

УДК 637.144.045.075:579.67(045)

**АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА И АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ  
ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ****Т.Н. Головач, В.П. Курченко, О.И. Кравцова, До Чунг Ши\****Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь**\*Институт химии ВАНТ, Ханой, Вьетнам***Сокращения**

ABTS – 2,2'-azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] diammonium salt (диаммониевая соль 2,2'-азино-бис [3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты]).

mg – молекулярная масса, кДа.

TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.

$\alpha$ -ла –  $\alpha$ -лактальбумин.

$\beta$ -лг –  $\beta$ -лактоглобулин.

АГ – антигенность.

АОА – антиоксидантная активность.

БСА – бычий сывороточный альбумин.

ИФА – иммуноферментный анализ.

КСБ – концентрат сывороточных белков.

М.д. – массовая доля.

Отн. ед. – относительная единица.

**Введение**

Основными белками молочной сыворотки – побочного продукта производства сыра и казеина – являются  $\alpha$ -лактальбумин ( $\alpha$ -ла, 25%) и  $\beta$ -лактоглобулин ( $\beta$ -лг, 60%). Минорный компонент представлен БСА, лактоферрином, иммуноглобулинами, лактопероксидазой и др. Ферментативный гидролиз белков молочной сыворотки направлен на получение продуктов с низким аллергенным потенциалом и высокой питательной ценностью [1]. Пептиды белков сывороточной фракции характеризуются разнообразными физико-химическими, иммунохимическими и биологически активными свойствами (бактерицидным, антифунгальным, антиоксидантным, иммуномодулирующим и др. эффектами) [2].

Контролируемыми характеристиками ферментативных гидролизатов являются степень гидролиза белковых субстратов, пептидный состав и остаточная антигенность (АГ) – количество нерасщепленного белка, сохраняющего способность взаимодействовать с антителами. В соответствии с данными [3] минимальная молекулярная масса (mg) пептидов сывороточных белков, способных вызвать иммунный ответ, составляет 3–5 кДа. Согласно степени гидролиза выделяют частичные гидролизаты, содержащие пептиды различной длины и минимальное количество свободных аминокислот, и глубокие гидролизаты, представленные короткоцепочечными пептидами и аминокислотами [4, 5]. Остаточная АГ частичных гидролизатов, используемых в смесях профилактического назначения, составляет  $10^{-3}$  относительных единиц (отн. ед.) и более, тогда как глубоких гидролизатов, являющихся компонентом продуктов лечебного питания, –  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  отн. ед., или в  $10^4$ – $10^6$  раз меньше антигенности нативных белков [6]. При тяжелых случаях пищевой аллергии применяют исключительно аминокислоты, не обладающие антигенными свойствами [7].

Известно, что при избытке свободных радикалов и недостатке антиоксидантов в организме происходит свободнорадикальное повреждение нуклеиновых кислот, белков, липидов мембран и других макромолекул клетки. В связи с этим полноценный рацион питания предполагает использование продуктов с антиоксидантным потенциалом или дополнительное внесение компонентов с антирадикальными свойствами. Антиоксидантная активность (АОА) белков и пептидов обусловлена доступными растворителю аминокислотами (восстанавливающими свойствами аминокислотных радикалов) [8].

В составе идентифицированных пептидов с антирадикальными свойствами выявлены триптофан, тирозин, метионин и гистидин. Кроме того, антиоксидантная активность показана для стандартов аминокислот (триптофана > тирозина, метионина >>цистеина > гистидина > фенилаланина) [9].

Для получения ферментативных гидролизатов с заданными показателями (пептидным профилем, биологическими активностями) используют различные эндо- и экзопептидазы, среди которых можно выделить ферменты микробного (алкалаза, нейтраза), растительного (папаин, фицин) и животного (пепсин, трипсин) происхождения [1]. Особенности ферментативного расщепления белковых субстратов определяются оптимальными условиями каталитической активности фермента, его субстратной и сайт-специфичностью, физико-химическими свойствами расщепляемых белков.

