




## Оценка кинетических параметров протеолиза сывороточных белков в УФ-концентрате подсырной сыворотки

Елена И. Мельникова<sup>1</sup>[melnikova@molvest.ru](mailto:melnikova@molvest.ru) 0000-0002-3474-2534Екатерина В. Богданова<sup>1</sup>[ek-v-b@yandex.ru](mailto:ek-v-b@yandex.ru) 0000-0001-5053-2273<sup>1</sup> Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия

**Аннотация.** Цель работы – обоснование выбора ферментных препаратов Promod 523MDP, Promod 439L, Flavorpro 766MDP, Flavorpro 750MDP (производитель – Biocatalysts Limited, Великобритания) и определение эффективного времени гидролиза сывороточных белков в ультрафильтрационном концентрате (УФ-концентрате) подсырной сыворотки для снижения их аллергенности на основании анализа кинетических констант реакции протеолиза. Экспериментальные исследования проводили с образцами УФ-концентрата подсырной сыворотки с массовой долей общего белка не менее 3,0%, полученными на промышленной ультрафильтрационной установке MMS Swissflow UF с керамическими мембранами в условиях ПАО МК «Воронежский». Предварительно их подвергали ферментативному гидролизу в течение 8 ч при постоянной температуре, исходя из данных по дозировке, оптимума pH и температуры используемых ферментов, рекомендованных производителем. Для оценки эффективности действия применяемых ферментных препаратов использовали константу «специфичности»  $V_{max}/K_m$ , характеризующую константы всех стадий реакции гидролиза. Сделан вывод о том, что изученные ферментные препараты с достаточной эффективностью могут быть использованы для гидролиза сывороточных белков УФ-концентрата подсырной сыворотки. Наиболее высокой скоростью протеолиза характеризуется смесь Promod 439L и Flavorpro 766MDP в соотношении 1,5 и 3,0% соответственно от общего содержания белка в субстрате. По результатам микроскопирования доказано увеличение растворимости азотсодержащих компонентов после гидролиза вследствие уменьшения на поверхности пептидов гидрофобных участков. Полученный гидролизат может быть реализован в технологии широкого ассортимента молочных и кисломолочных продуктов для снижения их остаточной антигенности путем частичной замены в рецептуре обезжиренного молока.

**Ключевые слова:** протеолиз, скорость гидролиза, константа специфичности, снижение аллергенности, сывороточные белки

## Estimation of the kinetic parameters of whey proteins proteolysis in the UF-concentrate of cheese whey

Elena I. Melnikova<sup>1</sup>[melnikova@molvest.ru](mailto:melnikova@molvest.ru) 0000-0002-3474-2534Ekaterina V. Bogdanova<sup>1</sup>[ek-v-b@yandex.ru](mailto:ek-v-b@yandex.ru) 0000-0001-5053-2273<sup>1</sup> Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia

**Abstract.** The purpose of the research is to substantiate the choice of enzyme preparations Promod 523MDP, Promod 439L, Flavorpro 766MDP, and Flavorpro 750MDP (Biocatalysts Limited, UK) and to determine the effective time of whey proteins hydrolysis in an ultrafiltration concentrate (UF-concentrate) of cheese whey for reducing their allergenicity based on the analysis of kinetic constants of the proteolysis reaction. Experimental studies were carried out with samples of cheese whey UF-concentrate with a total protein mass fraction at least 3.0% obtained with the use of industrial ultrafiltration unit MMS Swissflow UF with ceramic membranes under the conditions of the PSC Dairy Plant “Voronezhskii”. They were preliminarily subjected to enzymatic hydrolysis for 8 hours at a constant temperature, based on the dosage data, the optimum pH and the temperature of the used enzymes, recommended by the manufacturer. The specificity constant  $V_{max}/K_m$  was used to estimate the effectiveness of the enzyme preparations, which characterizes the constants of all stages of the hydrolysis reaction. The highest proteolysis rate has a mixture of Promod 439L and Flavorpro 766MDP in the ratio of 1.5 and 3.0%, respectively, of the total protein content in the substrate. Microscopy results showed an increasing in the solubility of nitrogen-containing components after hydrolysis due to a decreasing in hydrophobic areas on the surface of peptides. The resulting hydrolysate can be applied in the technology of a wide range of dairy products to reduce their residual antigenicity by partially replacing skim milk in the formulation.

**Keywords:** proteolysis, hydrolysis rate, specificity constant, decreased allergenicity, whey proteins

### Введение

Белки имеют важное значение в пищевом рационе человека, поэтому их получают из различных сырьевых источников и применяют при производстве продуктов питания. Однако ассортиментные группы пищевых продуктов для обогащения зачастую ограничены свойствами, которыми характеризуются белки.

Для цитирования

Мельникова Е.И., Богданова Е.В. Оценка кинетических параметров протеолиза сывороточных белков в УФ-концентрате подсырной сыворотки // Вестник ВГУИТ. 2020. Т. 82. № 4. С. 107–112. doi:10.20914/2310-1202-2020-4-107-112

Их направленное изменение возможно посредством различных способов, одним из которых является ферментативный гидролиз. Этот способ широко используется в пищевой промышленности, особенно при получении низкоаллергенных заменителей грудного молока и хорошо растворимых пептидных фракций для обогащения различных пищевых продуктов [1, 2, 3].

