

УДК 637.144.5+ 577.152.344

Поступила в редакцию 20.04.2023  
Received 20.04.2023

Т. Н. Головач

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь***ВЫСОКОАКТИВНЫЕ ПРОТЕАЗЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ  
ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВ МОЛОКА  
С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ ГИДРОЛИЗА**

**Аннотация.** Изучены особенности гидролиза сывороточных белков коровьего молока с применением бактериальных эндопептидаз алкалазы и протозима. Проведен сравнительный анализ белково-пептидного состава ферментативных гидролизатов молочной сыворотки. Установлено влияние предварительной тепловой обработки субстрата и степени его гидролиза на уровень антиоксидантной активности пептидов сыворотки молока. Показано, что предварительная тепловая обработка сывороточных белков и гидролиз в оптимизированных условиях приводят к возрастанию степени их гидролиза протозимом, получению гипоаллергенных продуктов протеолиза.

**Ключевые слова:** пептидазы, сывороточные белки молока, ферментативный гидролиз, белково-пептидный состав, антиоксидантная активность.

T. M. Halavach

*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus***HIGHLY ACTIVE PROTEASES FOR OBTAINING ENZYMATIC DAIRY  
PROTEIN HYDROLYSATES WITH DIFFERENT HYDROLYSIS DEGREE**

**Abstract.** The features of bovine whey protein hydrolysis with bacterial endopeptidases alcalase and protozyme were studied. A comparative analysis of the protein-peptide profile of enzymatic whey hydrolysates was carried out. The effect of substrate heat pretreatment and the degree of its hydrolysis on the level of antioxidant activity of whey peptides was established. It was shown that heat pretreatment of whey proteins and hydrolysis at optimized conditions resulted in higher degree of their hydrolysis with protozyme, obtaining hypoallergenic proteolysis products.

**Key words:** peptidases, whey proteins, enzymatic hydrolysis, protein-peptide composition, antioxidant activity.

**Введение.** Ферментативный гидролиз белков молока направлен на повышение их питательной ценности, улучшение технологических свойств (растворимости, вязкости, термостабильности) [1, 2], снижение аллергенного потенциала путем разрушения областей антигенных детерминант в составе казеина и сывороточных белков [3]. В процессе протеолиза белки молока расщепляются на пептиды с широким спектром биоактивных функций (антимикробная, антиоксидантная, опиоидная иммуномодулирующая активность) [4]. Биоактивные пептиды обладают значительным потенциалом в качестве компонентов функциональных продуктов питания, терапевтических и косметических средств [5, 6]. Технологический процесс получения гидролизатов белков молока предусматривает выбор субстрата и фермента (ферментов), условий ферментативной реакции и характеристику продуктов протеолиза [7].

Сывороточные белки молока, обладающие относительно высокой пищевой ценностью, являются оптимальным ингредиентом для функциональных продуктов [8]. Промышленное производство биоактивных гидролизатов сывороточных белков молока включает следующие технологические этапы: фракционирование сывороточных белков для отделения жира, лактозы и минералов; ферментативный гидролиз белкового субстрата с применением коммерческих ферментов; инактивация протеазы (комплекса протеаз); распылительная/лиофильная сушка гидролизата; упаковка продукта. Возможно введение в технологический процесс дополнительных стадий, в частности применение предварительной обработки белкового субстрата, фракционирование гидролизатов, выделение целевых биоактивных пептидов [7, 8].

Молочная промышленность является одним из наиболее важных направлений применения протеолитических ферментов (эндопептидаз), расщепляющих внутренние пептидные связи белковых макромолекул с образованием средне- и короткоцепочечных пептидов. Эндopeптидазы выделяют, главным образом, из растительных, животных и бактериальных источников. В условиях промышленного производства предпочтительным является применение микроорганизмов для достижения высокого выхода протеолитических ферментов, сокращения временных и финансовых затрат [9, 10].

