

## Znaczenie i wykorzystanie białkowych składników serwatki

### Józefa Chrzanowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

e-mail: jozefa.chrzanowska@upwr.edu.pl

ORCID: 0000-0002-9410-5297

### Anna Dąbrowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

e-mail: anna.dabrowska@upwr.edu.pl

ORCID: 0000-0002-8524-5802

### Marek Nowak

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

e-mail: marekznowak@onet.eu

© 2023 Józefa Chrzanowska, Anna Dąbrowska, Marek Nowak

Praca opublikowana na licencji Creative Commons Uznanie autorstwa-Na tych samych warunkach 4.0 Międzynarodowe (CC BY-SA 4.0). Skrócona treść licencji na <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.pl>

**Cytuj jako:** Chrzanowska, J., Dąbrowska, A. i Nowak, M. (2023). Znaczenie i wykorzystanie białkowych składników serwatki. *Nauki Inżynierskie i Technologie*, (39), 32-51.

**DOI:** 10.15611/nit.2023.39.03

**JEL Classification:** N5

**Streszczenie:** W serwatce, pozostającej jako produkt uboczny po skoagulowaniu kazeiny mleka w procesie produkcji serów, występuje wiele różnorodnych białek, które nie tylko wyróżniają się wysoką wartością odżywczą, ale przejawiają też atrakcyjne właściwości funkcjonalne oraz biologiczne. W artykule przedstawiono właściwości i kierunki wykorzystania najważniejszych białek serwatkowych, w tym:  $\beta$ -laktoglobuliny,  $\alpha$ -laktoalbuminy, immunoglobulin, albuminy serum, laktoferyny, laktoperoksydazy, lizozymu, osteopontyny i glikomakropeptydu oraz produktów ich modyfikacji.

**Słowa kluczowe:** białka serwatkowe, biologicznie aktywne białka, właściwości prozdrowotne, wykorzystanie

## 1. Wstęp

Serwatka jest głównym produktem ubocznym pozyskiwanym przy produkcji serów, który z niegdyś kłopotliwego odpadu stał się obecnie cennym koproduktem tego procesu (Papademas i Kotsaki, 2020). Stanowi ona ok. 85-90% objętości mleka przerabianego na sery, zarówno podpuszczkowe, jak i twarogowe. Stąd też uzyskuje się odpowiednio serwatkę podpuszczkową – słodką, o pH 5,5-6,5, oraz ser-

watkę kwasową o pH ok. 4,6-4,7. W serwatce pozostaje blisko połowa składników suchej masy mleka (ok. 6,5%), wśród których największy udział ma laktoza, pozostałe składniki to głównie sole mineralne i białka, które stanowią ok. 20% wszystkich białek mleka (Smithers, 2008). Są one mieszaniną wielu globularnych białek o wyjątkowych cechach odżywczych, biologicznych i wielokierunkowym zastosowaniu (Batista i in., 2018; Krissansen, 2007; Smithers, 2008). Pod względem ilościowym największy udział mają kolejno:  $\beta$ -laktoglobulina (BLG),  $\alpha$ -laktoalbumina (ALA), immunoglobuliny i albumina serum (BSA). Inne białka występujące w niej w mniejszym stężeniu (<1%), ale o ważnym znaczeniu komercyjnym, to: laktoferyna (LF), laktoperoksydaza (LPO) i lizozym (Kassem, 2015) czy osteopontyna (Jiang i in., 2020). Ponadto w serwatce obecne są inne bioaktywne białka, w tym wiążące witaminy, czynniki wzrostu i ok. 60 enzymów (Steijns, 2001). W serwatce podpuszczkowej występuje także glikomakropeptyd, stanowiący 10-15% ogółu jej białek, który jest odzyskiwany również w skali przemysłowej (Neelima i in., 2013). Podstawowe cechy fizykochemiczne głównych białek serwatkowych i ich zawartość w mleku przedstawiono w tab. 1.

**Tabela 1.** Zawartość w mleku i parametry fizykochemiczne głównych białek serwatkowych  
**Table 1.** Concentration in milk and physicochemical properties of selected whey proteins

Białko/Protein	pI	MW (Da)	Zawartość/Concentration (mg/kg)
$\beta$ -laktoglobulina/ $\beta$ -lactoglobulin	5,4	18,300	3200
$\alpha$ -laktoalbumina/ $\alpha$ -lactalbumin	4,4	14 000	1200
Immunoglobuliny/Immunoglobulins	5,5 – 8,3	$15 \times 10^3 - 1 \times 10^6$	300-600
Albumina serum/Serum albumin	5,1	69 000	400
Laktoferyna/Lactoferrin	7,9	77 000	50-70
Laktoperoksydaza/Lactoperoxidase	9,5	77 500	8-20
Lizozym/Lysozyme	10,2*	14 400*	0,008-0,06
Osteopontyna/Osteopontin	3,5	$41 \times 10^3 - 75 \times 10^3$	18

Źródło/Source: na podstawie literatury wykorzystanej w pracy/ based on the literature used in the work.

Mimo że zawartość białek w serwatce wynosi zaledwie 0,6-0,7%, to jednak ich wartość odżywcza i biologiczna jest najwyższa nie tylko wśród wszystkich białek mleka, ale też wśród innych białek żywnościowych (Khan i Selamoglu, 2019; Madureira i in., 2007; Tsusumi i Tsusumi, 2014). Wskaźnik ich wartości biologicznej BV (*biological value*) jest wyższy o ok. 15% niż białka jaja, przyjętego za wzorcowe (Smithers, 2008). Wynika ona z ich składu aminokwasowego, znacznie bogatszego w aminokwasy egzogenne w porównaniu z innymi białkami żywnościowymi, jak kazeina czy białko jaja (tab. 2). W ich składzie zaznacza się bardzo wysoki poziom zawartości długich rozgałęzionych aminokwasów leucyny, izoleucyny i waliny (BCAA) oraz aminokwasów siarkowych, głównie cysteiny. Aminokwasy rozgałęzione pełnią ważną funkcję w metabolizmie i homeostazie glukozy we krwi, jak również w metabolizmie lipidów. Sama leucyna odgrywa także kluczową rolę w regulacji syntezy białek szkieletowej tkanki mięśniowej (Chen i in., 2014; Minj i Anand, 2020; Naclerio i Seijo, 2019). Cysteina jest natomiast prekursorem glutationu, ważnego związku redukującego w komórkach stres oksydacyjny (Bell, 2000), jak również istotnego dla wzmacniania odporności organizmu i jego ochrony przed nowotworami (Madureira i in., 2007; Trachootham i in., 2008; Tseng i in., 2006).

Białka serwatkowe są obecnie dostępne komercyjnie. Dzięki zastosowaniu technik filtracji membranowej oraz metod chromatograficznych pozyskuje się je na większą skalę w postaci preparatów o różnej ich koncentracji, takich jak koncentraty (*whey proteins concentrate* – WPC) o ich zawartości w granicach 34-80%, izolaty (*whey proteins isolates* – WPI), zawierające powyżej 90% tych białek, czy też izoluje się indywidualne ich frakcje (Kassem, 2015; Smithers, 2015). Doniosłe znaczenie na rynku mają też hydrolizaty tych białek, które okazały się niezwykle atrakcyjnym funkcjonalnym dodatkiem do żywności (Brandelli i in., 2015; Khan, 2013; Khan i Selamoglu, 2019). Obniżona, w wyniku kontrolowanej degradacji,

**Tabela 2.** Zawartość aminokwasów egzogennych w wybranych białkach [g/100g protein]  
**Table 2.** Essential amino acids in proteins [g/100g protein]

Aminokwas/ Aminoacid	Rodzaj preparatu/Preparations			Wzorce/Standards	
	WPC 80 Sk <sup>a</sup>	WPC 80 Sp <sup>a</sup>	Kazeinian wapnia/ Calcium caseinate <sup>c</sup>	Białko jaja/ Egg protein <sup>b</sup>	WHO/FAO UNU 2007 <sup>c</sup> Wzorzec/Standard
Izoleucyna/Isoleucine	5,9	6,6	4,5	5,9	2,8
Leucyna/Leucine	10,7	11,4	9,4	8,5	6,6
Lizyna/Lysine	12,5	9,8	7,1	6,3	5,8
Metionina/Metionine	1,9	1,9	3,3	5,9	2,5
Fenylalanina/ Phenylalanine	3,7	3,7	10,5	9,6	6,3
Treonina/Treonine	5,0	7,6	3,8	4,7	3,4
Tryptofan/ Tryptophane	2,7	2,8	1,3	0,7	1,1
Walina/Valine	5,3	6,4	6,0	6,9	3,5
Histydyna/Histidine	2,6	2,5	3,2	5,4	

Sk – serwatka kwasowa (*acid whey*), Sp – serwatka podpuszczkowa (*rennet whey*).

Źródło/Source: <sup>a</sup>(de Boer 2014); <sup>b</sup>(Wereńska i Okruszek, 2011); <sup>c</sup>(Szpendowski i Siemianowski 2013).

alergienność białek serwatkowych, a przy tym podwyższona aktywność biologiczna powstająca na skutek uwolnienia z ich sekwencji peptydów o szerokim spektrum aktywności, wpłynęły na ich znaczące wykorzystanie zarówno w żywieniu dzieci, sportowców, jak i w żywieniu medycznym czy też jako „slim food” (Artym i Zimecki, 2013; Brandelli i in., 2015; Gupta i in., 2016; Kassem, 2015; Korhonen, 2009; Li-Chan, 2015; Madadlou i Abbaspourrad, 2018; Madureira i in., 2010; Pihlanto, 2011; Zimecki i Kruzel, 2007).

Preparaty białek serwatkowych wykazują również dobre cechy funkcjonalne, związane z ich właściwościami żelującymi i emulgującymi oraz dużą zdolnością wiązania wody i tworzenia pian (Batista i in., 2018; Minj i Anand, 2020; Patel, 2015a; Soltani i in., 2017).

Białka serwatki przejawiają też zdolność wiązania związków zapachowych, która jest większa niż preparatów kazeinowych (Livney, 2010). Dzięki tym właściwościom białka te znalazły szerokie wykorzystanie w różnych branżach przemysłu, w tym głównie przemysłu żywnościowego (Costa i in., 2021). Niektóre z tych białek stosowane są też jako substytuty syntetycznych substancji powierzchniowo czynnych w recepturach wielu kosmetyków (Król i in., 2014). Dzięki zastosowaniu chemicznych modyfikacji ich właściwości funkcjonalne są wciąż doskonałe (Li i in., 2005; Patel, 2015b; Smithers, 2015; Wefers i in., 2018).

Białka serwatkowe mają też coraz większe znaczenie w medycynie, czy to bezpośrednio, jako substancje o działaniu terapeutycznym (Amirani i in., 2020; Artym i Zimecki, 2005, 2013; Ng i in., 2015; Sousa i in., 2012), czy też pośrednio, jako substancje służące do enkapsulacji leków oraz innych bioaktywnych substancji, co wynika z ich zdolności tworzenia nanokompozytów (Livney, 2010; Varlamova i Zaripow, 2020). Jak dowiedziono, białka te wykazują działanie przeciwzapalne, wpływają korzystnie na funkcjonowanie układu odpornościowego, regulację ciśnienia tętniczego oraz poziomu glukozy i cholesterolu we krwi, jak również mają właściwości antynowotworowe (Cicero i in., 2017; Krissansen i in., 2007; Sousa i in., 2012; Teixeira i in., 2019; Vasilyev i in. 2021; Yang i in. 2019). Ich spożywanie wpływa na obniżenie ryzyka wystąpienia zespołu metabolicznego i związanych z nim schorzeń (Amirani i in., 2020). Pozytywne efekty metaboliczne spożywania tych białek przejawiają się również w redukcji masy ciała, co może wynikać ze wzrostu poziomu uwalniania niektórych hormonów, w tym peptydu glukagonopodobnego 1 (GLP-1), leptyn i cholecystokininy i redukcji greliny (Adams i Broughton, 2016; Kondrashina i in., 2020; Sanchez-Moya i in., 2020).

## 2. Właściwości głównych białek serwatki

Głównym białkiem serwatkowym jest BLG stanowiąca u przeżuwaczy 50-60% ich ogółu. Występuje także u niektórych zwierząt monogastrycznych, jak świnie, konie, psy i koty, natomiast nie występuje w mleku ludzkim i u gryzoni (Kontopidis i in., 2004). Wykazuje jednak homologię z ludzkim surowiczym białkiem wiążącym retinol (*retinol binding protein* – RBP) (Papiz i in., 1986). Jest syntetyzowana w komórkach epitelialnych gruczołu mlekowego. BLG posiada ok. 10 wariantów genetycznych, wśród których najczęściej występują genotypy: A i B, różniące się podstawieniem dwóch aminokwasów w pozycji 64 i 118: Asp i Val w BLG – A i Gly i Ala w wariantcie B (Broersen, 2020). W swojej strukturze zawiera 162 reszty aminokwasowe, w tym 5 reszt cysteiny, z których 4 są zaangażowane w tworzenie dwóch mostków disiarczkowych pomiędzy Cys 66 a Cys 160 i między Cys 106 a Cys 119. Wolna jest natomiast grupa Cys 121, która pozostaje zamaskowana w strukturze tego białka. W wyniku jego denaturacji zostaje odsłonięta, dzięki czemu może wchodzić w interakcje z innymi cząsteczkami BLG lub z innymi białkami (Broersen, 2020; Sava i in., 2005). Wpływa ona również na aktywność antyoksydacyjną tego białka, w 50% determinując właściwości antyoksydacyjne mleka (Liu i in., 2007).

