

ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDES IN PROTEOLYSIS PRODUCTS OF MILK WHEY PROTEINS CONCENTRATE

V. Yukalo, K. Datsyshyn, L. Storozh

Ternopil Ivan Puluj National Technical University

Key words:

Hypertension
Angiotensin converting
Enzyme
Inhibitory peptides

Article history:

Received 16.11.2021
Received in revised form
30.11.2021
Accepted 13.12.2021

Corresponding author:

K. Datsyshyn
E-mail:
katkostyuk3103@
gmail.com

ABSTRACT

Hypertension is the most common cardiovascular disease. This is a universal problem of the scale of the epidemic, which affects 10—20% of the planet adult population and 40—50% of people aged 50 and older. Traditionally, hypertension control is focused on the renin-angiotensin system through inhibition of the angiotensin converting enzyme. Inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme, which plays a major role in the regulation of blood pressure, are among the biologically active peptides isolated from whey proteins. Peptides which inhibit angiotensin converting enzyme can be obtained from proteins-predecessori by enzymatic cleavage.

Therefore, the aim of the research was to establish the presence of angiotensin converting enzyme inhibitory peptide inhibitors among the products of proteolysis by various enzyme preparations of whey proteins and to compare their inhibitory effect on angiotensin converting enzyme. Whey proteins concentrate was used as a substrate in the research. Proteolysis was performed using pancreatin, papain and neutral protease at physiological values of pH and temperature during 120 minutes. Using gel filtration on Sephadex G-25, the obtained hydrolysates were divided by molecular weights into three fractions, which were analyzed for inhibitory activity against angiotensin converting enzyme. It was found that macromolecular proteolysis products with the molecular weight of more than 5000 Da have practically no inhibitory effect on angiotensin converting enzyme. The highest inhibitory activity was found in fraction III, which contained peptides with the molecular weight less than 1000 Da. The highest inhibitory effect was shown by generalized fraction III, obtained by the action of pancreatin on whey protein concentrate in physiological conditions.

АНТИГІПЕРТЕНЗИВНІ ПЕПТИДИ У ПРОДУКТАХ ПРОТЕОЛІЗУ КОНЦЕНТРАТУ СИРОВАТКОВИХ БІЛКІВ МОЛОКА

В. Г. Юкало, К. Є. Дацишин, Л. А. Сторож

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

Гіпертонія є найпоширенішим серцево-судинним захворюванням. Це універсальна проблема масштабів епідемії, яка зачіпає 10—20% дорослого населення планети та 40—50% людей у віці 50 років і старших. Традиційно контроль гіпертонії зосереджується на системі ренін-ангіотензин через пригнічення ангіотензинперетворювального ензиму. Серед біологічно активних пептидів, виділених із білків молочної сироватки, є інгібітори ангіотензин-І-перетворювального ензиму, який відіграє основну роль у регуляції артеріального тиску. Пептиди, що інгібують ангіотензинперетворювальний ензим, можуть бути отримані з білків-попередників шляхом ферментативного розщеплення.

У статті встановлено наявність серед продуктів протеолізу сироваткових білків різними ферментними препаратами інгібіторних пептидів ангіотензинперетворювального ензиму та порівняно їхню активність. Як субстрат при проведенні досліджень було використано концентрат сироваткових білків. Протеоліз проводили з використанням панкреатину, папаїну та нейтральної протеази при фізіологічних значеннях рН та температури протягом 120 хв. Отримані гідролізати з використанням гель-фільтрації на сефадексі G-25 було розділено за молекулярними масами на три фракції, які досліджували на інгібіторну дію щодо ангіотензинперетворювального ензиму. Встановлено, що практично не проявляють інгібіторну дію на ангіотензинперетворювальний ензим високомолекулярні продукти протеолізу з молекулярною масою більше 5000 Да. Найвища інгібіторна активність була виявлена у фракції, що містила пептиди з молекулярною масою менше 1000 Да. Найвищу інгібіторну дію показала узагальнена фракція, отримана у фізіологічних умовах за дії панкреатину на концентрат сироваткових білків.