Актуальность исследований связана с необходимостью усовершенствования технологии изготовления частичных ферментативных гидролизатов с требуемыми физико-химическими и биологически активными свойствами: белковым и пептидным составом, остаточной антигенностью, радикал-восстанавливающей активностью.

Цель работы – сравнительная характеристика АОА и остаточной АГ гидролизатов сывороточных белков и аналогов зарубежного производства с различной степенью расщепления субстратов и пептидным составом.

### **Материалы и методы**

Изучена остаточная АГ и АОА экспериментальных образцов гидролизатов сывороточных белков, полученных с применением сериновых протеаз (алкалазы, трипсина, смеси трипсина и алкалазы), металлопротеаз (термолизина и нейтразы), аспарагиновой протеазы (пепсина), цистеиновой протеазы (папаина). В качестве контроля использовали концентрат сывороточных белков, изготовленный методом ультрафильтрации (КСБ, ТУ ВУ 100377914.550–2008, исходный субстрат для получения образцов гидролизатов). В качестве образцов сравнения применяли гидролизаты Vital Armor H 801 LB (Armor Protéines, Франция), Peptigen IF 3080 WPH (Arla Foods Ingredients Group, Дания), Optipep-80 DH 32 (Carbery Food Ingredients, Ирландия), PRODIET GF 006 (Ingredia, Франция), Hilmar 8350 (Hilmar, США).

Гидролизаты сывороточных белков фракционировали с применением фильтров Amicon Ultra–4 3K, 10K и 30K (Millipore, США; пропускающая способность 3, 10 и 30 кДа соответственно). Концентрацию общего белка (TN) в гидролизатах и фильтрах определяли по ГОСТ 30648.2–99. Распределение пептидов по молекулярным массам устанавливали путем измерения концентрации белка в образцах, полученных в результате ступенчатого фильтрования фракций гидролизата. Содержание  $\alpha$ -аминного азота (AN) в гидролизатах и фильтрах определяли методом формолового титрования по ГОСТ 13805–76 (п. 3.9). Степень гидролиза рассчитывали как соотношение AN/TN.

За основу конкурентного ИФА для определения остаточной АГ сывороточных белков и их ферментативных гидролизатов приняты методики, описанные в [10, 11].

Измерение ABTS-радикал-восстанавливающей активности предполагало применение предварительно полученного катион-радикала на основе диаммониевой соли 2,2'-азинобис[3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты].  $ABTS^{\bullet+}$  – метастабильный радикал, который может существовать в растворе достаточно продолжительное время; при внесении в среду различных антирадикальных агентов (тролокса) наблюдается быстрое восстановление радикала. Реакцию контролировали спектрофотометрически при  $\lambda_{734}$ :  $ABTS^{\bullet+}$ -радикал (синее окрашивание раствора) при восстановлении преобразуется в свою бесцветную нейтральную форму. В описанной системе присутствует лишь один тип радикала и исключено влияние антиоксиданта на процесс его образования, поэтому осуществляется механизм прямого взаимодействия антиоксиданта с катион-радикалом. Измерение  $ABTS^{\bullet+}$ -восстанавливающей активности проведено на основе модифицированной методики, описанной в статье [12]. Для оценки уровня АОА применяли ТЕАС (Trolox equivalent antioxidant capacity)-метод [13].

Построение графиков и математическую обработку результатов исследований осуществляли при помощи компьютерной программы «Microsoft Office Excel 2003» (Microsoft Corporation, США). Результаты независимых экспериментов представлены как среднее арифметическое значение  $\pm$  доверительный интервал. Достоверность различий между выборками данных определяли методом доверительных интервалов [14].

