ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2515
https://elibrary.ru/BEJEGN

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Изучение некоторых функциональных характеристик ферментативных гидролизатов пищевых белков

С. Н. Лебедева*, Б. А. Болхонов, С. Д. Жамсаранова, Б. А. Баженова, С. Ю. Лескова

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия

Поступила в редакцию: 18.12.2023
Принята после рецензирования: 22.01.2024
Принята к публикации: 06.02.2024

**С. Н. Лебедева: lebedeva1959@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-5664-6028*
Б. А. Болхонов: https://orcid.org/0000-0002-1822-4980
С. Д. Жамсаранова: https://orcid.org/0000-0002-0574-1575
Б. А. Баженова: https://orcid.org/0000-0001-7380-5959
С. Ю. Лескова: https://orcid.org/0000-0002-2938-4752

© С. Н. Лебедева, Б. А. Болхонов, С. Д. Жамсаранова, Б. А. Баженова, С. Ю. Лескова, 2024

Аннотация.
Распространенность пищевой аллергии растет во всем мире. Одной из ее причин могут быть белки. Поэтому получение ферментативных гидролизатов белков в качестве гипоаллергенных компонентов пищевых продуктов является актуальным. Целью исследования стала оценка уровня антигенности, сенсибилизирующей активности и антиоксидантных свойств ферментативных гидролизатов яичного и соевого белков.
Сырьем для исследований являлись протеин соевый (изолят) и яичный альбумин. Получение гидролизатов белков проводили с использованием протеаз (пепсин и трипсин) путем двухстадийного процесса. Затем определяли степень гидролиза, суммарную антиоксидантную активность и остаточную антигенность. Сенсибилизирующую способность нативных белков и гидролизатов изучали на модели гиперчувствительности замедленного типа на мышах в внутрикожном тесте опухания лапы.
Путем последовательного внесения пепсина и трипсина получены гидролизаты яичного альбумина и соевого протеина. На основании определения содержания азота (общего, в негидролизованном сырье и гидролизате) рассчитана степень гидролиза белков, которая составила 82–88 %. Суммарная антиоксидантная активность гидролизатов составила 114,3 и 91,4 мг/100 мл соответственно. Остаточная антигенность гидролизатов, определенная методом ИФА, составила $1{,}55\times10^{-4}$ и $3{,}30\times10^{-4}$ отн.ед. Нативные белки обладали высокими аллергизирующими свойствами, увеличивая показатели индекса реакции гиперчувствительности замедленного типа более, чем в 5 раз. Гидролизаты снижали индекса реакции гиперчувствительности замедленного типа в среднем в 3,5 и 2,6 раза соответственно.
Ферментативные гидролизаты яичного альбумина и соевого белка обладали высокой степенью гидролиза и антиоксидантной активностью. Установлена низкая остаточная антигенность (10^{-4}) и невысокая сенсибилизирующая способность. Предполагается, что данные белки могут быть использованы в качестве гипоаллергенного компонента с антиоксидантным действием при разработке пищевых продуктов функционального назначения.

Ключевые слова. Яичный альбумин, соевый протеин, гидролизаты, остаточная антигенная активность, сенсибилизирующая активность, антиоксидантная активность

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (РНФ) № 23-26-00058, https://rscf.ru/project/23-26-00058

Для цитирования: Изучение некоторых функциональных характеристик ферментативных гидролизатов пищевых белков / С. Н. Лебедева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 2. С. 412–422. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2515

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2515
https://elibrary.ru/BEJEGN

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Functional Profile of Enzymatic Hydrolysates in Food Proteins

Svetlana N. Lebedeva*, Bulat A. Bolkhonov, Sesegma D. Zhamsaranova, Bayana A. Bazhenova, Svetlana Yu. Leskova

East Siberia State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russia

Received: 18.12.2023
Revised: 22.01.2024
Accepted: 06.02.2024

**Svetlana N. Lebedeva: lebedeva1959@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-5664-6028*
Bulat A. Bolkhonov: https://orcid.org/0000-0002-1822-4980
Sesegma D. Zhamsaranova: https://orcid.org/0000-0002-0574-1575
Bayana A. Bazhenova: https://orcid.org/0000-0001-7380-5959
Svetlana Yu. Leskova: https://orcid.org/0000-0002-2938-4752

© S.N. Lebedeva, B.A. Bolkhonov, S.D. Zhamsaranova, B.A. Bazhenova, S.Yu. Leskova, 2024

Abstract.
Food allergy is a matter of global concern, proteins being a popular allergen worldwide. Enzymatic protein hydrolysates serve as hypoallergenic components in functional foods. This article describes enzymatic hydrolysates of egg and soy proteins as potential antigens, sensitizers, and antioxidants.
The research featured soy protein isolate and egg albumin. The protein hydrolysates were obtained in a two-step process with pepsin and trypsin to measure hydrolysis, total antioxidant activity, and residual antigenicity. The sensitizing ability of native proteins and their hydrolysates was studied using a delayed-type hypersensitivity (DTH) skin test of paw swelling in mice.
The egg albumin and soy protein were hydrolyzed by sequentially adding the proteases, i.e., pepsin and trypsin. The degree of protein hydrolysis was calculated against total nitrogen and its contents in non-hydrolyzed raw materials and hydrolysate. It was 82.6% for the egg hydrolysate and 88.3% for the soy hydrolysate, the total antioxidant activity being 114.3 and 91.4 mg/100 mL, respectively. The residual antigenicity of the hydrolysates determined by ELISA in a sandwich version was 1.55×10^{-4} and 3.30×10^{-4} RU, respectively. The native egg and soy proteins demonstrated good allergenic properties, and the DTH response index increased fivefold. The hydrolysates reduced the DTH response indices by an average of 3.5 for egg hydrolysate and 2.6 times for soy hydrolysate.
The resulting enzymatic hydrolysates of egg albumin and soy protein demonstrated a high degree of hydrolysis and antioxidant activity. They had low residual antigenicity (10^{-4}) and low sensitizing ability. The resulting enzymatic hydrolysates could be used as hypoallergenic components and antioxidants in new functional foods.

Keywords. Egg albumin, soy protein, hydrolysates, residual antigenic activity, sensitizing activity, antioxidant activity

Funding. The research was supported by the Russian Science Foundation (RSF), grant no. 23-26-00058, https://rscf.ru/project/23-26-00058

For citation: Lebedeva SN, Bolkhonov BA, Zhamsaranova SD, Bazhenova BA, Leskova SYu. Functional Profile of Enzymatic Hydrolysates in Food Proteins. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(2):412–422. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2515

Введение

За последние десятилетия наблюдается тенденция роста распространенности пищевой аллергии не только в развитых странах, но и в развивающихся. Пищевая аллергия стала одной из главных проблем XXI века. В зону риска пищевой аллергии входят как дети (особенно новорожденные), так взрослые люди. По результатам исследований в среднем в мире пищевая аллергия встречается у 8 % детей и 10 % взрослых [1]. Международным союзом иммунологических обществ разработана современная база аллергенов, куда входит более 400 наименований (https://www.allergen.org).