BLG wyróżnia wysoka zawartość (ok. 25,1%) długich rozgałęzionych aminokwasów, jak leucyna, izoleucyna i walina (Sousa i in., 2012). W warunkach fizjologicznych w mleku krowim BLG występuje jako dimer (o MW 36 700Da) na skutek elektrostatycznych interakcji między Asp 130 i Glu 134 w jednym monomerze z odpowiednimi resztami lizyny w drugim, w pH < 3 i pH > 8 dysocjuje do monomerów (Xu, 1996). W zakresie pH 3,5-5,2 tworzy oktamer o MW ok. 140kDa (Madureira i in., 2007). W trakcie ogrzewania do temp. 65°C zachodzą odwracalne zmiany jej struktury, w zakresie temp. 70-75°C ulega denaturacji, natomiast w temp. 78 do 82°C tworzy agregaty (Sava i in., 2005). Jej termostabilność zależy jednak od wariantu genetycznego oraz pH środowiska, jakkolwiek najwyższa jest w pH 3 (Boye i in., 2004).

BLG należy do białek z rodziny lipokalin, które w swojej strukturze w centralnej wnęce mogą wiązać różne ligandy, w tym głównie małe hydrofobowe związki, jak retinol, witamina D2, cholesterol, związki aromatyczne, jak również nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe i fosfolipidy, dzięki czemu lepsza jest biodostępność tych związków (Broersen, 2020; Flower, 2000, Kontopidis i in., 2004; Perez i Calvo, 1995; Simoes i in., 2020; Teng i in., 2016). Połączenie retinolu i  $\beta$ -karotenu z BLG chroni je przed termiczną degradacją i utlenianiem (Hattori i in., 1995). Także związanie BLG z kurkumina, która jest słabo absorbowana i szybko w organizmie metabolizowana, powoduje podwyższenie jej biodostępności i zwiększenie aktywności antyoksydacyjnej (Li i in., 2013). Wykazano również, że dokosaheksaenowy kwas (DHA) skoniugowany z tym białkiem jest mniej wrażliwy na procesy utleniania w pH 7 i temp. 40°C niż wolny kwas (Zimet i Livney, 2009).

BLG, wiążąc wolne kwasy tłuszczowe, które hamują lipazę pregastryczną, może wpływać na proces trawienia tłuszczu mlekowego w okresie noworodkowym poprzez podwyższenie aktywności tego enzymu (Perez i in., 1992). Z kolei wiążąc jony metali, jak Cu i Fe, może się przyczyniać do hamowania procesów oksydacyjnych, w czym ważną rolę odgrywa jej wolna grupa sulfhydrylowa (Liu i in., 2007). BLG może wiązać też związki polifenolowe, jak resweratrol i galusan epigallokatechiny (EGCG), przez co uzyskane kompleksy modyfikują jej właściwości biologiczne i funkcjonalne (Kanakis i in., 2011; Livney, 2010).

Obok swojej głównej funkcji jako białka transportowego pełni też rolę w biernej odporności u noworodków i w regulacji metabolizmu fosforu w gruczole mlekowym (Broersen, 2020). Poprzez hamowanie adhezji drobnoustrojów na powierzchni nabłonka jelita zapobiega jego kolonizacji przez patogeny w początkowym etapie infekcji, pozwalając na jej zahamowanie lub redukcję (Ouweland i in., 1997). BLG wpływa również, w stopniu zależnym od dawki, na hamowanie replikacji rotawirusów (Chatterton i in., 2006). Właściwości antywirusowe, w tym wobec wirusa HIV, zwiększają chemiczne modyfikacje tego białka, jak acetylowanie i sukcynowanie (Chatterton i in., 2006; Ng i in., 2015). Jak wykazano, BLG podawane doustnie wykazuje działanie antyrakowe, co wiąże się z wysoką zawartością w jej strukturze reszt siarkowych (Pepe i in., 2013). Sun i in. (2018) stwierdzili natomiast zwiększenie właściwości antynowotworowych i aktywności immunoregulatorowej tego białka poprzez wprowadzanie do jego

struktury jonów selenu. Na modelu mysim potwierdzili *in vivo* silniejsze działanie Se-BLG wobec komórek mięsaka linii S180 i wyższą jej aktywność immunoregulatorową. Również zdolność tego białka do wiązania mutagennych heterocyklicznych amin zapobiega ich kancerogennemu oddziaływaniu (Yoshida i in., 1991).

Ujemną stroną BLG jest fakt, że wśród białek mleka jest najsilniejszym alergenem, który w 70-80% jest odpowiedzialny za reakcje uczuleniowe na mleko u dzieci (Rahaman i in., 2015). Dotykają one ok. 2-3% dzieci, które jednak w wieku powyżej 3 lat na ogół tracą wrażliwość na to białko (Petrotos i in., 2014; Sousa i in., 2012).

BLG posiada wiele epitopów o zróżnicowanym stopniu alergenicności, które występują na całej długości jej łańcucha polipeptydowego. Niektóre z nich są to sekwencje liniowe, inne, większe są epitopami konformacyjnymi (Cong i Li, 2012; Villa i in., 2018). Spośród różnych epitopów BLG dwa odpowiadające sekwencjom: f58-77 i f121-140 są według Cerecedo i in. (2008) rozpoznawane przez 75% pacjentów uczulonych na mleko.

BLG ze względu na wysoką wartość odżywczą jest jednak cennym składnikiem odżywek dla dzieci, w których wykorzystywane jest w postaci shydrolizowanej (Quintieri i in., 2017). Również wiązanie tego białka z innymi związkami, w tym z cukrami redukującymi w reakcji Maillarda, oraz poddawanie różnym procesom technologicznym, m.in. długotrwałemu ogrzewaniu w wysokich temperaturach 85-100°C, obniżają jego potencjał alergenny (Rahaman i in., 2015; Villa i in., 2018). Wu i in. (2018) wykazali, że kowalencyjne wiązanie BLG ze związkami polifenolowymi, jak EGCG i kwas chlorogenowy, redukuje też jego alergenicność, powodując jednocześnie podwyższenie jego termostabilności i właściwości antyoksydacyjnych.

BLG w formie natywnej jest na ogół odporne na hydrolizę enzymatyczną. Nie jest też podatne na degradację z udziałem pepsyny, ale jest trawione przez enzymy trzustkowe w jelicie cienkim (Bossios i in., 2011). Również innego pochodzenia enzymy proteolityczne degradują to białko, na ogół jednak w formie zdenaturowanej (Babij i in., 2014). Uwolnione z jej struktury peptydy przejawiają szereg aktywności biologicznych. Są to zarówno biopeptydy antyoksydacyjne (zawierające w swojej strukturze reszty Leu, Pro, His), bakteriocydne czy też peptydy obniżające ciśnienie krwi poprzez hamowanie enzymu konwertującego angiotensynę I (Angiotensin Converting Enzyme – ACE) do angiotensyny II, nazywane laktokininami, jak peptyd  $\beta$ -laktosyna o sekwencji Ala-Leu-Pro-Met f(142-145). Z BLG uwalniany jest też opioidowy peptyd  $\beta$ -laktorfina: Tyr-Leu-Leu-Phe f(102-105) oraz peptyd poprawiający pamięć  $\beta$ -laktotensyna His-Ile-Arg-Leu f(146-149) (Brandelli i in., 2015; Madureira i in., 2010). Nagaoka i in. (2001) w trypsynowym hydrolizacie BLG zidentyfikowali hypocholesterolowy peptyd  $\beta$ -laktostatynę o sekwencji: Ile-Ile-Ala-Glu-Lys f(71-75), który w badaniach *in vitro* powodował supresję absorpcji cholesterolu przez komórki Caco-2, jak również wykazywał hypocholesterolemiczną aktywność *in vivo* u szczurów.

BLG przejawia atrakcyjne cechy funkcjonalne. Dzięki swojej amfifilnej strukturze i wysokiej stabilności w kwaśnym środowisku wykazuje po ogrzaniu zdolność tworzenia żeli. Została ona wykorzystana do enkapsulacji bioaktywnych substancji, które na tym nośniku mogą być bezpiecznie transportowane przez środowisko żołądka bezpośrednio do jelita cienkiego (Madureira i in., 2007; Simões i in., 2020; Teng i in., 2016; Wilde i in., 2016). Poprzez poddawanie BLG różnorodnym modyfikacjom chemicznym – czy to na drodze fosforylacji, czy glikacji – które wpływają na jego zmiany konformacyjne, możliwe są też zmiany jego właściwości funkcjonalnych (Enomoto i in., 2007; Medrano i in., 2009).

Drugim białkiem serwatki jest ALA, która podobnie jak BLG syntetyzowana jest w komórkach wydzielniczych gruczołu mlekowego. Występuje w mleku prawie wszystkich ssaków. W mleku kobiecym jest dominującym białkiem (75%), ale w mleku krowim stanowi 20-25% wszystkich białek serwatkowych (Kamau i in., 2010).

ALA pełni bardzo ważną funkcję fizjologiczną poprzez udział w procesie biosyntezy laktozy. Przyłączając się do  $\beta$ -galaktozylotransferazy, zwiększa jej powinowactwo do glukozy w finalnym etapie wytwarzania cukru mlecznego z UDP-galaktozy i glukozy w gruczole mlekowym (McSweeney i Fox, 2013).

ALA wykazuje w 40% podobieństwo sekwencji aminokwasowej oraz struktury przestrzennej do lizozymu, co wskazuje na pochodzenie od jednego prekursora tych białek, pełniących jednak przeciwstawną funkcję, odpowiednio przez udział tego pierwszego w syntezie i drugiego w hydrolizie wiązania wiązań  $\beta$ -1,4-glikozydowego (Permyakov i Berliner, 2000).

ALA jest niewielkim białkiem, które w swojej strukturze zawiera 123 reszty aminokwasowe (MW 14,175 Da), w tym 8 reszt cysteiny tworzących cztery mostki disiarczkowe (Cys6-Cys120; Cys28-Cys111; Cys61-Cys77; Cys73-Cys91), stabilizujące jej strukturę przestrzenną. Jest też metaloproteiną wiążącą wapń, który wpływa na jej molekularną stabilność i zabezpiecza ją przed termiczną denaturacją (Hiraoka i in., 1980). Usunięcie wapnia redukuje termostabilność ALA, jakkolwiek spośród wszystkich białek serwatkowych wykazuje ona największą termooporność. Denaturuje w temp. 62-65° C w pH 6,5, ale po schłodzeniu w 90% ulega renaturacji. Całkowita jej denaturacja zachodzi w temp. 70-80°C (McGuffey i in., 2005). W wyższych temperaturach ALA, pozbawiona jonów wapnia, tworzy klasyczną *molten globule*, podobnie jak natywne białko w środowisku kwaśnym (Hochwallner i in., 2014). Natywne ALA ma zdolność wiązania i transportu innych jonów, jak Mg, Zn, Co, jakkolwiek podstawienie wapnia przez cynk obniża jej termostabilność (Permyakov i Berliner, 2000). W pH mleka ALA jest monomerem, w pH kwaśnym natomiast zachodzi jej odwracalna agregacja.

Struktura ALA jest w 72% homologiczna z ludzką  $\alpha$ -laktoalbuminą. W porównaniu z nią zawiera więcej His, Trp i Val. Z kolei ludzka ALA jest bogatsza w reszty Ile, Leu i Met (tab. 3). Zawartość pozostałych egzogennych aminokwasów jest w tych białkach na zbliżonym poziomie (Kamau i in., 2010; Lönnerdal i Lien, 2003). ALA pod względem odżywczym jest najwartościowszym białkiem mleka. Wśród wszystkich białek żywnościowych wyróżnia się największą zawartością tryptofanu (stanowiącego 5,9% wszystkich jej aminokwasów), który jest prekursorem serotoniny (Ruddick i in., 2006).

**Tabela 3.** Skład aminokwasowy krowiej i ludzkiej  $\alpha$ -laktalbuminy [%]

**Table 3.** Amino acid composition of bovine and human  $\alpha$ -lactalbumin [%]

Aminokwasy egzogenne i względnie egzogenne/ Aminoacids essential and conditionally essential	Krowiej/ Bovine	Ludzkiej/ Human	Aminokwasy endogenne/ Aminoacids nonessential	Krowiej/ Bovine	Ludzkiej/ Human
Izoleucyna/Isoleucine	6,4	9,7	Alanina/Alanine	1,5	2,5
Leucyna/Leucine	10,4	11,3	Asparagina/Asparagine	6,4	3,2
Lizyna/Lysine	10,9	10,9	Glutamina/Glutamine	5,4	6,4
Metionina/Methionine	0,9	1,9	Glicyna/Glycine	2,4	2,4
Cysteina/Cysteine	5,8	5,8	Prolina/Proline	1,4	1,4
Feniloalanina/Phenylalanine	4,2	4,2	Seryna/Serine	4,3	5,0
Treonina/Treonine	5,0	5,0	Kwas asparaginowy/ Aspartic acid	10,6	9,8
Tryptofan/Tryptophane	5,3	4,0	Kwas glutaminowy/ Glutamic acid	6,4	7,4
Tyrozyna/Tyrosine	4,6	4,6			
Walina/Valine	4,2	1,4			
Histydyna/Histidine	2,9	2,0			
Arginina/Arginine	1,1	1,1			

Źródło/Source: (Lönnerdal i Lien, 2003).