### Результаты и их обсуждение

При выполнении экспериментальной части исследований охарактеризована антиоксидантная эффективность стандарта (тролокса) при инактивации  $ABTS^{\bullet+}$ . Установлена степень восстановления катион-радикала за определенный временной интервал (10 мин). Значение данного показателя отражает долю, на которую снижается концентрация свободных радикалов в системе под действием антиоксиданта. Показано, что процесс характеризуется наличием стадии быстрого восстановления  $ABTS^{\bullet+}$  в течение 1-й мин реакции (рисунок 1). Таким образом,  $ABTS^{\bullet+}$  быстро реагирует с активными антиоксидантами, что позволяет его использовать в качестве селективного реагента при анализе поликомпонентных образцов [13]. Определена величина  $IC_{50}$  (рисунок 2), или концентрация тролокса, при которой скорость процесса снижается в 2 раза – 16,45 мкМ. Величину  $EC_{50}$  стандарта далее использовали для расчета TEAC (показатель антиоксидантной активности, выраженный в мкмоль тролокса на 1 мг белка).

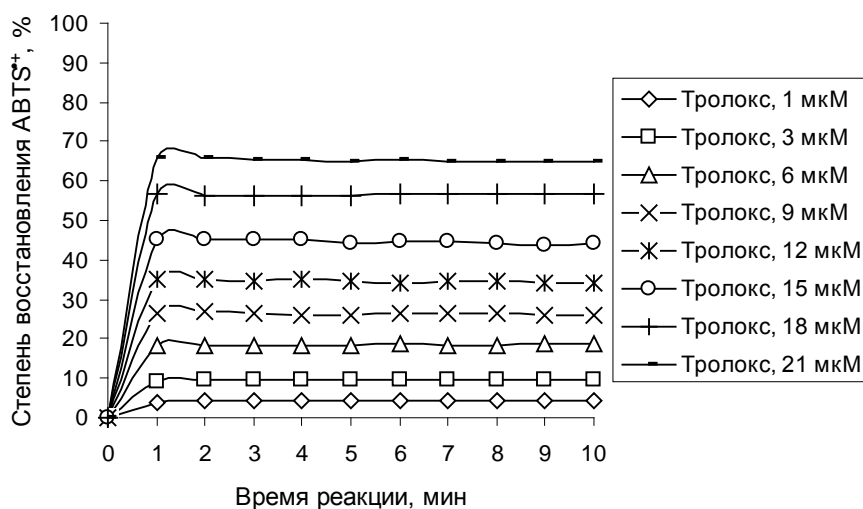


Рисунок 1 – Зависимость степени восстановления катион-радикала  $ABTS$  тролоксом от времени реакции

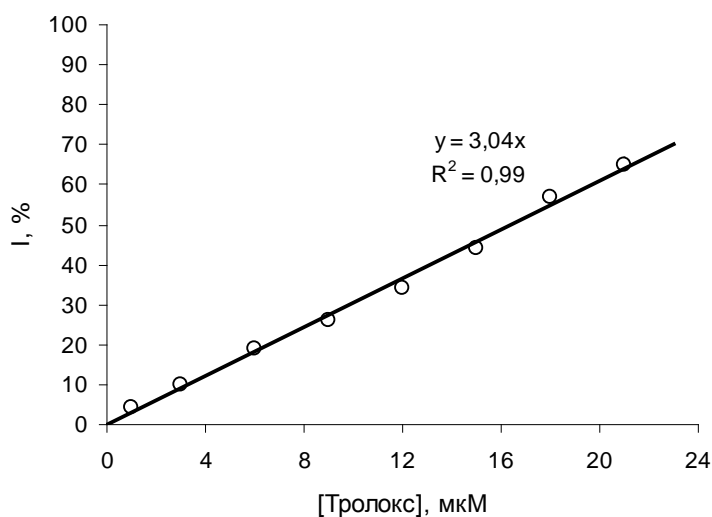


Рисунок 2 – Зависимость ингибирования поглощения ( $I$ , %) от концентрации тролокса

Получены данные об антирадикальной активности исходного субстрата для получения гидролизатов (КСБ). При изучении кинетики реакции восстановления катион-радикала КСБ выявлена стадия быстрого убывания количества  $ABTS^{*+}$  в течение 1-й мин реакции и относительно медленное увеличение степени восстановления радикала во временном интервале 1–30 мин. Быструю стадию ингибирования поглощения, протекающую за 1 мин, связывают с наличием высокоактивных антиоксидантов. В работе оценивали общую антирадикальную активность в течение 30 мин реакции для определения суммарного содержания антиоксидантов с различной эффективностью восстановления  $ABTS^{*+}$ . Значение  $IC_{50}$  для образца КСБ достигнуто при концентрации белкового компонента  $95,1 \pm 2,8$  мкг/мл, а антиоксидантная активность в ед. ТЕАС составила  $0,173 \pm 0,005$  мкмоль/мг.