For citation

Melnikova E.I., Bogdanova E.V. Estimation of the kinetic parameters of whey proteins proteolysis in the UF-concentrate of cheese whey. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2020. vol. 82. no. 4. pp. 107–112. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2020-4-107-112

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License

Микробиологические протеазы охватывают широкий спектр ферментов, воздействующих на пептидные связи в молекулах белков и пептидов [4]. Некоторые из них способны разрывать только специфические связи между определенными  $\alpha$ -аминокислотами на N- или C-терминальных участках или внутри пептидных цепей. При этом важное значение для проведения направленного протеолиза представляет совместное использование эндо- и экзопептидаз. Первые участвуют в расщеплении белков на олигопептиды, вторые, проявляя свойства амино- или дипептидаз, разрушают образующиеся молекулы до свободных  $\alpha$ -аминокислот.

Важным сырьевым источником полноценных белков животного происхождения является подсырная сыворотка, объемы получения которой на молочных предприятиях значительно возросли за последние несколько лет [5]. Молекулы сывороточных белков содержат ряд последовательностей аминокислот, близких к составу белков мышечной ткани человека. Также они превосходят все известные белки животного и растительного происхождения по количеству в молекулах аминокислот с разветвленной цепью (лейцина и изолейцина, валина) и общему количеству незаменимых аминокислот (метионина, триптофана, лизина, треонина). Фактором, ограничивающим применение сывороточных белков в пищевых технологиях, является их аллергенность [6, 7]. Значительной аллергенностью среди всех сывороточных белков характеризуется  $\beta$ -лактоглобулин.

В этой связи проведены исследования по снижению антигенности сывороточных белков подсырной сыворотки в результате ферментативного гидролиза с применением различных высокоспецифичных протеаз: Promod 523MDP, Promod 439L, Flavorpro766MDP и Flavorpro 750MDP (производитель – Biocatalysts Limited, Великобритания). Promod 523MDP – нейтральная протеаза, которую используют для эффективного гидролиза  $\beta$ -лактоглобулина. Promod 439L – протеаза, субстратом для которой является как  $\beta$ -лактоглобулин, так и  $\alpha$ -лактоальбумин. Flavorpro766 MDP – ферментный препарат, который может проявлять свойства как экзо-, так и эндопептидазы, отщепляя аминокислоты с высокой гидрофобностью и снижая таким образом горечь образующихся пептидов. Flavorpro 750MDP – протеаза, применяемая для контроля длины образующихся при гидролизе белков пептидов и снижения их горечи.

**Цель работы** – обоснование выбора ферментных препаратов и определение эффективного времени гидролиза сывороточных белков

в ультрафильтрационном концентрате (УФ-концентрате) подсырной сыворотки для снижения их аллергенности на основании анализа кинетических констант реакции протеолиза.

## Материалы и методы

Экспериментальные исследования проводили с образцами УФ-концентрата подсырной сыворотки с массовой долей общего белка не менее 3,0%, полученными на промышленной ультрафильтрационной установке MMS Swissflow UF с керамическими мембранами в условиях ПАО МК «Воронежский» [8]. Предварительно их подвергали ферментативному гидролизу в течение 8 ч при постоянной температуре в условиях кафедры технологии продуктов животного происхождения ФГБОУ ВО ВГУИТ, исходя из данных по дозировке, оптимума pH и температуры используемых ферментов, рекомендованных производителем. Поскольку активная кислотность исследуемой смеси изменялась в связи с высвобождением аминок- и карбоксильных групп, протеолиз проводили в буферной системе, уровень pH поддерживали внесением растворов кислоты или щелочи. С целью инактивации ферментов по окончании гидролиза образцы подвергали тепловой обработке при  $t = (80 \pm 2) ^\circ\text{C}$  с выдержкой не менее  $\tau = 5$  мин.

Для изучения основных кинетических характеристик протеолиза сывороточных белков в УФ-концентрате подсырной сыворотки была применена модель А.И. Костнера, С.В. Богаткова и А.Д. Неклюдова [9]. Кинетические константы реакции гидролиза рассчитывали по уравнениям [10, 11, 12]:

$$V_t = \frac{P}{t} = V_{\max} \cdot e^{-K_i t}, \quad (1)$$

$$\ln V = \ln\left(\frac{P}{t}\right) = \ln V_{\max} - K_i \cdot t, \quad (2)$$

$$K_m = \frac{V_{\max}}{K_i}, \quad (3)$$

где  $P$  – концентрация в 1 л реакционной смеси расщепленных пептидных связей к моменту времени  $t$ , выраженная в граммах условного азота свободных аминокислот (г/л);  $V_{\max}$  – максимальная скорость гидролиза, моль/л·с;  $K_i$  – константа специфичности,  $\text{с}^{-1}/\text{моль}$ ;  $K_m$  – константа Михаэлиса, моль/л.