Пищевую аллергию могут вызывать белки животного и растительного происхождения таких продуктов, как коровье молоко, яйцо, соя, орехи, морепродукты и др. [2, 3]. Популярными и ценными продуктами, богатыми источниками белка и биологически активных компонентов, являются куриные яйца, соя и пищевые

продукты на их основе. Яйцо содержит в среднем 13 % белков, а соя – 40 % [4].

Четыре основных яичных белка, вызывающих аллергию, составляют 80 % белка яиц. Основные аллергены – это овомукоид (Gal d1, 11 %), овальбумин (Gal d2, 54 %), овотрансферрин (Gal d3, 12 %) и лизоцим (Gal d4, 3 %). Белки яичного желтка обладают умеренным аллергенным потенциалом, наиболее высокоаллергенным считается α-ливетин (Gal d5) [2, 5]. Белки сои, такие как Gly m1, глицинин, Gly m4, термостабильный ингибитор трипсина (СИТ), также обладают свойствами сильных аллергенов. Также установлено, что респираторной аллергии на березовую пыльцу (Bet v1) сопутствует перекрестная аллергия на сою [2, 6]. Необходимо учитывать, что очень часто соя является скрытым аллергеном в непищевых и пищевых продуктах, поскольку может содержаться в мясных полуфабрикатах, колбасных и кондитерских изделиях, а также в лекарственных и косметических средствах [2].

Для людей с аллергией на яйцо и сою жизненно важно избегать потребления продуктов питания, содержащих яичные и соевые белки даже в небольших количствах, поскольку это может привести к развитию целого спектра аллергических реакций: крапивницы и отеку Квинке, а в тяжелых случаях к анафилактическому шоку.

Пищевая аллергия является результатом иммунной дисрегуляции и нарушения нормальной пероральной толерантности. Способность белка выступать в роли антигена у генетически предрасположенных индивидов зависит от наличия антигенных структур, способных вызывать специфическую активацию Th2-хелперов и выработку IgE-антител. Этот тип пищевой аллергии является наиболее распространенным [2]. Можно выделить и не-IgE-зависимые аллергические реакции, к которым относятся иммуноглобулин G/иммуноглобулин M (IgG/IgM)-зависимые и Т-зависимые реакции [7].

Лечение пищевой аллергии является трудной и сложной проблемой, которая требует определенных знаний как у врачей, так и у самих пациентов. Например, пациент, страдающий пищевой аллергией, должен постоянно проверять этикетки продуктов с составом их ингредиентов. Производители многих стран, в соответствии со своим законодательством, должны указывать на упаковке продуктов 14 пищевых аллергенов, относящихся к основным [2].

Специалисты отмечают, что единственным полноценным методом, который может быть использован для предотвращения и лечения пищевой аллергии, является отказ от продуктов, содержащих аллергены, что практически невозможно. Однако возможен другой путь – профилактика и использование специализированных диет, которые могут снижать симптомы проявления аллергических реакций и способствовать нормализации общего аллергического фона. Особую значимость приобретают исследования по разработке компонентов и продуктов гипоаллергенной направленности, в которых аллергенное сырье заменено на технологически измененное (гипоаллергенное) [8, 9].

Принцип снижения аллергенности (гипоаллергизация) состоит в блокировании, уменьшении или устранении способности аллергенов вызывать новое проявление сенсибилизации или аллергической реакции у сенсибилизированных людей. С этой целью для обработки пищевых продуктов применяется широкий спектр технологий: термическое воздействие (сухое и влажное), модификации белков, ферментативный гидролиз, сбраживание, воздействие ультразвука, облучения и высокого давления, а также генно-инженерные методы. Проводятся исследования по разработке и исследованию эффективности комбинированных методик [10–12]. Используемые методы обработки пищевых продуктов вызывают целый спектр физико-биохимических изменений белков (разрушение до низкомолекулярных структур, денатурацию, агрегацию и деградацию). Их взаимодействие с другими компонентами пищевого сырья (например, с углеводами, липидами и др.) может привести и к дополнительным модификациям. Таким образом, необходимо осуществить такое воздействие на аллергенные IgE-эпитопы, которое может привести либо к их разрушению, либо модификации или маскировке, и тем самым – к нарушению их способности распознаваться иммуноглобулином E [7].

Из всех вышеперечисленных технологий ферментативный гидролиз является эффективным и специфическим воздействием на аллергенные белки [13]. В результате данного процесса образуются пептиды различной длины и аминокислоты, обладающие низким аллергенным потенциалом, который обусловлен расщеплением в белковых макромолекулах специфических областей – антигенных детерминант [7]. Для этих целей применяются ферменты животного, растительного и микробного (бактериального и грибкового) происхождения (трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин, алкалаза, проназа и др.), а также ферментные препараты (например, «Новозаймс», «Флавозим», «Панкреатин» и др.). Ферменты животного происхождения (пепсин, трипсин, химотрипсин и эластаза поджелудочной железы) эффективно используются для получения пищевых белковых ферментолизатов [14–16].

Гидролиз белков является эффективным методом модификации их функциональных свойств (эмульгирования, вязкости, растворимости, пенообразования и др.). По сравнению с нерасщеплёнными (нативными) белками гидролизаты обладают целым спектром преимуществ: лучше перевариваются, быстрее усваиваются организмом, доступны для питания людей с различными заболеваниями органов пищеварительной системы, имеют более низкую антигенность и обладают широким спектром биологической активности [17, 18].

Выбор протеолитического фермента (или комбинации ферментов) для получения белкового гидролизата зависит от вида целевого продукта, т. е. требуемой степени гидролиза субстрата и условий гидролиза. Могут

быть получены частичные и глубокие гидролизаты. Первые применяются для улучшения функциональных свойств белков, вторые в основном используются в специализированном и лечебном питании. На выбор фермента влияет и структура белкового субстрата. Для снижения антигенности соевого белка используют ферментативный гидролиз в сочетании с различными физико-химическими способами предварительной обработки (термическая обработка при высокой влажности, экструзионная обработка). Также для увеличения степени гидролиза рекомендуется комбинирование нескольких протеаз. В обзоре Е. В. Костылевой и др. отмечается, что при ферментативной обработке соевых бобов наиболее эффективно расщепляли белки до низкомолекулярных пептидов алкалаза, пепсин и папаин [19].