Проведено комплексное сравнительное исследование кинетики реакции восстановления катион-радикала при внесении в тест-систему образцов КСБ, гидролизованных алкалазой, трипсином, комплексом трипсина и алкалазы, термолизином, нейтразой, пепсином и папаином. Как и в случае негидролизованного КСБ, выявлена стадия быстрого убывания количества  $ABTS^{*+}$  в течение 1-й мин реакции; также следует отметить замедление процесса до 4–6-й мин и постепенное угасание восстановления радикала вплоть до 30-й мин реакции (на примере трипсинового гидролизата, рисунки 3 и 4).

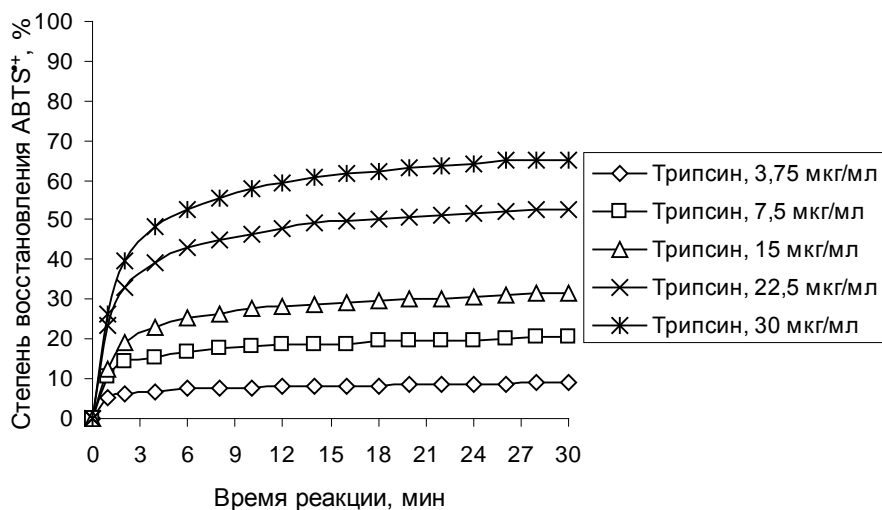


Рисунок 3 – Зависимость степени восстановления катион-радикала  $ABTS$  образцом гидролизата КСБ, полученным с использованием трипсина, от времени реакции

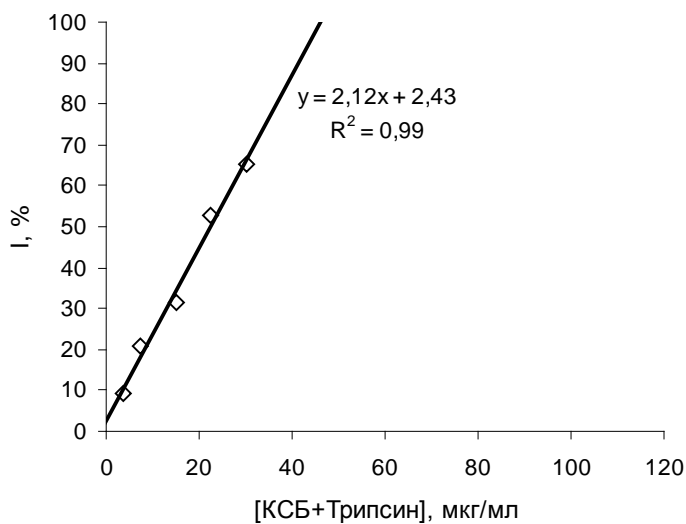


Рисунок 4 – Зависимость ингибирования поглощения ( $I$ , %) от концентрации белка в гидролизате сывороточных белков, полученном с использованием трипсина

С целью определения суммарного содержания антиоксидантов (соединений с различной эффективностью взаимодействия с АВТС<sup>+</sup>) основные показатели АОА рассчитаны для времени реакции 30 мин (таблица 1).

