr. Opin. Colloid & Interface Sci. – 2006. – V. 11. – P. 154–163.
2. Smoczyński, M. Composition and Structure of the Bovine Milk Fat Globule Membrane – Some Nutritional and Technological Implications / M. Smoczyński, B. Staniewski, K. Kielczewska // Food Reviews International. – 2012. – V. 28. – № 2. – P. 188–202.
3. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 2: Lipids, 3rd edition. Composition, Applications, Fractionation, Technological and Nutritional Significance of Milk Fat Globule Membrane Material / R.E. Ward, J.B. German, M. Corredig; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Springer, 2006. – P. 213–244.

4. Комарова, О.Н. Мембрана жировых глобул молока: технология будущего уже сегодня / О.Н. Комарова, А.И. Хавкин // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2016. – №2. – С. 35–41.
5. Lopez, C. Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure / C. Lopez // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2011. – V. 16. – P. 391–404.
6. *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 2: Lipids*, 3rd edition. Intracellular Origin of Milk Fat Globules and the Nature of the Milk Fat Globule Membrane / T.W. Keenan, I.H. Mather.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Springer, 2006. – P. 137–171.
7. *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 2: Lipids*, 3rd edition. Physical Chemistry of Milk Fat Globules / T. Huppertz, A.L. Kelly.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – New York, USA: Springer, 2006. – P. 173–212.
8. Dewettinck, K. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material / K. Dewettinck, R. Rombaut, N. Thienpont, T. Le, K. Messens, J. Vancamp // *Int. Dairy J.* – 2008. – V. 18. – P. 436–457.
9. Bauman, D. E. Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk / D. E. Bauman, I.H. Mather, R.J. Wall, A.L. Lock // *J. Dairy Sci.* – 2006. – V. 89. – P. 1235–1243.
10. Lopez, C. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins / C. Lopez, M.-N. Madec, R. Jimenez-Flores // *Food Chemistry.* – 2010. – V. 120. – P. 22–33.
11. Jensen, R.G. The Composition of bovine milk lipids, Invited Review / R.G. Jensen // *J. Dairy Sci.* – 2002. – V. 85. – P. 295–350.
12. Robenek, H. Butyrophilin controls milk fat globule secretion / H. Robenek, O. Hofnagel, I. Buers, S. Lorkowski, M. Schnoor, M.J. Robenek, H. Heid, D. Troyer, N.J. Severs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103(27). – P. 10385–10390.
13. Keenan, T.W. Biochemical and morphological comparison of plasma membrane and milk fat globule membrane from bovine mammary gland / T.W. Keenan, D.J. Morré, D.E. Olson, W.N. Yung-hans, S. Patton // *J. Cell Biol.* – 1970. – V. 44. – P. 80–93.
14. Basch, J.J. Identification of the milk fat globule membrane proteins. II. Isolation of the major proteins from electrophoretic gels and comparison of their amino acid compositions / J.J. Basch, R. Greenberg, H.M. Farrell // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – V. 830. – P. 127–135.
15. Eigel, W.N. Nomenclature of proteins of cow's milk. 5th rev. / W.N. Eigel, J. E. Butler, C.A. Ernstrom, H.M. Farrell, V.R. Harwalker, R. Jenness, R.M. Whitney // *J. Dairy Sci.* – 1984. – V. 67. – P. 1599–1631.
16. Mather, I.H. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane / I.H. Mather // *J. Dairy Sci.* – 2000. – V. 83. – P. 203–247.
17. Wiking, L. Milk Fat Globule Stability. Lipolysis with Special Reference to Automatic Milking Systems. Doctoral thesis / L. Wiking // Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Food Science, Uppsala. – 2005. – P. 10–15.
18. Kanno, C.M. A simple procedure for the preparation of bovine milk fat globule membrane and a comparison of its composition, enzymatic activities, and electrophoretic properties with those prepared by other methods / C.M. Kanno, D.H. Kim // *Agric. Biol. Chem.* – 1990. – V. 54. – P. 2845–2854.
19. Mather, I.H. Studies on the structure of milk fat globule membrane / I.H. Mather, T.W. Keenan // *J. Membr. Biol.* – 1975. – V. 21. – P. 65–85.
20. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. 3rd ed. Physical equilibria: lipid phase / T.W. Keenan, I.H. Mather, D.P. Dylewski.; N.P. Wong, ed. – New York, NY, USA: Van Nostrand Reinhold Co, 1988. – P. 511–582.

21. A Handbook of Milk Composition. The structure of milk: Implications for sampling and storage. The milk lipid globule membrane / T.W. Keenan, S. Patton.; R. G. Jensen, ed. – New York, NY, USA: Academic Press, 1995. – P. 5–50.
22. The Mammary Gland: Development, Regulation and Function. Proteins of the milk–fat–globule membrane as markers of mammary epithelial cells and apical plasma membrane / I.H. Mather.; M.C. Neville, C.W. Daniel, eds. – New York, NY, USA: Plenum Publ. Corp, 1987. – P. 217–267.
23. McPherson, A.V. Reviews of the progress of dairy science: the bovine milk fat globule membrane – its formation, composition, structure and behavior in milk and dairy products / A.V. McPherson, B.J. Kitchen // J. Dairy Res. – 1983. – V. 50. – P. 107–133.
24. Patton, S. Release of remnant plasma membrane from milk fat globules by Triton X–100 / S. Patton // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – V. 688. – P. 727–734.
25. Patton, S. Release of membrane from milk fat globules by conjugated bile salts / S. Patton, B. Borgström, B.H. Stemberger, U. Welsch // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. – 1986. – V. 5. – P. 262–267.
26. Dapper, C.H. Use of polar aprotic solvents to release membranes from milk lipid globules / C.H. Dapper, H.M. Valivullah, T.W. Keenan // J. Dairy Sci. – 1987. – V. 70. – P. 760–765.
27. Russell, M.W. Electron microscopic observations of the interaction of casein micelles and milk fat globules with bovine polymorphonuclear leucocytes during the phagocytosis of staphylococci in milk / M.W. Russell, B.E. Brooker, B. Reiter // J. Comp. Pathol. – 1977. – V. 87. – P. 43–52.
28. Hvarregaard, J. Characterization of glycoprotein PAS–6/7 from membranes of bovine milk fat globules / J. Hvarregaard, M.H. Andersen, L. Berglund, J.T. Rasmussen, T.E. Petersen // Eur. J. Biochem. – 1996. – V. 240. – P. 628–636.
29. Janssen, M.M.T. Cytoplasmic remnants in milk of certain species / M.M.T. Janssen, P. Walstra // Neth. Milk Dairy J. – 1982. – V. 36. – P. 365–368.
30. Patton, S. A method for isolation of milk fat globules / S. Patton, G.E. Huston // Lipids. – 1986. – V. 21. – P. 170–174.
31. Ogg, S.L. Butyrophilin is expressed in mammary epithelial cells from a single–sized messenger RNA as a type I membrane glycoprotein / S.L. Ogg, L.J.W. Jack, V.N. Vakharia, I.H. Mather // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273. – P. 4171–4179.
32. Anderson, M. Molecular–weight estimates of milk–fat–globule–membrane protein–sodium dodecyl sulphate complexes by electrophoresis in gradient acrylamide gels / M. Anderson, T. Cawston, G.C. Cheeseman // Biochem. J. – 1974. – V. 139. – P. 653–660.
33. Mather, I.H. Separation of the proteins of bovinemilk–fat–globule membrane by electrofocusing with retention of enzymatic and immunological activity / I.H. Mather, C.B. Tamplin, M.G. Irving // Eur. J. Biochem. – 1980. – V. 110. – P. 327–336.
34. Shimizu, M. Microheterogeneity and some properties of the major glycoprotein fraction isolated from bovine milk fat globule membrane after delipidation / M. Shimizu, C. Kanno, K. Yamauchi // Agric. Biol. Chem. – 1978. – V. 42. – P. 981–987.
35. Anderson, M. Loss of material during the isolation of milk fat globule membrane / M. Anderson, B.E. Brooker // J. Dairy Sci. – 1975. – V. 58. – P. 1442–1448.
36. Kitchen, B.J. A comparison of the properties of membranes isolated from bovine skim milk and cream / B.J. Kitchen // Biochim. Biophys. Acta. – 1974. – V. 356. – P. 257–269.
37. Kobylka, D. Proteins and glycoproteins of the milk fat globule membrane / D. Kobylka, K.L. Carraway // Biochim. Biophys. Acta. – 1972. – V. 288. – P. 282–295.
38. Greenwalt, D.E. Characterization of an apically derived epithelial membrane glycoprotein from bovine milk, which is expressed in capillary endothelia in diverse tissues / D.E. Greenwalt, I.H. Mather // J. Cell Biol. – 1985. – V. 100. – P. 397–408.

39. Aoki, N. Molecular cloning of glycoprotein antigens MGP57/53 recognized by monoclonal antibodies raised against bovine milk fat globule membrane / N. Aoki, M. Kishi, Y. Taniguchi, T. Adachi, R. Nakamura, T. Matsuda // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – V. 1245. – P. 385–391.
40. Basch, J.J. Identification of the milk fat globule membrane proteins. I. Isolation and partial characterization of glycoprotein B / J.J. Basch, H.M. Farrell, R. Greenberg // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1976. – V. 448. – P. 589–598.
41. Butler, J.E. Bovine-associated mucoprotein. I. Distribution among adult and fetal bovine tissues and body fluids / J.E. Butler, D.J. Pringnitz, C. L. Martens, N. Crouch // *Differentiation.* – 1980. – V. 17. – P. 31–40.
42. Pringnitz, D.J. *In vivo* proteolytic activity of the mammary gland. Contribution to the origin of secretory component, β 2-microglobulin and bovine-associated mucoprotein (BAMP) in cows' milk / D.J. Pringnitz, J.E. Butler, A.J. Guidry // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 1985. – V. 9. – P. 143–160.
43. Böhmer, F.-D. Identification of a polypeptide growth inhibitor from bovine mammary gland. Sequence homology to fatty acid- and retinoid-binding proteins / F.-D. Böhmer, R. Kraft, A. Otto, C. Wernstedt, U. Hellman, A. Kurtz, T. Müller, K. Rohde, G. Etzold, W. Lehmann, P. Langen, C.-H. Heldin, R. Grosse // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262. – P. 15137–15143.
44. Benfeldt, C. Isolation and characterization of plasminogen and plasmin from bovine milk / C. Benfeldt, L.B. Larsen, J.T. Rasmussen, P.A. Andreasen, T.E. Petersen // *Int. Dairy J.* – 1995. – V. 5. – P. 577–592.
45. Patton, S. The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues / S. Patton, S.J. Gendler, A.P. Spicer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – V. 1241. – P. 407–424.
46. Mangino, M.E. Isolation and partial characterization of xanthine oxidase associated with the milk fat globule membrane of cow's milk / M.E. Mangino, J.R. Brunner // *J. Dairy Sci.* – 1977. – V. 60. – P. 841–850.
47. Kaetzel, C.S. Expression of a 95–100 kDa glycoprotein on the apical surfaces of bovine mammary epithelial cells during lactation / C.S. Kaetzel, L.R. Banghart, D.Y. Jackson, P.J. Madara, E.-D. Jarasch, I.H. Mather // *Biochem. Soc. Trans.* – 1987. – V. 15. – P. 1117–1118.
48. Greenwalt, D. E. PAS IV, an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV) / D.E. Greenwalt, K.W.K. Watt, O.Y. So, N. Jiwani // *Biochemistry.* – 1990. – V. – 29. – P. 7054–7059.
49. Jack, L.J. Cloning and analysis of cDNA encoding bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and secreted in association with the milk-fat globule membrane during lactation / L.J. Jack, I.H. Mather // *J. Biological Chem.* – 1990. – V. 265. – P. 14481–14486.
50. Stubbs, J.D. cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences / J.D. Stubbs, C. Lekutis, K.L. Singer, A. Bui, D. Yuzuki, U. Srinivasan, G. Parry // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – V. 87. – P. 8417–8421.
51. Heid, H.W. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases / H.W. Heid, R. Moll, I. Schwetlick, H.-R. Rackwitz, T.W. Keenan // *Cell Tissue Res.* – 1998. – V. 294. – P. 309–321.
52. Brandt, R.A. 13-kilodalton protein purified from milk fat globule membranes is closely related to a mammary-derived growth inhibitor / R. Brandt, M. Pepperle, A. Otto, R. Kraft, F.-D. Boehmer, R. Grosse // *Biochemistry.* – 1988. – V. 27. – P. 1420–1425.
53. Morrissey, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity / J.H. Morrissey // *Anal. Biochem.* – 1981. – V. 117. – P. 307–310.