Белки являются предшественниками пептидов, обладающих биологической активностью. Они могут образоваться в организме в процессе пищеварения или при ферментативном расщеплении в результате технологической обработки пищевых продуктов. Они вызывают большой интерес специалистов в области нутрициологии, поскольку обладают целым спектром биологических активностей. В обзорной статье С. Н. Зорина отмечено, что в большинстве работ, касающихся гидролизатов из белков куриного яйца и сои, наибольшее количество упоминаний о наличии у них антиоксидантных, антигипертензивных и иммуномодулирующих свойств [9].

Процессы развития оксидативного стресса и окислительных реакций считаются основной причиной старения и развития дегенеративных заболеваний человека, ухудшения качества продуктов питания. Пептидные антиоксиданты пищевого происхождения имеют широкий спектр источников и высокую активность. Они используются для уменьшения повреждений, вызванных свободными радикалами, смягчения влияния окислительного стресса на организм; а также продления сроков годности продуктов, содержащих липиды, и сохранения их питательных качеств [20]. В настоящее время натуральные антиоксиданты животного и растительного происхождения (гидролизаты белков, пептиды и аминокислоты) активно изучаются. В научной литературе имеются данные о более, чем 100 антиоксидантных пептидов, которые выделены из различных источников, а также получены путем конверсии белков с применением ферментов и/или микроорганизмов [21, 22]. В настоящее время до конца не установлен механизм, с помощью которого пептиды проявляют свои антиоксидантные свойства. Исследованиями установлено, что антиоксидантные пептиды предотвращают окислительные повреждения несколькими путями, к которым относятся: ингибирование свободных радикалов, хелатирование ионов металлов с переменной валентностью, инактивация активных форм кислорода и восстановление гидропероксидов [23, 24]. Пептиды пищевого происхождения, обладающие антиоксидантной активностью, содержат в своей углеродной цепи от 2 до 20 остатков аминокислот, также имеются данные и о более длинных пептидных молекулах [25]. Антиоксидантные свойства таких пептидов связаны с их аминокислотным составом. Часто в них присутствуют такие гидрофобные остатки аминокислот, как лейцин, изолейцин и пролин, а также остатки ароматических аминокислот, например, тирозина [26].

Применение в целях профилактики и лечения окислительных повреждений и связанных с ними патологий биологически активных пептидов с антиоксидантным действием широко изучается. Более 770 пептидных последовательностей с антиоксидантными свойствами зарегистрированы в базе данных BIOPEP [24]. Одной из рекомендацией ВОЗ является увеличение доли потребления пищевых продуктов с антиоксидантными свойствами, так как именно пища является естественным источником этих соединений.

Чтобы быть компонентами для получения гипоаллергенных продуктов гидролизаты должны обладать высокой степенью расщепления белка. Одними из основных характеристик, контролируемых у ферментативных гидролизатов, являются степень гидролиза субстрата и остаточная антигенность – количество нерасщепленного белка, которое сохраняет способность взаимодействовать с антителами. Остаточная антигенность может быть выражена либо в кратности снижения антигенности или быть величиной, обратной кратности снижения. Для определения остаточной антигенности применяют иммуноферментные методы анализа, которые характеризуются высокой чувствительностью, сравнительной дешевизной используемого оборудования и большой производительностью при работе с сериями проб [9].

Частичные гидролизаты, используемые в составе смесей профилактического назначения, содержат пептиды различной длины и минимальное количество свободных аминокислот. Глубокие гидролизаты, являющиеся компонентами продуктов лечебного питания, представлены короткоцепочечными пептидами и аминокислотами. Короткие фрагменты пищевых белков не являются иммуногенными и не обладают аллергенными свойствами. Исключительно смеси аминокислот применяются в тяжелых случаях пищевой аллергии [19].

Исследования авторов С. Д. Жамсарановой и др. посвящены получению ферментолизатов пищевых белков. В частности, с использованием двухстадийного процесса получен ферментативный соевый гидролизат, проведено его гель-фильтрационное хроматографирование, определена антиоксидантная активность полученных трех основных фракций (высоко-, средне- и низкомолекулярной) [27]. Разработаны рабочие параметры получения пептидов яичного белка [28]. Получен гидролизат яичного альбумина с высокой степенью гидролиза и определены его основные функционально-технологические показатели [29]. На основе математических методов планирования эксперимента рассчитаны оптимальные показатели двухстадийного

процесса ферментативной конверсии соевого белка и определена суммарная антиоксидантная активность фракций в процессе гидролиза [30].

Целью настоящего исследования явилась оценка уровня антигенности, сенсибилизирующей активности и антиоксидантных свойств ферментативных гидролизатов яичного и соевого белков.

Объекты и методы исследования

Сырьем для исследований явились протеин соевый – изолят (Китай) и яичный альбумин (Франция). Для проведения гидролиза были использованы протеазы – пепсин («Реахим», Россия) и трипсин («Спофа», Чехия).

Получение гидролизатов яичного альбумина и соевого белка проводили с использованием двухстадийного ферментативного гидролиза ферментами по методике, описанной в предыдущих работах авторов [29, 30].

Органолептические и физико-химические показатели яичного и соевого гидролизатов представлены в таблице 1.

Степень гидролиза (СГ) белка рассчитывали по формуле 1

$$СГ = \frac{(N_{AA} - N_{AA0})}{(N_{OA} - N_{AA0})} \times 100 \quad (1)$$

где N_{OA} – содержание общего азота, %; N_{AA0} – содержание азота в негидролизованном сырье, %; N_{AA} – содержание аминного азота в гидролизате в течение некоторого периода времени, %.

Определение концентрации общего азота проводили с реактивом Несслера по ОФС. 1.7.2.0027.15. Метод основан на способности реактива Несслера давать цветную реакцию с ионами аммония, которые образуются после минерализации белковых продуктов.

Содержание аминного азота в негидролизованном сырье и белковом гидролизате определяли методом формольного титрования (метод Серенса) по ОФС.1.2.3.0022.15. Метод заключается в защите формальдегидом свободных аминогрупп (образование оснований Шиффа) и алкалиметрическом титровании эквивалентного количества карбоксильных групп.

Суммарную антиоксидантную активность гидролизатов оценивали на хроматографе Цвет-Яуза-01-АА (НПО «Химавтоматика», 2012) по ГОСТ Р 54037-2010 амперометрическим методом. Массовую концентрацию антиоксидантов рассчитывали по градуировочному графику зависимости выходного сигнала от концентрации кверцетина. Сущность данного метода состоит в измерении силы тока, который возникает при окислении антиоксидантных молекул на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале, преобразующегося после усиления в цифровой сигнал.