В настоящее время щелочная эндопептидаза алкалаза, продуцируемая *Bacillus licheniformis*, является одной из самых эффективных протеаз в условиях применения различных источников белка, в частности отходов пищевой промышленности [11, 12]. Относительно широкая субстратная и сайт-специфичность алкалазы позволяют использовать фермент для гидролиза различных белковых субстратов как при индивидуальном применении, так и в сочетании с другими протеазами. В связи с широким спектром потенциальных сайтов гидролиза применение алкалазы обуславливает получение гидролизата с преобладанием низкомолекулярных пептидов. Среди продуктов гидролиза алкалазой обнаружены пептиды с антиоксидантной, гипотензивной, антидиабетической, противовоспалительной, антимицробной активностью [13]. Щелочная эндопептидаза протозим, использованная в настоящей работе, является аналогом алкалазы.

Актуальность исследований связана с совершенствованием технологии получения ферментативных гидролизатов белков молока с заданными физико-химическими и биоактивными свойствами для специализированных продуктов питания, поиском высокоактивных протеаз для эффективного расщепления сывороточных белков молока.

Целью настоящей работы является характеристика белково-пептидного состава гидролизатов белков сыворотки молока, полученных с применением алкалазы и протозима, установление влияния гидролиза протозимом на антиоксидантные свойства нативных и термообработанных белков молочной сыворотки.

**Материалы и методы исследования.** Для получения гидролизатов использовали концентрат сывороточных белков (КСБ–УФ–80, ТУ ВУ 100377914.550–2008), фермент алкалазу (Alcalase® 2.4L, протеаза бактериальная щелочная из *Bacillus licheniformis*, активность 2,4 ЕА/г; Novozymes A/S, Дания), фермент протозим (протеаза бактериальная щелочная из *Bacillus licheniformis*, активность 50 000 ед/г; ТД «Биопрепарат, РФ»). В экспериментах с предельной тепловой обработкой субстрата раствор КСБ инкубировали на водяной бане при 80 °С в течение 10 мин, охлаждали до температуры гидролиза. Ферментативное расщепление сывороточных белков алкалазой и протозимом проводили при соотношении фермент : субстрат, равном 1–5 %, активной кислотности исходного раствора КСБ, равной 8,0 ед. рН, температуре 50 и 60 °С в течение 2–3 ч. Фермент инактивировали путем внесения ингибитора сериновых протеаз фенилметансульфонилфторида (Sigma, США) в конечной концентрации 0,1 мМ. Полученные образцы хранили при температуре –20 °С для последующего анализа белково-пептидного состава и определения антиоксидантной активности.

Для установления белкового и пептидного состава молочной сыворотки и ее ферментативных гидролизатов применяли метод электрофоретического разделения в 20 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (ДСН-электрофорез) [14]. В качестве стандарта молекулярных масс использовали маркер PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10–180 kDa (Thermo Fisher Scientific, США). Количественную обработку электрофореграмм осуществляли с помощью специализированного программного обеспечения TotalLab Quant (TotalLab Ltd, Великобритания). Степень протеолиза определяли как относительное количество расщепленного белка, выраженное в %.

Анализ белково-пептидного состава методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводили на хроматографе Agilent 1100 («Agilent», США) с применением колонки Zorbax–300SB C8 (4,6×250 мм, 5 мкм, «Agilent», США). Колонку уравнивали 0,1 % водным раствором трифторуксусной кислоты (Panreac, Испания). Элюирование образцов сывороточных белков осуществляли с использованием градиента ацетонитрила (Криохром, РФ; ацетонитрил–вода–ТФУ = 95 : 5 : 0,1 мл/100 мл): 0–5 мин, 5 %; 5–10 мин, 5–10 %; 10–30 мин, 10–40 %; 30–32 мин, 40 %; 32–40 мин, 40–50 %; 40–45 мин, 50 %; 45–50 мин, 50–10 %. Разделение проводили при комнатной температуре в потоке 1,0 мл/мин в течение 50 мин, детекцию осуществляли при 214 нм.