54. Jarasch, E.-D. Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium / E.-D. Jarasch, C. Grund, G. Bruder, H.W. Heid, T.W. Keenan, W.W. Franke // *Cell*. – 1981. – V. 25. – P. 67–82.
55. Mather, I.H. Origin and secretion of milk lipids / I.H. Mather, T.W. Keenan // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. – 1998. – V. 3. – P. 259–273.
56. Mather, I.H. Membranes of mammary gland. XII. Loosely associated proteins and compositional heterogeneity of bovine milk fat globule membrane / I.H. Mather, K. Weber, T. W. Keenan // *J. Dairy Sci.* – 1977. – V. 60. – P. 394–402.
57. Smorodinsky, N. Detection of a secreted MUC1/SEC protein by MUC1 isoform specific monoclonal antibodies / N. Smorodinsky, M.Weiss, M.-L. Hartmann, A. Baruch, E. Harness, M. Yaakovitz, I. Keydar, D. H. Wreschner // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – V. 228. – P. 115–121.
58. Patton, S. Genetic polymorphism of PAS-I, the mucin-like glycoprotein of bovine milk fat globule membrane / S. Patton, R.S. Patton // *J. Dairy Sci.* – 1990. – V. 73. – P. 3567–3574.
59. Ельчанинов, В.В. Белки мембраны молочной жировой глобулы. 1. Генез и структура жировой глобулы молока, номенклатура белков мембраны молочной жировой глобулы / В.В. Ельчанинов // *Молочная промышленность*. – 2019. – № 7. – С. 24–27.
60. Ельчанинов, В.В. Белки мембраны молочной жировой глобулы. 2. Муцин 1 (MUC 1) / В.В. Ельчанинов // *Молочная промышленность*. – 2019. – № 8. – С. 26–28.
61. Singh, H. The milk fat globule membrane – A biophysical system for food applications / H. Singh // *Curr. Opinion Colloid Interface Sci.* – 2006. – V. 11. – P. 154–163.
62. Spicer, A.P. Analysis of mammalian MUC1 genes reveals potential functionally important domains / A.P. Spicer, T. Duhig, B.S. Chilton, S.J. Gendler // *Mammal. Genome*. – 1995. – V. 6. – P. 885–888.
63. Gendler, S.J. Epithelial mucin genes / S.J. Gendler, A.P. Spicer // *Annu. Rev. Physiol.* – 1995. – V. 57. – P. 607–634.
64. Hareuveni, M. A transcribed gene, containing a variable number of tandem repeats, codes for a human epithelial tumor antigen. cDNA cloning, expression of the transfected gene and overexpression in breast cancer tissue / M. Hareuveni, I. Tsarfaty, J. Zaretsky, P. Kotkes, J. Horev, S. Zrihan, M. Weiss, S. Green, R. Lathe, I. Keydar, D.H. Wreschner // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – V. 189. – P. 475–486.
65. Patton, S. Genetic polymorphism of the epithelial mucin, PAS-I, in milk samples from the major dairy breeds / S. Patton, L.D. Muller // *J. Dairy Sci.* – 1992. – V. 75. – P. 863–867.
66. Gendler, S.J. Molecular cloning and expression of human tumorassociated polymorphic epithelial mucin / S.J. Gendler, C.A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E.-N. Lalani, D. Wilson // *J. Biol. Chem.* – 1990. – V. 265. – P. 15286–15293.
67. Hens, J.R. Associations of the epithelial mucin, PAS-1, with yield, health, and reproductive traits in Holstein dairy cows / J.R. Hens, G.W. Rogers, M.L. Huott, S. Patton // *J. Dairy Sci.* – 1995. – V. 78. – P. 2473–2480.
68. Huott, M.L. Polymorphic forms of the epithelial mucin, PAS I (MUC1), in milk of Holstein cows (*Bos taurus*) / M.L. Huott, R.V. Josephson, J.R. Hens, G.W. Rogers, S. Patton // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1995. – V. 111B. – P. 559–565.
69. Sacchi, P. Two new variants of the bovine PAS-1 glycoprotein / P. Sacchi, E. Macchi, R. Rasero, P. Fiandra // *Anim. Genet.* – 1995. – V. 26. – P. 197–198.
70. Sando, L. Bovine Muc1 is a highly polymorphic gene encoding an extensively glycosylated mucin that binds bacteria / L. Sando, R. Pearson, C. Gray, P. Parker, R. Hawken, P. C. Thomson, J.R.S. Meadows, K. Kongsuwan, S. Smith, R. L. Tellam // *J. Dairy Sci.* – 2009. – V. 92. – P. 5276–5291.

71. Swallow, D.M. The human tumour-associated epithelial mucins are coded by an expressed hyper-variable gene locus PUM / D.M. Swallow, S. Gendler, B. Griffiths, G. Corney, J. Taylor-Papadimitriou, M. E. Bramwell // *Nature (Lond.)*. – 1987. – V. 328. – P. 82–84.
72. Peterson, J.A. Milk fat globule glycoproteins in human milk and in gastric aspirates of mother's milk-fed preterm infants / J.A. Peterson, M. Hamosh, C.D. Scallan, R.L. Ceriani, T.R. Henderson, N.R. Mehta, M. Armand, P. Hamosh // *Pediatr. Res.* – 1998. – V. 44. – P. 499–506.
73. Peterson, J.A. Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breastfed infant against infections / J.A. Peterson, S. Patton, M. Hamosh // *Biol. Neonate*. – 1998. – V. 74. – P. 143–162.
74. Braga, V.M.M. Spatial and temporal expression of an epithelial mucin, Muc-1, during mouse development / V.M.M. Braga, L.F. Pemberton, T. Duhig, S.J. Gendler // *Development*. – 1992. – V. 115. – P. 427–437.
75. Parry, G. Determination of apical membrane polarity in mammary epithelial cell cultures: the role of cell-cell, cell-substratum, and membrane-cytoskeleton interactions / G. Parry, J.C. Beck, L. Moss, J. Bartley, G.K. Ojakian // *Exp. Cell Res.* – 1990. – V. 188. – P. 302–311.
76. Hilkens, J. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property / J. Hilkens, M.J.L. Ligtenberg, H.L. Vos, S.V. Litvinov // *Trends. Biochem. Sci.* – 1992. – V. 17. – P. 359–363.
77. Wesseling, J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1 / J. Wesseling, S.W. van der Valk, J. Hilkens // *Mol. Biol. Cell*. – 1996. – V. 7. – P. 565–577.
78. Schroten, H. Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction / H. Schroten, F.G. Hanisch, R. Plogmann, J. Hacker, G. Uhlenbruck, R. Nobis-Bosch, V. Wahn // *Infect. Immun.* – 1992. – V. 60. – P. 2893–2899.
79. Sando, L. Bovine Muc1: a polymorphic gene encoding a highly glycosylated mucin that protects epithelial cells from bacterial attachment / L. Sando, R. Pearson, C. Gray, P. Parker, R. Hawken, P. Thomson, J. Meadows, K. Kongsuwan, S. Smith, R.L. Tellam // *J. Dairy Sci.* – 2009. – V. 92. – P. 5276–5291.
80. Food Structures, Digestion and Health, Chapter 4 – The Milk Fat Globule Membrane: Structure, Methodology for its Study, and Functionality / S. Gallier, A. Laubscher, R. Jiménez-Flores; M. Bolland, M. Golding, H. Singh, eds. – Waltham, USA: Elsevier Inc., 2014. – P. 107–142.
81. Bhavanandan, V.P. Cancer-associated mucins and mucintype glycoproteins // V.P. Bhavanandan // *Glycobiology*. – 1991. – V. 1. – P. 493–503.
82. Houghton, A.N. Stuck in the MUC on the long and winding road / A.N. Houghton, K.O. Lloyd // *Nat. Med.* – 1998. – V. 4. – P. 270–271.
83. McKenzie, I.F.C. Mucins in breast cancer: recent immunological advances / I.F.C. McKenzie, P.-X. Xing // *Cancer Cells*. – 1990. – V.2. – P. 75–78.
84. Taylor-Papadimitriou, J. The polymorphic epithelial mucin as a target for immunotherapy / J. Taylor-Papadimitriou, L. Stewart, J. Burchell, P. Beverley // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1993. – V. 690. – P. 69–79.
85. McAuley, J.L. The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection / J.L. McAuley, L. Corcilius, H.-X. Tan, R.J. Payne, M.A. McGuckin, L.E. Brown // *Mucosal Immunol.* – 2017. – V. 10. – N. 6. – P. 1581–1593.
86. Li, Y. Anti-inflammatory effect of MUC1 during respiratory syncytial virus infection of lung epithelial cells *in vitro* / Y. Li, D.L. Dinwiddie, K.S. Harrod, Y. Jiang, K.C. Kim // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2010. – V. 298. – P. 558–563.

87. Spicer, A. P. Delayed mammary tumor progression in Muc-1null mice / A.P. Spicer, G.J. Rowse, T.K. Lidner, S.J. Gendler // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270. – P. 30093–30101.
88. Parker, P. Bovine Muc1 inhibits binding of enteric bacteria to Caco-2 cells / P. Parker, L. Sando, R. Pearson, K. Kongsuwan, R. Tellam, S. Smith // Glycoconjugate J. – 2010. – V. 27. – P. 89–97.
89. McAuley, J.L. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection / J.L. McAuley, S.K. Linden, C.W. Png, R.M. King, H.L. Pennington, S.J. Gendler, T.H. Florin, G.R. Hill, V. Korolik, M.A. McGuckin // J. Clin. Invest. – 2007. – V. 117. – P. 2313–2324.
90. McGuckin, M.A. Muc1 mucin limits both *Helicobacter pylori* colonization of the murine gastric mucosa and associated gastritis / M.A. McGuckin, A.L. Every, C.D. Skene, S.K. Linden, Y.T. Chionh, A. Swierczak, J. McAuley, S. Harbour, M. Kaparakis, R. Ferrero, P. Sutton // Gastroenterol. – 2007. – V. 133. – P. 1210–1218.
91. Pallesen, L.T. Purification of MUC1 from bovine milk-fat globules and characterization of a corresponding full-length cDNA clone / L.T. Pallesen, M.H. Andersen, R.L. Nielsen, L. Berglund, T.E. Petersen, L.K. Rasmussen, J.T. Rasmussen // J. Dairy Sci. – 2001. – V. 84(12). – P. 2591–2598.
92. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. Q8WML4 MUC1_BOVIN – Mucin-1 *Bos taurus* (Bovine), Gene: MUC1, 580 amino acids 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8WML4/entry> (дата обращения: 31.08.2022).
93. Ligtenberg, M.J.L. Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini / M.J.L. Ligtenberg, H.L. Vos, A.M.C. Genissen, J. Hilken // J. Biol. Chem. – 1990. – V. 265. – P. 5573–5578.
94. Rasero, R. Molecular analysis of the length polymorphic MUC1 gene in cattle / R. Rasero, P. Sacchi, S. Rosati, E. Cauvin // J. Anim. Breed. Genet. – 2002. – V. 19. – P. 342–349.
95. Perucatti, A. Comparative FISH mapping of mucin 1, transmembrane (MUC1) among cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes: comparison between bovine chromosome 3 and human chromosome 1 / A. Perucatti, S. Floriot, G.P. Di Meo, D. Soglia, R. Rullo, S. Maione, D. Incarnato, A. Eggen, P. Sacchi, R. Rasero, L. Iannuzzia // Cytogen. Genome Res. – 2005. – V. 112(1–2). – P. 103–105.
96. Spicer, A. P. Molecular cloning and analysis of the mouse homologue of the tumorassociated mucin, MUC1, reveals conservation of potential O-glycosylation sites, transmembrane, and cytoplasmic domains and a loss of minisatellite-like polymorphism / A.P. Spicer, G. Parry, S. Patton, S.J. Gendler // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266. – P. 15099–15109.
97. Zrihan-Licht, S. Tyrosine phosphorylation of the MUC1 breast cancer membrane proteins. Cytokine receptor-like molecules / S. Zrihan-Licht, A. Baruch, O. Elroy-Stein, I. Keydar, D.H. Wreschner // FEBS Lett. – 1994. – V. 356. – P. 130–136.
98. Pemberton, L.F. The epithelial mucin MUC1 contains at least two discrete signals specifying membrane localization in cells / L.F. Pemberton, A. Rugghetti, J. Taylor-Papadimitriou, S.J. Gendler // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – P. 2332–2340.
99. Li, Y. Interaction of glycogen synthase kinase 3 β with the DF3/MUC1 carcinoma associated antigen and β -catenin / Y. Li, A. Bharti, D. Chen, J. Gong, D. Kufe // Mol. Cell. Biol. – 1998. – V. 18. – P. 7216–7224.
100. Gumbiner, B.M. Regulation of cadherin adhesive activity / B.M. Gumbiner // J. Cell Biol. – 2000. – V. 148. – P. 399–404.
101. Yap, A.S. Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane / A.S. Yap, E.M. Kovacs // J. Cell Biol. – 2003. – V. 160. – P. 11–16.
102. Syme, C.D. A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau. New insight into the structure and behavior of natively unfolded proteins / C.D. Syme, E.W. Blanch,