Остаточная антигенность гидролизатов яичного альбумина и соевого белка была определена с использованием тест-систем Эврика AL0206 и AL0202. В основе работы тест-систем лежит метод иммуноферментного анализа в сэндвич-варианте (ОФС.1.7.2.0033.15). Лунки полистиролового планшета покрыты антителами к яичным белкам/или белкам сои. При добавлении в лунки исследуемых и стандартных растворов соответствующие белки связываются на поверхности планшета. В отсутствии этого белка связывания не происходит. После инкубации при комнатной температуре и промывки буфером в лунки добавляли ферментный конъюгат антител, затем следует повторная инкубация и промывка. После этого в лунки вносили субстрат-хромогенную смесь, в которой развивается цветная реакция. На последнем этапе анализа реакцию останавливали, добавляя в лунки стоп-раствор. С помощью фотометра для иммуноферментного метода анализа измеряли оптическую плотность в лунках планшета, величина которой прямо пропорциональна концентрации соответствующих белков в исследуемых растворах. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на программно-аппаратном комплексе Betty. Остаточную антигенность выражали в относительных единицах к исходному белку.

Сравнительное исследование сенсибилизирующей способности образцов было проведено на экспериментальной модели воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа на 50 белых беспородных мышах-самцах массой 18–20 г (согласно Руководству

Таблица 1. Физико-химические показатели яичного и соевого гидролизатов

Table 1. Physical and chemical parameters of egg and soy hydrolysates

Показатель	Характеристика	
	Яичный гидролизат	Соевый гидролизат
Внешний вид	Однородная жидкость	Однородная жидкость
Цвет	Молочный прозрачный	Светло-желтый
Вкус	Без вкуса	Без вкуса
Запах	Без запаха	Без запаха
Содержание сухих веществ, %	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Содержание влаги, %	98,0 ± 0,8	98,0 ± 0,8
Плотность, г/мл	0,999 ± 0,004	0,999 ± 0,004
pH	7,9 ± 0,1	7,8 ± 0,1
Содержание белка, мг/мл	3,85 ± 0,05	4,05 ± 0,05

по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая, 2012). Экспериментальные группы формировали с учетом в качестве определяющего показателя массы тела мышей (≤ 10 %) методом случайной выборки. Было сформировано 5 групп: 1 группа – контрольная; 2 группа – яичный альбумин; 3 группа – гидролизат яичного альбумина; 4 группа – соевый белок; 5 группа – гидролизат соевого белка.

Внутрикожное введение исследуемых препаратов проводили микрошприцом (в основание хвоста) в дозе 300 мкг (в расчете на белок) в смеси 1:1 с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) в объеме по 0,06 см^3 на животное, однократно. Животным контрольной группы аналогичным образом вводили смесь физиологического раствора и ПАФ.

Сенсибилизацию выявляли на 6-е сутки эксперимента путем постановки провокационной пробы – внутрикожного теста опухания лапы. Сущность метода заключалась во введении в подушечку (под апоневроз) задней коллатеральной лапы животных опытных групп препаратов в дозе по 400 мкг (при объеме 0,04 см^3). Животным контрольной группы в том же объеме вводили физиологический раствор. Учет результатов реакции проводили, рассчитывая разницу результатов измерения толщины тестированной лапы животных опытных и контрольной групп микрометром через 24 ч после введения на месте провокационной пробы с точностью измерения до 10–2 мм. Также дополнительно результаты выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа определяли по массе лап, массе и клеточности подколенных лимфатических узлов.

Рассчитывали индекс реакции (ИР) по формуле 2

$$ИР = \frac{П_{оп.} - П_{к.}}{П_{к.}} \times 100 \qquad (2)$$

где $П_{к.}$ – показатель контрольной лапы (или лимфоузла); $П_{оп.}$ – показатель опытной лапы (или лимфоузла).

Эксперименты на животных были проведены в виварии ФГБОУ ВО «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления».

Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с международными морально-этическими нормами, согласно требованиям «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, а также Приказом Минздрава России №199н от 1.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Оборудование помещений и организация процедур осуществлены в соответствии с правилами ГОСТ 33215-2014, содержание и уход за животными с ГОСТ 33216-2014.

В период подготовки к эксперименту мыши прошли карантин и адаптацию к обстановке в виварии. При проведении эксперимента осуществляли ежедневное наблюдение за общим состоянием животных, потреблением ими корма и воды.

Мыши были размещены по 10 особей в отдельные клетки соответствующего размера и находились на одинаковом (стандартном) рационе при свободном доступе к пище и воде. Световой режим в условиях вивария был обеспечен сменой освещения «день/ночь» каждые 12 ч. Температура воздуха составляла 20–25 °С, относительная влажность 60–70 %.

Мышей выводили из эксперимента цервикальной дислокацией.

Протокол исследования был одобрен на заседании этической комиссии.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали с применением расчета средних значений (M), стандартной ошибки среднего (m) и параметрического критерия оценки (t-критерия Стьюдента). Результаты считали достоверными при достижении уровня значимости различий ($p \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Исследуемые пищевые белки (яичный альбумин и соевый протеин) широко используются в качестве ингредиентов при производстве многих продуктов питания.

Применение таких ферментов, как пепсин и трипсин, для проведения процесса гидролиза практически повторяет (моделирует) естественный пищеварительный процесс в организме, что, в свою очередь, позволяет в дальнейшем использовать полученные гидролизаты в составе продуктов питания [31]. Также отмечено, что использование данных протеаз позволяет создавать четко определенные, эффективные и безопасные, пептидные профили [24, 32]. Немаловажным фактором является также доступность данных ферментов на российском рынке.

Одними из основных контролируемых характеристик ферментативных гидролизатов является степень гидролиза субстрата и остаточная антигенность. А среди спектра биологической активности гидролизатов важным показателем является их антиоксидантная активность.

Был проведен анализ степени гидролиза, суммарной антиоксидантной активности и остаточной антигенности яичного и соевого ферментолизатов. Полученные данные представлены в таблицах 2 и 3.

Из данных, представленных в таблице 2, следует, что через 2 ч ферментолиза (2 группа) средняя степень гидролиза составила 46,1 % при максимальной суммарной антиоксидантной активности 170,2 мг/100 мл, а в конце процесса ферментолиза (3 группа) средняя степень гидролиза возросла в 1,8 раза (82,6 %), но показатель суммарной антиоксидантной активности снизился в 1,5 раза (114,3 мг/100 мл). Концентрация антител к яичным белкам через 2 ч ферментолиза снижалась незначительно (в 5,2 раза), остаточная антигенность составила $1,94 \times 10^{-1}$ отн.ед., а после окончания процесса (через 8 ч) – в 6438 раз и остаточная антигенность составила

Таблица 2. Остаточная антигенность, степень гидролиза и суммарная антиоксидантная активность яичного гидролизата (M ± m)

Table 2. Residual antigenicity, degree of hydrolysis, and total antioxidant activity of egg hydrolysate (M ± m)

№ п/п	Наименование образца	Концентрация антител к яичным белкам, мг/л (M ± m)	Остаточная антигенность, отн.ед. (min-max)	Степень гидролиза, %	Суммарная антиоксидантная активность, мг/100 мл
1	Раствор яичного альбумина	$1{,}03 \pm 0{,}10\times10^{5}$	1	0	17,8 ± 1,1
2	Яичный гидролизат через 2 ч гидролиза (промежуточный продукт)	$2{,}00 \pm 0{,}02\times10^{4}$[a]	$1{,}94\times10^{-1}$ ($1{,}92–1{,}96\times10^{-1}$)	46,1 ± 2,3[a]	170,2 ± 9,0[a]
3	Яичный гидролизат через 8 ч гидролиза (конечный продукт)	$1{,}60 \pm 0{,}16\times10$[a,b]	$1{,}55\times10^{-4}$ ($1{,}40–1{,}71\times10^{-4}$)	82,6 ± 4,1[a,b]	114,3 ± 6,2[a,b]

Примечание: [a] – достоверные отличия относительно 1 экспериментальной группы ($p \le 0{,}01$), [a,b] – достоверные отличия относительно 1 и 2 экспериментальных групп ($p \le 0{,}01$).