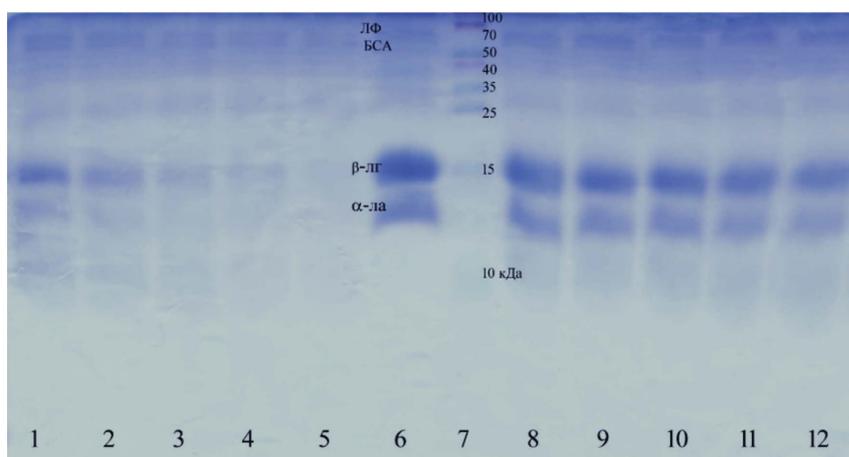
Для оценки антиоксидантной активности опытных образцов применяли флуориметрический метод. В экспериментальной работе использовали методику, описанную в статье Е.И. Тарун (2014) [15]. Строили графики зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от содержания белка в анализируемых образцах гидролизатов. Согласно получен-

ному уравнению рассчитывали концентрацию пробы  $IC_{50}$ , соответствующую 50 % ингибированию флуоресценции.

Построение графиков осуществляли в программе Microsoft Office 365 Excel (MS Corporation, США). Результаты экспериментов представлены как среднее арифметическое значение  $\pm$  доверительный интервал. Статистический анализ проводили с использованием функций R aov, Dunnett's test, t-test и Tukey Honest Significant Difference (HDS) test из пакетов stats [16] и DescTools [17]. Статистические различия между группами считались значимыми при уровне  $p < 0,05$  с поправкой на множественные парные сравнения.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Проведен сравнительный анализ белково-пептидного состава гидролизатов сывороточных белков молока, полученных с применением сериновых эндопептидаз алкалазы и протозима. На первом этапе исследований осуществляли гидролиз нативной молочной сыворотки при температурном режиме, оптимальном для алкалазы, в частности при 50 °C, и продолжительности ферментативной реакции 2 ч.

По данным ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях установлены существенные отличия в профиле продуктов протеолиза нативных сывороточных белков молока алкалазой и протозимом, что отражено на рис. 1.



1 — WH-1%A, 2 — WH-2%A, 3 — WH-3%A, 4 — WH-4%A, 5 — WH-5%A, 6 — WP, 7 — маркер, 8 — WH-1%P, 9 — WH-2%P, 10 — WH-3%P, 11 — WH-4%P, 12 — WH-5%P

Рис. 1. ДСН-электрофореграмма нативных (WP) и гидролизованных белков сыворотки молока (WH), полученных с применением алкалазы (A) и протозима (P)

Fig. 1. SDS-electropherogram of native (WP) and hydrolyzed whey proteins (WH) obtained using alkalase (A) and protozyme (P)

Так, следовые количества  $\beta$ -лактоглобулина ( $\beta$ -лг) и  $\alpha$ -лактальбумина ( $\alpha$ -ла) обнаружены в гидролизатах при использовании алкалазы (рисунок 1, дорожки 1–5). Вместе с тем, лишь частичное расщепление преобладающих белков молочной сыворотки выявлено в образцах, полученных после гидролиза протозимом (рисунок 1, дорожки 8–12). Следует отметить устойчивость высокомолекулярной белковой фракции (лактоферрин, ЛФ; бычий сывороточный альбумин, БСА) к расщеплению сериновыми протеазами.