- C. Holt, R. Jakes, M. Goedert, L. Hecht, L.D. Barron // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – V. 269. – P. 148–156.
103. Smyth, E. Solution structure of native proteins with irregular folds from Raman optical activity / E. Smyth, C.D. Syme, E.W. Blanch, L. Hecht, M. Vařák, L.D. Barron / *Biopolymers.* – 2000. – V 58. – P. 138–151.
 104. Adzhubei, A.A. Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins / A.A. Adzhubei, M.J.E. Sternberg // *J. Mol. Biol.* – 1993. – V. 229. – P. 472–493.
 105. Snow, L.D. Purification and properties of the major sialoglycoprotein of the milk fat globule membrane / L.D. Snow, D.G. Colton, K.L. Carraway // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1977. – V. 179. – P. 690–697.
 106. Hanisch, F.–G. MUC1 glycoforms in breast cancer. Cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation / F.–G. Hanisch, T.R.E. Stadie, F. Deutzmann, J. Peter-Katalinic // *Eur. J. Biochem.* – 1996. – V. 236. – P. 318–327.
 107. Waud, W.R. A new purification procedure for bovine milk xanthine oxidase: effect of proteolysis on the subunit structure / W.R. Waud, F.O. Brady, R.D. Wiley, K.V. Rajagopalan // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1975. – V. 169. – P. 695–701.
 108. Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 3: Milk Lipids, Second Edition. Milk Fat Globule Membrane / I.H. Mather.; J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – San Diego, USA: Academic Press, 2011. – P. 680–690.
 109. Wang, C.H. Xanthine dehydrogenase: An old enzyme with new knowledge and prospects / C.H. Wang, C. Zhang, X.H. Xing // *Bioengineered.* – 2016. – V. 7(6). – P. 395–405.
 110. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P80457 (XDH_BOVIN) – Xanthine dehydrogenase / oxidase Bos taurus (Bovine), Gene: XDH 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P80457/entry> (дата обращения: 31.08.2022).
 111. Ельчанинов, В.В. Белки мембраны молочной жировой глобулы. 3. Ксантиндегидрогеназа / оксидаза (XDH/XO) / В.В. Ельчанинов // *Молочная промышленность.* – 2020. – № 5. – С. 56–58.
 112. BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System. EC 1.17.1.4 – xanthine dehydrogenase. 2022. – URL: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.17.1.4> (дата обращения: 27.08.2022).
 113. BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System. EC 1.17.3.2 – xanthine oxidase 2022. – URL: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.17.3.2> (дата обращения: 27.08.2022).
 114. Enroth, C. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion / C. Enroth, B.T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, Nishino, E.F. Pai // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97. – P. 10723–10728.
 115. Okamoto, K. The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition / K. Okamoto, K. Matsumoto, R. Hille, B.T. Eger, E.F. Pai, T. Nishino // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2004. – V. 101. – P. 7931–7936.
 116. Briley, M.S. Association of xanthine oxidase with the bovine milk-fat-globule membrane. Catalytic properties of the free and membrane-bound enzyme / M.S. Briley, R. Eisinger // *Biochem. J.* – 1974. – V. 143. – P. 149–157.
 117. Bruder, G. Characteristics of membrane-bound and soluble forms of xanthine oxidase from milk and endothelial cells of capillaries / G. Bruder, H. Heid, E.–D. Jarasch, T.W. Keenan, I.H. Mather // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – V. 701. – P. 357–369.
 118. Briley, M.S. Association of xanthine oxidase with the bovine milk-fat-globule membrane. Nature of the enzyme-membrane association / M.S. Briley, R. Eisinger // *Biochem. J.* – 1975. – V. 147. – P. 417–423.

119. Hille, R. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase / R. Hille, T. Nishino // *FASEB J.* – 1995. – V. 9. – P. 995–1003.
120. Nishino, T. The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene / T. Nishino, T. Nishino // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 29859–29864.
121. Hunt, J. Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase / J. Hunt, V. Massey // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – P. 21479–21485.
122. Clare, D.A. Sulfhydryl oxidase-catalyzed conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase / D.A. Clare, B.A. Blakistone, H.E. Swaisgood, H.R. Horton // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1981. – V. 211. – P. 44–47.
123. Kuwabara, Y. Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase / Y. Kuwabara, T. Nishino. K. Okamoto, T. Matsumura, B.T. Eger, E.F. Pai, T. Nishino // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2003. – V. 100. – P. 8170–8175.
124. Nishino, T. Interaction of milk xanthine oxidase with folic acid. Inhibition of milk xanthine oxidase by folic acid and separation of the enzyme into two fractions on Sepharose 4B/folate gel / T. Nishino, K. Tsushima // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V. 261. – P. 11242–11246.
125. Massey, V. Milk xanthine oxidoreductase: the first one hundred years / V. Massey, C. M. Harris // *Biochem. Soc. Trans.* – 1997. – V. 25. – P. 750–755.
126. Bulkley, G.B. Physiology of reactive oxidant-mediated signal transduction: an overview / G.B. Bulkley // *Biochem. Soc. Trans.* – 1997. – V. 25. – P. 804–812.
127. Trujillo, M. Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols / M. Trujillo, M.N. Alvarez, G. Peluffo, B.A. Freeman, R. Radi // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 7828–7834.
128. Zhang, Z. Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity / Z. Zhang, D. Naughton, P.G. Winyard, N. Benjamin, D.R. Blake, M.R.C. Symons // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – V. 249. – P. 767–772.
129. Pahl, H.L. Oxygen and the control of gene expression / H.L. Pahl, P.A. Baeuerle // *BioEssays.* – 1994. – V. 16. – P. 497–502.
130. Khan, A.U. Reactive oxygen species as cellular messengers / A.U. Khan, T. Wilson // *Chem. Biol.* – 1995. – V. 2. – P. 437–445.
131. Kurosaki, M. Expression of xanthine oxidoreductase in mouse mammary epithelium during pregnancy and lactation: regulation of gene expression by glucocorticoids and prolactin / M. Kurosaki, S. Zanotta, M. Li Calzi, E. Garattini, M. Terao // *Biochem. J.* – 1996. V. 319. – P. 801–810.
132. Page, S. Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines / S. Page, D. Powell, M. Benboubetra, C.R. Stevens, D.R. Blake, F. Selase, A. J. Wolstenholme, R. Harrison // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – V. 1381. – P. 191–202.
133. Parks, D.A. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology / D.A. Parks, D.N. Granger // *Acta. Physiol. Scand.* – 1986. – V. 548(Suppl.). – P. 87–99.
134. Ishii, T. Carboxy-terminal cytoplasmic domain of mouse butyrophilin specifically associates with a 150-kDa protein of mammary epithelial cells and milk fat globule membrane / T. Ishii, N. Aoki, A. Noda, T. Adachi, R. Nakamura, T. Matsuda // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – V. 1245. – P. 285–292.
135. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 7th ed. Vol. II. Hereditary xanthinuria / H.A. Simmonds, S. Reiter, T. Nishino.; C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, eds. – New York, NY: McGraw-Hill, Inc., 1995. – P. 1781–1797.
136. Ichida, K. Identification of two mutations in human xanthine dehydrogenase gene responsible

- for classical type I xanthinuria / K. Ichida, Y. Amaya, N. Kamatani, T. Nishino, T. Hosoya, O. Sakai // J. Clin. Invest. – 1997. – V. 99. – P. 2391–2397.
137. Amaya, Y. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin / Y. Amaya, K.-I. Yamazaki, M. Sato, K. Noda, T. Nishino, T. Nishino // J. Biol. Chem. – 1990. – V. 265. – P. 14170–14175.
 138. Berglund, L. Purification of the bovine xanthine oxidoreductase from milk fat globule membranes and cloning of complementary deoxyribonucleic acid / L. Berglund, J.T. Rasmussen, M.D. Andersen, M.S. Rasmussen, T.E. Petersen // J. Dairy Sci. – 1996. – V. 79. – P. 198–204.
 139. Keenan, T.W. Tight attachment of fatty acids to proteins associated with milk lipid globule membrane / T.W. Keenan, H.W. Heid, J. Stadler, E.-D. Jarasch, W.W. Franke // Eur. J. Cell Biol. – 1982. – V. 26. – P. 270–276.
 140. Mather, I.H. Separation of the proteins of bovine milkfat globule membrane by electrofocusing / I.H. Mather // Biochim. Biophys. Acta. – 1978. – V. 514. – P. 25–36.
 141. Mather, I.H. Detection of xanthine oxidase and immunologically related proteins in fractions from bovine mammary tissue and milk after electrophoresis in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate / I.H. Mather, C.H. Sullivan, P.J. Madara // Biochem. J. – 1982. – V. 202. – P. 317–323.
 142. Zikakis, J.P. Xanthine oxidase polymorphism in bovine milk / J.P. Zikakis, J.M. Treece // J. Dairy Sci. – 1971. – V. 54. – P. 648–654.
 143. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. Q8MI01 MUC15_BOVIN – Mucin-15 *Bos taurus* (Bovine) Gene: MUC15, 330 amino acids 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8MI01/entry> (дата обращения: 01.09.2022).
 144. Pallesen, L.T. Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane associated mucin / L.T. Pallesen, L. Berglund, L.K. Rasmussen, T.E. Petersen, J.T. Rasmussen // Eur. J. Biochem. – 2002. – V. 269. – P. 2755–2763.
 145. Greenwalt, D.E. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine / D.E. Greenwalt, R.H. Lipsky, C.F. Ockenhouse, H. Ikeda, N.N. Tandon, G.A. Jamieson // Blood. – 1992. – V. 80. – P. 1105–1115.
 146. Berglund, L. Structural characterization of bovine CD36 from the milk fat globule membrane / L. Berglund, T.E. Petersen, J.T. Rasmussen // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – V. 1309. – P. 63–68.
 147. Greenwalt, D.E. Structural, functional, and antigenic differences between bovine heart endothelial CD36 and human platelet CD36 / D.E. Greenwalt, K.W.K. Watt, T. Hasler, R.J. Howard, S. Patel // J. Biol. Chem. – 1990. – V. 265. – P. 16296–16299.
 148. Talle, M.A. Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies / M.A. Talle, P.E. Rao, E. Westberg, N. Allegar, M. Makowski, R.S. Mittler, G. Goldstein // Cell Immunol. – 1983. – V. 78 P. 83–99.
 149. Kieffer, N. Developmentally regulated expression of a 78 kDa erythroblast membrane glycoprotein immunologically related to the platelet thrombospondin receptor / N. Kieffer, A. Bettaieb, C. Legrand, L. Coulombel, W. Vainchenker, L. Edelman, J. Breton-Gorius // Biochem. J. – 1989. – V. 262. – P. 835–842.
 150. Asch, A.S. Isolation of the thrombospondin membrane receptor / A.S. Asch, J. Barnwell, R.L. Silverstein, R.L. Nachman // J. Clin. Invest. – 1987. – V. 79. – P. 1054–1061.
 151. Knowles, D.M. Monoclonal anti-human monocyte antibodies OKM1 and OKM5 possess distinctive tissue distributions including differential reactivity with vascular endothelium /