Ключові слова: *гіпертонія, ангіотензинперетворювальний ензим, інгібіторні пептиди.*

Постановка проблеми. Ангіотензинперетворювальний ензим (АПЕ) класично пов'язують з системою ренін-ангіотензин, яка регулює периферійний кров'яний тиск. Деякі пептиди, які утворюються з основних білків сироватки молока, мають здатність гальмувати АПЕ й отримали назву лактокініни. Найпотужніший лактокінін β -LG f(142-148), виділений на сьогодні, здатний гальмувати АПЕ на 50% при концентрації 42,6 ммоль/л. Лактокініни загалом не володіють такою інгібіторною дією, як синтетичні лікарські засоби, які, зазвичай, використовуються для лікування гіпертонії. Однак ці природні пептиди є функціональними харчовими інгредієнтами для профілактики та лікування високого кров'яного тиску. Протеолітичні дослідження з використанням ензимів різного походження

свідчать про те, що саме ферментна специфічність, а не ступінь гідролізу, визначає інгібіторну дію гідролізаторів білків сироватки на АПЕ. Для отримання гідролізаторів білків сироватки молока використовують ферментні препарати тваринного, мікробного та рослинного походження. У зв'язку з цим потрібно з'ясувати, чи можуть при цьому утворюватися природні антигіпертензивні пептиди, які, як відомо, звільняються при дії протеаз шлунково-кишкового тракту.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Артеріальна гіпертензія є серйозною проблемою здоров'я і одним із найважливіших факторів ризику виникнення різних серцево-судинних захворювань. Гіпертонія є причиною приблизно 40% смертей від інсульту і 25% смертей від ішемічної хвороби серця в усьому світі. Ангіотензинперетворювальний ензим відіграє важливу роль у регулюванні артеріального тиску, каталізує перетворення ангіотензину I в судинозвужувальний ангіотензин II та інактивує брадикінін, важливий вазодилататор (Costa, Gontijo & Netto, 2007; Mills, Stefanescu & He, 2020).

Сироваткові білки становлять приблизно 20% від загального вмісту білка коров'ячого молока та представлені такими основними фракціями, як α -лактальбумін (α -LA), β -лактоглобулін (β -LG) та альбумін сироватки (BSA). Значний інтерес спрямований на сироваткові протеїни, як джерело біоактивних пептидів (Sgarbieri, 2004; Abadía-García, Castaño-Gostado, Cardador-Martínez, Martín-del-Campo & Amaya-Llano, 2021). Ці біоактивні пептиди володіють багатьма корисними для організму властивостями, такими як антихолестеролемічна, антиканцерогенна, протимікробна, антиоксидантна, імуностимулювальна та опіоїдна дія (Hartmann & Meisel, 2007; Mann, Athira, Sharma, Kumar & Sarkar, 2019). Проте найчастіше серед них зустрічаються лактокініни, здатні гальмувати активність АПЕ та, відповідно, проявляти антигіпертензивну дію (Wu, Liao & Udenigwe, 2017).