Dlatego spożywanie tego białka wpływa na podwyższenie poziomu tego neurotransmitera w mózgu, redukuje też stężenie kortyzolu, działa antystresowo i poprawia zdolności kognitywne oraz nastroj (Markus i in., 2002; Orosco i in., 2004).

ALA, obok BLG, stanowi wśród białek serwatkowych drugi ważny alergen często wywołujący u dzieci reakcje uczuleniowe na mleko. Jak wykazano w jej strukturze, występuje również wiele epitopów zdolnych do łączenia się ze specyficznymi przeciwciałami IgE oraz IgG (Cong i Lingfeng, 2012, Hochwallner i in., 2014).

ALA wykazuje jednak wszechstronne dobroczynne działanie na organizm. W badaniach Matsumoto i in. (2001) wykazano jej działanie ochronne przed stresem wywołanym etanolem i stanami chorobowymi żołądka (wrzody żołądka) poprzez oddziaływanie na wzrost prostaglandyn. Skuteczne w terapii tych schorzeń okazało się podawanie białka w optymalnej dawce 200 mg/kg masy ciała dziennie. Krissansen (2007) stwierdził efektywność ALA w zapobieganiu wiązania się enteropatogennych bakterii *E. coli*, *Salmonella typhimurium* i *Shigella flexneri* z komórkami nabłonka jelita. Jego aktywność antybakteryjną wobec zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych bakterii wzmacnia też jego współdziałanie z lizozymem, z którym asocjuje w warunkach fizjologicznego pH (Expósito i Recio, 2006).

ALA wykazuje również właściwości antynowotworowe. Bruck i in. (2014) wykazali jej zdolność do hamowania proliferacji niektórych linii komórek nowotworowych. Wielu innych autorów potwierdziło, że kompleksy ludzkiej i krowiej ALA, pozbawionej jonów Ca (apo forma ALA), z kwasem oleinowym (C18:1:9cis), w skrócie nazywane odpowiednio HAMLET i BAMLET, wykazują silne działanie antynowotworowe (Barbana i in., 2011; Delgado i in., 2015; Fast i in., 2005). Kompleksy te mogą wnikać do komórek nowotworowych, wiązać się z histonami i zaburzać organizację chromatyny w jądrze komórkowym. W rezultacie indukują apoptozę komórek wielu linii rakowych, np. ludzkiego brodawczaka (*human skin papilloma*) i glejaka (*human glioblastoma*) (Delgado i in., 2015; Hsieh i in., 2012; Lišková i in., 2010; Rath i in., 2015).

Hydrolizaty ALA pozbawione alergenicności przejawiają szereg aktywności biologicznych. Pellegrini i in. (1999) wykazali, że jej hydrolizaty otrzymane z udziałem trypsyny i chymotrypsyny przejawiają działanie bakteriocydne, głównie wobec patogennych bakterii Gram-dodatnich. Wywierają też stymulujący wpływ na wzrost bifidobakterii.

Biopeptyd  $\alpha$ -laktorfina, o sekwencji Tyr-Gly-Leu-Phe, stanowiący fragment 50-53 ALA, uwalniany pod wpływem pepsyny, wykazuje strukturalne podobieństwo do ludzkiego opioidowego peptydu Leu-enkephaliny (Tyr-Gly-Gly-Phe) i charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności. Poprzez pobudzenie receptora opioidowego wpływa na uśmierzanie bólu, obniża ciśnienie krwi i wykazuje aktywność immunomodulującą oraz antybakteryjną wobec *E. coli* Q127. Przejawia także aktywność antynowotworową. Również peptydy uwalniane z C-końca ALA, stanowiące fragmenty jej sekwencji: f 99-108 i f104-108, wykazują wysoką aktywność hipotensyjną. Inny natomiast biopeptyd Gly-Leu-Phe f51-53 wykazuje działanie immunomodulacyjne poprzez stymulowanie fagocytozy u makrofagów (Chatterton i in., 2006; Madureira i in., 2010). Generalnie hydrolizaty ALA mają właściwości immunostymulujące poprzez aktywację proliferacji limfocytów, stymulują wydzielanie cytokin i produkcję przeciwciał (Gauthier i in., 2006).

ALA, ze względu na wysoką wartość odżywczą, pozytywny wpływ na mikrobiotę przewodu pokarmowego, działanie immunomodulujące oraz stymulujące rozwój mózgu i wzrost dzieci, jest szeroko wykorzystywana w ich żywieniu (Artym, 2020; Nielsen i in., 2020). Jest też komponentem wielu produktów żywnościowych przeznaczonych dla dorosłych. ALA wykazuje wiele atrakcyjnych właściwości funkcjonalnych. Poddana ograniczonej hydrolizie z udziałem serynowej proteazy z *Bacillus licheniformis*, przy zapewnieniu odpowiednich warunków pH oraz w obecności dwuwartościowego kationu, przejawia zdolność samoorganizacji i tworzenia nanotubularnych struktur, które mogą być szeroko wykorzystane jako nośniki różnorodnych substancji, w tym o działaniu terapeutycznym (Graveland-Bikker i in., 2006; Ipsen i Otte, 2007).

Wśród białek serwatkowych ssaków występują pochodzące z krwi immunoglobuliny, które, jako przeciwciała odpornościowe, przekazywane są noworodkom z mlekiem matki. W zależności od gatunku wykazują one zróżnicowany skład. U przeżuwaczy dominują immunoglobuliny G: IgG1 i IgG2, stanowiące ok. 75% ich ogółu (Kassem, 2015). Oprócz nich występują też IgM i IgA. Zawartość immunoglobulin jest

najwyższa w colostrum (ok. 48g/L), w którym stanowią 70-80% wszystkich białek mleka (Steijns, 2001). W serwatce jest ich ok. 9% w porównaniu ze wszystkimi jej białkami. Na drodze immunizacji krów przeciw określonym patogenom lub antygenom możliwe jest podwyższenie poziomu zawartości immunoglobulin (Korhonen, 2009; Mehra i in., 2006; Pihlanto, 2011). Warunkują one swoistą odporność humoralną organizmu. Uczestniczą w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych na drodze aglutynacji, bakteriolizy, bakteriostazy lub opsonizacji. Neutralizują również wirusy i toksyny, jak również wykazują zdolność wiązania dopełniacza (Mehra i in., 2006). Liczne badania kliniczne potwierdziły skuteczność preparatów immunoglobulinowych przeciw patogenom jamy ustnej (*Streptococcus mutans*, *Candida albicans*), a także przeciw *Helicobacter pylori* powodującemu wrzody żołądka czy też przeciw *Cryptosporidium parvum*, powodującemu biegunki u osób z obniżoną odpornością, jak również przeciw wywołującym infekcje u dzieci enteropatogennym bakteriom *Escherichia coli* (Korhonen, 2009; Severin i Wenshui, 2005; Steijns, 2001). Doustne podawanie koncentratu immunoglobulin, zwłaszcza w formie enkapsułowanej zamkniętej w powłokach opornych na działanie kwaśnego środowiska żołądka, może stanowić naturalną antymikrobiologiczną osłonę organizmu przed bakteryjnymi infekcjami (Steijns, 2001).

Ig G2 towarzyszy kompleks peptydów bogatych w prolinę (*proline-rich peptides*), określane mianem colostrinin. Zawiera ona mieszaninę peptydów o MW < 10 kDa. W ich składzie dominują dwa aminokwasy: prolina i kwas glutaminowy, stanowiące odpowiednio ponad 20% i 18% (Sokołowska i in., 2008). Ich sekwencja wykazuje homologię do prekursorów białkowych: beta-kazeiny i hipotetycznego homologue beta-kazeiny. Kompleks ten przejawia działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Stwierdzono też, że reguluje wzrost i różnicowanie limfocytów oraz hamuje patologiczny proces związany z agregacją amyloidu  $\beta$  u osób ze zmianami degeneracyjnymi centralnego układu nerwowego (Zabłocka i in., 2020; Zimecki i Kruzel, 2007).

Do albumin występujących w serwatce zalicza się pochodzącą również z krwi BSA, która w surowicy krwi stanowi 50% wszystkich jej białek, natomiast w serwatce jej zawartość wynosi ok. 8% wszystkich białek serwatkowych (Madureira i in., 2007). Jest to białko o MW ok. 66 kDa, które cechuje wysoka zawartość aminokwasów egzogennych, obecność 17 mostków disiarczkowych i jednej wolnej grupy sulfhydrylowej (Fox i McSweeney, 2013). Sekwencja tego białka wykazuje w 75% podobieństwo z ludzką albuminą serum krwi. BSA spełnia głównie funkcję białka transportowego dla wielu ligandów, w tym długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, hormonów steroidowych czy jonów metali (Krissansen, 2007). BSA jest też źródłem bioaktywnych peptydów, takich jak albutensyna (f208-216) i serofina (f399-404) o aktywności opioidowej (Madureira i in., 2010).

Niezwykle cennym białkiem serwatki jest laktoferyna (LF), która w najwyższym stężeniu występuje w colostrum (1,5g/L). W normalnym krowim mleku jej zawartość jest wielokrotnie niższa i w stosunku do ogółu białek serwatkowych stanowi ok. 2% (Rascon-Cruz i in., 2021). LF jest złożonym białkiem, należącym do glikoprotein z rodziny transferyn zaangażowanych w chelatację i transport żelaza. Zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o MW ok. 80 kDa zawierającego ok. 700 reszt aminokwasowych, wśród których największy udział mają: alanina, leucyna i glicyna, stanowiące w jej składzie odpowiednio 10%, 9% i 7% (Niaz i in., 2019). W swojej strukturze LF zawiera 14 mostków disiarczkowych. Jej cząsteczkę tworzą dwa płaty N- i C-końcowy połączone krótkim łańcuchem  $\alpha$ -helisy, co nadaje jej dużą giętkość. Płaty, które wykazują homologię na poziomie 31-41%, dodatkowo posiadają po dwie domeny, odpowiednio N1 i N2 oraz C1 i C2 (Giansanti i in., 2016). Bydlęca LF wykazuje 69% podobieństwo struktury z LF mleka kobiecego (Steijns, 2000). Jej charakter jest silnie zasadowy, co wpływa na jej pI, który przypada w zakresie pH 8-9.

W LF występuje od 6,7 do 11,2% cukrów, które także wpływają na heterogenność tego białka (O'Riordan i in., 2014). Są wśród nich: N-acetyloglukozamina, acetylogalaktozamina, galaktoza, fukoza, mannoza i kwas neuraminowy, połączone wiązaniami N- glikozydowymi z resztami asparaginy: Asn233, Asn281, Asn368, Asn476 and Asn545 (Rascon-Cruz i in., 2021). Stopień glikozylacji LF wpływa na jej oporność na proteolizę pod wpływem enzymów trawiennych oraz działanie niskiego pH środowiska. LF może



występować w trzech różnych izoformach:  $\alpha$ ,  $\gamma$  i  $\beta$ , ale tylko ta pierwsza izoforma wykazuje zdolność łączenia się z jonami żelaza. Pozostałe dwie izoformy przejawiają natomiast aktywność rybonukleazową wobec mRNA (Furmanski i in., 1989; Karav i in., 2017). Częsteczką LF może przyłączyć dwa jony tego metalu, po jednym w każdym z płatów, przy czym pierwiastek ten jest wiązany przez cztery reszty aminokwasów: Asp, dwie reszty Tyr i His. Procesowi temu towarzyszy wiązanie anionu dwuwęglanowego lub wodorowęglanowego przez reszty argininy. Wiązanie żelaza jest procesem odwracalnym, dlatego LF może też występować jako apo-LF, kiedy jest pozbawiona tego pierwiastka, lub jako holo-LF wiążąca jony metalu. Zwykle LF jest tylko w 15% wysycona żelazem. W zależności od obecności żelaza LF może przejawiać też zróżnicowany poziom aktywności biologicznej (Wang i in., 2019). LF może wiązać też inne jony metali, jak: Co, Mn, Cu, Zn, jakkolwiek z mniejszym powinowactwem (Steijns, 2000). Apo-LF w porównaniu z holo-LF wykazuje bardziej otwartą strukturę i tym samym większą podatność na hydrolityczny rozkład oraz denaturujące działanie wyższej temperatury (Karav i in., 2017).