- D.M. Knowles, B. Tolidjian, C. Marboe, V. D'Agati, M. Grimes, L. Chess // J. Immunol. – 1984. – V. 132. – P. 2170–2173.
152. Abumrad, N.A. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36 / N.A. Abumrad, M.R. El-Maghrabi, E.-Z. Amri, E. Lopez, P.A. Grimaldi // J. Biol. Chem. – 1993. – V. 268. – P. 17665–17668.
 153. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P26201 CD36_BOVIN – Platelet glycoprotein 4 *Bos taurus* (Bovine), Gene: CD36 (PAS4), 472 amino acids 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P26201/entry> (дата обращения: 02.09.2022).
 154. Tao, N. CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails / N. Tao, S.J. Wagner, D.M. Lublin // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – P. 22315–22320.
 155. Sefton, B.M. The covalent modification of eukaryotic proteins with lipid / B.M. Sefton, J.E. Buss // J. Cell Biol. – 1987. – V. 104. – P. 1449–1453.
 156. Crombie, R. Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif / R. Crombie, R. Silverstein // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273. – P. 4855–4863.
 157. Rasmussen, J.T. Assignment of disulfide bridges in bovine CD36 / J.T. Rasmussen, L. Berglund, M.S. Rasmussen, T.E. Petersen // Eur. J. Biochem. – 1998. – V. 257. – P. 488–494.
 158. Gruarin, P. Formation of one or more intrachain disulphide bonds is required for the intracellular processing and transport of CD36 / P. Gruarin, R. Sitia, M. Alessio // Biochem. J. 1997. – V. 328. – P. 635–642.
 159. Shaw, A.S. Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase / A.S. Shaw, J. Chalupny, J.A. Whitney, C. Hammond, K.E. Amrein, P. Kavathas, B.M. Sefton, J.K. Rose // Mol. Cell Biol. – 1990. – V. 10. – P. 1853–1862.
 160. Nakata, N. Structural study of the sugar chains of CD36 purified from bovine mammary epithelial cells: occurrence of novel hybrid-type sugar chains containing the Neu5Ac α 2 $\rightarrow$ 6GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc and the Man α 1 $\rightarrow$ 2Man α 1 $\rightarrow$ 3Man α 1 $\rightarrow$ 6Man groups / N. Nakata, K. Furukawa, D.E. Greenwalt, T. Sato, A. Kobata // Biochemistry. – 1993. – V. 32. – P. 4369–4383.
 161. Sato, T. Most bovine milk fat globule membrane glycoproteins contain asparagine-linked sugar chains with GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc groups / T. Sato, K. Furukawa, D.E. Greenwalt, A. Kobata // J. Biochem. (Tokyo). – 1993. – V. 114. – P. 890–900.
 162. Sato, T. Site-specific glycosylation of bovine butyrophilin / T. Sato, K. Takio, A. Kobata, D.E. Greenwalt, K. Furukawa // J. Biochem. (Tokyo). – 1995. – V. 117. – P. 147–157.
 163. Sato, T. Expression of β -N-acetylgalactosaminylated N-linked sugar chains is associated with functional differentiation of bovine mammary gland / T. Sato, J. Taka, N. Aoki, T. Matsuda, K. Furukawa // J. Biochem. (Tokyo). – 1997. – V. 122. – P. 1068–1073.
 164. Ujita, M. A change in soybean agglutinin binding patterns of bovine milk fat globule membrane glycoproteins during early lactation / M. Ujita, K. Furukawa, N. Aoki, T. Sato, A. Noda, R. Nakamura, D.E. Greenwalt, T. Matsuda // FEBS Lett. – 1993. – V. 332. – P. 119–122.
 165. Asch, A.S. Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain / A.S. Asch, I. Liu, F.M. Briccetti, J.W. Barnwell, F. Kwakye-Berko, A. Dokun, J. Goldberger, M. Pernambuco // Science. – 1993. – V. 262. – P. 1436–1440.
 166. Ockenhouse, C.F. Activation of monocytes and platelets by monoclonal antibodies or malaria-infected erythrocytes binding to the CD36 surface receptor *in vitro* / C.F. Ockenhouse, C. Magowan, J.D. Chulay // J. Clin. Invest. – 1989. – V. 84. – P. 468–475.

167. Silverstein, R.L. Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion / R.L. Silverstein, A.S. Asch, R.L. Nachman // J. Clin. Invest. – 1989. – V. 84. – P. 546–552.
168. Dawson, D.W. CD36 mediates the *in vitro* inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells / D.W. Dawson, S.F.A. Pearce, R. Zhong, R.L. Silverstein, W.A. Frazier, N.P. Bouck // J. Cell Biol. – 1997. – V. 138. – P. 707–717.
169. Savill, J. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis / J. Savill, N. Hogg, Y. Ren, C. Haslett // J. Clin. Invest. – 1992. – V. 90. – P. 1513–1522.
170. Ryeom, S.W. CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium / S.W. Ryeom, J.R. Sparrow, R.L. Silverstein // J. Cell Sci. – 1996. – V. 109. – P. 387–395.
171. Rigotti, A. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids / A. Rigotti, S.L. Acton, M. Krieger // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270. – P. 16221–16224.
172. Tait, J.F. Phosphatidylserine receptors: role of CD36 in binding of anionic phospholipid vesicles to monocytic cells / J.F. Tait, C. Smith // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – P. 3048–3054.
173. Endemann, G. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein / G. Endemann, L.W. Stanton, K.S. Madden, C.M. Bryant, R.T. White, A.A. Protter // J. Biol. Chem. – 1993. – V. 268. – P. 11811–11816.
174. Febbraio, M. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism / M. Febbraio, N.A. Abumrad, D.P. Hajjar, K. Sharma, W. Cheng, S.F.A. Pearce, R.L. Silverstein // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – P. 19055–19062.
175. Han, J. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36 / J. Han, D.P. Hajjar, M. Febbraio, A.C. Nicholson // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – P. 21654–21659.
176. Prodanović, R. Obesity-driven prepartal hepatic lipid accumulation in dairy cows is associated with increased CD36 and SREBP-1 expression / R. Prodanović, G. Korićanac, I. Vujanac, A. Djordjević, M. Pantelić, S. Romić, Z. Stanimirović, D. Kirovski // Res. Veterinary Sci. – 2016. – V. 107. – P. 16–19.
177. Dawes, J. Thrombospondin in milk, other breast secretions, and breast tissue / J. Dawes, P. Clezardin, D.A. Pratt // Semin. Thromb. Hemostasis. – 1987. – V. 13. – P. 378–384.
178. Mondy, B.L. Butyrophilin and xanthine oxidase occur in constant molar proportions in milk lipid globule membrane but vary in amount with breed and stage of lactation / B.L. Mondy, T.W. Keenan // Protoplasma. – 1993. – V. 177. – P. 32–36.
179. Franke, W.W. Antibodies to the major insoluble milk fat globule membrane-associated protein: specific location in apical regions of lactating epithelial cells / W.W. Franke, H.W. Heid, C. Grund, S. Winter, C. Freudenstein, E. Schmid, E.-D. Jarasch, T.W. Keenan // J. Cell Biol. – 1981. – V. 89. – P. 485–494.
180. Heid, H.W. Butyrophilin, an apical plasmamembrane-associated glycoprotein characteristic of lactating mammary glands of diverse species / H.W. Heid, S. Winter, G. Bruder, T. W. Keenan, E.-D. Jarasch // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – V. 728. – P. 228–238.
181. Johnson, V.G. Identification and characterization of the principal proteins of the fat-globule membrane from guinea-pig milk / V.G. Johnson, D.E. Greenwalt, H.W. Heid, I.H. Mather, P.J. Madara // Eur. J. Biochem. – 1985. – V. 151. – P. 237–244.
182. Neira, L.M. Biochemical and immunological comparison of bovine butyrophilin with a butyrophilinlike glycoprotein in guinea pig milk-fat-globule membrane: evidence that the guinea pig protein is developmentally regulated and specifically expressed in lactating mammary tissue / L.M. Neira, I.H. Mather // Protoplasma. – 1990. – V. 159. – P. 168–178.

183. Taylor, M.R. Cloning and sequence analysis of human butyrophilin reveals a potential receptor function / M.R. Taylor, J.A. Peterson, R.L. Ceriani, J.R. Couto // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1996. – V. 1306. – P. 1–4.
184. Shimizu, M. High-Mr glycoprotein profiles in human milk serum and fat-globule membrane / M. Shimizu, K. Yamauchi, Y. Miyauchi, T. Sakurai, K. Tokugawa, R.A.J. McIlhinney // *Biochem. J.* – 1986. – V. 233. – P. 725–730.
185. Mather, I.H. A review of the molecular and cellular biology of butyrophilin, the major protein of bovine milk fat globule membrane / I.H. Mather, L.J.W. Jack // *J. Dairy Sci.* – 1993. – V. 76. – P. 3832–3850.
186. Banghart, L.R. Butyrophilin is expressed in mammary epithelial cells from a single-sized messenger RNA as a type I membrane glycoprotein / L.R. Banghart, C.W. Chamberlain, J. Velarde, I.V. Korobko, S.L. Ogg, L.J.W. Jack, V.N. Vakharia, I.H. Mather // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 4171–4179.
187. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P18892 BT1A1_BOVIN – Butyrophilin subfamily 1 member A1 *Bos taurus* (Bovine), Gene: BTN1A1 (BTN), 526 amino acids 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P18892/entry> (дата обращения: 02.09.2022).
188. Eichinger, A. The extracellular region of bovine milk butyrophilin exhibits closer structural similarity to human myelin oligodendrocyte glycoprotein than to immunological BTN family receptors / A. Eichinger, I. Neumaier, A. Skerra // *Biol. Chem.* – 2021. – Published online August 2, 2021. DOI:10.1515/hsz-2021-0122.
189. Encyclopedia of Dairy Sciences. Vol. 3: Milk Lipids, 2nd ed. Milk Fat Globule Membrane / I.H. Mather.; J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. – San Diego, USA: Academic Press, 2011. – P. 680–690.
190. Pham-Dinh, D. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex / D. Pham-Dinh, M.-G. Mattei, J.-L. Nussbaum, G. Roussel, P. Pontarotti, N. Roedel, I.H. Mather, K. Artzt, K. Fischer Lindahl, A. Dautigny // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – V. 90. – P. 7990–7994.
191. Williams, A.F. The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition / A.F. Williams, A.N. Barclay // *Annu. Rev. Immunol.* – 1988. – V. 6. – P. 381–405.
192. Bajorath, J. Immunoglobulin fold characteristics of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) / J. Bajorath, R.J. Peach, P.S. Linsley // *Protein Sci.* – 1994. – V. 3. – P. 2148–2150.
193. Wootton, J.C. Non-globular domains in protein sequences: automated segmentation using complexity measures / J.C. Wootton // *Comput. Chem.* – 1994. – V. 18. – P. 269–285.
194. Seto, M.H. Protein fold analysis of the B30.2-like domain / M.H. Seto, H.-L. C. Liu, D.A. Zajchowski, M. Whitlow // *Proteins.* – 1999. – V. 35. – P. 235–249.
195. Henry, J. B30.2-like domain proteins: update and new insights into a rapidly expanding family of proteins / J. Henry, I.H. Mather, M.F. McDermott, P. Pontarotti // *Mol. Biol. Evol.* – 1998. – V. 15. – P. 1696–1705.
196. Henry, J. B30.2-like domain proteins: a growing family / J. Henry, M.-T. Ribouchon, C. Offer, P. Pontarotti // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1997. – V. 235. – P. 162–165.
197. Chan, E.K.L. Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen / E.K.L. Chan, J.C. Hamel, J.P. Buyon, E.M. Tan // *J. Clin. Invest.* – 1991. – V. 87. – P. 68–76.
198. Quaderi, N.A. Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22 / N.A. Quaderi, S. Schweiger, K. Gaudenz, B. Franco, E.I. Rugarli, W. Berger, G.J. Feldman, M. Volta, G. Andolfi, S. Gilgenkrantz, R.W. Marion, R.C.M. Hennekam, J.M. Opitz, M. Muenke, H.H. Ropers, A. Ballabio // *Nat. Genet.* – 1997. – V. 17. – P. 285–291.
199. Bellini, M. A zinc-binding domain is required for targeting the maternal nuclear protein PwA33 to lampbrush chromosome loops / M. Bellini, J.-C. Lacroix, J.G. Gall // *J. Cell Biol.* – 1995. –