Встановлено, що поряд із проявом інгібіторної дії лактокінінів *in vitro* зниження артеріального тиску може не відбуватися *in vivo*, оскільки пептид повинен абсорбуватися в кров'яне русло неушкодженим (Costa, Gontijo & Netto, 2007). Цей висновок може вказувати на те, що гідролізати з високим вмістом ди- і трипептидів можуть бути більш біологічно активними, оскільки, як підтверджено (Frenhani & Burini, 1999), харчовий білок всмоктується у вигляді цих невеликих пептидів, а також вільних амінокислот. Пептиди, що гальмують АПЕ та мають антигіпертензивні властивості, вивільняються шляхом ферментативної обробки коров'ячого β -LG та концентрату сироваткових білків (КСБ) (Wang, Mao, Cheng, Xiong & Ren, 2010). Зокрема, показано, що негідролізований β -LG має дуже низьку інгібіторну активність щодо АПЕ (Mulally, Meisel & FitzGerald, 1997), але гідроліз (з використанням пепсину, трипсину, хімотрипсину та/або інших протеаз) призводить до високого рівня пригнічення АПЕ (73—90%). Припускають, що гальмування АПЕ гідролізатами в основному спричинене низькомолекулярними пептидами, оскільки фракції пермеату, отримані після фільтрації через мембрани з розміром пор 1 кДа, дають відносно високу АПЕ-інгібіторну активність (Pihlanto-Leppälä, Koskinen, Piilola, Tupasela & Korhonen, 2000; Park, 2009; Mann et al., 2019). Декілька антигіпертензивних пептидів були виділені та охарактеризовані з α -LA і β -LG після гідролізу травними ферментами (Pihlanto-Leppälä, Koskinen,

Piilola, Tupasela, & Korhonen, 2000; Sipola, Finckenberg, Korpela, Vapaatalo, & Nurminen, 2002; Chobert et al., 2005). Іншими вченими встановлено, що гідролізати КСБ, отримані з використанням панкреатину, мали інгібіторну активність у межах від 89 до 91%, а в гідролізатів КСБ, отриманих із папаїном, значення коливалась від 17 до 70% (Mauro et al., 2014).

Вплив типу ферменту на АПЕ-інгібіторну активність білкових гідролізатів досліджували багато вчених. Наприклад, Mullally та співавтори (Mullally, Meisel & Fitzgerald, 1997) проводили дослідження з п'ятьма різними ферментами і показали, що найбільш ефективними були трипсин (88,6%) і хімотрипсин (87,7%), потім короназа PP (78,2%), яка є фактично панкреатином, PTN 3,0S (60,8%) і, нарешті, еластаза (35,5%) (PTN — комерційний ферментний препарат, збагачений трипсином).

Іншими дослідниками була проведена оцінка впливу алкалази, хімотрипсину і протеоміксу щодо інгібіторної активності АПЕ ферментних гідролізатів ізоляту сироваткового білка (Costa, Gontijo, & Netto, 2007). Вони встановили, що найкращий результат був отриманий за допомогою хімотрипсину завдяки вивільненню ароматичних амінокислот у С-кінцевому положенні. Проведені дослідження пояснюють, принаймні частково, високу ефективність панкреатину, оскільки дія хімотрипсину, одного з ферментів, що міститься в цьому ферментному комплексі, пов'язана з розривом пептидних зв'язків, утворених карбоксильними групами ароматичних амінокислот. Унаслідок цього вивільняються пептиди з АПЕ-інгібіторною активністю. На відміну від панкреатину, папаїн проявляє тільки ендопептидазну активність і діє при розщепленні субстратів, що містять амінокислотні залишки лізину, аргініну або валіну, утворюючи при цьому менш активні пептиди (Beunon, Bond, 2001; Mauro et al., 2014).

Той факт, що гідролізати сироваткового білка, отримані шляхом ферментативного гідролізу, мають нижчу інгібіторну активність щодо АПЕ, ніж, наприклад, синтетичний каптоприл, не перешкоджає застосуванню пептидів, отриманих із сироваткового білка, для лікування та профілактики гіпертонії. Насправді, очікується, що природні інгібіторні пептиди, на відміну від каптоприлу, не матимуть небажаних побічних ефектів (Mullally, Meisel, & Fitzgerald, 1997). Синтетичні інгібітори АПЕ, такі як каптоприл, еналаприл, лізиноприл і алацеприл є надзвичайно ефективними в регулюванні артеріального тиску і використовуються як клінічні антигіпертензивні препарати. Однак при їх застосуванні спостерігаються різноманітні побічні ефекти, зокрема, алергічні реакції, висипання на шкірі, кашель та порушення смаку (Mills, Stefanescu & He, 2020). Тому триває постійний пошук нетоксичних, безпечних та інноваційних інгібіторів АПЕ для лікування високого кров'яного тиску. З цієї причини використання біологічно активних природних антигіпертензивних пептидів, отриманих з білків сироватки молока, є перспективним шляхом вирішення цієї проблеми, а також уникнення небажаних ефектів синтетичних гіпотензивних препаратів.