Zakres funkcji biologicznych LF jest niezwykle szeroki, co w pełni uprawnia nazywanie jej białkiem multifunkcyjnym. Jest ona białkiem odporności wrodzonej organizmu, silnie wpływającym także na jego odporność nabytą (Rascón-Cruz i in., 2021). Jest w pierwszej linii obrony organizmu przed infekcjami bakteryjnymi i tym samym chroni i stymuluje wzrost nabłonka jelita, szczególnie u wcześniaków. Początkowo jej ochronne oddziaływanie antymikrobiologiczne przypisywano sekwestracji żelaza niezbędnego do wzrostu wielu bakterii patogennych. Bardziej efektywne działanie bakteriocydnego LF wynika jednak z jej bezpośredniego oddziaływania ze ścianą komórkową drobnoustrojów, zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, a także grzybów i pierwotniaków (Castro i in. 2017; Lodhi i in., 2019; Rascon-Cruz i in., 2021). Wiążąc się ze strukturami ich ściany N-końcowym fragmentem o silnie kationowym charakterze, powoduje jej destabilizację i uszkodzenie komórki. LF zapobiega również adhezji patogenów do tkanek gospodarza poprzez wiązanie się z adhezynami bakteryjnymi, jak również przejawia wobec ich białkowych czynników wirulencji aktywność enzymatyczną. Bezpośrednie antymikrobiologiczne oddziaływanie LF polega też na hamowaniu procesu tworzenia biofilmu przez bakterie, który jest bardziej odporny na mechanizmy ochronne gospodarza i na terapię antybiotykową. Wynikać może też z jej właściwości antyoksydacyjnych wiążących się z chelatowaniem prooksydacyjnych metali oraz wyłapywaniem wolnych rodników przez jej reszty siarkowe (Khan i Selamoglu, 2019). LF wykazuje też szeroką aktywność przeciwwirusową wobec zwierzęcych i ludzkich RNA i DNA-wirusów, m.in. zapalenia wątroby typu C, HIV, wirusów herpes i rotawirusów oraz wirusowi grypy (Berkhout i in., 2004; Ng i in., 2015, Niaz i in., 2019; Superti i in., 2001). Mechanizm tego działania polega na jej interakcji z cząstkami wirusów lub z ich receptorami na powierzchni komórek docelowych. Zdolność wiązania się LF z receptorami, w tym również koronawirusa, stała się w ostatnim czasie zachętą do podjęcia badań nad jej wykorzystaniem w prewencji i leczeniu infekcji SARS-CoV-2 (Hu i in., 2021; Salaris i in., 2021).

Szerokie spektrum antymikrobiologicznej aktywności LF wynika też z jej współdziałania z innymi bioaktywnymi składnikami obecnymi wśród białek serwatkowych, jak lizozym i laktoperoksydaza czy osteopontyna (de Andrade i in., 2014; Jiang i in., 2020 Nakano i in., 2019). Również niektóre chemiczne modyfikacje LF podwyższają jej właściwości biologiczne, w tym działanie antybakteryjne i antywirusowe czy też antyrakowe (Najmafshar i in., 2020).

LF, hamując rozwój patogenów, jednocześnie moduluje prawidłowy skład mikroflory przewodu pokarmowego i stymuluje wzrost probiotyków, głównie z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Jej dobroczynne działanie rozciąga się również na inne tkanki i narządy organizmu, w tym na układ oddechowy, moczowy czy też skórę (Artym i Zimecki, 2020; Superti, 2020). Bakteriocydne właściwości wywiera nie tylko natywna LF, ale też produkty jej hydrolizy uwalniane pod wpływem pepsyny, które wykazują silny charakter amfipatyczny. Zidentyfikowano wśród nich peptydy pochodzące z N-końca LF określane mianem laktoferycyn (Madureira i in., 2010; Sinha i in., 2013). Są to sekwencje 1-11 oraz 17-41. Pierwszy z peptydów okazał się efektywny wobec pięciu szczególnie lekoopornych szczepów bakterii *Acinetobacter baumannii* oraz opornego na metycylinę *Staphylococcus aureus*, a także wobec wielu gatunków z rodzaju *Candida* (Sinha i in., 2013). Drugi natomiast peptyd bogaty w reszty zasadowe (Lys i Arg) i hydrofobowe (Try i Phe), zawierający mostek disiarczkowy (Cys 19- Cys 36) przejawia aktywność

antybakteryjną i antywirusową, hamuje też przerzutowanie oraz indukuje apoptozę komórek raka krwi. Okazał się on znacznie bardziej aktywny niż białko substratowe. Inny peptyd uwalniany z LF, stanowiący fragment sekwencji LF 268-284, określany mianem laktoferampiny, wykazuje szczególnie szeroką aktywność antimikrobiologiczną, w tym antybakteryjną i antygrzybową (Bruni i in., 2016).

LF może wywierać również pośrednie działanie antimikrobiologiczne poprzez stymulację układu immunologicznego. W ostatnich latach ukazało się na ten temat wiele cennych prac przeglądowych. LF podawana doustnie stymuluje zarówno miejscową odpowiedź immunologiczną w obrębie tkanki limfatycznej błon śluzowych przewodu pokarmowego (GALT), jak i odpowiedź ogólnoustrojową. Poprzez indukcję produkcji przeciwciał klasy IgA oraz IgG wpływa na wydzielanie niektórych cytokin oraz aktywację komórek B, T i NK (Artym, 2012; Kruzel i in., 2017; Legrand i in., 2005; Zimecki i Kruzel, 2007; Superti, 2020).

Jak wykazali Kawashima i in. (2012), LF poprzez swoją aktywność wpomagającą wydzielanie łez oraz ograniczanie procesów zapalnych w starzejącym się oku ma także działanie ochronne w związanym z wiekiem tzw. zespole „suchego oka”. Białko to wspomaga prawidłowe działanie gruczołu łzowego, a choć mechanizm tego procesu nie jest dokładnie poznany, uważa się, że może wynikać on z bezpośredniego działania LF na gruczoł łzowy, jak i ogólnego jej wpływu na metabolizm organizmu. Dlatego może być ono alternatywnym suplementem diety dla pacjentów z zespołem „suchego oka”.

Niezwykle ważna jest aktywność antynowotworowa tego białka (Najmafshar i wsp. 2020), która, obok jego działania antyoksydacyjnego i immunomodulacyjnego, przejawia się w indukowaniu apoptozy komórek nowotworowych oraz hamowaniu ich proliferacji, a także hamowaniu procesu angiogenezy, czyli tworzenia nowych naczyń krwionośnych, niezbędnych w rozwoju guza i tworzeniu przerzutów (Hsieh i in., 2012). LF należy też do ważnych związków chemioprewencyjnych, uczestniczących zarówno w procesach neutralizacji kancerogenów, jak i w wielu procesach naprawczych, m.in. zmniejszaniu ilości reaktywnych form tlenu i hamowaniu stanów zapalnych (Artym, 2013).

LF bierze udział również w regulacji metabolizmu tkanki kostnej i chrzęstnej, wywierając stymulujące działanie na różnicowanie i proliferację osteoblastów i chondrocytów oraz hamujące ich apoptozę (Artym, 2012). LF wpływa na metabolizm lipidów, może hamować peroksydację kwasów tłuszczowych oraz powstawanie rodników ponadtlenkowych (Khan i in., 2019). W licznych badaniach potwierdzono również działanie hipotensyjne, przeciwstresowe i przeciwbólowe LF (Artym, 2012). Wszystkie te właściwości LF sprawiają, że znajduje ona szerokie wykorzystanie w praktyce klinicznej (Artym i Zimecki, 2013). Dzięki poznaniu sekwencji genu LF mleka ludzkiego i krowiego oraz LF wytwarzanej w neutrofilach możliwa stała się produkcja rekombinowanego białka w skali przemysłowej. Nadanie jej statusu GRAS przez agencje FDA oraz EFSA, zezwalającego na stosowanie jej jako nowego składnika żywności, sprawia, że jest obecnie szeroko wykorzystywana komercyjnie w odżywkach dla dzieci, jako suplement żelaza, w gumach do żucia, preparatach kosmetycznych, paszach czy też jako nutraceutyk wzmacniający układ odpornościowy, stosowany w preparatach terapeutycznych i w żywności funkcjonalnej (Niaz i in., 2019; Steijns, 2001).

Do innych białek zawartych w serwatce, które obok laktoferyny uczestniczą w reakcjach obrony nieswoistej organizmu, należą dwa enzymy: laktoperoksydaza (LPO) i lizozym.

Laktoperoksydaza jest gliko-hemoproteiną zawierającą 0,07% Fe i ok. 10% cukrów. Jej cząsteczka złożona jest z dwóch identycznych podjednostek. Do celów komercyjnych pozyskiwana jest z serwatki. Jest to jeden z najbardziej termoopornych enzymów mleka, dlatego jest wykorzystywana do monitorowania skuteczności pasteryzacji wysokiej. Jest jedną z najbardziej skutecznych substancji bariery antymikrobiologicznej mleka przeżuwaczy. LPO utlenia tiocyjaniany z wykorzystaniem  $H_2O_2$ , w wyniku czego powstaje podtiocjanian, który działa toksycznie na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Stwierdzono, że LPO jest szczególnie skuteczna w hamowaniu rozwoju bakterii wywołujących zapalenie dziąseł i wpływa też na szybkie ich gojenie (Smithers, 2015).

Bakteriocydnym efektem systemu LPO znalazł szerokie wykorzystanie w praktyce, w terapii zapalenia jelit u cieląt i zapalenia gruczołu mlekowego u krów, w utrwalaniu mleka zwłaszcza w regionach o cieplejszym klimacie oraz jako dodatek do past do zębów. LPO wykorzystywana jest również do utrwalania produktów żywnościowych (Costa i in., 2021; Flemmig i in., 2016; Severin, 2015).

System laktoperoksydazy jest zaangażowany w rozkład wielu karcynogenów, ma także działanie ochronne przed toksycznym działaniem nadtlenu wodoru. Na modelu mysim wykazano aktywność supresyjną tego białka wobec komórek czerniaka linii B-16 (Seifu i in., 2005). W tych aktywnościach wykazuje działanie synergistyczne z innymi bioaktywnymi białkami mleka, np. laktoferyną.

Lizozym jest hydrolazą o działaniu bakteriocydnym prowadzącą lizę, głównie bakterii Gram-dodatnich, poprzez hydrolizę wiązań  $\beta$  1-4 glikozydowych między kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetyloglukozaminą w peptydoglikanie ich ściany komórkowej. W proces katalizy zaangażowane są dwie jego reszty aminokwasowe: kwas glutaminowy i kwas asparaginowy. Jak wykazano, lizozym może, w synergii z laktoferyną, oddziaływać na ściany komórek bakterii Gram-ujemnych (Löenerdal, 2003; Severin i Wenshui, 2005). Szczególnie wrażliwe na jego działanie lityczne są bakterie *Micrococcus lysodeikticus*, których ściany komórkowe są wykorzystywane jako substrat w standardowych oznaczeniach aktywności enzymu metodą turbidymetryczną. Bakteriobójcze właściwości lizozymu pozwoliły na jego wykorzystanie jako naturalnego antybiotyku do utrwalania żywności oraz pasz, a także w medycynie w leczeniu zakażeń o różnym podłożu etiologicznym czy też w terapii wspomagającej antybiotykoterapię.

Lizozym znajduje również szerokie zastosowanie aplikacyjne w leczeniu infekcji wirusowych i bakteryjnych, leczeniu chorób skóry i oczu, zapalenia dziąseł, białaczki i wielu nowotworów (Artym i Zimecki, 2005). Jest elementem odporności wrodzonej, np. w ślinie, chroni przed rozwojem patogenów w jamie ustnej. Wykazuje także aktywność anti-HIV, obniżając częstotliwość replikacji tego wirusa. Jest białkiem termostabilnym, w mleku poddanym obróbce termicznej w 75°C przez 15 minut lub 80°C przez 15 sekund 75% jego wyjściowej aktywności jest wciąż oznaczane (Zagorska i Ciprovica, 2012).

Wśród licznych innych białek serwatki, jakkolwiek występujących w niewielkich ilościach, jest osteopontyna (OPN) (Schack i in., 2009). Jej zawartość w mleku krowim jest o wiele niższa niż w mleku kobiecym (138 mg/L), jednak struktura obu białek jest w 61% homologiczna (Demmelair i in., 2017). OPN występuje też w licznych tkankach i w płynach ustrojowych organizmu. Jest to kwaśna, silnie ufosforylowana glikoproteina o punkcie izoelektrycznym w pH 3,5 i MW w przedziale 45-74 kDa w zależności od stopnia fosforylacji i glikozylacji (Denhardt i Noda, 1998). Zawiera 261 reszt aminokwasowych, wśród których największy udział mają: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, seryna i treonina (De Boer, 2014). Zawiera 27 reszt fosfoseryny i jedną fosfotreoninę, przez które wiąże wapń, w stosunku do którego przejawia niezwykle duże powinowactwo ( $K_d = \sim 3-5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ). W swojej strukturze posiada sekwencję wiążącą integryny Arg- Gly- Asp, dzięki czemu może wiązać się z różnymi komórkami. OPN jest multifunkcyjnym białkiem, które wykazuje szereg aktywności biologicznych, w tym aktywność immunomodulującą, przeciwzapalną, antynowotworową i antibakteryjną. Ma również zdolność biomineralizacji, która jest szczególnie istotna dla wzrostu kości oraz gojenia ran (Icer i Gezmen-Karadag, 2018; Liu i in., 2020; Schack i in., 2009). Krowia OPN, podobnie jak ludzka, wykazuje silne powinowactwo do dodatnio naładowanej LF, tworząc kompleksy o podwyższonej bioaktywności (Jiang i in., 2020; Liu i in., 2020). OPN jest pozyskiwana z serwatki kwasowej wolnej od glikomakropeptydy GMP. Jest ona wykorzystywana głównie w produkcji żywności humanizowanej, w której jej stężenie jest podwyższone do poziomu zawartości w mleku kobiecym (tj. 2,1% w stosunku do wszystkich białek) oraz w żywieniu klinicznym. Coraz częściej jest też wykorzystywana jako suplement diety dla dorosłych (Jiang i in., 2020). Komercyjnie dostępna jest też OPN rekombinowana.