Очевидным является возрастание АОА в результате ферментативного расщепления белкового компонента по сравнению с исходным КСБ. Так способность к восстановлению АВТС<sup>+</sup> при внесении гидролизованного субстрата увеличилась в 1,77–5,71 раза. Значение IC<sub>50</sub> для образцов сывороточных белков, гидролизованных папаином и комплексом ферментов (трипсина и алкалазы), достигнуто при концентрации белкового компонента 50,02±3,30 и 17,02±0,36 мкг/мл, а антиоксидантная активность составила 0,329±0,022 и 0,966±0,020 мкмоль тролокса/ мг белка соответственно.

Антирадикальные свойства гидролизатов убывают в последовательности: комплекс трипсина и алкалазы, термолизин, алкалаза > трипсин >> пепсин, нейтраза >> папаин. Наряду с этим, степень гидролиза белков молочной сыворотки при использовании ряда эндопептидаз уменьшается в ряду: термолизин, комплекс трипсина и алкалазы > трипсин, алкалаза, нейтраза >> папаин, пепсин. Также необходимо указать, что доля гидролизованной фракции с  $m_r \leq 10$  кДа убывает в следующем порядке: термолизин > комплекс трипсина и алкалазы, алкалаза, трипсин >> папаин > нейтраза, пепсин. В то же время остаточная АГ возрастает для образцов ультрафильтратов ( $m_r \leq 10$  кДа) гидролизатов, полученных с использованием комплекса трипсина и алкалазы < термолизина < трипсина < алкалазы << папаина, нейтразы.

Полученные экспериментальные данные обусловлены различной субстратной и сайт-специфичностью ферментов, а также особенностями конформации сывороточных белков. Относительно высокий уровень АОА (0,682–0,986 ед. ТЕАС) подтвержден для всех образцов гидролизатов, для которых содержание фракции с  $m_r \leq 10$  кДа составило 90,9–98,3% и остаточная АГ была снижена до  $(3,53–4,96) \times 10^{-3}$  отн. ед., что достигается за счет интенсивного гидролиза преобладающих белков молочной сыворотки. Так при применении комплекса (трипсина и алкалазы), термолизина, алкалазы или трипсина выявлена корреляция количества пептидной фракции, степени гидролиза и остаточной АГ с уровнем антирадикальной активности. Так как пепсин не гидролизует основной аллерген молочной сыворотки ( $\beta$ -лг), в ультрафильтрате присутствуют лишь короткоцепочечные пептиды  $\alpha$ -ла и других минорных компонентов молочной сыворотки с низким аллргенным потенциалом. В связи с этим пепсин не является перспективным ферментом для получения гипоаллергенных гидролизатов сывороточных белков.

Установлена высокая эффективность получения частичных гидролизатов сывороточных белков при использовании сериновых протеаз: трипсина и алкалазы [1]. В указанных гидролизатах содержится 90,9–95,2% фракции с  $m_r \leq 10$  кДа, показатель AN/TN составляет 17,8±1,0% для алкалазы и 18,2±0,6% для трипсина. Совместное воздействие данных протеаз приводит к повышению AN/TN до 22,0±1,3% и существенному уменьшению остаточной АГ до  $(0,38 \pm 0,03) \times 10^{-3}$  отн. ед. в результате наиболее полного гидролиза пептидных связей, а также возрастанию антирадикальной активности продуктов ферментативной реакции до 0,966±0,020 мкмоль тролокса/ мг белка.