Результаты количественного анализа ДСН-электрофореграмм представлены в табл. 1. В целом, в гидролизатах сывороточных белков алкалазой содержится 0–15 % нативного белка, в случае протозима — 30–45 %. Следовательно, при внесении алкалазы в количестве 1–5 % гидролизу подвергаются 85–100 % преобладающих сывороточных белков ( $\beta$ -лг и  $\alpha$ -ла), а в эксперименте с протозимом — 55–70 %.

На следующем этапе в рамках оптимизации гидролиза белкового компонента сыворотки проведена предварительная тепловая обработка субстрата (80 °C, 10 мин) и последующая ферментативная реакция протозимом (5 %) при повышенной температуре (60 °C) в течение 2 и 3 ч. При увеличении температуры гидролиза с 50 до 60 °C установлено существенное возрастание степени протеолиза до полного расщепления  $\beta$ -лг и  $\alpha$ -ла на пептиды, как предельно на рисунке 2 (дорожки 3 и 4). Наряду с этим, в образцах гидролизатов обнаруживаются нативные ЛФ и БСА. Данные электрофоретического анализа сопоставимы с результатами ВЭЖХ, свидетельствующими об увеличении степени расщепления  $\beta$ -лг и  $\alpha$ -ла (рис. 3).

Кроме того, установлено совпадение профилей элюирования пептидов, что подтверждает идентичность действия алкалазы и протозима.

**Таблица 1. Характеристика белкового состава образцов нативных сывороточных белков молока, гидролизованных алкалазой и протозимом**  
**Table 1. Characteristics of the protein composition of samples of native whey milk proteins hydrolyzed by alkalase and protozyme**

Название образца	Состав белковой фракции, %		Степень протеолиза (СП), %
	$\beta$ -лг	$\alpha$ -ла	
WH-1%A	<10	<5	>85
WH-2%A	<10	0	>90
WH-3-5%A	0	0	0
WH-1-5%P	30> $\beta$ -лг>20	15> $\alpha$ -ла>10	70>СП>55

Примечание — гидролизованные белки сыворотки молока (WH), полученные с применением алкалазы (A) и протозима (P)

В гидролизатах термообработанных сывороточных белков протозимом не обнаруживается высокомолекулярная белковая фракция (БСА и ЛФ), характерная для образцов гидролизованной нативной сыворотки молока (рис. 2, дорожки 5 и 6). Так, тепловая обработка белкового субстрата обусловила увеличение степени протеолиза и, как следствие, получение образцов, содержащих пептидную фракцию с молекулярной массой, меньшей 10 кДа. По данным ДСН-электрофореза белково-пептидный профиль образцов остается неизменным при увеличении продолжительности ферментативной реакции с 2 до 3 ч (рис. 2, дорожки 3, 5 и 6).

Целесообразным является проведение предварительной тепловой обработки белков сыворотки и увеличение температуры протеолиза протозимом с 50 до 60 °С для получения гидролизатов, в которых весь белковый компонент расщеплен на пептидную фракцию.