Мета дослідження: виявлення антигіпертензивних пептидів у гідролізатах концентрату сироваткових білків, отриманих у фізіологічних умовах з використанням протеолітичних препаратів тваринного, рослинного і мікробіологічного походження та дослідження їх інгібіторної дії на АПЕ.

Матеріали і методи. Для проведення протеолізу використовували такі ензимні препарати: нейтральна протеаза і папаїн фірми «Barret industrial limited» (Велика Британія) і панкреатин виробництва ПрАТ «Технолог» (Україна). Як субстрат брали концентрат сироваткових білків, вироблений на ТОВ «Бучацький сирзавод» (Україна) згідно з проектом ТУ У 15.5-00419880-XXX:2011 «Концентрат сироваткових білків (КСБ-УФ). Технічні умови» (КСБ).

Для гель-фільтрації використовували сефадекс G-25 фірми «Pharmacia» (Швеція). Гель-фільтрацію проводили в колонках фірми «Reanal» (Угорщина). Спектрофотометрію продуктів протеолізу концентрату сироваткових білків проводили на спектрофотометрі СФ-46. Концентрацію протеїнів і продуктів протеолізу у хроматографічних фракціях визначали спектрофотометрично за поглинанням при довжині хвилі $\lambda=280$ нм.

Фракційний склад КСБ аналізували експрес-методом електрофорезу в анодній системі однорідного ПАГ (Yukalo, Datsyshyn & Storozh, 2019). Кількісну обробку електрофореграм проводили, використовуючи функцію зчитування графічних зображень *imread* (Юкало, Яворський, Сторож & Соловдзінська, 2007).

Математично-статистичну обробку результатів дослідження виконували з використанням пакетів програми Microsoft Office Excel 2007.

Результати і обговорення. Концентрат сироваткових білків є інгредієнтом, який широко використовується в багатьох харчових продуктах завдяки чудовим функціональним властивостям його білків. Тому для отримання гідролізатів сироваткових білків як субстрат був використаний КСБ. Його фізико-хімічні показники наведені у табл. 1.

Таблиця 1. Фізико-хімічні показники КСБ

Фізико-хімічні показники продукту	Значення показника
Масова частка вологи, %	7,85
Масова частка золи, %	4,80
Масова частка лактози, %	11,35
Масова частка жиру, %	4,0
Індекс розчинності, см ³ сухого осаду	0,3
Кислотність, °Т	16,8
Масова частка білка, %	72,0

Перед проведенням досліджень у концентраті сироваткових білків було охарактеризовано фракційний склад протеїнів. Результати денситометричного аналізу електрофореграми КСБ свідчать про типовий розподіл протеїнових фракцій сироватки молока. Типовий розподіл протеїнових фракцій сироватки молока: β -LG, α -LA, альбумін сироватки крові (BSA), імуноглобуліни (IG) та окремі високомолекулярні компоненти протеозо-пептонної фракції (PPF) добре видно на денситограмі. Для проведення гідролізу використовували 15% розчин КСБ. Гідроліз проводили при фізіологічних значеннях температури (37°C) та рН (7,9), які забезпечують утворення природних біологічно активних пептидів (БАП) за дії протеаз підшлункової залози (Madadlou & Abbaspourrad, 2016; Mann et al., 2019). Для проведення досліджень використовували співвідношення ензим:субстрат — 1:20. Такі співвідношення були обґрунтовані авторами, що проводили дослідження з отримання гідролізатів сироваткових білків (Головач & Курченко, 2012; Шаркова, Жукотський, Авдєєва & Декуша, 2013).