W serwatce podpuszczkowej, przetwarzanej w przemyśle na większą skalę niż serwatka kwasowa, występuje GMP, który stanowi pod względem zawartości trzecie jej białko.

Jest on produktem uwalnianym z  $\kappa$ -kazein pod wpływem enzymu koagulującego, jakim jest chymozyna lub jej substytuty. Jest on również uwalniany w warunkach fizjologicznych po spożyciu mleka w wyniku hydrolizy białka przez pepsynę. W ostatnich latach odnotowuje się duże zainteresowanie tym pepty-

dem ze względu na jego unikalne cechy fizykochemiczne, odżywcze, a także prozdrowotne. GMP jest fragmentem C-końcowej sekwencji (f 106-169)  $\kappa$ -kazein o MW ok. 7500Da i pI w pH 3,15 (Cordova-Davalos i in., 2019).

Wykazuje on silnie hydrofilne właściwości, co wynika głównie z obecności zawartych w jego strukturze komponentów cukrowych, które wpływają na jego znaczną heterogenność (O' Riordan i in., 2014). Występują one najczęściej (w ok. 75%) w postaci tri- i tetra oligosacharydów, złożonych z galaktozy, N-acetylogalaktozaminy i kwasu sjałowego, które połączone są z GMP wiązaniami O-glikozydowymi z resztami treoniny i jednej seryny (Brody, 2000; Sawin i in., 2015). Obecność cukrów, zwłaszcza kwasu sjałowego, wywiera istotny wpływ na aktywność biologiczną tego oligopeptydu (Fernando i Woonton, 2010). GMP pozbawiony reszt cukrowych wykazuje niższą masę cząsteczkową i wyższe pI niż jego forma glikozylowana. W swojej strukturze zawiera jedną resztę fosforanową zestryfikowaną z seryną lub treoniną. W składzie aminokwasowym GMP najwięcej jest reszt Pro, Glu, Ser i Thr, nie występują natomiast reszty aromatyczne (Phe, Tyr i Trp), jak również His, Cys, i Arg (Cordova-Davalos i in., 2019; Neelima i in., 2013). Ze względu na brak w jego składzie fenyloalaniny jest on cennym produktem dietetycznym, pozyskiwanym na skalę przemysłową z przeznaczeniem dla osób cierpiących na fenyloketonurię (Laclair i in., 2009). Jego szczególna wartość odżywcza wynika też z wysokiej zawartości rozgałęzionych aminokwasów (głównie Ile i Val), co przy jednocześnie niskiej zawartości metioniny sprawia, że jest on cennym komponentem diety osób cierpiących na schorzenia wątrobowe (Korhonen, 2009). W licznych badaniach potwierdzono jego istotny wpływ na funkcjonowanie przewodu pokarmowego (Brody, 2000; Manso i Lopez-Fandino, 2004; Tulipano, 2020). Jak wykazano, GMP hamuje sekrecję soków w żołądku. Uważano też, że stymuluje wydzielanie cholecystokininy, hormonu sytości regulującego apetyt, jakkolwiek w dalszych badaniach tego jednoznacznie nie potwierdzono (Poppit i in., 2013). Peptyd ten korzystnie wpływa natomiast na mikroflorę przewodu pokarmowego, a szczególnie na wzrost bifidobakterii, co powiązane jest z obecnością zawartych w jego strukturze reszt cukrowych (Manso i Lopez-Fandino, 2004; Li i Mine, 2004; O' Riordan i in., 2018; Sawin i in., 2015). Wysokiej zawartości kwasu sjałowego w GMP przypisuje się jego korzystny wpływ na rozwój mózgu i poprawę zdolności uczenia się, co wykazano w badaniach na modelu zwierzęcym (Wang i in., 2009). Z drugiej strony wysoka zawartość treoniny w sekwencji GMP zawartego w odżywkach dla niemowląt (zwłaszcza wcześniaków) może skutkować u nich stanem hypertreoninemii (Rigo i in., 2001). GMP wykazuje również właściwości antymikrobiologiczne. W badaniach prowadzonych *in vitro* potwierdzono, że hamuje on adhezję i wzrost bakterii *Str. mutans* i *Str. sobrinus* uczestniczących w tworzeniu płytki nazębnej, dlatego dodawany jest do dostępnych komercyjnie przeciwiopróchnicznych preparatów dentystrycznych (Brody, 2000; Setarehnejad i in., 2010). Rhoades i in. (2005) wykazali też hamowanie przez GMP adhezji patogennych szczepów *E. coli* (VTEC i EPEC) do komórek ludzkiego raka okrężnicy HT29. Zimecki i in. (2006) natomiast wykazali ochronny wpływ glikomakropeptydu przed indukowaną u myszy endotoksemią i bakteremią. GMP posiada ponadto zdolność inaktywacji toksyn *V. cholerae* i enterotoksyn *E. coli* LT I i LT II oraz hamowania hemaglutynacji przez cztery szczepy ludzkiego wirusa grypy (Kawasaki i in., 1992; Zimecki i in., 2005, 2007).

GMP wpływa również na funkcjonowanie układu immunologicznego (Brody, 2000; Cordova-Davalos i in., 2019; Zimecki i in., 2006). Wykazano, że stymuluje fagocytozę i proliferację komórek ludzkich makrofagów linii U937 (Li i Mine, 2004) oraz przyspiesza proliferację ludzkich limfocytów B, lecz nie limfocytów T (Brody, 2000). Wykazuje działanie przeciwzapalne, jak również wpływa na zwiększenie wytwarzania cytokin w ludzkich monocytach (Requena i in., 2009, 2010; Sawin i in., 2015). Liczni autorzy zwracają uwagę na terapeutyczne właściwości GMP, w tym na jego prewencyjne i lecznicze działanie w przypadku syndromu metabolicznego i powiązanych z nim schorzeń (Sauve i in., 2021; Thomä-Woringer i in., 2006).

Prozdrowotne właściwości wykazują również produkty hydrolizy GMP. Wśród nich zidentyfikowano biopeptydy o aktywności antytrombotycznej, pochodzące z jego N-końcowej sekwencji, w tym undekapeptyd (f106 – 116) określany terminem kazoplateliny, który hamował zarówno agregację ADP – aktywowanych płytek krwi, jak i wiązanie łańcuchów fibrynogenu do receptorów na powierzchni płytek.

Mniejszy biopeptyd, stanowiący fragment 106-110 GMP, nazwany kazopiastryną, wydzielony z trypsynowych hydrolizatów, wykazywał działanie przeciwkrzepliwe poprzez hamowanie wiązania fibrynogenu (Clare i Swaisgood, 2000).

Obok wartości odżywczych i biologicznych GMP przejawia też takie cechy funkcjonalne, jak dobra rozpuszczalność w szerokim zakresie pH, wysoka termostabilność, zdolności pianotwórcze, żelujące oraz właściwości emulgujące, które są doskonalone poprzez koniugację GMP z kwasami tłuszczowymi lub cukrami (Neelima i in., 2013). Dzięki tym wszystkim właściwościom GMP jest wykorzystywany jako atrakcyjny dodatek do różnych produktów żywnościowych.

### 3. Podsumowanie

Różnorodne białka pozostające w serwatce po wydzieleniu z mleka kazeiny są cennymi substancjami. Nie tylko wykazują wysoką wartość odżywczą, ale też zapewniają dodatkowe korzyści zdrowotne dla organizmu. Spełniają więc wszystkie kryteria stawiane nutaceutykom, jako substancjom łączącym w sobie wartość środka odżywczego i farmaceutycznego. Dlatego też białka te, jak i produkty ich modyfikacji, są coraz szerzej wykorzystywane w produkcji żywności funkcjonalnej oraz farmaceutyków, co ma istotne znaczenie tak w profilaktyce, jak i w terapii wielu chorób, zwłaszcza o podłożu dieto-zależnym.

### Literatura

- Adams, R. L. i Broughton, K. S. (2016). Insulinotropic Effects of Whey: Mechanisms of Action, Recent Clinical Trials, and Clinical Applications. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 69, 56-63. DOI:10.1159/000448665
- Agostoni, C. V., Bresson, J. L., Fairweather-Tait, S., Flynn, A., Golly, I., Korhonen, H., Lagiou, P., Løvik, ..., Verhagen, H. (2012). Scientific Opinion on Bovine Lactoferrin. *EFSA Journal*, 10(5), 2701. DOI:10.2903/j.efsa.2012.2811
- Amirani, E., Milajerdi, A., Reiner, Ž., Mirzaei, H., Mansournia, M. A. i Asemi, Z. (2020). Effects of Whey Protein on Glycemic Control and Serum Lipoproteins in Patients with Metabolic Syndrome and Related Conditions: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Lipids in Health and Disease*, 19(1), 1-18.
- Artym, J. (2012). *Laktoferyna – niezwykle białko*. Wydawnictwo BORGIS.
- Artym, J. i Zimecki, M. (2005). The Role of Lactoferrin in the Proper Development of Newborns. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 59, 421-432.
- Artym, J. i Zimecki, M. (2013). Milk-derived Proteins and Peptides in Clinical Trials. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67, 800-816.
- Artym, J. i Zimecki, M. (2020). Beneficial Effect of Lactoferrin on the Microbiota from Gastrointestinal Tract. *Postępy Mikrobiologii*, 59, 277-290.
- Babij, K., Dąbrowska, A., Szołtyśk, M., Pokora M., Zambrowicz A. i Chrzanowska J. (2014). The Evaluation of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV,  $\alpha$ -glucosidase and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities of Whey Proteins Hydrolyzed with Serine Protease Isolated from Asian Pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20(4), 483-491.
- Barbana, C., Sánchez, L. i Pérez, M. D. (2011). Bioactivity of  $\alpha$ -Lactalbumin Related to its Interaction with Fatty Acids: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(8), 783-794. DOI:10.1080/10408398.2010.481368
- Batista, M. A., Campos, N. C. A. i Silvestre, M. P. C. (2018). Whey and Protein Derivatives: Applications in Food Products Development, Technological Properties and Functional Effects on Child Health. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1), 1509687.
- Bell, S. J. (2000). Whey Protein Concentrates with and without Immunoglobulins: A Review. *Journal of Medicinal Food*, 3, 1-13.
- Berkhout, B., Floris, R., Recio, I. i Visser, S. (2004). The Antiviral Activity of the Milk Protein Lactoferrin against the Human Immunodeficiency Virus Type 1. *BioMetals*, 17, 291-294. doi.org/10.1023/B:BIOM.0000027707.82911.be
- Bossios, A., Theodoropoulou, M., Mondoulet, L., Rigby, N. M., Papadopoulos, N. G., Bernard, H. i Papageorgiou, P. (2011). Effect of Simulated Gastro-Duodenal Digestion on the Allergenic Reactivity of Beta-Lactoglobulin. *Clinical and Translation Allergy*, 1(1), 1-11. DOI:10.1186/2045-7022-1-6
- Boye, J. I., Ma, C. Y. i Ismail, A. (2004). Thermal Stability of  $\beta$ -lactoglobulins A and B: Effect of SDS, Urea, Cysteine and N-ethylmaleimide. *Research Journal of Dairy Science*, 71, 207-215. DOI:10.1017/S0022029904000184
- Brandelli, A., Folmer Corrêaa, A. P. i Daroit, D. J. (2015). Whey as a Source of Peptides with Remarkable Biological Activities. *Food Research International*, 73, 143-161.
- Brody, E. P. (2000). Biological Activities of Bovine Glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84, 39-46.
- Broersen, K. (2020). Milk Processing Affects Structure, Bioavailability and Immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin. *Foods*, 9(874).