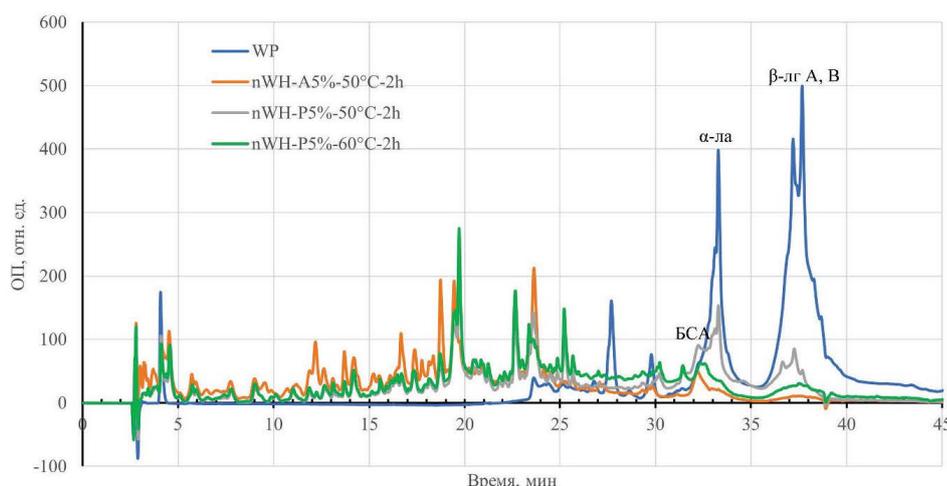


1 — маркер, 2 — WP (50 мг/мл), 3 — WH-5%P-60°C-2h, 4 — WH-5%P-60°C-3h, 5 — tWH-5%P-60°C-2h, 6 — tWH-5%P-60°C-3h, 7 — маркер, 8 — WP (40 мг/мл), 9 — WP (30 мг/мл), 10 — WP (20 мг/мл), 11 — WP (10 мг/мл), 12 — WP (5 мг/мл)

*Рис. 2.* ДСН-электрофореграмма гидролизатов нативных (WP) и термообработанных (tWP) белков сыворотки молока, полученных с применением протозима (P)

*Fig. 2.* SDS electrophoregram of hydrolysates of native (WP) and heat-treated (tWP) whey proteins obtained using protozyme (P)

Впоследствии изучены антиоксидантные свойства гидролизатов сывороточных белков протозимом. Уровень АОА оценивали по способности образцов восстанавливать уровень флуоресценции флуоресцеина. В табл. 2 отражены показатели  $IC_{50}$ , соответствующие концентрации экспериментальных образцов, при которой установлено 50 % ингибирование флуоресценции.



**Рис. 3.** ВЭЖХ-профили нативных (WP) и гидролизованных белков сыворотки молока (WH), полученных с применением алкалазы (А) и протозима (P)  
**Fig. 3.** HPLC profile of native (WP) and hydrolyzed whey proteins (WH) obtained using alkalase (A) and protozyme (P)

При внесении термообработанных сывороточных белков в диапазоне концентраций 5–100 мкг/мл в тест-систему с флуоресцеином отмечено возрастание степени его флуоресценции. Вместе с тем, при дальнейшем увеличении концентрации образца с 100 до 500 мкг/мл установлено понижение уровня флуоресценции, видимо, в результате необратимой денатурации белка и последующей агрегации белковых макромолекул.

Согласно экспериментальным данным гидролизат сывороточных белков, полученный при температуре 50 °С, обладает более высокой АОА, чем изготовленный при 60 °С. Вероятно, это обусловлено наличием в молочной сыворотке термолабильных антиоксидантов небелковой природы.

**Т а б л и ц а 3.** Характеристика АОА нативных, термоденатурированных и гидролизованных протозимом сывороточных белков молока  
**Table 3.** Characterization of AOA of native, thermodenatured and protozyme hydrolyzed milk whey proteins

Наименование образца	IC <sub>50</sub> , мкг/мл
Нативные сывороточные белки	153,25±9,01
Термообработанные сывороточные белки	95,29±1,98 <sup>a</sup>
Гидролизат нативных сывороточных белков (50 °С, 2 ч)	20,93±1,81 <sup>b</sup>
Гидролизат нативных сывороточных белков (60 °С, 2 ч)	28,06±2,32 <sup>b, c</sup>
Гидролизат термообработанных сывороточных белков (60 °С, 2 ч)	31,70±0,71 <sup>c</sup>
Гидролизат нативных сывороточных белков (60 °С, 3 ч)	29,28±1,25 <sup>c</sup>
Гидролизат термообработанных сывороточных белков (60 °С, 3 ч)	32,82±3,64 <sup>c</sup>

*Примечания* — <sup>a</sup> — в расчете использован диапазон концентраций, на котором наблюдается возрастание восстановления флуоресценции флуоресцеина; <sup>b</sup> — различия между образцами достоверны; <sup>c</sup> — различия между образцами не достоверны

В случае гидролиза протозимом при 60 °С радикал-восстанавливающие свойства гидролизатов нативных и термообработанных сывороточных белков сопоставимы, различия между ними не достоверны. Кроме того, увеличение продолжительности гидролиза протозимом с 2 до 3 ч не приводит к достоверному увеличению АОА.