Note: [a] – significant differences relative to experimental group 1 ($p \le 0{,}01$), [a,b] – significant differences relative to experimental groups 1 and 2 ($p \le 0{,}01$).

Таблица 3. Остаточная антигенность, степень гидролиза и суммарная антиоксидантная активность соевого гидролизата (M ± m)

Table 3. Residual antigenicity, degree of hydrolysis, and total antioxidant activity of soybean hydrolysate (M ± m)

№ п/п	Наименование образца	Концентрация антител к сое, мг/л (M ± m)	Остаточная антигенность, отн.ед. (min-max)	Степень гидролиза, %	Суммарная антиоксидантная активность, мг/100 мл
1	Раствор соевого альбумина	$0{,}40 \pm 0{,}03\times10^{5}$	1	0	19,0 ± 1,3
2	Соевый гидролизат через 5 ч гидролиза (промежуточный продукт)	$0{,}48 \pm 0{,}04\times10^{3}$[a]	$1{,}20\times10^{-2}$ ($1{,}10–1{,}30\times10^{-2}$)	60,5 ± 2,7[a]	249,4 ± 12,4[a]
3	Соевый гидролизат через 8 ч гидролиза (конечный продукт)	$1{,}32 \pm 0{,}07\times10$[a,b]	$3{,}30\times10^{-4}$ ($3{,}13–3{,}48\times10^{-4}$)	88,3 ± 4,4[a,b]	91,4 ± 4,6[a,b]

Примечание: [a] – достоверные отличия относительно 1 экспериментальной группы ($p \le 0{,}01$), [a,b] – достоверные отличия относительно 1 и 2 экспериментальных групп ($p \le 0{,}01$).

Note: [a] – significant differences relative to experimental group 1 ($p \le 0{,}01$), [a,b] – significant differences relative to experimental groups 1 and 2 ($p \le 0{,}01$).

$1{,}55\times10^{-4}$ отн.ед. Таким образом, в процессе гидролиза яичного альбумина возрастала степень его гидролиза и уменьшались показатели концентрации антител к яичным белкам и остаточная антигенность. Показатель суммарной антиоксидантной активности достигал максимального значения через 2 ч гидролиза.

Из данных, представленных в таблице 3, следует, что через 5 ч ферментолиза (2 группа) степень гидролиза составила 60,5 % при максимальной суммарной антиоксидантной активности 249,4 мг/100 мл, а в конце процесса ферментолиза (3 группа) средняя степень гидролиза возросла в 1,5 раза (88,3 %), но при этом показатель суммарной антиоксидантной активности снизился в 2,7 раза (91,4 мг/100 мл). Концентрация антител к сое через 5 ч процесса ферментолиза снижалась в 83,3 раза и остаточная антигенность составила $1{,}20\times10^{-2}$ отн.ед., а после окончания процесса (через 8 ч) – в 3030 раз и остаточная антигенность составила $3{,}30\times10^{-4}$ отн.ед. Таким образом, в процессе гидролиза соевого альбумина, аналогично яичному альбумину, возрастала степень его гидролиза и уменьшались показатели концентрации антител к сое и остаточная антигенность. Показатель суммарной антиоксидантной активности достигал максимального значения через 5 ч гидролиза.

Таким образом, несмотря на среднюю степень гидролиза и высокую суммарную антиоксидантную активность у яичного гидролизата через 2 ч, а у соевого – через 5 ч гидролиза концентрация антител к обеим белкам и остаточная антигенность оставались высокими. Только через 8 ч процесса ферментолиза остаточная антигенность составила 10^{-4} отн.ед.

В работах автора С. Н. Зорина с соавторами был получен гидролизат белка куриного яйца сочетанием протеолиза ферментом алкалазой и ультрафильтрации, что позволило снизить исходную антигенность гидролизата в $9{,}9\times10^4$ раз, а при повторной ультрафильтрации – еще в 5 раз [8].

В соответствии с литературными данными показатель остаточной антигенности частичных гидролизатов, используемых в продуктах профилактического назначения, должен составлять $\geq 10^{-3}$ отн.ед., тогда как для глубоких гидролизатов, являющихся компонентом продуктов лечебного питания, –10–6–10^{-4} отн.ед., что в 10^4–10^6 раз меньше, чем у нативных белков [33].

По мнению других авторов, для ферментативных гидролизатов пищевых белков в составе профилактических пищевых продуктов снижение антигенности лежит в пределах 10^{-4}–10^{-5} от исходного белка, что считается средней степенью гидролиза [9].

Несомненно, большой теоретический и практический интерес представляет установленная высокая антиоксидантная активность яичного и соевого гидролизатов. В этой связи, представляет интерес выявление и характеристика пептидов, обуславливающих их антиоксидантную активность. Например, в работе S. Benedé и E. Molina описано, что 3-часовой протеолиз яичного белка с использованием пепсина при соотношении фермент:субстрат 1:100, pH 2 и 37 °C и позволил получить пептидную фракцию с молекулярной массой ниже 3 кДа. Было установлено, что по сравнению с нативным яичным белком данная фракция обладала в 3 раза большей антиоксидантной активностью. Также были идентифицированы четыре пептида овальбумина, антиоксидантная активность которых была обусловлена присутствием тирозина на N-конце [23].

Кроме последовательности аминокислот, на антиоксидантную активность пептидов может также влиять молекулярная масса. Например, M. Akbarian и др. установили, что максимальная антиоксидантная активность гидролизованного белка кукурузного глютена находилась в интервале молекулярных масс от 0,5 до 1,5 кДа. Также было показано, что с дальнейшим увеличением степени гидролиза антиоксидантная активность пептидов уменьшалась. Этот процесс обусловлен дальнейшим расщеплением пептидов до свободных аминокислот, обладающих значительно меньшей антиоксидантной активностью [31].