- Bruck, W. M., Gibson, G. R. i Bruck, T. B. (2014). The Effect of Proteolysis on the Induction of Cell Death by Monomeric Alpha Lactalbumin. *Biochimie*, 97, 138-143.
- Bruni, N., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Pessione, E., Cirrincione, S., Giraudo, L., Corona, A. i Dosio, F. (2016). Antimicrobial Activity of Lactoferrin-Related Peptides and Applications in Human and Veterinary Medicine. *Molecules*, 21(6), 752.
- Castro, S. L., Samaniego-Barrón, L., Serrano-Rubio, L. E., Ceballos-Olivera, I., Avalos-Gómez, C. i de la Garza, M. (2017). Lactoferrin: A Powerful Antimicrobial Protein Present in Milk. *Advances in Dairy Research Journal*, 5(195), 2. DOI:10.4172/2329-888X.1000195
- Cerecedo, I., Zamora, J., Shreffler, W. G., Lin, J., Bardina, L., Dieguz, M. C., Wang, J., Muriel, A., De La Hoz, B. i Sampson, H. A. (2008). Mapping of the IgE and IgG Sequential Epitopes of Milk Allergens with a Peptide Microarray-based Immunoassay. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122, 589-594.
- Chatterton, D. E., Smithers, G., Roupas, P. i Brodtkorb, A. (2006). Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin – Technological Implications for Processing. *International Dairy Journal*, 16(11), 1229-1240. DOI:10.1016/j.idairyj.2006.06.001
- Chen, W. C., Huang, W. C., Chiu, C. C., Chang, Y. K. i Huang, C. C. (2014). Whey Protein Improves Exercise Performance and Biochemical Profiles in Trained Mice. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 46(8), 1517-1524. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000272>
- Cicero, A. F. G., Fogacci, F. i Colletti, A. (2017). Potential Role of Bioactive Peptides in Prevention and Treatment of Chronic Disease: A Narrative Review. *British Journal of Pharmacology*, 174, 1378-1394.
- Clare, D. A. i Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, 1187-1195.
- Cong, Y. i Linfeng, L. (2012). Identification of the Critical Amino Acid Residues of Immunoglobuline E and Immunoglobuline G Epitopes in  $\beta$ -lactoglobuline by Alanine Scanning Analysis. *Journal of Dairy Science*, 95, 6307-6312.
- Cong, Y., Shengyun, Z. i Linfeng, L. (2016). Identification of the Critical Amino Acid Residues of Immunoglobuline E and Immunoglobuline G Epitopes in  $\alpha$ -lactalbumin by Alanine Scanning Analysis. *Journal of Food Science*, 81, 2597-2603.
- Córdova-Dávalos, L. E., Jiménez, M. i Salinas, E. (2019). Glycomacropeptide Bioactivity and Health: A Review Highlighting Action Mechanisms and Signaling Pathways. *Nutrients*, 11(598), DOI:10.3390/nu11030598 2019
- Costa, C., Azoia, N.G., Coelho, L., Freixo, R., Batista, P. i Pintado, M. (2021). Proteins Derived from the Dairy Losses and By-Products as Raw Materials for Non-Food Applications. *Foods*, 10(1), 135. <https://doi.org/10.3390/foods10010135>
- de Andrade, F. B., de Oliveira, J. C., Yoshie, M. T., Guimaraes, B. M., Gonçalves, R. B. i Schwarcz, W. D. (2014). Antimicrobial Activity and Synergism of Lactoferrin and Lysozyme against Cariogenic Microorganisms. *Brazilian Dental Journal*, 25(2), 165-169. DOI:10.1590/0103-6440201302257
- de Boer, R. (2014). *From Milk by-Products to Milk Ingredients: Upgrading the Cycle*. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Delgado, Y., Morales-Cruz, M., Figueroa, C. M., Hernández-Román, J., Hernández, G. i Griebenow, K. (2015). The Cytotoxicity of BAMLET Complexes is Due to Oleic Acid and Independent of the  $\alpha$ -lactalbumin Component. *FEBS Open Bio*, 5, 397-404. DOI:10.1016/j.fob.2015.04.010
- Demmelair, H., Prell, C., Timby, N. i Lönnerdal, B. (2017). Benefits of Lactoferrin, Osteopontin and Milk Fat Globule Membranes for Infants. *Nutrients*, 9(8), 817. DOI:10.3390/nu9080817
- Denhardt, D. T. i Noda, M. (1998). Osteopontin Expression and Function: Role in Bone Remodeling. *Journal of Cellular Biochemistry*, 72(S30–31), 92-102.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2012). Scientific Opinion on Bovine Lactoferrin. *EFSA Journal*, 10(5), 2701. DOI:10.2903/j.efsa.2012.2811
- Enomoto, H., Li, C. P., Morizane, K., Ibrahim, H. R., Sugimoto, Y., Ohki, S., Ohtomo, H. i Aoki, T. (2007). Glycation and Phosphorylation of  $\beta$ -Lactoglobulin by Dry-Heating: Effect on Protein Structure and Some Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2392-2398.
- Expósito, I. L. i Recio, I. (2006). Antibacterial Activity of Peptides and Folding Variants from Milk Proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1294-1305. DOI:10.1016/j.idairyj.2006.06.002
- Fast, J., Mossberg, A. K., Svanborg, C. i Linse, S. (2005). Stability of HAMLET-A Kinetically Trapped  $\alpha$ -La Oleic Acid Complex. *Protein Science*, 14(2), 329-340.
- Fernando, S. F. i Wooton, B. W. (2010). Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) Acid in Bovine Glycomacropeptide (GMP). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(4), 359-366.
- Flemmig, J., Gau, J., Schlorke, D. i Arnhold, J. (2016). Lactoperoxidase as a Potential Drug Target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20(4), 447-461. DOI:10.1517/14728222.2016.1112378
- Flower, D. R. (2000). Beyond the Superfamily: The Lipocalin Receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1-2), 327-336. DOI:10.1016/s0167-4838(00)00169-2
- Fox, P. F. i McSweeney, P. L. (Eds.). (2013). *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins, Parts A&B*. Springer, Cork, Ireland.
- Furmanski, P., Li, Z., Fortuna, M. B., Swamy, C. i Das, M. R. (1989). Multiple Molecular Forms of Human Lactoferrin. Identification of a Class of Lactoferrins that Possess Ribonuclease Activity and Lack Iron-Binding Capacity. *Journal of Experimental Medicine*, 170, 415-429.
- Gauthier, S. F., Pouliot, Y. i Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory Peptides Obtained by the Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1315-1323. DOI:10.1016/j.idairyj.2006.06.014
- Giansanti, F., Panella, G., Leboffe, L. i Antonini, G. (2016). Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals*, 9(4), 61. DOI:10.3390/ph9040061

- Gibbons, J. A., Kanwar, J. R. i Kanwar, R. K. (2015). Iron-free and Iron-saturated Bovine Lactoferrin Inhibit Survivin Expression and Differentially Modulate Apoptosis in Breast Cancer. *BMC Cancer*, 15, 1-16.
- Graveland-Bikker, J. F., Fritz, G., Glatter, O. i de Kruif, C. G. (2006). Growth and Structure of A-lactalbumin Nanotubes. *Journal of Applied Crystallography*, 39, 180-184.-
- Gupta, A., Jadhav, J. B., Gunaware, K. D. i Shinde, B. (2016). Whey Proteins and Its Impact on Human Health Nutrition: Review. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 3(8), 00083. DOI:10.15406/japlr.2016.03.00083
- Gupta, G., Prakash, D., Garg, A. P. i Gupta, S. (2012). Whey Proteins: A Novel Source of Bioceuticals. Middle-East. *Journal of Scientific Research*, 12, 365-375.
- Hattori, M., Watabe, A. i Takahashi, K. (1995). Beta-lactoglobulin Protects Beta-ionone Related Compounds from Degradation by Heating, Oxidation, and Irradiation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(12), 2295-2297.
- Hiraoka, Y., Segawa, T., Kuwajima, K., Sugai, S. i Murai, N. (1980). Alpha-lactalbumin: A Calcium Metalloprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 95(3), 1098-1104.
- Hochwallner, H., Schulmeister, U., Swoboda, I., Spitzauer, S. i Valenta, R. (2014). Cow's Milk Allergy: From Allergens to New Forms of Diagnosis, Therapy and Prevention. *Methods*, 66(1), 22-33. DOI:10.1016/j.ymeth.2013.08.005
- Hsieh, M. J., Yang, S. J., Hsieh, Y. S., Chen, T. Y. i Chiou, H. L. (2012). Autophagy Inhibition Enhances Apoptosis Induced by Dioscin in Huh7 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11. DOI:10.1155/2012/134512
- Hu, Y., Meng, X., Zhang, F., Xiang, Y. i Wang, J. (2021). The in Vitro Antiviral Activity of Lactoferrin Against Common Human Coronaviruses and SARS-CoV-2 is Mediated by Targeting the Heparan Sulfate Co-receptor. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 317-330. DOI:10.1080/22221751.2021.1888660
- Icer, M. A. i Gezmen-Karadag, M. (2018). The Multiple Functions and Mechanisms of Osteopontin. *Clinical Biochemistry*, 59, 17-24. DOI:10.1016/j.clinbiochem.2018.07.003
- Ipsen, R. i Otte, J. (2007). Self-assembly of Partially Hydrolysed  $\alpha$ -lactalbumin. *Biotechnology Advances*, 25, 602-605.
- Jiang, R., Liu, L., Du, X. i Lönnnerdal, B. (2020). Evaluation of Bioactivities of the Bovine Milk Lactoferrin–Osteopontin Complex in Infant Formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(22), 6104-6111. DOI:10.1021/acs.jafc.9b07988
- Kamau, S. M., Cheison, S. C., Chen, W., Liu, X. M. i Lu, R. R. (2010). Alpha-lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(2), 197-212.
- Kanakis, C. D., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G. i Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Milk Beta-lactoglobulin Complexes with Tea Polyphenols. *Food Chemistry*, 127(3), 1046-1055.
- Karav, S. (2018). Selective Deglycosylation of Lactoferrin to Understand Glycans' Contribution to Antimicrobial Activity of Lactoferrin. *Cellular and Molecular Biology*, 64(9), 52-57.
- Karav, S., German, J. B., Rouquié, C., Le Parc, A. i Barile, D. (2017). Studying Lactoferrin N-Glycosylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 870. DOI:10.3390/ijms18040870
- Kassem, J. M. (2015). Future Challenges of Whey Proteins. *International Journal of Dairy Science*, 10, 139-159.
- Kawasaki, Y., Isoda, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T. i Ahiko, K. (1992). Inhibition by Lactoferrin and Kappa-Casein Glycomacropeptide of Binding of Cholera Toxin to its Receptor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 195-198.
- Kawashima, M., Kawakita, T., Inaba, T., Okada, N., Ito, M., Shimmura, S., Watanabe, M., Shinmura, K. i Tsubota, K. 2012. Dietary Lactoferrin Alleviates Age-Related Lacrimal Gland Dysfunction in Mice. *PLoS ONE*, 7(3), e33148.
- Khan, S. H. (2013). Whey Protein Hydrolysates: Techno-functional Perspective. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 4, 1-3.
- Khan, U. M. i Selamoglu, Z. (2019). Nutritional and Medical Perspectives of Whey Protein: A Historical Overview. *Journal of Pharmaceutical Care*, 7(4), 112-117.
- Kondrashina, A., Brodtkorb, A. i Giblin, L. (2020). Dairy-derived Peptides for Satiety. *Journal of Functional Foods*, 66, 103801.
- Kontopidis, G., Holt, C. i Sawyer, L. (2004). Beta-lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 785-796.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived Bioactive Peptides: From Science to Applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 177-187.
- Krissansen, G. W. (2007). Emerging Health Properties of Whey Proteins and their Clinical Implications. *Journal of the American College of Nutrition*, 26, 713-723.
- Król, J., Brodziak, A. i Zaborowska, A. (2014). Białka serwatkowe jako naturalne surowce w przemyśle kosmetycznym. *Polish Journal of Cosmetology*, 17(2), 96-102.
- Kruzel, M. L., Actor, J. K., Boldogh, I. i Zimecki, M. (2007). Lactoferrin in Health and Disease. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 61, 261-267.
- Kruzel, M. L., Zimecki, M. i Actor, J. K. (2017). Lactoferrin in a Context of Inflammation-induced Pathology. *Frontiers in Immunology*, 8, 1438.
- Laclair, C. E., Ney, D. M., MacLeod, E. L. i Etzel, M. R. (2009). Purification of Glycomacropeptide for Nutritional Management of Phenylketonuria. *Journal of Food Science*, 74, 199-206.
- Layman, D. K., Lönnnerdal, B. i Fernstrom, J. D. (2018). Applications for  $\alpha$ -lactalbumin in Human Nutrition. *Nutrition Reviews*, 76(6), 444-460.
- Le Maux, S., Giblin, L., Croguennec, T., Bouhallab, S. i Brodtkorb, A. (2012).  $\beta$ -Lactoglobulin as a Molecular Carrier of Linoleate: Characterization and Effects on Intestinal Epithelial Cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(37), 9476-9483.
- Legrand, D. i Mazurier, J. (2010). A Critical Review of the Roles of Host Lactoferrin in Immunity. *Biometals*, 23, 365-376.