В образцах КСБ, расщепленного термолизином, выявлен максимальный выход фракции с  $m_r \leq 10$  кДа (97,0±1,3%), показана относительно высокая степень гидролиза (23,3±0,6%) и низкий уровень остаточной АГ  $(2,11 \pm 0,02) \times 10^{-3}$  отн. ед. В результате протеолиза данной металлопротеазой получен белковый компонент с высоким уровнем АОА – 0,930±0,027 мкмоль тролокса/ мг белка (таблица 1). Показано возрастание радикал-восстанавливающей активности при увеличении времени гидролиза КСБ термолизином с 30 до 90 мин, очевидно, за счет экспонирования реакционноспособных групп аминокислот при возрастании глубины гидролиза белковых субстратов.

Таблица 1 – Характеристика экспериментальных образцов частичных гидролизатов сывороточных белков, полученных с применением различных протеаз

Фермент для получения гидролизата	М.д. фракции с $m_r \leq 10$ кДа*, %	Соотношение $\alpha$ -аминного и общего азота*, AN/TN, %	IC <sub>50</sub> , мкг/мл	ТЕАС, мкмоль тролокса/ мг белка	ТЕАС (г-г) / ТЕАС (КСБ)**	Остаточная АГ фильтрата гидролизата, 10 <sup>-3</sup> отн. ед.
Алкалаза	93,0±0,6	17,8±1,0	17,72±0,13	0,928±0,007	5,37±0,04	4,88±0,08
Трипсин	92,4±1,5	18,2±0,6	22,49±1,53	0,732±0,050	4,23±0,29	3,66±0,13
Трипсин и алкалаза	93,2±2,0	22,0±1,3	17,02±0,36	0,966±0,020	5,59±0,12	0,38±0,03
Термолизин 15 мин	–	–	21,35±1,31	0,771±0,047	4,46±0,27	–
30 мин	–	–	21,31±2,24	0,774±0,082	4,47±0,47	–
90 мин	97,0±1,3	23,3±0,6	17,69±0,52	0,930±0,027	5,38±0,16	2,11±0,02
Нейтраза	48,0±1,9	16,8±0,8	32,77±2,89	0,503±0,044	2,91±0,26	7,85±0,46
Пепсин	46,1±1,8	12,7±1,3	31,66±3,06	0,521±0,050	3,01±0,29	0,058±0,005
Папаин	51,9±0,6	13,7±1,0	50,02±3,30	0,329±0,022	1,90±0,13	8,06±0,51

Примечание – \* – содержание белка в гидролизатах, степень гидролиза (AN/TN) представлены согласно данным [1]; \*\* – показатель отражает, во сколько раз АОА гидролизатов превышает антирадикальные свойства нерасщепленного КСБ

На следующем этапе работы изучены антиоксидантные свойства частичных ферментативных гидролизатов сывороточных белков зарубежного производства.

Получены зависимости степени восстановления АВТС<sup>•+</sup> гидролизатами от продолжительности реакции (30 мин). Характерной является стадия быстрого убывания количества АВТС<sup>•+</sup> в течение 1-й мин процесса; на 4–6-й мин реакции наблюдается менее интенсивное увеличение доли восстановленного радикала; далее следует медленная стадия реакции (до 30-й мин). В эксперименте оценивали антирадикальные свойства гидролизатов как комплекса различных антиоксидантов, поэтому показатели АОА рассчитаны для времени реакции 30 мин (таблица 2).

Для образцов Hilmar 8350 и Vital Armor Н 801 LB согласно данным производителя характерна относительно невысокая степень гидролиза белковых субстратов. По итогам исследования опытных образцов гидролизатов показана корреляция между глубиной расщепления сывороточных белков и уровнем АОА. Так при степени гидролиза 12,5 и 13% антирадикальная активность изученных белковых компонентов составляет 0,559±0,022 и 0,619±0,001 мкмоль тролокса/ мг белка соответственно.

Наряду с этим, образцы PRODIET GF 006, Optiper-80 DH 32 и Peptigen IF 3080 WPH можно объединить в группу гидролизатов с высоким уровнем АОА. В соответствии с сертификатами качества указанные белковые компоненты содержат следовые количества нативного белка (0,1–2,8%), а степень гидролиза составляет 20–32%. Очевидно, с увеличением выхода пептидной фракции достигается возрастание уровня антирадикальной активности до 0,803–0,996 мкмоль тролокса/ мг белка, что в 4,64–5,76 раза больше АОА нерасщепленных сывороточных белков (таблица 2).