Як ферментні препарати для проведення досліджень було використано папаїн, панкреатин та нейтральну протеазу, оскільки саме такі ензими найчастіше застосовуються дослідниками при отриманні гідролізатів сироваткових білків, що мають інгібіторний ефект щодо АПЕ.

Під час проведення гідролізу КСБ періодично відбирали проби для спектрофотометричного визначення продуктів гідролізу, розчинних у трихлороцтовій кислоті (ТХО). Окрім того, відбирали зразки для хроматографічного та електрофоретичного аналізу. Результати дослідження утворення ТХО-розчинних продуктів протеолізу КСБ показані на рис. 1.

На діаграмах видно, що впродовж перших 60 хв гідроліз проходить досить інтенсивно та практично завершується до 120 хвилини. В гідролізатах 15% КСБ, отриманих за дії панкреатину, папаїну і нейтральної протеази визначали інгібіторну дію на ангіотензинперетворювальний ензим. Для цього гідролізати, отримані у фізіологічних умовах протягом 120 хв, фільтрували і розводили дистильованою водою (у 5 разів) і відфільтровували нерозчинні продукти протеолізу. Фільтрат наносили на колонку з сефадексом G-25 і проводили гель-фільтрацію. Результати гель-фільтрації показані на рис. 2, 3, 4. В результаті гель-фільтрації на G-25 кожен із гідролізатів, отриманих із використанням трьох різних ферментних препаратів, було розділено на три фракції. Продукти протеолізу фракції I мали молекулярну масу більше 5000 Да, фракції II — від 1000 Да до 5000 Да; фракція III містила низькомолекулярні пептиди з молекулярною масою менше 1000 Да. Над кожним графіком позначені об'єднані фракції, для яких визначали інгібіторну дію щодо АПЕ.