- Li, C. P., Enomoto, H., Ohki, S., Ohtomo, H. i Aoki, T. (2005). Improvement of Functional Properties of Whey Protein Isolate through Glycation and Phosphorylation by Dry Heating. *Journal of Dairy Science*, 88(12), 4137-4145.
- Li, E. W. i Mine, Y. (2004). Immuno Enhancing Effects of Bovine Glicomacropptide and its Derivatives on the Proliferative Response and Fagocytic Activities of Human Macrophage Like Cells U937. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2704-2708.
- Li, M., Ma, Y. i Ngadi, M. O. (2013). Binding of Curcumin to  $\beta$ -lactoglobulin and its Effect on Antioxidant Characteristics of Curcumin. *Food Chemistry*, 141(2), 1504-1511.
- Li-Chan, E. C. (2015). Bioactive Peptides and Protein Hydrolysates: Research Trends and Challenges for Application as Nutraceuticals and Functional Food Ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1, 28-37.
- Lišková, K., Kelly, A. L., O'Brien, N. i Brodkorb, A. (2010). Effect of Denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin on the Formation of BAMLET (Bovine Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(7), 4421-4427.
- Liu, H. C., Chen, W. L. i Mao, S. J. T. (2007). Antioxidant Nature of Bovine Milk  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 547-555.
- Liu, L., Jianga, R., Liu, J. i Lönnnerdal, B. (2020). The Bovine Lactoferrin-Osteopontin Complex Increases Proliferation of Human Intestinal Epithelial Cells by Activating the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Food Chemistry*, 310, 125919.
- Livney, Y. D. (2010). Milk Proteins as Vehicles for Bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), 73-83.
- Lodhi, A. M., Aslam, P., Sajid, K. i Zulfiqar, K. (2019). Lactoferrin as Nutraceutical Protein from Milk. *Journal of Nutraceuticals and Food Science*, 4(1), 5.
- Lönnnerdal, B. i Lien, E. (2003). Nutritional and Physiologic Significance of Alpha-lactalbumin in Infants. *Nutrition Reviews*, 61, 295-305. DOI:10.1031/nr.2003.sept.295-305
- Madadlou, A. i Abbaspourrad, A. (2018). Bioactive Whey Peptide Particles: An Emerging Class of Nutraceutical Carriers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 1468-1477.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2007). Bovine Whey Proteins – Overview on Their Main Biological Properties. *Food Research International*, 40(10), 1197-1211.
- Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E. i Malcata, F. X. (2010). Invited Review: Physiological Properties of Bioactive Peptides Obtained from Whey Proteins. *Journal of Dairy Science*, 93, 437-455.
- Manso, M. A. i Lopez-Fandino, R. (2004).  $\kappa$ -Casein Macropptides from Cheese Whey: Physicochemical, Biological, Nutritional, and Technological Features for Possible Uses. *Food Research International*, 20(4), 329-355.
- Markus, C. R., Olivier, B. i De Haan, E. H. F. (2002). Whey Protein Rich in Alpha-lactalbumin Increases the Ratio of Plasma Tryptophan to the Sum of the other Large Neutral Amino Acids and Improves Cognitive Performance in Stress Vulnerable Subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75, 1051-1056.
- Matsumoto, H., Shimokawa, Y., Ushida, Y., Toida, T. i Hayasawa, H. (2001). New Biological Function of Bovine Alpha-lactalbumin: Protective Effect Against Ethanol- and Stress-induced Gastric Mucosal Injury in Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65, 1104-1111.
- McGuffey, M., Epting, K., Kelly, R. i Foegeding, E. (2005). Denaturation and Aggregation of Three  $\alpha$ -Lactalbumin Preparations at Neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3182-3190. DOI:10.1021/jf048863p
- McSweeney, P. L. H. i Fox, P. F. (2013). *Advanced Dairy Chemistry*. Springer Science + Business Media New York
- Medrano, A., Abirached, C., Panizzolo, L., Moyna, P. i Añón, M. C. (2009). The Effect of Glycation on Foam and Structural Properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 113, 127-133.
- Mehra, R., Marnila, P. i Korhonen, H. (2006). Milk Immunoglobulins for Health Promotion. *International Dairy Journal*, 16, 1262-1271.
- Minj, S. i Anand, S. (2020). Whey Proteins and its Derivatives: Bioactivity, Functionality Andcurrent Application. *Dairy*, 1, 233-258.
- Naclerio, F. i Seijo, M. (2019). Whey Protein Supplementation and Muscle Mass: Current Perspectives. *Nutrition and Dietary Supplements*, 11, 37-48. <https://doi.org/10.2147/NDS.S166195>
- Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K. i Kanamaru, Y. (2001). Identification of Novel Hypocholesterolemic Peptides Derived from Bovine Milk  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218, 11-17.
- Najmafshar, A., Rostami, M., Varshosaz, J., Norouziyan, D. i Samsam Shariat, S. Z. A. (2020). Enhanced Antitumor Activity of Bovine Lactoferrin through Immobilization onto Functionalized Nano Graphene Oxide: An in Vitro/in Vivo Study. *Drug Delivery*, 27(1), 1236-1247.
- Nakano, M., Suzuki, M., Wakabayashi, H., Hayama, K., Yamauchi, K., Abe, F. i Abe, S. (2019). Synergistic Anti-Candida Activities of Lactoferrin and the Lactoperoxidase System. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 13(1), 28-33. DOI:10.5582/ddt.2019.01010. PMID:30880319
- Neelima, Sharma, R., Rajput, Y. S. i Mann, B. (2013). Chemical and Functional Properties of Glycomacropptide (GMP) and Its Role in the Detection of Cheese Whey Adulteration in Milk: A Review. *Journal of Dairy Science and Technology*, 93, 21-43.
- Ney, D. M., Stroup, B. M., Clayton, M. K., Murali, S. G., Rice, G. M., Rohr, F. i Levy, H. L. (2016). Glycomacropptide for Nutritional Management of Phenylketonuria: A Randomized, Controlled, Crossover Trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 104, 334-345.
- Ng, T. B., Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Wang, Y., Ip, D. T. M., Wan, D. C. C. i Xia, J. (2015). Antiviral Activities of Whey Proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 6997-7008. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6818-4>



- Niaz, B., Saeed, F., Ahmed, A., Imran, M., Maan, A. A., Khan, M. K. I., Tufail, T., Anjum, M. F., Hussain, S. i Suleria, H. A. R. (2019). Lactoferrin (LF): A Natural Antimicrobial Protein. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1626-1641. DOI:10.1080/10942912.2019.1666137
- Nielsen, C. H., Hui, Y., Nguyen, D. N., Ahnfeldt, A. M., Burrin, D. G., Hartmann, B., Heckmann, A. B., Sangild, P. T., Thymann, T. i Bering, S. B. (2020). Alpha-Lactalbumin Enriched Whey Protein Concentrate to Improve Gut, Immunity and Brain Development in Preterm Pigs. *Nutrients*, 12(245). <https://doi.org/10.3390/nu12010245>
- O'Riordan, N., Kane, M., Joshi, L. i Hickey, R. M. (2014). Structural and Functional Characteristics of Bovine Milk Protein Glycosylation. *Glycobiology*, 24, 220-236.
- O'Riordan, N., O'Callagan, J., Buttò, L. F., Kilcoyne, M., Joshi, L., i Hickey, R. M. (2018). Bovine Glycomacropeptide Promotes the Growth of *Bifidobacterium longum* ssp. *infntis* and a Modulates its Gene Expression. *Journal of Dairy Science*, 101, 1-12. DOI:10.3168/jds.2018-14499
- Orosco, M., Rouch, C., Beslot, F., Feurte, S., Regnault, A. i Dauge V. (2004). Alpha-lactalbumin-enriched Diets Enhance Serotonin Release and Induce Anxiolytic and Rewarding Effects in the Rat. *Behavioural Brain Research*, 148, 1-10.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., Skurnik, M. i Conway, P. L. (1997). Inhibition of Pathogen Adhesion by  $\beta$ -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 7, 685-692.
- Pan, Y., Wan, J., Roginski, H., Lee, A., Shiell, B., Michalski, W. i Coventry, M. (2007). Comparison of the Effects of Acylation and Amidation on the Antimicrobial and Antiviral Properties of Lactoferrin. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 229-234.
- Papademas, P. i Kotsaki, P. (2020). Technological Utilization of Whey Towards Sustainable Exploitation. *Journal of Advances in Dairy Research*, 7(4), 231. DOI:10.35248/2329-888X.19.7.231
- Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E. i Kraulis, P. J. (1986). The Structure of Beta-lactoglobulin and its Similarity to Plasma Retinol-Binding Protein. *Nature*, 324(6095), 383-385.
- Patel, S. (2015a). Emerging Trends in Nutraceutical Applications of Whey Protein and its Derivatives. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 6847-6858.
- Patel, S. (2015b). Functional Foods Relevance of Whey Protein: A Review of Recent Findings and Scopes Ahead. *Journal of Funcional Foods*, 19, 308-319.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P. i von Fellenberg, R. (1999). Isolation and Identification of Three Bactericidal Domains in the Bovine Alphas-lactalbumin Molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426, 439-448.
- Pepe, G., Tenore, G. C., Mastrocinque, R., Stusio, P. i Campiglia, P. (2013). Potential Anticarcinogenic Peptides from Bovine Milk. *Journal of Amino Acids*, 2013. DOI:10.1155/2013/939804
- Pérez, M. D. i Calvo, M. (1995). Interaction of Beta-lactoglobulin with Retinol and Fatty Acids and its Role as a Possible Biological Function for this Protein: A Review. *Journal of Dairy Science*, 78(5), 978-988.
- Perez, M. D., Sanchez, L., Aranda, P., Ena, J., Oria, R. i Calvo, M. (1992). Effect of  $\beta$ -lactoglobulin on the Activity of Pregastric Lipase. A Possible Role for this Protein in Ruminant Milk. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism*, 1123, 151-155.
- Permyakov, E. A. i Berliner, L. J. (2000).  $\alpha$ -lactalbumin: Structure and Function. *FEBS Letters*, 473, 269-274.
- Petrotos, K., Tsakali, E., Goulas, P. i D'Alessandro, A. G. (2014). Casein and Whey Proteins in Human Health. *Milk and Dairy Products as Functional Foods*, 94, 1-10.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2000). Bioactive Peptides Derived from Bovine Whey Proteins: Opioid and Ace-inhibitory Peptides. *Trends Food Sci Technol*, 11, 347-356.
- Pihlanto, A. (2011). Whey Proteins and Peptides. Emerging Properties to Promote Health. *Nutrafoods*, 10, 29-42.
- Poppit, S. D., Strik, C. M., McArdle, B. H., McGill, A. i Hall, R. S. (2013). Evidence of Enhanced Serum Amino Acid Profile but not Appetite Suppression by Dietary Glycomacropeptide (GMP): A Comparison of Dairy Whey Proteins. *Journal of the American College of Nutrition*, 32, 177-186.
- Quintieri, L., Monaci, L., Baruzzi, F., Giuffrida, M. G., de Candia, S. i do Caputo, L. (2017). Reduction of Whey Protein Concentrate Antigenicity by Using a Combined Enzymatic Digestion and Ultrafiltration Approach. *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 1910-1916.
- Rahaman, T., Vasiljevic, T. i Ramchandran, L. (2015). Conformational Changes of  $\beta$ -lactoglobulin Induced by Shear, Heat, and pH-Effects on Antigenicity. *Journal of Dairy Science*, 98, 4255-4265.
- Rascón-Cruz, Q., Espinoza-Sánchez, E. A., Siqueiros-Cendón, T. S., Nakamura-Bencomo, S. I., Arévalo-Gallegos, S. i Iglesias-Figueroa, B. F. (2021). Lactoferrin: A Glycoprotein Involved in Immunomodulation, Anticancer, and Antimicrobial Processes. *Molecules*, 26(205).
- Rath, E. M., Duff, A. P., Håkansson, A. P., Vacher, C. S., Liu, G. J., Knott, R. B. i Church, W. B. (2015). Structure and Potential Cellular Targets of HAMLET-like Anti-cancer Compounds Made From Milk Components. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 18(4), 773-824.
- Reid, H. E., Fazzalari, N., Baker, H. M., Baker, E. N., Haggarty, N. W., Grey, A. B. i Reid, I. R. (2004). Lactoferrin is a Potent Regulator of Bone Cell Activity and Increases Bone Formation in Vivo. *Endocrinology*, 145, 4366-4374.
- Requena, P., Daddaoua, A., Guadix, E., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., De Medina, F. S. i Martínez-Augustin, O. (2009). Bovine Glycomacropeptide Induces Cytokine Production in Human Monocytes through the Stimulation of the MAPK and the NF- $\kappa$ B Signal Transduction Pathways. *British Journal of Pharmacology*, 157, 1232-1240.