Исследование испытуемых средств на аллергенность включает в себя аллергодиагностику *in vivo*. Под аллергизирующими свойствами понимают способность того или иного вещества вызывать при введении в организм состояние повышенной чувствительности (гиперчувствительности, сенсибилизации). Поэтому было проведено сравнительное исследование сенсибилизирующей способности яичного альбумина, соевого белка и их гидролизатов на экспериментальной модели гиперчувствительности замедленного типа на белых мышах (табл. 4).

Из данных, представленных в таблице 4, следует, что исследуемые белки – яичный альбумин (2 группа) и соевый белок (4 группа) обладали высокими аллергизи-

Таблица 4. Показатели гиперчувствительности замедленного типа у белых мышей при введении яичного альбумина, соевого белка и их гидролизатов (M ± m, n = 50)

Table 4. Indicators of delayed-type hypersensitivity in white mice administered with egg albumin, soy protein, and their hydrolysates (M ± m, n = 50)

№ гр.	Образец	$ИР_1$ (по объему лапок), M ± m, t, p	$ИР_2$ (по массе лапок), M ± m, t, p	$ИР_3$ (по массе лимфоузлов), M ± m, t, p	$ИР_4$ (по клеточности лимфоузлов), M ± m, t, p
1	Контроль	+ реакция 20 % 0,49 ± 0,01	+ реакция 100 % 5,14 ± 0,85	+ реакция 100 % 9,64 ± 0,76	+ реакция 100 % 14,46 ± 1,74
2	Яичный альбумин	+ реакция 100 % 4,46 ± 0,57 $t_1 = 6{,}96$; $p_1 \leq 0{,}001$	+ реакция 90 % 22,28 ± 2,96 $t_1 = 5{,}57$; $p_1 \leq 0{,}001$	+ реакция 90 % 53,90 ± 2,62 $t_1 = 16{,}22$; $p_1 \leq 0{,}001$	+ реакция 100 % 46,83 ± 2,51 $t_1 = 10{,}60$; $p_1 \leq 0{,}001$
3	Гидролизат яичного альбумина (конечный продукт)	+ реакция 20 % 0,72 ± 0,01 $t_1 = 16{,}31$; $p_1 \leq 0{,}001$ $t_2 = 6{,}56$; $p_2 \leq 0{,}001$	+ реакция 30 % 6,16 ± 0,54 $t_1 = 1{,}01$; p_1 не дост. $t_2 = 5{,}36$; $p_2 \leq 0{,}001$	+ реакция 70 % 21,25 ± 2,17 $t_1 = 5{,}05$; $p_1 \leq 0{,}001$ $t_2 = 9{,}60$; $p_2 \leq 0{,}001$	+ реакция 100 % 26,60 ± 1,17 $t_1 = 5{,}79$; $p_1 \leq 0{,}001$ $t_2 = 7{,}31$; $p_2 \leq 0{,}001$
4	Соевый белок	+ реакция 100 % 3,27 ± 0,30 $t_1 = 29{,}14$; $p_1 \leq 0{,}001$ $t_2 = 1{,}85$; p_2 не дост.	+ реакция 100 % 18,82 ± 1,86 $t_1 = 6{,}69$; $p_1 \leq 0{,}001$ $t_2 = 0{,}99$; p_2 не дост.	+ реакция 100 % 58,23 ± 1,19 $t_1 = 34{,}41$; $p_1 \leq 0{,}001$ $t_2 = 1{,}50$; p_2 не дост.	+ реакция 100 % 56,76 ± 1,22 $t_1 = 19{,}90$; $p_1 \leq 0{,}001$ $t_2 = 3{,}56$; $p_2 \leq 0{,}01$
5	Гидролизат соевого белка (конечный продукт)	+ реакция 20 % 0,72 ± 0,01 $t_1 = 16{,}31$; $p_1 \leq 0{,}001$ $t_4 = 8{,}50$; $p_4 \leq 0{,}001$	+ реакция 80 % 7,75 ± 0,86 $t_1 = 2{,}16$; p_1 не дост. $t_4 = 5{,}40$; $p_4 \leq 0{,}001$	+ реакция 90 % 24,26 ± 2,24 $t_1 = 6{,}18$; $p_1 \leq 0{,}001$ $t_4 = 13{,}39$; $p_4 \leq 0{,}001$	+ реакция 100 % 28,70 ± 2,20 $t_1 = 5{,}08$; $p_1 \leq 0{,}001$ $t_4 = 11{,}15$; $p_4 \leq 0{,}001$

рующими свойствами (по сравнению с 1 – контрольной группой), так как вызывали индукцию гиперчувствительности замедленного типа у 90–100 % подопытных животных и достоверно увеличивая показатели $ИР_1$–$ИР_4$ (объем и масса лапок, масса и клеточность лимфоузлов) ($p \leq 0{,}001$). Для яичного альбумина увеличение $ИР_{1–4}$ составило 9,1, 4,3, 5,6 и 3,2 раза (в среднем 5,6 раза), для соевого белка – 6,7, 3,7, 6,0 и 3,9 раза (в среднем 5,1 раза) соответственно.

Гидролизаты обоих белков (3 и 5 группы) обладали невысокими аллергизирующими свойствами, хотя $ИР_{1,3,4}$ достоверно превышали контрольные показатели (1 группа) ($p \leq 0{,}001$). Гидролизат яичного альбумина (3 группа) по сравнению с яичным альбумином (2 группа) имел более низкие $ИР_{1–4}$, снижая их в 6,2, 3,6, 2,5 и 1,8 раз (в среднем в 3,5 раза) соответственно. Аналогичная зависимость характерна и для гидролизата соевого белка (5 группа), который, по сравнению с соевым белком (4 группа), снижал $ИР_{1–4}$ в 3,5, 2,4, 2,4 и 2,0 раза (в среднем в 2,6 раза) соответственно.

Таким образом, данные реакции гиперчувствительности замедленного типа свидетельствуют о снижении сенсибилизирующей способности гидролизатов яичного и соевого белков по сравнению с исходными белками.

В настоящее время для снижения аллергенности используется множество методов, в том числе, физических (нагревание, ультразвук, высокое гидростатическое давление, холодная плазма, импульсное электрическое поле и импульсное ультрафиолетовое излучение), химических (связывание полифенолов, гликозилирование) и биологических (ферментация, ферментативное сшивание и ферментативный гидролиз).

В обзоре L. Pang и др. отмечается, что ферментативный гидролиз широко используется для снижения аллергенности пищевых аллергенов и в зависимости от молекулярной массы гидролизата их можно разделить на частично гидролизованные (пептиды < 5 кДа, распределение по размерам: 3–10 кДа) или глубоко гидролизованные (< 3 кДа). Между тем, в качестве пищевого сырья используются гидролизованные белки с низкой аллергенностью, поскольку они обладают отличными технологическими характеристиками и хорошей биологической активностью при производстве различных пищевых продуктов. Однако сам по себе ферментативный гидролиз не может полностью устранить аллергенность, а это означает, что его применение ограничено. Альтернативно, комбинация ферментативного гидролиза и физической или химической обработки повышает эффективность ферментативного гидролиза, поскольку она улучшает ферментативную доступность и позволяет ферменту гидролизовать больше аллергенных эпитопов [34].