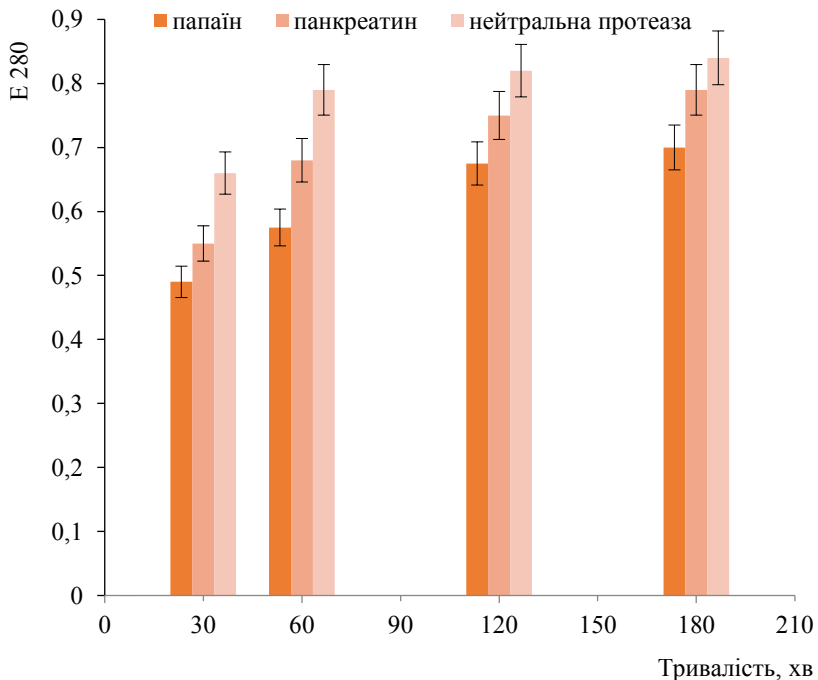


Рис. 1. Протеоліз концентрату сироваткових білків протеолітичними препаратами

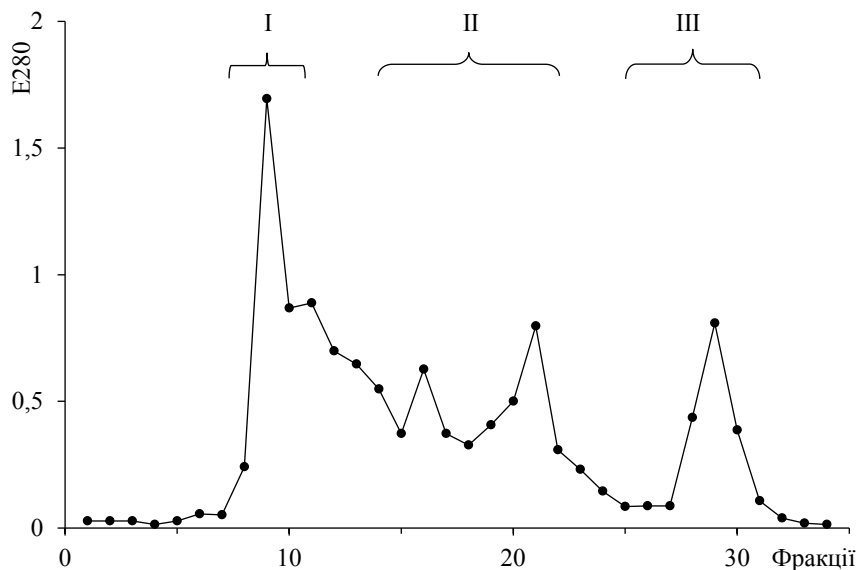


Рис. 2. Хроматограма гідролізату КСБ, отриманого за дії панкреатину

Відібрані хроматографічні фракції кожного гідролізату, як показано на рис. 2, 3 та 4, тестували на інгібіторну дію щодо АПЕ за методом (Cushman & Cheung, 1971). При цьому використовували синтетичний субстрат гіпурил-L-гістидин-L-лейцин та АПЕ з легень кролика. Гіпурову кислоту, яка утворювалась в результаті дії АПЕ на субстрат, екстрагували етилацетатом. Після випаровування етилацетату залишок розчиняли у воді і вимірювали оптичну густина при 228 нм на спектрофотометрі СФ-46.