Так, предварительная тепловая обработка сывороточных белков и повышение температуры гидролиза до 60 °С обуславливает возрастание степени их расщепления протозимом, образование гипоаллергенных продуктов протеолиза с молекулярной массой менее 10 кДа. Наряду с этим, гидролизаты нативной и термообработанной молочной сыворотки, полученные с применением протозима при 60 °С, обладают сопоставимым уровнем АОА, различия между образцами не достоверны. В результате гидролиза сывороточных белков протозимом

в оптимизированных условиях показано возрастание радикал-восстанавливающих свойств соответствующих гидролизатов в 4,7–5,5 раза.

Согласно обзорным литературным данным широко известным протеолитическим ферментом является алкалаза — внеклеточная бактериальная протеаза, которую активно применяют при модификации пищевых продуктов, в частности для снижения их аллергенного потенциала, повышения антиоксидантной активности [11]. В целом, активное внедрение микробных протеаз обуславливает относительно низкую стоимость производства, стабильность и специфичность протеолиза, что требуется для изготовления белковых гидролизатов с целевыми характеристиками [12].

Алкалаза относится к сериновым эндопептидазам: она содержит в каталитическом центре триаду аминокислот, одной из которых является серин. Коммерчески доступный препарат Alcalase® 2.4L является зарегистрированной торговой маркой компании Novozymes Corp. и представляет собой жидкий ферментный препарат, содержащий (масс./масс.) 50 % глицерина, 41 % воды и 9 % экстракта протеазы из *Bacillus licheniformis*. Фермент имеет спецификацию «для пищевых продуктов» в соответствии с требованиями Объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) и Кодекса пищевой химии (Food Chemical Codex). Относительно широкая субстратная и сайт-специфичность алкалазы позволяют использовать фермент для гидролиза различных белковых субстратов с достижением высокой степени протеолиза, как при индивидуальном применении, так и в сочетании с другими протеазами [13].

Продукты протеолиза условно разделяют на две группы, одна из которых представлена легко усваиваемыми источниками незаменимых аминокислот, а также гипоаллергенными производными белков. Аллергические реакции обусловлены связыванием антител с антигенными эпитопами на поверхности белковых макромолекул. В результате гидролиза расщепляются потенциальные сайты связывания антител, что предотвращает аллергическую реакцию. Ко второй группе относят биоактивные пептиды, для высвобождения которых требуется гидролиз белка [18]. В ферментативных гидролизатах содержится широкий спектр пептидов, различающихся по длине аминокислотной цепи (или молекулярной массе), гидрофобности и заряду. В частности, классификация гипоаллергенных молочных смесей для детского питания основана на молекулярно-массовом распределении пептидов. Частично гидролизованная смесь (предназначены для профилактики аллергии), главным образом, включают пептиды с молекулярной массой 3–10 кДа, тогда как смеси на основе глубоких гидролизатов (лечебное питание) представлены фракцией с молекулярной массой <3 кДа [18, 19].

Согласно проведенным ранее исследованиям оптимизированы условия гидролиза сывороточных белков молока с применением высокоактивных протеаз животного (трипсин) и бактериального происхождения (алкалаза, термолизин). В качестве наиболее эффективной и доступной протеазы, разрешенной для использования в пищевых целях, определена бактериальная эндопептидаза алкалаза [20, 21]. Охарактеризован белково-пептидный профиль гидролизатов сывороточных белков молока со средней и глубокой степенью гидролиза [21, 22]. Установлено влияние степени протеолиза алкалазой на уровень антиоксидантной активности белкового компонента молочной сыворотки, в частности возрастание радикал-восстанавливающих свойств при увеличении количества средне- и короткоцепочечных пептидов [20, 23].