- V. 131. – P. 563–570.
200. Ruddy, D.A. A 1.1-Mb transcript map of the hereditary hemochromatosis locus / D.A. Ruddy, G.S. Kronmal, V.K. Lee, G.A. Mintier, L. Quintana, R. Domingo, N.C. Meyer, A. Irrinki, E.E. McClelland, A. Fullan, F.A. Mapa, T. Moore, W. Thomas, D.B. Loeb, C. Harmon, Z. Tsuchihashi, R.K. Wolff, R.C. Schatzman, J.N. Feder // *Genome Res.* – 1997. – V. 7. – P. 441–456.
 201. Ghadessy, F.J. Stonustoxin is a novel lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. cDNA cloning and characterization / F.J. Ghadessy, D. Chen, R.M. Kini, M.C.M. Chung, K. Jeyaseelan, H.E. Khoo, R. Yuen // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – P. 25575–25581.
 202. Schweiger, S. The Opitz syndrome gene product, MID1, associates with microtubules / S. Schweiger, J. Foerster, T. Lehmann, V. Suckow, Y.A. Muller, G. Walter, T. Davies, H. Porter, H. van Bokhoven, P.W. Lunt, P. Traub, H.–H. Ropers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – V. 96. – P. 2794–2799.
 203. Ye, A. Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes / A. Ye, H. Singh, M.W. Taylor, S. Anema // *Int. Dairy J.* – 2002. – V. 12. – P. 393–402.
 204. Heid, H.W. Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane / H.W. Heid, M. Schnolzer, T.W. Keenan // *Biochem. J.* – 1996. – V. 320. – P. 1025–1030.
 205. Henry, J. Cloning, structural analysis, and mapping of the B30 and B7 multigenic families to the major histocompatibility complex (MHC) and other chromosomal regions / J. Henry, M.–T. Ribouchon, D. Depetris, M.–G. Mattei, C. Offer, R. Tazi-Ahnini, P. Pontarotti // *Immunogenetics.* – 1997. – V. 46. – P. 383–395.
 206. Tazi-Ahnini, R. Cloning, localization, and structure of new members of the butyrophilin gene family in the juxta-telomeric region of the major histocompatibility complex / R. Tazi-Ahnini, J. Henry, C. Offer, C. Bouissou-Bouchouata, I.H. Mather, P. Pontarotti // *Immunogenetics.* – 1997. – V. 47. – P. 55–63.
 207. Protein Data Bank, PDB – банк данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот. PDB Entry – 4HH8. Title: Crystal structure of bovine butyrophilin; Latest revision on: 13 November 2013. DOI: 10.2210/pdb4hh8/pdb 2022. – URL: https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00004hh8 (дата обращения: 03.09.2022).
 208. Cavaletto, M. Multiple forms of lactadherin (breast antigen BA46) and butyrophilin are secreted into human milk as major components of milk fat globule membrane / M. Cavaletto, M.G. Giffuffrida, C. Giunta, C. Vellano, C. Fabris, E. Bertino, J. Godovac-Zimmermann, A. Conti // *J. Dairy Res.* – 1999. – V. 66. – P. 295–301.
 209. Spitsberg, V.L. *In vitro* phosphorylated bovine milk fat globule membrane proteins / V.L. Spitsberg, R.C. Gorewit // *J. Nutr. Biochem.* – 1997. – V. 8. – P. 181–189.
 210. Riccio, P. The proteins of the milk fat globule membrane in the balance / P. Riccio // *Trends Food Sci. Technol.* – 2004. – V. 15. – P. 458–461.
 211. Stefferl A. Butyrophilin, a milk protein, modulates the encephalitogenic T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis / A. Stefferl, A. Schubart, M. Storch, A. Amini, I. Mather, H. Lassmann, C. Linington // *J. Immunol.* – 2000. – V. 165. – P. 2859–2865.
 212. Guggenmos, J. Antibody cross-reactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and the milk protein butyrophilin in multiple sclerosis / J. Guggenmos, A.S. Schubart, S. Ogg, M. Andersson, T. Olsson, I.H. Mather, C. Linington // *J. Immunol.* – 2004. – V. 172(1). – P. 661–668.
 213. Mañá, P. Tolerance induction by molecular mimicry: prevention and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis with the milk protein butyrophilin / P. Mañá, M. Goodyear, C. Bernard, R. Tomioka, M. Freire-Garabal, D. Liñares // *Int Immunol.* – 2004. – V. 16 (3). – P. 489–99.

214. Heid, H.W. Review – Intracellular origin and secretion of milk fat globules / H.W. Heid, T.W. Keenan // Eur. J. Cell Biol. – 2005. – V. 84. – P. 245–258.
215. Ogg, S.L. Expression of butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary glands essential for the regulated secretion of milk–lipid droplets / S.L. Ogg, A.K. Weldon, L. Dobbie, A.J.H. Smith, I.H. Mather // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – V. 101. – P. 10084–10089.
216. Aoki, N. Immunologically crossreactive 57 kDa and 53 kDa glycoprotein antigens of bovine milk fat globule membrane: isoforms with different N-linked sugar chains and differential glycosylation at early stages of lactation / N. Aoki, M. Ujita, H. Kuroda, M. Urabe, A. Noda, T. Adachi, R. Nakamura, T. Matsuda // Biochim. Biophys. Acta. – 1994. – V. 1200. – P. 227–234.
217. Kanno, C. Selective solubilization of glycoproteins of milk fat globule membrane with KCl and MgCl₂ / C. Kanno, S. Nakamura, K. Yamauchi // Agric. Biol. Chem. – 1980. – V. 44. – P. 1193–1194.
218. Keenan, T.W. Membranes of mammary gland. XIII. A lipoprotein complex derived from bovine milk fat globule membrane with some preparative characteristics resembling those of actin / T.W. Keenan, C. Freudenstein, W.W. Franke // Cytobiologie. – 1977. – V. 14. – P. 259–278.
219. Kim, D.H. Purification and characterization of major glycoproteins, PAS–6 and PAS–7, from bovine milk fat globule membrane / D.H. Kim, C. Kanno, Y. Mizokami // Biochim. Biophys. Acta. – 1992. – V. 1122. – P. 203–211.
220. Mather, I.H. The major fat–globule membrane proteins, bovine components 15/16 and guinea–pig GP 55, are homologous to MGF–E8, a murine glycoprotein containing epidermal growth factor–like and factor V/VIII–like sequences / I.H. Mather, L.R. Banghart, W.S. Lane // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1993. – V. 29(3). – P. 545–554.
221. Mather, I.H. Protein synthesis in lactating guinea–pig mammary tissue perfused *in vitro*. II. Biogenesis of milk–fat–globule membrane proteins / I.H. Mather, G. Bruder, E.-D. Jarasch, H.W. Heid, V.G. Johnson // Exp. Cell Res. – 1984. – V. 151. – P. 277–282.
222. Taylor, M.R. Lactadherin (formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes arg–gly–asp (RGD)–dependent cell adhesion / M.R. Taylor, J.R. Couto, C.D. Scallan, R.L. Ceriani, J.A. Peterson // DNA Cell Biol. – 1997. – V. 16. – P. 861–869.
223. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. Q95114 MFGM_BOVIN – Lactadherin *Bos taurus* (Bovine), Gene: MFG8, 427 amino acids 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q95114/entry> (дата обращения: 04.09.2022).
224. Ogura, K. Cloning and expression of cDNA for O–acetylation of GD3 ganglioside / K. Ogura, K. Nara, Y. Watanabe, K. Kohno, T. Tai, Y. Sanai // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1996. – V. 225. – P. 932–938.
225. Ensslin, M. Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm–associated zona pellucida–binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins / M. Ensslin, T. Vogel, J.J. Calvete, H.H. Thole, J. Schmidtke, T. Matsuda, E. Töpfer–Petersen // Biol. Reprod. – 1998. – V. 58. – P. 1057–1064.
226. Andersen, M.H. Bovine PAS–6/7 binds α v/ β 5 integrin and anionic phospholipids through two domains / M.H. Andersen, L. Berglund, J.T. Rasmussen, T.E. Petersen // Biochemistry. – 1997. – V. 36. – P. 5441–5446.
227. Couto, J.R. Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor–like domain / J.R. Couto, M.R. Taylor, S.G. Godwin, R.L. Ceriani, J.A. Peterson // DNA Cell Biol. – 1996. – V. 15. – P. 281–286.
228. Lin, L., Crystal Structure of the Bovine Lactadherin C2 Domain, a Membrane Binding Motif,

- Shows Similarity to the C2 Domains of Factor V and Factor VII / L. Lin, Q. Huai, M. Huang, B. Furie, B.C. Furie // J. Mol. Biol. – 2007. – V. 371(3). – P. 717–724.
229. Shao, C. Crystal Structure of Lactadherin C2 Domain at 1.7 Å Resolution with Mutational and Computational Analyses of Its Membrane-binding Motif / C. Shao, V.A. Novakovic, J.F. Head, B.A. Seaton, G.E. Gilbert // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283(11). – P. 7230–7241.
 230. Ortel, T.L. Localization of functionally important epitopes within the second C-type domain of coagulation factor V using recombinant chimeras / T.L. Ortel, M.A. Quinn-Allen, F.G. Keller, J.A. Peterson, D. Larocca, W.H. Kane // J. Biol. Chem. – 1994. – V. 269. – P. 15898–15905.
 231. Peterson, J.A. Selection of tumor-specific epitopes on target antigens for radioimmunotherapy of breast cancer / J.A. Peterson, J.R. Couto, M.R. Taylor, R.L. Ceriani // Cancer Res. – 1995. – V. 55. – P. 5847s–5851s.
 232. Oshima, K. Lactation-dependent expression of an mRNA splice variant with an exon for a multiply O-glycosylated domain of mouse milk fat globule glycoprotein MFG-E8 / K. Oshima, N. Aoki, M. Negi, M. Kishi, K. Kitajima, T. Matsuda // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1999. – V. 254. – P. 522–528.
 233. Larocca, D. A Mr 46,000 human milk fat globule protein that is highly expressed in human breast tumors contains factor VIII-like domains / D. Larocca, J.A. Peterson, R. Urrea, J. Kuniyoshi, A.M. Bistrain, R.L. Ceriani // Cancer Res. – 1991. – V. 51. – P. 4994–4998.
 234. Yolken, R.H. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis / R.H. Yolken, J.A. Peterson, S.L. Vonderfecht, E.T. Fouts, K. Midthun, D.S. Newburg // J. Clin. Invest. – 1992. – V. 90. – P. 1984–1991.
 235. Newburg, D.S. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection / D.S. Newburg, J.A. Peterson, G.M. Ruiz-Palacios, D.O. Matson, A.L. Morrow, J. Shults, M.L. Guerrero, P. Chaturvedi, S.O. Newburg, C.D. Scallan, M.R. Taylor, R.L. Ceriani, L.K. Pickering // Lancet. – 1998. – V. 351. – P. 1160–1164.
 236. Ensslin, M. Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane-associated proteins bound to immobilized porcine zona pellucida. Mapping of the phosphorylethanolamine-binding region of spermadhesin AWN / M. Ensslin, J.J. Calvete, H.H. Thole, W.D. Sierralta, K. Adermann, L. Sanz, E. Töpfer-Petersen // Biol. Chem. (Hoppe-Seyler). – 1995. – V. 376. – P. 733–738.
 237. Jiang, H.-P. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein / H.-P. Jiang, G. Serrero // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89. – P. 7856–7860.
 238. Brasaemle, D.L. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein / D.L. Brasaemle, T. Barber, N.E. Wolins, G. Serrero, E.J. Blanchette-Mackie, C. Londos // J. Lipid Res. – 1997. – V. 38. – P. 2249–2263.
 239. Heid, H.W. Review – Intracellular origin and secretion of milk fat globules / H.W. Heid, T.W. Keenan // Eur. J. Cell Biol. – 2005. – V. 84. – P. 245–258.
 240. Steiner, S. Induction of the adipose differentiation-related protein in liver of etomoxirtreated rats / S. Steiner, D. Wahl, B.L.K. Mangold, R. Robison, J. Raymackers, L. Meheus, N.L. Anderson, A. Cordier // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – V. 218. – P. 777–782.
 241. Meehan, A. Oleate plus oxfenicine improves functional recovery assessed by an intraventricular balloon, in ischemic reperfused rat hearts / A. Meehan, A. Higgins // Ann. NY. Acad. Sci. – 1994. – V. 723. – P. 343–344.
 242. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. Q9TUM6 PLIN2_BOVIN – Perilipin-2 *Bos taurus* (Bovine), Gene: PLIN2 (ADFP, ADRP), 450 amino acids. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9TUM6/entry> (дата обращения: 05.09.2022).