Отмеченному диапазону антирадикальной активности соответствуют показатели экспериментальных образцов гидролизатов, полученных с использованием комплекса трипсина и алкалазы (0,966±0,020 ед. ТЕАС), термолизина (0,930±0,027 ед. ТЕАС) и алкалазы (0,928±0,007 ед. ТЕАС). Экспериментальный трипсиновый гидролизат сывороточных белков (0,732±0,050 ед. ТЕАС) также обладает более высоким радикал-восстанавливающим потенциалом, чем образцы Hilmar 8350 и Vital Armor Н 801 LB (таблица 2). Кроме того, для ультрафильтратов опытных образцов гидролизатов, полученных

с применением высокоактивных протеаз (трипсина, алкалазы, смеси трипсина и алкалазы, термолизина) характерен низкий уровень остаточной АГ –  $(0,35–4,96) \times 10^{-3}$  отн. ед.

Таблица 2 – Характеристика частичных гидролизатов сывороточных белков зарубежного производства

Наименование гидролизата	Пептидный профиль*	Соотношение $\alpha$ -аминного и общего азота*, AN/TN, %	IC <sub>50</sub> , мкг/мл	ТЕАС, мкмоль тролокса/ мг белка	ТЕАС (г-т) / ТЕАС (КСБ)**	Остаточная АГ, $10^{-3}$ отн. ед.
Hilmar 8350 (Hilmar, США)	<20 кДа 83,0%	12,5	29,46±1,18	0,559±0,022	3,23±0,13	52,9±2,0
Vital Armor H 801 LB (Armor Protéines, Франция)	<10 кДа 93,5–95,7%	13	26,56±0,02	0,619±0,001	3,58	–
PRODIET GF 006 (Ingredia, Франция)	<5 кДа 97,2%	20–25	16,75±0,24	0,982±0,014	5,68±0,08	0,84±0,04
Optiper-80 DH 32 (Carbery Food Ingredients, Ирландия)	<10 кДа 99,0%	28–32	18,35±0,21	0,896±0,010	5,18±0,06	–
Peptigen IF 3080 WPH (Arla Foods, Дания)	<10 кДа 99,9%	22–28	20,02±0,47	0,822±0,019	4,75±0,11	–

Примечание – \* – показатели представлены согласно данным производителей

По результатам конкурентного ИФА остаточная АГ образца «PRODIET GF 006» составляет  $(0,84 \pm 0,04) \times 10^{-3}$  отн. ед. и уровень антиоксидантной активности достигает  $0,982 \pm 0,014$  мкмоль тролокса/ мг белка, тогда как для «Hilmar 8350» –  $(52,9 \pm 2,0) \times 10^{-3}$  отн. ед. и  $0,559 \pm 0,022$  мкмоль тролокса/ мг белка соответственно. Полученные данные подтверждают, что с увеличением степени ферментативного расщепления белковых субстратов наблюдается возрастание антирадикальной активности и снижение аллергенного потенциала гидролизатов.

Таким образом, при использовании высокоактивных протеолитических ферментов: комплекса сериновых протеаз (трипсина и алкалазы), термолизина, алкалазы или трипсина – получены экспериментальные образцы гидролизатов, соответствующие по физико-химическим показателям, уровню остаточной антигенности и антиоксидантной активности зарубежным аналогам, которые в настоящее время применяются при производстве продуктов детского и специализированного питания.