В целом, пептиды казеина и сывороточных белков являются мощным источником антиоксидантных пептидов, как правило состоящих из 2–14 аминокислот, большинство из которых содержат гидрофобные аминокислоты на N-конце и/или C-конце, а также пролин, гистидин или тирозин в составе последовательности [4]. С наличием His (является пероксидрадикальной ловушкой и обладает хелатирующей способностью) и гидрофобных аминокислот (увеличивают доступность пептидов к гидрофобным мишеням) связывают антиоксидантный потенциал биоактивных пептидов [4, 7].

В настоящей работе получены новые данные об особенностях расщепления нативных и термообработанных сывороточных белков молока щелочной бактериальной эндопептидазой протозимом. Оптимизированы условия гидролиза молочной сыворотки протозимом, что позволило достичь показателей, характерных для алкалазы. Достоверное влияние предварительной тепловой обработки сывороточных белков молока на антирадикальное действие гидролизатов не установлено. Подтверждено увеличение антиоксидантного потенциала молочной сыворотки, гидролизованной протозимом, а также возрастание степени протеолиза термообработанных белков сыворотки молока.

**Заключение.** По итогам экспериментальной работы охарактеризован белково-пептидный состав частичных ферментативных гидролизатов сывороточных белков молока, полученных

с применением сериновых эндопептидаз алкалазы и протозима. Полное расщепление основных белков молочной сыворотки ( $\beta$ -лг и  $\alpha$ -ла) на пептидную фракцию с молекулярной массой, меньшей 10 кДа, установлено при внесении ферментов в количестве 5 % от содержания субстрата при 50 °С в случае алкалазы и при 60 °С — для протозима. Наряду с этим, расщепление минорной высокомолекулярной сывороточной фракции (БСА и ЛФ) протозимом достигается в результате предварительной тепловой обработки молочной сыворотки. Показано возрастание антиоксидантной активности гидролизатов сывороточных белков протозимом в 4,7–5,5 раза по сравнению в нативным белковым компонентом. Получены образцы частичных ферментативных гидролизатов сывороточных белков молока, в которых белки-аллергены расщеплены на гипоаллергенную пептидную фракцию, обладающую высокой антиоксидантной активностью. Они являются потенциальным биологически активным ингредиентом для продуктов специализированного (спортивного, детского, диетического) питания.