243. Chong, B.M. Determinants of adipophilin function in milk lipid formation and secretion / B. M. Chong, P. Reigan, K. D. Mayle-Combs, D.J. Orlicky, J. L. McManaman // *Trends in Endocrinology and Metabolism*. – 2011. – V. 22. – N. 6. – P. 211–217.
244. Nielsen, R.L. Isolation of adipophilin and butyrophilin from bovine milk and characterization of a cDNA encoding adipophilin / R.L. Nielsen, M.H. Andersen, P. Mabhout, L. Berglund, T.E. Petersen, J.T. Rasmussen // *J. Dairy Sci.* – 1999. – V. 82. – P. 2543–2549.
245. Greenberg, A.S. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes / A.S. Greenberg, J.J. Egan, S.A. Wek, M.C. Moos, C. Londos, A.R. Kimmel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. – V. 90. – P. 12035–12039.
246. Greenberg, A.S. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets / A.S. Greenberg, J.J. Egan, S.A. Wek, N.B. Garty, E.J. Blanchette-Mackie, C. Londos // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – P. 11341–11346.
247. Blanchette-Mackie, E.J. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes / E.J. Blanchette-Mackie, N.K. Dwyer, T. Barber, R.A. Coxey, T. Takeda, C.M. Rondinone, J.L. Theodorakis, A.S. Greenberg, C. Londos // *J. Lipid Res.* – 1995. – V. 36. – P. 1211–1226.
248. Brasaemle, D.L. Thematic review series: Adipocyte Biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis / D.L. Brasaemle // *J. Lipid Res.* – 2007. – V. 48. – P. 2547–2559.
249. Brasaemle, D.L. Post-translational regulation of perilipin expression. Stabilization by stored intracellular neutral lipids / D.L. Brasaemle, T. Barber, A.R. Kimmel, C. Londos // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 9378–9387.
250. Souza, S.C. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor α to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes / S.C. Souza, L.M. de Vargas, M.T. Yamamoto, P. Lien, M.D. Franciosa, L.G. Moss, A.S. Greenberg // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 24665–24669.
251. Zehmer, J.K. A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic / J.K. Zehmer, Y. Huang, G. Peng, J. Pu, R.G.W. Anderson, P. Liu // *Proteomics*. – 2009. – V. 9 (4). – P. 914–921.
252. Wolins, N.E. TIP47 Associates with Lipid Droplets / N.E. Wolins, B. Rubin, D.L. Brasaemle // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 5101–5108.
253. McManaman, J.L. Lipid droplet targeting domains of adipophilin / J.L. Mc Manaman, W. Zabar-onick, J. Schaack, D.J. Orlicky // *J. Lipid Res.* – 2003. – V. 44. – P. 668–673.
254. Garcia, A. The central domain is required to target and anchor perilipin A to lipid droplets / A. Garcia, A. Sekowski, V. Subramanian, D.L. Brasaemle // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 625–635.
255. Zhang, H.H. Lipase-selective functional domains of perilipin A differentially regulate constitutive and protein kinase A-stimulated lipolysis / H.H. Zhang, S.C. Souza, K.V. Muliro, F.B. Kraemer, M.S. Obin, A.S. Greenberg // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 51535–51542.
256. Russell, T.D. Mammary glands of adipophilin-null mice produce an amino-terminally truncated form of adipophilin that mediates milk lipid droplet formation and secretion / T.D. Russell, C.A. Palmer, D.J. Orlicky, E.S. Bales, B.H.-J. Chang, L. Chan, J.L. McManaman // *J. Lipid Res.* – 2008. – V. 49. – P. 206–216.
257. Orlicky, D.J. Multiple functions encoded by the N-terminal PAT domain of adipophilin / D.J. Orlicky, G. Degala, C. Greenwood, E.S. Bales, T.D. Russell, J.L. McManaman // *J. Cell Sci.* – 2008. – V. 121. – P. 2921–2929.
258. Narayanaswami, V. The helix bundle: a reversible lipid binding motif / V. Narayanaswami, R.S. Kiss, P.M.M. Weers // *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* – 2010. – V. 155. – P. 123–133.

259. Chong, B.M. The adipophilin C-terminus is a self-folding membrane binding domain that is important for milk lipid secretion / B.M. Chong, T.D. Russell, J. Schaack, D.J. Orlicky, P. Reigan, M. Ladinsky, J.L. McManaman // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286(26). – P. 23254–23265.
260. Gao, J. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake / J. Gao, G. Serrero // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 16825–16830.
261. McMahon, H.T. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling / H.T. McMahon, J.L. Gallop // *Nature*. – 2005. – V. 438. – P. 590–596.
262. Varkey, J. Membrane curvature induction and tabulation are common features of synucleins and apolipoproteins / J. Varkey, J.M. Isas, N. Mizuno, M.B. Jensen, V.K. Bhatia, C.C. Jao, J. Petrlova, J.C. Voss, D.G. Stamou, A.C. Steven, R. Langen // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 32486–32493.
263. Böhmer, F.-D. Specific neutralizing antiserum against a polypeptide growth inhibitor for mammary cells purified from bovine mammary gland / F.-D. Böhmer, W. Lehmann, F. Noll, R. Samtleben, P. Langen, R. Grosse // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – V. 846. – P. 145–154.
264. Böhmer, F.-D. Purification of a growth inhibitor for Ehrlich ascites mammary carcinoma cells from bovine mammary gland / F.-D. Böhmer, W. Lehmann, H. E. Schmidt, P. Langen, R. Grosse // *Exp. Cell Res.* – 1984. – V. 150. – P. 466–476.
265. Billich, S. Cloning of a full-length complementary DNA for fatty-acid-binding protein from bovine heart / S. Billich, T. Wissel, H. Kratzin, U. Hahn, B. Hagenhoff, A.G. Lezius, F. Spener // *Eur. J. Biochem.* – 1988. – V. 175. – P. 549–556.
266. Binas, B. Hormonal induction of functional differentiation and mammary-derived growth inhibitor expression in cultured mouse mammary gland explants / B. Binas, E. Spitzer, W. Zschiesche, B. Erdmann, A. Kurtz, T. Müller, C. Niemann, W. Blenau, R. Grosse // *In Vitro Cell Dev. Biol.* – 1992. – V. 28A. – P. 625–634.
267. Bansal, M.P. Expression of fatty acidbinding proteins in the developing mouse mammary gland / M.P. Bansal, D. Medina // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – V. 191. – P. 61–69.
268. Jones, P.D. Isolation and characterization of fatty acid binding proteins from mammary tissue of lactating rats / P.D. Jones, A. Carne, N.M. Bass, M.R. Grigor // *Biochem. J.* – 1988. – V. 251. – P. 919–925.
269. Nielsen, S.U. Differentiation regulation and phosphorylation of the fatty acid-binding protein from rat mammary epithelial cells / S.U. Nielsen, R. Rump, P. Højrup, P. Roepstorff, F. Spener // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – V. 1211. – P. 189–197.
270. Specht, B. Mammary derived growth inhibitor is not a distinct protein but a mix of heart-type and adipocytetype fatty acid-binding protein / B. Specht, N. Bartetzko, C. Hohoff, H. Kuhl, R. Franke, T. Borchers, F. Spener // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – P. 19943–19949.
271. Smathers, R.L. The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions / R.L. Smathers, D.R. Petersen // *Human genomics.* – 2011. – V. 5 (3). – P. 170–191.
272. Zhou, H. Variation in the bovine FABP4 gene affects milk yield and milk protein content in dairy cows / H. Zhou, L. Cheng, W. Azimu, S. Hodge, G.R. Edwards, J.G. Hickford // *Sci. Reports.* – 2015. – V. 5 (1). DOI: 10.1038/srep10023.
273. Krieg, P. Tumor-specific overexpression of a novel keratinocyte lipid-binding protein. Identification and characterization of a cloned sequence activated during multistage carcinogenesis in mouse skin / P. Krieg, S. Feil, G. Fürstenberger, G.T. Bowden // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 17362–17369.
274. Hohoff, C. Correspondence re: Y.E. Shi et al. Antitumor activity of the novel human breast cancer growth inhibitor, mammary-derived growth inhibitor-related gene, MRG (*Cancer Res.*, 57:3084–3091, 1997) / C. Hohoff, F. Spener // *Cancer Res.* – 1998. – V. 58. – P. 4015–4017.