В последние десятилетия для снижения иммунореактивности пищевых аллергенов также использовался метод ферментативного сшивания. Как отмечают авторы I. Ahmed и др., это новый нетермический метод, который может служить альтернативой традиционным подходам к обработке пищевого сырья при разработке гипоаллергенных пищевых продуктов благодаря их преимуществам, заключающимся в высокой специфичности и селективности. Ферментативное сшивание с помощью тирозиназы (TYR), лакказы (LAC), пероксидазы (PO) и трансглутаминазы (TG) изменяет структурные и биохимические свойства пищевых аллергенов, что впоследствии вызывает денатурацию или маскирование антигенных эпитопов. LAC, TYR и PO катализируют окисление боковых цепей тирозина, инициируя сшивание белка, тогда как TG инициирует изопептидную связь между остатками лизина и глутамина. Ферментативная обработка дает высокомолекулярный сшитый полимер с пониженной иммунореактивностью и потенциалом связывания IgE. Сшитые аллергены дополнительно ингибируют дегрануляцию тучных клеток из-за более низкого иммуностимулирующего потенциала, что способствует уравновешиванию иммунобаланса Т-хелперов (Th1/Th2) [35].

Процесс ферментации пищевых продуктов различными микроорганизмами, естественным образом присутствующими или добавленными в субстрат в качестве заквасок, также является эффективным методом как для получения пептидов с антиоксидантной активностью, так и для снижения аллергенности многих компонентов пищевых продуктов растительного и животного происхождения. Как отмечают K. E. Mecherfi и др. El ключевым моментом для лучшего понимания протеолитических процессов в ферментированных пищевых продуктах является идентификация образующихся пептидов [36].

Выводы

Рост заболеваемости пищевой аллергией требует разработки эффективных и безопасных терапевтических и пищевых стратегий. В настоящее время широко применяемым методом снижения аллергенности пищевых продуктов, получения гипоаллергенных компонентов для их рецептуры является ферментативный гидролиз.

В результате исследования проведена оценка остаточной антигенности, сенсибилизирующих свойств и суммарной антиоксидантной активности ферментативных гидролизатов яичного альбумина и соевого белка.

Полученные с использованием пепсина и трипсина гидролизаты яичного альбумина и соевого белка характеризовались степенью гидролиза 82–88 %, а суммарная антиоксидантная активность составила 114,3 и 91,4 мг/100 мл соответственно.

Установлено, что гидролизаты яичного альбумина и соевого белка обладали низкой остаточной антигенностью (10^{-4}) и невысокой сенсибилизирующей способностью, что обуславливает снижение их аллергенной активности по сравнению с таковой у нативных белков в среднем в 3–4 раза.

Полноценное питание является основой жизнедеятельности организма человека и важным фактором снижения рисков развития многих заболеваний. Именно

оно обеспечивает активное долголетие и адаптационный потенциал организма. Однако в настоящее время пищевая промышленность не может удовлетворить в полной мере потребность в гипоаллергенных и специализированных продуктах. Предполагается, что полученные ферментативные гидролизаты яичного альбумина и соевого белка могут быть использованы в качестве гипоаллергенного компонента с антиоксидантными свойствами при разработке пищевых продуктов функционального назначения.

Перспективной идеей является создание комплексных гипоаллергенных продуктов питания массового потребления, все компоненты которых были бы гипоаллергенными. Однако большинство исследователей и производителей в настоящее время находятся на стадии разработки алгоритмов создания гипоаллергенных продуктов для их применения в будущем.

Критерии авторства

Авторы в равной степени принимали участие в исследованиях и оформлении рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

All the authors contributed equally to the study and bear equal responsibility for information published in this article.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Sampath V, Abrams EM, Adlou B, Akdis C, Akdis M, Brough H, *et al.* Food Allergy Across the Globe. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2021;148(6):1347–1364. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.10.018

2. Revyakina VA. The Problem of Food Allergies at the Present Stage. Problems of Nutrition. 2020;89(4):186–192. (In Russ.). https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10052; https://www.elibrary.ru/IAVQHX

3. Chittoor RI, Saraswathi HTB. A Review of Naturally Occuring Food Allergens and Their Impact on Health. Biosciences Biotechnology Research Asia. 2022;19(1):13–35. https://doi.org/10.13005/bbra/2965

4. Dolganyuk V, Sukhikh S, Kalashnikova O, Ivanova S, Kashirskikh E, Prosekov A, *et al*. Food Proteins: Potential Resources. Sustainability. 2023;15(7):5863. https://doi.org/10.3390/su15075863

5. Fedotova MM, Fedorova OS, Konovalova UV, Kamaltynova EM, Nagaeva TA Ogorodova LM. Hen's Egg Allergy: An Update. Bulletin of Siberian Medicine. 2018;17(2):156–166. https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-2-156-166; https://www.elibrary.ru/UTINVZ

6. Monaci L, Pilolli R, de Angelis E, Crespo JF, Novak N, Cabanillas B. Food Allergens: Classification, Molecular Properties, Characterization, and Detection in Food Sources. Advances in Food and Nutrition Research. 2020;93:113–146. https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.03.001

7. Gromov DA, Borisova AV, Bakharev VV. Food Allergens and Methods for Producing Hypoallergenic Foods. Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(2):232–247. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-232-247; https://elibrary.ru/MHOLPD

8. Zorin SN, Sidorova YuS, Mazo VK. Enzymatic Hydrolysates of Whey Protein and Chicken Egg Ppotein: Production, Physical-Chemical and Immunochemical Characteristics. Problems of Nutrition. 2020;89(1):64–68. (In Russ.). https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10007; https://elibrary.ru/EYXSNG

9. Zorin SN. Enzymatic Hydrolysates of Food Proteins for Specialized Foods for Therapeutic and Prophylactic Nutrition. Problems of Nutrition. 2019;88(3):23–31. (In Russ.). https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10026; https://elibrary.ru/JMLHXW

10. Clare Mills EN, Sancho AI, Rigby NM, Jenkins JA, Mackie AR. Impact of Food Processing on the Structural and Allergenic Properties of Food Allergens. Molecular Nutrition and Food Research. 2009;53(8):963–969. https://doi.org/10.1002/mnfr.200800236

11. Mahler V, Goodman RE. Definition and Design of Hypoallergenic Foods. In: Kleine-Tebbe J, Jakob T, editors. Molecular Allergy Diagnostics. Innovation for a Better Patient Management. Cham: Springer; 2017. pp. 487–511. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42499-6_27