- Requena, P., Gonzalez, R., Lopez-Posadas, R., Abadia-Molina, A., Suarez, M. D., Zarzuelo, A., Medina, F. S. i Martinez-Augustin, O. (2010). The Intestinal Antiinflammatory Agent Glycomacropeptide Has Immunomodulatory Actions on rat Splenocytes. *Biochemical Pharmacology*, 79, 1797-1804.
- Rhoades, J. R., Gibson, G. R., Formentin, K., Beer, M., Greenberg, N. i Rastall, R. A. (2005). Caseinoglycomacropeptide Inhibits Adhesion of Pathogenic Escherichia coli Strains to Human Cells in Culture. *Journal of Dairy Science*, 88, 3455-3459.
- Rigo, J., Boehm, G., Georgi, G., Jelinek, J., Nyambugabo, K., Sawatzki, G. i Studzinski, F. (2001). An Infant Formula Free of Glycomacropeptide Prevents Hyperthreoninemia in Formula-fed Preterm Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32(2), 127-130.
- Ruddick, J. P., Evans, A. K., Nutt, D. J., Lightman, S. L., Rook, G. A. W. i Lowry, C. A. (2006). Tryptophan Metabolism in the Central Nervous System: Medical Implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 8, 1-27.
- Salaris, C., Scarpa, M., Elli, M., Bertolini, A., Guglielmetti, S., Pregliasco, F., Blandizzi, C., Brun, P. i Castagliuolo, I. (2021). Protective Effects of Lactoferrin Against SARS-CoV-2 Infection in Vitro. *Nutrients*, 13(2), 328. DOI:10.3390/nu13020328
- Sanchez-Moya, T., Planes-Munoz, D., Frontela-Saseta, C., Ros-Berruzo, G. i Lopez-Nicolas, R. (2020). Milk Whey from Different Animal Species Stimulates the *in vitro* Release of CCK and GLP-1 through a Whole Simulated Intestinal Digestion. *Food & Function*, 11(8), 7208-7216.
- Sauve, M. F., Spahis, S., E. i Levy, E. (2021). Glycomacropeptide: A Bioactive Milk Derivative to Alleviate Metabolic Syndrome Outcomes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 34, 201-222.
- Sava, M., van der Plancken, I., Claeys, W. i Hendrickx, M. (2005). The Kinetics of Heat-induced Structural Changes of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 88, 1646-1653.
- Sawin, E. A., De Wolfe, T. J., Aktas, B., Stroup, B. M., Murali, S. G., Steele, J. L. i Ney, D. M. (2015). Glycomacropeptide is a Prebiotic that Reduces Desulfovibrio Bacteria, Increases Cecal Short-chain Fatty Acids, and is Anti-inflammatory in Mice. *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(7), 590-601.
- Schack, L., Lange, A., Kelsen, J., Agnholt, J., Christensen, B., Petersen, T. E. i Sørensen, E. S. (2009). Considerable Variation in the Concentration of Osteopontin in Human Milk, Bovine Milk, and Infant Formulas. *Journal of Dairy Science*, 92, 5378-5385.
- Seifu, E., Buys, E. M. i Donkin, E. F. (2005). Significance of the Lactoperoxidase System in the Dairy Industry and its Potential Applications: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 137-154.
- Setarehnejad, A., Kanekanian, A., Tatham, A. i Abedi, A. (2010). The Protective Effect of Caseinomacropeptide against Dental Erosion Using Hydroxyapatite as a Model System. *International Dairy Journal*, 20, 652-656.
- Severin, S. i Wenshui, X. (2005). Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 645-656.
- Sharma, S., Singh, A. K., Kaushik, S., Sinha, M., Singh, R. P., Sharma, P., Sirohi, H., Kaur, P. i Singh, T. P. (2013). Lactoperoxidase: Structural Insights into the Function, Ligand Binding and Inhibition. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 4(3), 108-128.
- Simões, L. S., Martins, J. T., Pinheiro, A. C., Vicente, A. A. i Ramos, O. L. (2020).  $\beta$ -Lactoglobulin Micro- and Nanostructures as Bioactive Compounds Vehicle: In vitro Studies. *Food Research International*, 131, 108979.
- Sinha, M., Kaushik, S., Kaumar, P., Sharma, S. i Singh, T. P. (2013). Antimicrobial Lactoferrin Peptides, the Hidden Players in the Protective Function of a Multifunctional Protein. *International Journal of Peptides*, 390230.
- Smithers, G. W. (2008). Whey and Whey Proteins – from ‘Gutter-to-Gold’. *International Dairy Journal*, 18, 695-704.
- Smithers, G. W. (2015). Whey-ing up the Options – Yesterday, Today and Tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2-14.
- Sokolowska, A., Bednarz, R., Pacewicz, M., Georgiades, J. A., Wilusz, T. i Polanowski, A. (2008). Colostrum from Different Mammalian Species – A Rich Source of Colostrin. *International Dairy Journal*, 18, 204-209.
- Soltani, M., Say, D. i Guzeler, N. (2017). Functional Properties and Nutritional Quality of Whey Proteins. *Journal of International Environmental Application and Science*, 12(4), 334-338.
- Sousa, G. T. D., Lira, F. S., Rosa, J. C., De Oliveira, E. P., Oyama, L. M., Santos, R. V. i Pimentel, G. D. (2012). Dietary Whey Protein Lessens Several Risk Factors for Metabolic Diseases: A Review. *Lipids in Health and Disease*, 11(67).
- Steijns, J. M. i Hooijdonk, A. C. M. (2000). Occurrence, Structure, Biochemical Properties and Technological Characteristics of Lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, 84(suppl.1), 11-17.
- Steijns, J. M. (2001). Milk Ingredients as Nutraceuticals. *The International Journal of Dairy Technology*, 54(3), 81-88.
- Sun, S. J., Feng, Y. Y., Zhang, Y., Ji, H. Y., Yu, J. i Liu, A. J. (2018). Antitumor and Immunoregulatory Activities of Seleno- $\beta$ -lactoglobulin on s180 Tumor-bearing Mice. *Molecules*, 23(1), 46. <https://doi.org/10.3390/molecules23010046>
- Superti, F., Siciliano, R., Rega, B., Giansanti, F., Valenti, P. i Antonini, G. (2001). Involvement of Bovine Lactoferrin Metal Saturation, Sialic Acid and Protein Fragments in the Inhibition of Rotavirus Infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1528(2-3), 107-115. DOI:10.1016/s0304-4165(01)00178-7
- Superti, F. (2020). Lactoferrin from Bovine Milk: A Protective Companion for Life. *Nutrients*, 12, 2562. DOI:10.3390/nu12092562
- Szpendowski, J. i Siemianowski, K. (2013). Właściwości odżywcze i funkcjonalne oraz zastosowanie kazeinianów w przetwórstwie spożywczym. *Engineering Sciences & Technologies/Nauki Inżynierskie i Technologie*.
- Teixeira, F. J., Santos, H. O., Howell, S. L. i Pimentel, G. D. (2019). Whey Protein in Cancer Therapy: A Narrative Review. *Pharmacological Research*, 144, 245-256. DOI:10.1016/j.phrs.2019.04.019
- Teng, Z., Luo, Y., Li, Y. i Wang, Q. (2016). Cationic Beta-lactoglobulin Nanoparticles as a Bioavailability Enhancer: Effect of Surface Properties and Size on the Transport and Delivery in vitro. *Food Chemistry*, 204, 391-399.

- Thomä-Worringer, C., Sørensen, J. i López-Fandiño, R. (2006). Health Effects and Technological Features of Caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 16, 1324-1333.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Valle, N. R. D. i Huang, P. (2008). Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10, 1343-1374.
- Tseng, Y. M., Lin, S. K., Hsiao, J. K., Chen, I. J., Lee, J. H., Wu, S. H. i Tsai, L. Y. (2006). Whey Protein Concentrate Promotes the Production of Glutathione (GSH) by GSH Reductase in the PC12 Cell Line after Acute Ethanol Exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 44(4), 574-578. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.09.00>
- Tsutsumi, R. i Tsutsumi, Y. M. (2014). Peptides and Proteins in Whey and their Benefits for Human Health. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, 1(1), 1002.
- Tulipano, G. (2020). Role of Bioactive Peptide Sequences in the Potential Impact of Dairy Protein Intake on Metabolic Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8881.
- Varlamova, E. G. i Zaripov, O. G. (2020). Beta-lactoglobulin Nutrition Allergen and Nanotransporter of Different Nature Ligands Therapy with Therapeutic Action. *Research in Veterinary Science*, 133, 17-25.
- Vasilyev, V. B., Sokolov, A. V., Kostevich, V. A., Elizarova, A. Y., Gorbunov, N. P. i Panasenko, O. M. (2021). Binding of Lactoferrin to the Surface of Low-Density Lipoproteins Modified by Myeloperoxidase Prevents Intracellular Cholesterol Accumulation by human Blood Monocytes. *Biochemistry and Cell Biology*, 99(1), 109-116.
- Villa, C., Costa, J., Oliveira, M. B. P. i Mafra, I. (2018). Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 137-164. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12318>
- Wang, B. (2009). Sialic Acid is an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition. *Annual Review of Nutrition*, 29, 177-222.
- Wang, B., Timilsena, Y. P., Blanch, E. i Adhikari, B. (2019). Lactoferrin: Structure, Function, Denaturation and Digestion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 580-596.
- Wang, Q., Allen, J. C. i Swaisgood, H. E. (1997). Binding of Vitamin D and Cholesterol to  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 80, 1054-1059.
- Wefers, D., Bindereif, B., Karbstein, H. P. i Van Der Schaaf, U. S. (2018). Whey Protein-Pectin Conjugates: Linking the Improved Emulsifying Properties to Molecular and Physico-Chemical Characteristics. *Food Hydrocolloids*, 85, 257-266.
- Wereńska, M. i Okruszek, A. (2011). Wartość odżywcza różnego rodzaju jaj. *Engineering Sciences & Technologies/Nauki Inżynierskie i Technologie*.
- Wilde, S. C., Treitz, C., Keppler, J. K., Koudelka, T., Palani, K., Tholey, A., Rawel, H. M. i Schwarz, K. (2016).  $\beta$ -Lactoglobulin as Nanotransporter – Part II: Characterization of the Covalent Protein Modification by Allicin and Diallyl Disulphide. *Food Chemistry*, 197, 1022-1029.
- Wu, X., Lu, Y., Xu, H., Lin, D., He, Z., Wu, H., Liu, L. i Wang, Z. (2018). Reducing the Allergenic Capacity of  $\beta$ -lactoglobulin by Covalent Conjugation with Dietary Polyphenols. *Food Chemistry*, 256, 427-434.
- Xu, R. (2009). Effect of Whey Protein on the Proliferation and Differentiation of Osteoblasts. *Journal of Dairy Science*, 92, 3014-3018. DOI:10.3168/jds.2008-1702
- Xu, Y. (1996). *Isolation and Characterization of Components from Whey*. University of Western Sydney, Hawkesbury (Australia). ProQuest Dissertations Publishing, 10309947.
- Xu, Q., Shi, J., Yao, M., Jiang, M. i Luo, Y. (2016). Effects of Heat Treatment on the Antigenicity of Four Milk Proteins in Milk Protein Concentrates. *Food and Agricultural Immunology*, 27, 401-413.
- Yang, J., Wang, H. P., Tong, X., Li, Z. N., Xu, J. Y., Zhou, L., Zhou, B. Y. i Qin, L. Q. (2019). Effect of Whey Protein on Blood Pressure in Pre- and Mildly Hypertensive Adults: A Randomized Controlled Study. *Food Science & Nutrition*, 7(5), 1857-1864. DOI:10.1002/fsn3.1040
- Yoshida, S., Xiuyun, Y. i Nishium, T. (1991). The Binding Ability of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin to Mutagenic Heterocyclic Amines. *Journal of Dairy Science*, 74, 3741-3745.
- Zabłocka, A., Sokołowska, A., Macała, J., Bartoszewska, M., Mitkiewicz, M., Janusz, M., Wilusz, T. i Polanowski, A. (2020). Colostral Proline-Rich Polypeptide Complexes. Comparative Study of the Antioxidant Properties, Cytokine-Inducing Activity, and Nitric Oxide Release Of Preparations Produced by a Laboratory and a Large-Scale Method. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 685-694. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09876-6>
- Zagorska, J. i Ciprovica, I. (2012). The Influence of Heat Treatment on Antimicrobial Proteins in Milk. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 64, 832-836.
- Zimecki, M. i Artym, J. (2005). Therapeutic Properties of Proteins and Peptides from Colostrum and Milk. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 59, 309-323.
- Zimecki, M., Artym, J., Chodaczek, G., Kocięba, M., Rybka, J., Skórska, A. i Kruze, L. M. (2006). Glycomacropeptide Protects against Experimental Endotoxemia and Bacteremia in Mice. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 9(2), 12.
- Zimecki, M. i Kruzel, M. L. (2007). Milk-derived Proteins and Peptides of Potential Therapeutic and Nutritive Value. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 6, 89-106.
- Zimet, P. i Livney, Y. D. (2009). Beta-lactoglobulin and Its Nanocomplexes with Pectin as Vehicles for  $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Food Hydrocolloids*, 23, 1120-1126.

## Importance and Application of Whey Protein Components

---

**Abstract:** In whey remaining as a by-product after milk casein coagulation during cheese production, there are a number of various proteins that are distinguished not only by their high nutritional value, but also exhibit attractive functional and biological properties. This article presents the properties and application of most important whey proteins, including:  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, immunoglobulins, serum albumin, lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme, osteopontin and glycomacropeptide, and products of their modification.

**Keywords:** whey proteins, bioactive proteins, health benefits, application

---