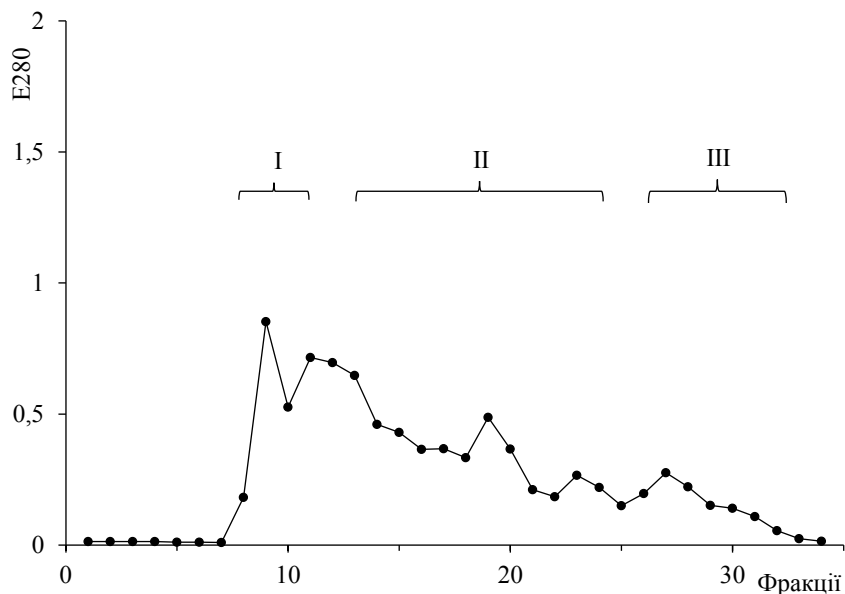


Рис. 3. Хроматограма гідролізату КСБ, отриманого за дії нейтральної протеази

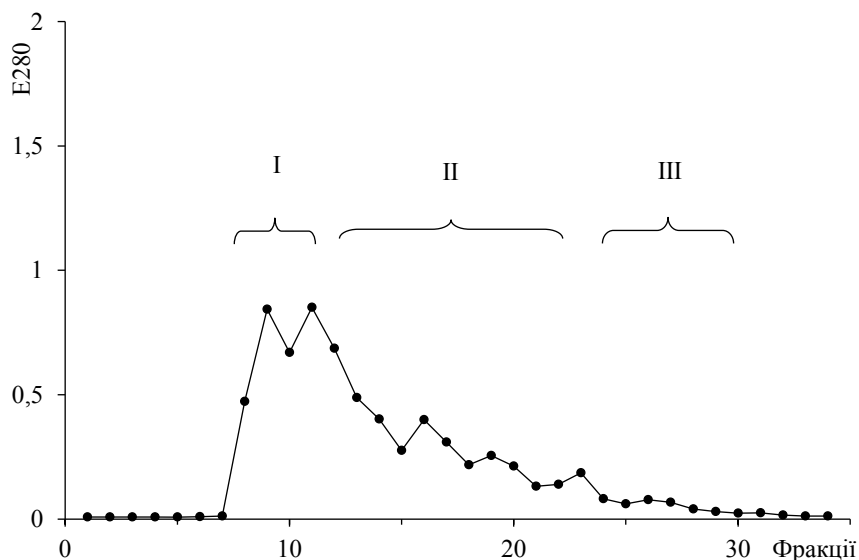


Рис. 4. Хроматограма гідролізату КСБ, отриманого за дії папаїну

Як контроль було використано негідролізований КСБ. Результати досліджень інгібіторної дії представлені в табл. 2.

Таблиця 2. Інгібіторна дія продуктів протеолізу КСБ на активність АПЕ (n=3)

№ п/п	Фракції продуктів протеолізу	Концентрація водорозчинних продуктів протеолізу, мг/мл	Інгібіторний ефект щодо АПЕ, %
1	КСБ + панкреатин (фракція I)	443,7±13,7	1,23±0,57
2	КСБ + панкреатин (фракція II)	251,3±6,54	17,36±1,48
3	КСБ + панкреатин (фракція III)	282±8,83	40,17±6,19
4	КСБ + нейтральна протеаза (фракція I)	269±13,67	0,5±0,34
5	КСБ + нейтральна протеаза (фракція II)	221,7±11,89	4,83±2,37
6	КСБ + нейтральна протеаза (фракція III)	111±11,43	34,3±4,62
7	КСБ + папаїн (фракція I)	227±10,42	0,73±0,37
8	КСБ + папаїн (фракція II)	226,3±7,36	5,87±1,72
9	КСБ + папаїн (фракція III)	92±7,48	36,37±5,3

Високомолекулярні продукти протеолізу (≥ 5000 Да) практично не проявляють інгібіторної дії на АПЕ. Найвища активність виявлена у фракції III. Це пептиди з $M \leq 1000$ Да. Найвищу інгібіторну дію показала узагальнена фракція III, отримана за дії панкреатину на КСБ. Очевидно, що в цьому випадку утворюються природні антигіпертензивні пептиди.

Висновки

Із концентрату сироваткових білків у фізіологічних умовах було отримано гідролізати з допомогою ферментних препаратів панкреатину, папаїну та нейтра-

льної протеази. З використанням гель-фільтрації на сефадексі G-25 кожен з отриманих гідролізатів було розділено на три фракції за молекулярною масою: $M \geq 5000$ Да, $M 1000—5000$ Да та $M \leq 1000$ Да.