12. Verhoeckx KCM, Vissers YM, Baumert JL, Faludi R, Feys M, Flanagan S, *et al*. Food Processing and Allergenicity. Food and Chemical Toxicology. 2015;80:223–240. https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.005

13. Prikhodko DV, Krasnoshtanova AA. Using casein and gluten protein fractions to obtain functional ingredients. Foods and Raw Materials. 2023;11(2):223–231. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-2-569

14. Rahaman T, Vasiljevic T, Ramchandran L. Effect of Processing on Conformational Changes of Food Proteins Related to Allergenicity. Trends in Food Science and Technology. 2016;49:24–34. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.001

15. Andjelkovic U. Food Allergy and Food Allergens. In: Cifuentes A, editor. Comprehensive Foodomics. Elsevier; 2021. pp. 154–174. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22844-8

16. Semenova ES, Simonenko ES, Simonenko SV, Zorin SN, Petrov NA, Mazo VK. Study of the Process of Hydrolysis of Milk Proteins Using Enzyme Preparations of Domestic and Production. Food Systems. 2023;6(2):224–232. (In Russ.). https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-2-224-232; https://elibrary.ru/VQTKGN

17. Sviridenko YuYa, Myagkonosov DS, Abramov DV, Ovchinnikova EG. Theoretical and Practical Aspects of Development Technology of Manufacturing Protein Hydrolyzates for Special Nutrition Use. Part 1. Technology of Production and Technical Characteristics of Hydrolysates. Food Industry. 2017;(5):48–51. (In Russ.). [Свириденко Ю.Я., Мягконосов Д.С., Абрамов Д.В., Овчинникова Е. Г. Научно-методические подходы к развитию технологии белковых гидролизатов для специального питания. Ч. 1. Технология производства и технические характеристики гидролизатов // Пищевая промышленность. 2017. № 5. С. 48–51.] https://elibrary.ru/YPIXGD

18. Sviridenko YuYa, Myagkonosov DS, Abramov DV, Ovchinnikova EG, Simonenko SV, Antipova TA. Technological Methods for Improving the Functional Properties of Hydrolysates for Specialized and Infant Nutrition. Food Industry. 2020;(10):12–17. (In Russ.). https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10113; https://elibrary.ru/MXLHHE

19. Kostyleva EV, Sereda AS, Velikoretskaya IA, Kurbatova EI, Tsurikova NV. Proteases For Obtaining of Food Protein Hydrolysates from Proteinaceous By-Products. Problems of Nutrition. 2023;92(1):116–132. (In Russ.). https://doi.org/10.33029/0042-8833-2023-92-1-116-132; https://elibrary.ru/PUGROG

20. Pan M, Liu K, Yang J, Liu S, Wang S, Wang S. Advances on Food-Derived Peptidic Antioxidants – A Review. Antioxidants. 2020;9(9):799. https://doi.org/10.3390/antiox9090799

21. Dziuba M, Darewicz M. Food Proteins as Precursors of Bioactive Peptides – Classification into Families. Food Science and Technology International. 2007;13(6):393–404. https://doi.org/10.1177/1082013208085933

22. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative Peptides from Food Proteins: A Review. Peptides. 2010;31(10):1949–1956. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020

23. Benedé S, Molina E. Chicken Egg Proteins and Derived Peptides with Antioxidant Properties. Foods. 2020;9(6):735. https://doi.org/10.3390/foods9060735

24. López-García G, Dublan-García O, Arizmendi-Cotero D, González-Olivan LM. Antioxidant and Antimicrobial Peptides Derived from Food Proteins. Molecules. 2022;27(4):1343. https://doi.org/10.3390/molecules27041343

25. Du Z, Li Y. Review and Perspective on Bioactive Peptides: A Roadmap for Research, Development, and Future Opportunities. Journal of Agriculture and Food Research. 2022;9:100353. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100353

26. Wong F-C, Xiao J, Wang S, Ee K-Y, Chai T-T. Advances on the Antioxidant Peptides from Edible Plant Sources. Trends in Food Science and Technology. 2020;99:44–57. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.012

27. Zhamsaranova SD, Lebedeva SN, Bolkhonov BA, Sokolov DV. Enzymatic Food Protein Conversion and Assessment of Antioxidant Activity of Peptides. ESSUTM Bulletin. 2021;(4):5–14. (In Russ.). https://doi.org/10.53980/24131997_2021_4_5; https://elibrary.ru/TNSCKR

28. Bolkhonov BA, Sokolov DV, Zhamsaranova SD, Lebedeva SN, Qian Ch. Selection of Working Parameters for the Production of Egg Protein Peptides. ESSUTM Bulletin. 2022;(4):15–23. (In Russ.). https://doi.org/10.53980/24131997_2022_4_15; https://elibrary.ru/UICXSZ

29. Zhamsaranova SD, Lebedeva SN, Bolkhonov BA, Sokolov DV, Bazhenova BA. Hydrolysate of Ovalbumin: Production and Evaluation of the Functional Properties of Peptides. Theory and Practice of Meat Processing. 2023;8(1):34–42. https://doi.org/10.21323/2414-438X-2023-8-1-34-42; https://elibrary.ru/EQUMSB

30. Sokolov DV, Bolkhonov BA, Zhamsaranova SD, Lebedeva SN, Bazhenova BA. Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(1):86–96. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2418; https://elibrary.ru/DHXSAX

31. Akbarian M, Khani A, Eghbalpour S, Uversky VN. Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(3):1445. https://doi.org/10.3390/ijms23031445

32. Manzoor M, Singh J, Gani A. Exploration of Bioactive Peptides from Various Origin as Promising Nutraceutical Treasures: *In Vitro*, *In Silico* and *In Vivo* Studies. Food Chemistry. 2021;373:131395. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131395

33. Aider M. Potential Applications of Ficin in The Production of Traditional Cheeses and Protein Hydrolysates. JDS Communications. 2021;2(5):233–237. https://doi.org/10.3168/jdsc.2020-0073

34. Pang L, Liu M, Li X, Guo L, Man C, Yang X, *et al.* Effect of Enzymatic Hydrolysis Combined with Processing on Allergenicity of Food Allergens. Trends in Food Science and Technology. 2024;143:104248 https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104248

35. Ahmed I, Chen H, Li J, Wang B, Li Z, Huang G. Enzymatic Crosslinking and Food Allergenicity: A Comprehensive Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2021;20(6):5856–5879. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12855

36. El Mecherfi K-E, Todorov SD, de Albuquerque MAC, Denery-Papini S, Lupi R, Haertlé T, *et al.* Allergenicity of Fermented Foods: Emphasis on Seeds Protein-Based Products. Foods. 2020;9(6):792. https://doi.org/10.3390/foods9060792