### Заключение

Установлено возрастание радикал-восстанавливающей активности гидролизованного белкового компонента в 1,77–5,71 раза и снижение остаточной АГ пептидной фракции ( $m_r \leq 10$  кДа) в пределах  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  отн. ед. по сравнению с нерасщепленным КСБ. Для образцов гидролизатов, полученных с использованием комплекса сериновых протеаз (трипсина и алкалазы), термолизина, алкалазы или трипсина, выявлена корреляция количества пептидной фракции и степени гидролиза с уровнем антирадикальной активности и остаточной АГ. Так относительно высокие значения АОА ( $0,682$ – $0,986$  ед. ТЕАС) и значительное снижение антигенных свойств  $((0,35–4,96) \times 10^{-3}$  отн. ед.) подтверждены для всех образцов гидролизатов, в которых содержание фракции с  $m_r \leq 10$  кДа достигало

90,9–98,3%, что связано с интенсивным гидролизом преобладающих белков молочной сыворотки ( $\beta$ -лг и  $\alpha$ -ла). Показано, что при применении различных протеолитических ферментов: комплекса протеаз (трипсина и алкалазы), термолизина, алкалазы или трипсина – получены образцы гидролизатов, которые по физико-химическим показателям, уровню АОА и остаточной АГ соответствуют зарубежным аналогам, предназначенным для использования в качестве компонента функциональных продуктов питания.

**Благодарность:** работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ–ВАНТ, проект № X14В-002.

### Список литературы

1. Halavach, T.M. Enzymatic hydrolysis of milk proteins as a basis of specialized food products biotechnology / T.M. Halavach, V.P. Kurchenko, A.I. Albulov // *Ural Scientific Bulletin*. – 2014. – № 25 (104). – P. 69–79.
2. Korhonen, H. Bioactive peptides: Production and functionality / H. Korhonen, A. Pihlanto // *Int. Dairy J.* – 2006. – Vol. 16. – P. 945–960.
3. El-Agamy, E.I. The challenge of cow milk protein allergy / E.I. El-Agamy // *Small Rumin. Res.* – 2007. – Vol. 68. – P. 64–72.
4. Use of hydrolysates in the treatment of cow's milk allergy / L. Terracciano [et al.] // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2002. – Vol. 89, № 1. – P. 86–90.
5. Clemente, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition / A. Clemente // *Trends Food Sci. Technol.* – 2000. – Vol. 11. – P. 254–262.
6. Special formulas in infant nutrition: a review / J. Maldonado [et al.] // *Early Hum. Dev.* – 1998. – Vol. 53, № 1. – P. 23–32.
7. de Boissieu, D. Allergy to extensively hydrolyzed cow milk proteins in infants: identification and treatment with an acid-based formula / de D. Boissieu, P. Matarazzo, C. DuPont // *J. Pediatr.* – 1997. – Vol. 131. – P. 744–747.
8. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk / A. Zulueta [et al.] // *Int. Dairy J.* – 2009. – Vol. 19, № 6–7. – P. 380–185.
9. Hernández-Ledesma, B. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS / B. Hernández-Ledesma [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – Vol. 53, № 3. – P. 588–593.
10. Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity / S.B. Kim [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2007. – Vol. 90. – P. 4043–4050.
11. Способ получения ферментативного гидролизата сывороточных белков со средней степенью гидролиза: пат. 2375910 РФ, МПК А 23 J 3/08, А 23 J 3/30, А 23 J 3/34, А 23 J 1/20 / В.И. Круглик, С.Н. Зорин, И.В. Гмошинский, Д.В. Пономарев, Н.Е. Никитина, А.А. Абрамова, И.Н. Волкова, Н.В. Ревякина; заявитель ЗАО «Компания «Нутритек». – № а 20081220114/13; заявл. 03.06.2008; опубл. 20.12.2009 // Официальный бюл. / Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. – 2009. – № 15.
12. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin / B. Hernández-Ledesma [et al.] // *Int. Dairy J.* – 2007. – Vol. 17, № 1 – P. 42–49.
13. Получение и характеристика антиоксидантной активности экстрактов *Iris Domestica* и их отдельных компонентов / А.П. Киселев [и др.] // *Труд. Белорусск. гос. ун-та.* – 2012. – Т. 7. – С. 228–237.
14. Теория вероятностей и математическая статистика: Учебное пособие для вузов / В.Е. Гмурман // М.: Высшая школа, 2003. – 9-е изд. – 479 с.