Отримані хроматографічні фракції кожного гідролізату тестували на інгібіторну дію стосовно АПЕ. Встановлено, що продукти протеолізу з молекулярною масою більше 5000 Да (фракція I) практично не проявляють інгібіторної дії на АПЕ. В усіх випадках найвища активність спостерігалась у третій фракції, яка містила низькомолекулярні пептиди з молекулярною масою менше 1000 Да. При цьому максимальна інгібіторна дія на АПЕ була в третій фракції гідролізату, отриманого у фізіологічних умовах з використанням ферментного препарату «Панкреатин».

Література

Головач, Т. Н., Курченко, В. П. (2012). Гидролиз белков молока ферментными препаратами и протеолитическими системами молочнокислых бактерий. *Труды БГУ* 2012, 7(1), 106—126.

Шаркова, Н. О., Жукотський, Е. К., Авдєєва, Л. Ю., Декуша, Г.В. (2013). Білкові гідролізати для дітей раннього віку. *Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій*, 44(2), 250—252.

Юкало, В. Г., Яворський, Б. І., Сторож, Л. А., Соловодзінська, І. Є. (2007). Кількісний електрофоретичний аналіз білків казеїнового комплексу. *Біологія тварин*, 9(1—2), 295—298.

Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Cardador-Martínez, A., Martín-del-Campo, S. T., Amaya-Llano, S. L. (2021). Production of ACE Inhibitory Peptides from Whey Proteins Modified by High Intensity Ultrasound Using Bromelain. *Foods*, 10(9), 2099—2110.

Beynon, R., & Bond, J. S. (2001). *Proteolytic Enzymes*. 2nd Ed. Oxford: Oxford University Press.

Chobert, J-M., El-Zahar, K., Sitohy, M., Dalgalarondo, M., Métro, F., Choiset, Y., Haertle, T. (2005). Angiotensin I — converting — enzyme (ACE) — inhibitory activity of tryptic peptides of ovine — lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using different starters. *Lait*, 85, 141—152.

Costa, E. L., Gontijo, J. A. R., Netto, F. M. (2007). Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 17(6), 632—640.

Frenhani, P. B., Burini, R. B. (1999). Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arquivos de Gastroenterologia*, 36(4), 227—237.

Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163—169.

Madadlou, A., Abbaspourrad, A. (2016). Bioactive whey peptide particles: An emerging class of nutraceutical carriers. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 58(9), 1468—1477.

Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R., Sarkar, P. (2019). Bioactive Peptides from Whey Proteins. In: Hilton C. Deeth & Nidhi Bansal (Eds.), *Whey Proteins: From milk to medicine* (pp. 519—547). London: Academic Press.

Silva, M. R., Silvestre, M. P.C., Silva, V. D. M., Souza, M. W.S., Lopes Junior, C. O., Afonso, W.O., Rodrigues, D. F. (2014). Production of Ace-Inhibitory Whey Protein Concentrate Hydrolysates: Use of Pancreatin and Papain. *International Journal of Food Properties*, 17(5), 1002—1012.

Mills, K. T., Stefanescu, A., He, J. (2020). The Global Epidemiology of Hypertension. *Nature Reviews Nephrology*, 16, 223—237.

Mullally, M. M., Meisel, H., Fitzgerald, R. J. (1997). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*, 7(5), 299—303.

Park, Y. W. (Ed.) (2009). *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. USA: Wiley-Blackwell.

Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67(1), 53—64.

Sgarbieri, V. C. (2004). Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição*, 17(4), 397—409.

Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H., Nurminen, M-L. (2002). Effect of long — term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *Journal of Dairy Research*, 69, 103—111.

Wang, L., Mao, X., Cheng, X., Xiong, X., Ren, F. (2010). Effect of enzyme type and hydrolysis conditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and as content of hydrolysed whey protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 807—812.

Wu, J., Liao, W., Udenigwe, C. C. (2017). Revisiting the Mechanisms of ACE Inhibitory Peptides from Food Proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 214—219.

Yukalo, V., Datsyshyn, K., Storozh, L. (2019). Electrophoretic system for express analysis of whey protein fractions. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 2(11 (98)), 37—44.