275. Shi, Y.E. Antitumor activity of the novel human breast cancer growth inhibitor, mammary-derived growth inhibitor-related gene, MRG / Y.E. Shi, J. Ni, G. Xiao, Y.E. Liu, A. Fuchs, G. Yu, J. Su, J.M. Cosgrove, L. Xing, M. Zhang, J. Li, B.B. Aggarwal, A. Meager, R. Gentz // *Cancer Res.* – 1997. – V. 57. – P. 3084–3091.
276. Borchers, T. Heart-type fatty acid binding protein–involvement in growth inhibition and differentiation / T. Borchers, C. Hohoff, C. Buhlmann, F. Spener // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* – 1997. – V. 57. – P. 77–84.
277. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. Results of search “FABP” as a Protein family, Protein Name, or Gene Name 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=FABP> (дата обращения: 06.09.2022).
278. Bionaz, M. ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation / M. Bionaz, J.J. Looor // *J. Nutr.* – 2008. – V. 138. – P. 1019–1024.
279. Marchitelli, C. Milk fatty acid variability: effect of some candidate genes involved in lipid synthesis / C. Marchitelli, G. Contarini, G. De Matteis, A. Crisà, L. Pariset, M.C. Scatà, G. Catillo, F. Napolitano, B. Moioli // *J. Dairy Res.* – 2013. – V. 80. – P. 165–173.
280. Nafikov, R.A. Associations of polymorphisms in solute carrier family 27, isoform A6 (SLC27A6) and fatty acid-binding protein–3 and fatty acid-binding protein–4 (FABP3 and FABP4) with fatty acid composition of bovine milk / R.A. Nafikov, J.P. Schoonmaker, K.T. Korn, K. Noack, D.J. Garrick, K.J. Koehler, J. Minick-Bormann, J.M. Reedy, D.E. Spurlock, D.C. Beitz // *J. Dairy Sci.* – 2013. – V. 96. – P. 6007–6021.
281. UniProt KB – открытая база данных последовательностей белков. P48035 FABP4_BOVIN – Fatty acid-binding protein, adipocyte *Bos taurus* (Bovine) Gene: FABP4, 132 amino acids. 2022. – URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P48035/entry> (дата обращения: 05.09.2022).
282. Zanotti, G. Three-dimensional structure of recombinant human muscle fatty acid-binding protein / G. Zanotti, G. Scapin, P. Spadon, J.H. Veerkamp, J.C. Sacchettini // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – P. 18541–18550.
283. Xu, Z. The adipocyte lipid-binding protein at 1.6-Å resolution. Crystal structures of the apo-protein and with bound saturated and unsaturated fatty acids / Z. Xu, D.A. Bernlohr, L.J. Banaszak // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 7874–7884.
284. Banaszak, L. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins / L. Banaszak, N. Winter, Z. Xu, D.A. Bernlohr, S. Cowan, T.A. Jones // *Adv. Protein Chem.* – 1994. – V. 45. – P. 89–151.
285. Monaco, H.L. Crystal structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution / H.L. Monaco, G. Zanotti, P. Spadon, M. Bolognesi, L. Sawyer, E.E. Eliopoulos // *J. Mol. Biol.* – 1987. – V. 197. – P. 695–706.
286. Yang, Y. Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland / Y. Yang, E. Spitzer, N. Kenney, W. Zschiesche, M. Li, A. Kromminga, T. Müller, F. Spener, A. Lezius, J.H. Veerkamp, G.H. Smith, D.S. Salomon, R. Grosse // *J. Cell Biol.* – 1994. – V. 127. – P. 1097–1109.
287. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 95/II. Peptide Growth Factors and Their Receptors. Mammary-derived growth inhibitor / R. Grosse, P. Langen.; M.B. Sporn, A.B. Roberts, eds. – New York, NY, USA: Springer-Verlag, 1991. – P. 249–265.
288. Spitsberg, V.L. Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland / V.L. Spitsberg, E. Matitashvili, R.C. Gorewit // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – V. 230. – P. 872–878.

289. Hresko, R.C. Identification of phosphorylated 422 (aP2) protein as pp15, the 15-kilodalton target of the insulin receptor tyrosine kinase in 3T3–L1 adipocytes / R.C. Hresko, M. Bernier, R.D. Hoffman, J.R. Flores-Riveros, K. Liao, D.M. Laird, M.D. Lane // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – V. 85. – P. 8835–8839.
290. Nielsen, S.U. Fatty acid-binding protein from rat heart is phosphorylated on tyr19 in response to insulin stimulation / S.U. Nielsen, F. Spener // *J. Lipid Res.* – 1993. – V. 34. – P.1355–1366.
291. Keenan, T.W. Milk lipid globules and their surrounding membrane: a brief history and perspectives for future research / T.W. Keenan // *J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia.* – 2001. – V. 6. – P. 365–371.
292. Murphy, D.J. Mechanisms of lipid–body formation / D.J. Murphy, J. Vance // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – V. 24. – P. 109–115.
293. Mc Manaman, J.L. Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: evidence of a role in lipid secretion / J.L. Mc Manaman, C.A. Palmer, R.M. Wright, M.C. Neville // *J. Physiol.* – 2002. – V. 545. – P. 567–579.
294. Ohsaki, Y. Fixation and permeabilization protocol is critical for the immunolabeling of lipid droplet proteins / Y. Ohsaki, T. Maeda, T. Fujimoto // *Histochem. Cell Biol.* – 2005. – V. 124. – P. 445–452.
295. Di Donato, D. Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy / D. Di Donato, D.L. Brasaemle // *J. Histochem. Cytochem.* – 2003. – V. 51. – P. 773–780.
296. Fukumoto, S. Deformation of lipid droplets in fixed samples / S. Fukumoto, T. Fujimoto // *Histochem. Cell Biol.* – 2002. – V. 118. – P. 423–428.
297. Robenek, H. Lipid droplets gain PAT family proteins by interaction with specialized plasma membrane domains / H. Robenek, M.J. Robenek, I. Buers, S. Lorkowski, O. Hofnagel, D. Troyer, N.J. Severs // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – P. 26330–26338.
298. Honvo–Houéto, E. The endoplasmic reticulum and casein-containing vesicles contribute to milk fat globule membrane / E. Honvo–Houéto, C. Henry, S. Chat, S. Layani, S. Truchet // *Mol. Biol. Cell.* – 2016. – V. 27(19). – P. 2946–2964.
299. Goldfarb, M. Two–dimensional electrophoretic analysis of human milk–fat–globule membrane proteins with attention to apolipoprotein E patterns / M. Goldfarb // *Electrophoresis.* – 1997. – V. 18. – P. 511–515.
300. Patton, S. The presence of plasma membrane enzymes on the surface of bovine milk fat globules / S. Patton, E.G. Trams // *FEBS Lett.* – 1971. – V. 14. – P. 230–232.
301. Anderson, M. Membrane material in bovine skim–milk from udder quarters infused with endotoxin and pathogenic organisms / M. Anderson, B.E. Brooker, A.T. Andrews, E. Alichanidis // *J. Dairy Res.* – 1975. – V. 42. – P. 401–417.
302. Anderson, M. Reviews of the progress of dairy science. The milk–fat globule membrane / M. Anderson, T.E. Cawston // *J. Dairy Res.* – 1975. – V. 42. – P. 459–483.
303. Kitchen, B.J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests / B.J. Kitchen // *J. Dairy Res.* – 1981. – V.48. – P. 167–188.
304. Fox, P.F. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – Part 2 / P.F. Fox, A.L. Kelly // *Int. Dairy J.* – 2006. – V. 16. – P. 517–532.
305. Fox, P.F. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – Part 1 / P.F. Fox, A.L. Kelly // *Int. Dairy J.* – 2006. – V. 16. – P. 500–516.
306. Anderson, M. Source and significance of lysosomal enzymes in bovine milk fat globule membrane / M. Anderson // *J. Dairy Sci.* – 1977. – V. 60. – P. 1217–1222.
307. Wooding, F.B.P. Theories of milk secretion: evidence from the electron microscopic examination of milk / F.B.P. Wooding, M. Peaker, J.L. Linzell // *Nature (Lond.).* – 1970. – V. 226. – P. 762–764.

Перечень сокращений и обозначений

а.к.	Аминокислотная, аминокислоты, аминокислота
АПФ	Ангиотензин-превращающий фермент
БГ	Белковый гидролизат
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ДВА	Дозированное высвобождение антигенов
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	Додецилсульфат натрия
ДСН-ЭФ	Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия
ЖК	Жирные кислоты
ЖКТ	Желудочно-кишечный тракт
ИКОМ	Иммуностимулирующий комплекс
ИЭФ	Изоэлектрическое фокусирование
КМ	Казеиновая мицелла
КРС	Крупный рогатый скот
КФК	Коллоидный фосфат кальция
МА	Молокосвертывающая активность
МЖГ	Молочная жировая глобула
ММЖГ	Мембрана молочной жировой глобулы
ММ	Молекулярная масса
МФ	Молокосвертывающий фермент
МФП	Молокосвертывающий ферментный препарат
НАДН	Никотинамиддинуклеотид в восстановленной форме
НФК	Нанокластеры фосфата кальция
ННС	Нативно-неупорядоченная структура
ОГ	Олигодендроцитарный гликопротеин
ПААГ	Полиакриламидный гель
ПТМ	Посттрансляционные модификации
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПА	Протеолитическая активность
РНК	Рибонуклеиновая кислота
РС	Рассеянный склероз
СВТ	Сверхвысокая температура
СЖК	Жирные кислоты
СибНИИС	Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия
тРНК	Транспортная РНК
ТС	Термостабильность
ТХ-1 (2)	Т-хелперы 1 (2)
ф.	Фрагмент

ФАД	Флавинадениндинуклеотид
ФКУ	Фенилкетонурия
Хн	Химозин
ЦЖК	Цитоплазматическая жировая капля
ЭАЭ	Экспериментальный аллергический энцефаломиелит
ЭГТА	Этиленгликоль-бис (β-аминоэтиловый эфир) -N, N, N', N'-тетрауксусная кислота
ЭДТА	Этилендиаминтетраацетат
ЭР	Эндоплазматический ретикулум
ЭФМ	Эндогенные ферменты молока
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
ADSA	Американская ассоциация молочной науки (American Dairy Science Association)
ALD	Альдолаза
ALP	Щелочная фосфатаза
ANG	Ангиогенин
ANGPTL4	Агиопоэтин-подобный белок 4 (ANGioPoieTin-Like protein 4)
APOC2	Аполипопротеин C2
At	Антитело(а)
Au-At	Антитела, конъюгированные с частицами коллоидного золота
BSA	Сывороточный альбумин коровы
BTN	Бутирофилин
CAT	Каталаза
CATD	Катепсин D
CBB	Coomassie Brilliant Blue (универсальный краситель для белков)
Cbl	Кобаламин
CHO	Клетки яичника китайского хомячка (Chinese Hamster Ovary cells)
COVID-19	Коронавирусная инфекция 2019 года (COroNaVIrus Disease 2019)
CN	Казеин
Cryo-TEM	Криотрансмиссионная электронная микроскопия (Cryo Transmission Electron Microscopy)
DBP	Витамин D-связывающий протеин
DBP-maf	Витамин D-связывающий протеин – фактор активирующий макрофаги
EC	Комиссия по Ферментам (Enzyme Commission)
EGF	Эпидермальный фактор роста
ESL-milk	Молоко с увеличенным сроком хранения (Extended Shelf-Life)
FABP	Белок, связывающий жирные кислоты (Fatty Acids Bindig Protein)
FABP4	Адипоцитарная форма белка, связывающего жирные кислоты
FAD-SOX	ФАД-зависимая оксидаза сульфгидрильных групп
FBP	Фолат-связывающий протеин
FESEM	Поле-эмиссионная сканирующая электронная микроскопия (Field Emission Scanning Electron Microscopy)
FGF	Фактор роста фибробластов
FIL	Ингибитор лактации с обратной связью

GGT	Гамма-глутамилтрансфераза (Глутатионгидролаза)
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
GMP	Гликомакропептид
GPIHBP1	Гликозилфосфатидилинозитол-несущий белок 1, связывающий липопротеины высокой плотности (GlycosylPhosphatidylInositol-anchored High density lipoprotein-Binding Protein 1)
GPX	Глутатионпероксидаза (GSH-пероксидаза)
GSH	Глутатион (γ-глутамилцистеинилглицин)
HAMLET	Специфическая форма α-лактальбумина в комплексе с олеиновой кислотой, индуцирующая апоптоз клеток ткани опухоли (Human α-LA Made Lethal to Tumor cells)
HARP	Гепарин-аффинный регуляторный пептид (Heparin Affin Regulatory Peptide)
HCr	Гаптокоррин
HEXD	β-N-ацетилгексозаминидаза
HL	Печеночная липаза
HRTEM	Трансмиссионная электронная микроскопия высокого разрешения (High-Resolution Transmission Electron Microscopy)
HSA	Сывороточный альбумин человека
HSPGs	Гепарансульфат протеогликаны (Heparan Sulfate Proteoglycans)
HTST-пастеризация	Режим пастеризации молока – 72°C, 15 секунд (High Temperature Short Time)
IFN	Интерферон
Ig	Иммуноглобулин
IGF	Инсулиноподобный фактор роста
IGFBPs	Белки, связывающие инсулиноподобные факторы роста
IL	Интерлейкин
α-LA	Альфа-лактальбумин
αs1-CN	Альфа-s1-казеин
αs2-CN	Альфа-s2-казеин
β-LG	Бэта-лактоглобулин
β-CN	Бэта-казеин
κ-CN	Каппа-казеин
LEP	Лептин
LF	Лактоферрин
Lfcin B	Лактоферрицин B
LPL	Липопротеинлипаза
LPO	Лактопероксидаза
LYZ	Лизоцим
mAt	Моноклональные антитела
MDGI	Ингибитор роста из молочной железы (Mammary-Derived Growth Inhibitor)
Met-SOX	Металл-зависимая оксидаза сульфгидрильных групп
Mo-pt	Молибдоптерин (молибдоптериновый кофактор)
MUC 1	Муцин 1
MUC 15	Муцин 15
5NTD	5'-нуклеотидаза