#### Список использованных источников

1. *Castro, R.J.S.* Improving the functional properties of milk proteins: focus on the specificities of proteolytic enzymes / R.J.S. De Castro, M.P. Bagagli, H.H. Sato // *Curr. Opin. Food Sci.* — 2015. — Vol. 1. — P. 64–69.
2. Functional properties of bovine milk protein isolate and associated enzymatic hydrolysates / G. Ryan [et al.] // *Int. Dairy J.* — 2018. — Vol. 81. — P. 113–121.
3. *Kleekaya, T.* Protein hydrolysates and peptides / T. Kleekaya, R.J. FitzGerald // *In Encyclopedia of dairy sciences*, 3 rd ed.; McSweeney, P.L.H., McNamara, J.P., Eds.; Elsevier B.V.: Amsterdam, Netherlands. — 2022. — P. 154–166.
4. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization / S.D. Nielsen [et al.] // *Food Chem.* — 2017. — Vol. 232. — P. 673–682.
5. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides / D. Agyei [et al.] // *Food Bioprod. Process.* — 2016. — Vol. 98. — P. 244–256.
6. Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review / Q. Xu [et al.] // *Trends Food Sci. Technol.* — 2019. — Vol. 86. — P. 399–411.
7. A review on health-promoting, biological, and functional aspects of bioactive peptides in food applications / S.H. Peighambaroust [et al.] // *Biomolecules.* — 2021. — Vol. 11. — 631.
8. *Dullius, A.* Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods — Biotechnological facilitation of industrial scale-up / A. Dullius, M.I. Goettert, C.F.V. de Souza // *J. Funct. Foods.* — 2018. — Vol. 42. — P. 58–74.
9. Role of enzymatic bioprocesses for the production of functional food and nutraceuticals / R. Chourasia [et al.] // *In Biomass, biofuels, biochemicals*; Singh, S.P., Pandey, A., Singhania, R.R., Larroche C., Li, Z., Eds.; Elsevier B.V.: Amsterdam, Netherlands. — 2020. — Vol. 15. — P. 309–334.
10. Peptidases used in dairy technology: Current knowledge and relevant applications / V.N. Paiva [et al.] // *Res., Soc. Dev.* — 2022. — Vol. 11, №7. — e57211730367.
11. Biotechnological applications of proteases in food technology / O.L. Tavano [et al.] // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* — 2018. — Vol. 17, №2. — P. 412–436.
12. Dos Santos Aguilar, J.G. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates / J.G. Dos Santos Aguilar, H.H. Sato // *Food Res. Int.* — 2018. — Vol. 103. — P. 253–262.
13. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. / V.G. Tacias-Pascacio [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2020. — Vol. 165. — P. 2143–2196.
14. Current protocols in molecular biology / Ausubos, M., Brent, R., Kingston, R.E., et al., Eds. — NY: John Wiley & Sons; 2003. — Unit 10.2A.1–10.2A.8.
15. Влияние пептидов сывороточных белков молока на восстановление уровня флуоресценции в системе с активированными формами кислорода / Е.И. Тарун [и соавт.] // *Труды БГУ.* — 2016. — Т. 11, ч. 1. — С. 231–236.
16. R: A language and environment for statistical computing / R Core Team // R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. — 2021.
17. DescTools: Tools for descriptive statistics / Andri Signorell [et al.]. — 2017. — R package version 0.99.23.

18. *Aluko, R.E.* Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. / R.E. Aluko // In Woodhead publishing series in food science, technology and nutrition, proteins in food processing, 2nd ed.; Yada, R.Y., Ed.; WP: Cambridge, UK, 2018. — Vol. 15. — P. 389–412.
19. Partial hydrolyzed protein as a protein source for infant feeding: do or don't? / Y. Vandenas [et al.] // *Nutrients*. — 2022. — Vol. 14, №9. — 1720.
20. Biologically active properties of hydrolysed and fermented milk proteins / T.M. Halavach [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* — 2020. — Vol. 9, №4. — P. 714–720.
21. *Halavach, T. M.* Hypoallergenic hydrolysates of whey proteins with average degree of hydrolysis / T.M. Halavach // *AIP Conf. Proc.* — 2022. — Vol. 2390. — 030030.
22. *Halavach, T. M.* Enzymatic protein hydrolysates of whey and colostrum with extensive degree of hydrolysis / T.M. Halavach, E.I. Tarun, V.A. Asafov // *AIP Conf. Proc.* — 2022. — Vol. 2390. — 030029.
23. *Halavach, T.* Proteolysis of bovine whey, milk and colostrum with serine endopeptidases / T. Halavach // In: V. Kurchenko, A. Lodygin, R.M. Machado da Costa, I. Samoylenko (eds) / *Intelligent Biotechnologies of Natural and Synthetic Biologically Active Substances. ICAETT 2021. Lecture Notes in Networks and Systems*; Springer, Cham. — 2022. — Vol. 408. — P. 35–45.

#### Информация об авторах

*Головач Татьяна Николаевна*, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник НИЛ прикладных проблем биологии кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета Белорусского государственного университета (220030, Республика Беларусь, г. Минск, пр. Независимости, 4).

E-mail: halavachtn@gmail.com

#### Information about authors

*Halavach Tatsiana Mikalaevna*, PhD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher of Research Laboratory of Applied Biology, Department of General Ecology and Methods of Biology Teaching, Faculty of Biology, Belarusian State University (4, Nezavisimosti Avenue, Minsk 220030, Belarus).

E-mail: halavachtn@gmail.com