NRG4	Нейрегулин 4
OPN	Остеопонтин
PAS	Periodic Acid / Schiff (специфический реагента на гликопротеины - периодная кислота / основания Шиффа
PAS III	Белок III, окрашиваемый Periodic Acid / Schiff (периодной кислотой / основанием Шиффа
PAS 6/7I	Белок 6/7, окрашиваемый Periodic Acid / Schiff (периодной кислотой / основанием Шиффа
PAT	Подсемейство белков перилипинов (PAT = Perilipin, Adipophilin, TIP47)
pI	Изоэлектрическая точка
PL	Панкреатическая липаза
PP II	Спираль типа поли(L-пролин) II – элемент вторичной структуры белка
PP3	Протеозо пептон 3 (Protease Peptone 3)
PLG	Плазминоген
PLMN	Плазмин
PMSF	Фенилметилсульфонил фторид (PhenylMethylSulfonyl Fluoride)
PTHrP	Паратиреоидный гормон-родственный белок
rANG	Рекомбинантный (генно-инженерный) ангиогенин
RCP	Рибофлавин-переносящий белок
RNASE1	Рибонуклеаза 1
SA	Сывороточный альбумин
SARS	Тяжелый острый респираторный синдром (Severe Acute Respiratory Syndrome)
SARS-CoV	Коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus), причина вспышки атипичной пневмонии (SARS) 2003 г.
SARS-CoV-2	Коронавирус 2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus 2), причина пандемии COVID-19, начавшейся в 2019 г.
SC	Секреторный компонент иммуноглобулинов
SDS-PAGE	Электрофорез в полиакриламидном геле, в присутствии додецилсульфата натрия
SeP	Фосфорилированный остаток серина
SOD	Супероксиддисмутаза
SOX	Оксидаза сульфгидрильных групп
TCb	Транскобаламин
TGF	Трансформирующий фактор роста
TIP47	Белок фосфолипидной оболочки жировых капель с ММ 47 кДа (Tail-Interacting Protein, ММ 47 kDa)
Tm	Температура плавления
TNF	Фактор некроза опухоли
XD	Ксантиндегидрогеназа
XDH, XOR	Ксантиноксидоредуктаза
XDH/XO	Ксантиндегидрогеназа/оксидаза
XO	Ксантиноксидаза

Приложение 1

Сокращенные обозначения аминокислот

Аминокислота	Трех- и однобуквенная аббревиатура
Аланин	Ala, A
Аргинин	Arg, R
Глицин	Gly, G
Лейцин	Leu, L
Тирозин	Tyr, Y
Серин	Ser, S
Глутаминовая кислота	Glu, E
Глутамин	Gln, Q
Аспарагиновая кислота	Asp, D
Аспарагин	Asn, N
Фенилаланин	Phe, F
Лизин	Lys, K
Гистидин	His, H
Цистеин	Cys, C
Валин	Val, V
Пролин	Pro, P
Гидроксипролин	Hyp, hP
Триптофан	Trp, W
Изолейцин	Ile, I
Метионин	Met, M
Треонин	Thr, T
Гидроксилизин	Hyl, hK

Приложение 2

Второстепенные эндогенные ферменты молока [5]

Наименование фермента	Номер ЕС
L-Идитол 2-дегидрогеназа	1.1.1.14
L-Лактат дегидрогеназа	1.1.1.27
Малат дегидрогеназа	1.1.1.37
NADH-зависимая малатдегидрогеназа («яблочный фермент»)	1.1.1.40
Изоцитрат дегидрогеназа	1.1.1.42
Фосфоглюконат дегидрогеназа	1.1.1.44
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа	1.1.1.49
Аминоксидаза	1.4.3.6
Полиаминоксидаза	-
Фукозилтрансфераза	-
NADH дегидрогеназа	1.6.99.3
Дигидролипоамид дегидрогеназа (диафораза)	1.8.1.4
Лактозосинтаза	2.4.1.22
Гликопротеин 4-β-галактозилтрансфераза	2.4.1.38
N-Ацетиллактозамин синтаза	2.4.1.90
СМР-N-ацетилнейроминат-галактозилдиацилглицерол α-2,3-сиалилтрансфераза	2.4.99.6
Тиамин-фосфат пироглутамилаза	2.5.1.3
Аспартат аминотрансфераза	2.6.1.1
Аланин аминотрансфераза	2.6.1.2
РНК-зависимая ДНК-полимераза	2.7.7.49
Тиосульфат сульфуртрансфераза	2.8.1.1
Холинэстераза	3.1.1.8
Глюкозо-6-фосфатаза	3.1.3.9
Фосфотидат фосфатаза	3.1.3.4
Фосфодиэстераза I	3.1.4.1
Арилсульфатаза	3.1.6.1
β-Глюкозидаза	3.2.1.21
β-Галактозидаза	3.1.1.23
α-Маннозидаза	3.2.1.24
α-L-Фукозидаза	3.2.1.51
Лейцин аминопептидаза (цитозольная аминопептидаза)	3.4.11.1
Цистил-аминопептидаза (окситоциназа)	3.4.11.13
Трипсин	3.4.21.4
Неорганическая пирофосфатаза	3.6.1.1
Аденозин трифосфатаза	3.6.1.3
Тиамин пирофосфатаза (нуклеозид дифосфатаза)	3.6.1.6
Нуклеотид пирофосфатаза	3.6.1.9
Фруктозо-бифосфат альдолаза	4.1.2.13
Карбонат дегидрогеназа	4.2.1.1
Глюкозо-6-фосфат изомераза	5.3.1.9
Ацетил-CoA карбоксилаза	6.4.1.2

Оглавление

Предисловие

Глава 1. Номенклатура и свойства казеинов

1.1. Общая характеристика казеинов	5
1.2. α 1-Казеины (α 1-CN)	6
1.3. α 2-Казеины (α 2-CN)	13
1.4. β -Казеины (β -CN)	16
1.5. κ -Казеины (κ -CN)	20
Библиографический список к главе 1	26

Глава 2. Структура и свойства казеиновых мицелл

2.1. Особенности структуры казеинов и некоторые свойства казеиновых мицелл.....	37
2.2. Модели структуры казеиновой мицеллы. Ретроспектива	41
2.3. Самоассоциация казеинов в растворе	49
2.4. Структура казеиновой мицеллы по D.S. Horne	53
2.5. Мицеллярные взаимодействия	55
2.6. Может ли модель структуры казеиновой мицеллы D.S. Horne объяснить некоторые реологические свойства молочных гелей?	56
2.7. Казеины как реоморфные белки. «Новый взгляд» на структуру казеинов	59
2.8. Модель сцепленной трехмерной решетки	62
2.9. Фибриллоподобные структуры в казеинах и казеиновых мицеллах.....	67
Библиографический список к главе 2	70

Глава 3. Номенклатура и свойства сывороточных белков

3.1. Общая характеристика сывороточных белков молока	80
3.2. β -Лактоглобулин (β -LG)	82
3.3. α -Лактальбумин (α -LA)	85
3.4. Сывороточный альбумин (SA).....	90
3.5. Лактоферрин (LF)	93
3.6. Иммуноглобулины (Ig).....	99
3.7. Остеопонтин (OPN)	107
3.8. Минорные сывороточные белки.....	110
3.8.1 Ангиогенины (ANG).....	111
3.8.2. Гепарин-аффинный регуляторный пептид (HARP)	112
3.8.3. Кининоген	112
3.8.4. Бэта-2-микроглобулин	112
3.8.5. Протеозо-пептон 3	113
3.8.6. Лактопероксидаза (LPO).....	113
3.8.7. Лизоцим.....	114
3.8.8. Цитокины	115
3.8.9. Инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), нейрегулин 4 (NRG4)	115
3.8.10. Белки, связывающие инсулиноподобные факторы роста (IGFBPs)	116
3.8.11. Фолат-связывающий протеин (FBP).....	116
3.8.12. Витамин D-связывающий протеин	117
3.8.13. Витамин B12-связывающие протеины	117
3.8.14. Рибофлавин-переносящий белок (RCP)	117

3.8.15. Лептин (LEP).....	118
3.8.16. Ингибитор лактации с обратной связью (FIL)	119
3.8.17. Паратиреоидный гормон-родственный белок (PTHrP)	119
3.8.18. Релаксин	119
3.8.19. Плазмин.....	119
3.8.20. Катепсин D	120
3.8.21. Гликомакропептид (GMP)	120
3.8.22. Просапозин	121
Библиографический список к главе 3	121

Глава 4. Эндогенные ферменты молока

4.1. Общая характеристика эндогенных ферментов молока	146
4.2. Лактопероксидаза (EC 1.11.1.7)	148
4.3. Каталаза (EC 1.11.1.6).....	151
4.4. Липазы	154
4.5. Амилаза (α -Амилаза EC 3.2.1.1., β -Амилаза EC 3.2.1.2)	158
4.6. Протеиназы	159
4.7. Фосфатазы	166
4.8. Ксантиндегидрогеназа/оксидаза (EC 1.17.1.4; 1.17.3.2)	172
4.9. Рибонуклеаза (Рибонуклеаза 1) (EC 4.6.1.18)	177
4.10. Бэта-N-ацетилгексозаминидаза (EC 3.2.1.52)	179
4.11. Лизоцим (EC 3.2.1.17).....	181
4.12. γ -Глутамилтрансфераза (Глутатионгидролаза) (EC 2.3.2.2; EC:3.4.19.13)	184
4.13. Супероксиддисмутаза [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1).....	186
4.14. Оксидаза сульфгидрильных групп (EC 1.8.3.2)	189
4.15. Альдолаза (EC 4.1.2.13).....	192
4.16. Глутатионпероксидаза (EC 1.11.1.9).....	194
4.17. Ангиогенин (EC 3.1.27)	195
4.18. 5'-Нуклеотидаза (EC 3.1.3.5)	198
4.19. Каталитические антитела (абзимы) с олигонуклеазной активностью	200
4.20. Второстепенные эндогенные ферменты молока.....	200
Библиографический список к главе 4	201

Глава 5. Номенклатура и свойства белков мембраны молочной жировой глобулы

5.1. Генез и структура молочной жировой глобулы	221
5.2. Принципы номенклатуры белков ММЖГ	224
5.3. Получение препаратов ММЖГ	227
5.4. Общая характеристика основных белков ММЖГ и супернатанта	227
5.5. Муцин 1 (MUC1).....	230
5.6. Ксантиндегидрогеназа/оксидаза (XDH/XO)	236
5.7. Муцин 15 (MUC15), или белок PAS III (PAS III)	240
5.8. Кластер дифференцировки 36 (CD36).....	241
5.9. Бутирофилин (BTN).....	246
5.10. Белок PAS 6/7 (PAS 6/7).....	252
5.11. Адипофилин (ADPH)	256
5.12. Белок, связывающий жирные кислоты (FABP).....	262
5.13. Предполагаемый механизм секреции МЖГ.....	265
5.14. Минорные белковые компоненты ММЖГ.....	269

Библиографический список к главе 5	271
Перечень сокращений и обозначений.....	291
Приложение 1	295
Приложение 2	296

Научное издание

Ельчанинов Вадим Валентинович

**Номенклатура и свойства
белков молока коровы (*Bos taurus*)**

Монография

Редактор Л.И. Базина

Подготовка оригинал-макета и дизайн обложки Ю.В. Луценко

Издательство Алтайского государственного университета

Издательская лицензия ЛР 020261 от 14.01.1997.

Подписано в печать 14.12.2022.

Дата выхода издания в свет 23.12.2022.

Формат 60×84 1/8. Усл.-печ. л. 34,87.

Гарнитура Serif. Бумага офсетная. Печать цифровая.

Тираж 200 экз. Заказ № 627.

Отпечатано в типографии Алтайского государственного университета:

656049, Алтайский край, г. Барнаул, ул. Димитрова, 66