Скорость ферментативной реакции находили с помощью графоаналитического метода с применением линейного преобразования уравнения Михаэлиса–Ментен в зависимость Эди–Скетчарда [13]. Течение реакции контролировали по изменению концентрации небелкового азота в исследуемых образцах методом Кьельдаля в соответствии с ГОСТ Р 55246–2012. Ввиду присутствия нескольких потенциальных субстратов в реакционной смеси ( $\beta$ -лактоглобулин,  $\alpha$ -лактоальбумин, иммуноглобулины) каталитическую эффективность исследуемых ферментов оценивали по константе специфичности  $V_{\max}/K_m$ . Ее максимальное значение определяется частотой столкновений субстрата и фермента,

приводящих к образованию фермент-субстратного комплекса, что, в свою очередь, прямо пропорционально скорости диффузии реагирующих веществ в растворе. Эта величина важна для анализа особенностей образования фермент-субстратного комплекса при наличии избытка активных центров связывания субстрата, что позволяет непосредственно оценить эффективность работы фермента при взаимодействии с различными субстратами.

Микроскопические исследования образцов проводили с препаратом «раздавленная капля» с применением микроскопа «Альтами Био 1», фотонасадка Canon) при увеличении в 600/0,85 раз.

В ходе выполнения эксперимента при определении каждого показателя проведены 5 – 10 опытов в трехкратной последовательности с последующей обработкой полученных результатов методами математической статистики с использованием пакета прикладных программ «MathCad 16.0».

### Результаты и обсуждение

В процессе ферментативного гидролиза происходило накопление пептидов и свободных аминокислот (таблица 1). При этом наиболее полно гидролиз протекал при совместном

использовании эндопептидазы Promod 439L и экзопептидаз Flavorpro 766MDP и Flavorpro 750MDP.

Полученные результаты, выраженные как функция скоростей гидролиза во времени [ $P/t = f(t)$ ], представляют собой гиперболические кривые. Проведена их линейаризация, позволившая преобразовать их в прямые псевдопервого порядка (рисунок 1). На них условно можно выделить 2 стадии процесса: «быструю» (первые 3 ч) и «медленную» (3–8 ч), в течение которых происходит накопление приблизительно равных количеств небелкового азота. Снижение скорости реакции на второй стадии протеолиза обусловлено насыщением системы продуктами реакции и достижением стационарной фазы. На основании данных рисунка 1 рассчитаны максимальные скорости реакции и эффективное время ферментативного гидролиза: точки пересечения линейных отрезков при экстраполяции с осью ординат соответствуют максимальным скоростям гидролиза ( $V_{max}$ ), а с осью абсцисс – эффективному времени гидролиза [12].

Таблица 1.

Изменение содержания небелкового азота в образцах в процессе протеолиза

Table 1.

Change in non-protein nitrogen content in samples during proteolysis

Продолжительность гидролиза, мин Duration of hydrolysis, min	Содержание небелкового азота в пробе, полученной с применением ферментных препаратов, % Non-protein nitrogen content in a sample obtained using enzyme preparations, %							
	Non-protein nitrogen content in a sample obtained using enzyme preparations, %							
	Promod 523MDP	Promod 439L	Flavorpro 766MDP	Flavorpro 750MDP	Promod 523MDP + Flavorpro 750MDP	Promod 439L + Flavorpro 766MDP	Promod 523MDP + Flavorpro 766MDP	Promod 439L + Flavorpro 750MDP
0	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094
30	0,098	0,101	0,097	0,095	0,103	0,108	0,105	0,105
60	0,107	0,112	0,103	0,099	0,115	0,125	0,118	0,122
90	0,125	0,130	0,113	0,107	0,129	0,147	0,133	0,144
120	0,139	0,148	0,126	0,117	0,150	0,164	0,156	0,159
150	0,161	0,175	0,141	0,129	0,176	0,205	0,181	0,192
180	0,183	0,196	0,158	0,142	0,202	0,251	0,213	0,235
240	0,195	0,208	0,175	0,158	0,233	0,288	0,238	0,272
300	0,203	0,217	0,185	0,166	0,249	0,311	0,252	0,287
360	0,210	0,224	0,191	0,175	0,262	0,321	0,275	0,297
420	0,212	0,228	0,193	0,177	0,266	0,326	0,278	0,301
480	0,215	0,231	0,194	0,178	0,268	0,329	0,280	0,303

Для оценки эффективности действия применяемых ферментных препаратов использовали константу специфичности  $V_{max}/K_m$ , характеризующую константы всех стадий реакции гидролиза. Анализ средних численных значений кинетических параметров реакции протеолиза (таблица 2) позволяет прийти к заключению, что изученные ферментные препараты с достаточной эффективностью могут

быть использованы для гидролиза сыровоточных белков УФ-концентрата подсырной сыворотки. При этом высокая скорость протеолиза, вероятно, обусловлена низкой энергией активации. В этой связи полученные гидролизаты могут характеризоваться высоким содержанием короткоцепочечных пептидов с низкой гидрофобностью, обуславливающей горький вкус конечного продукта [14].

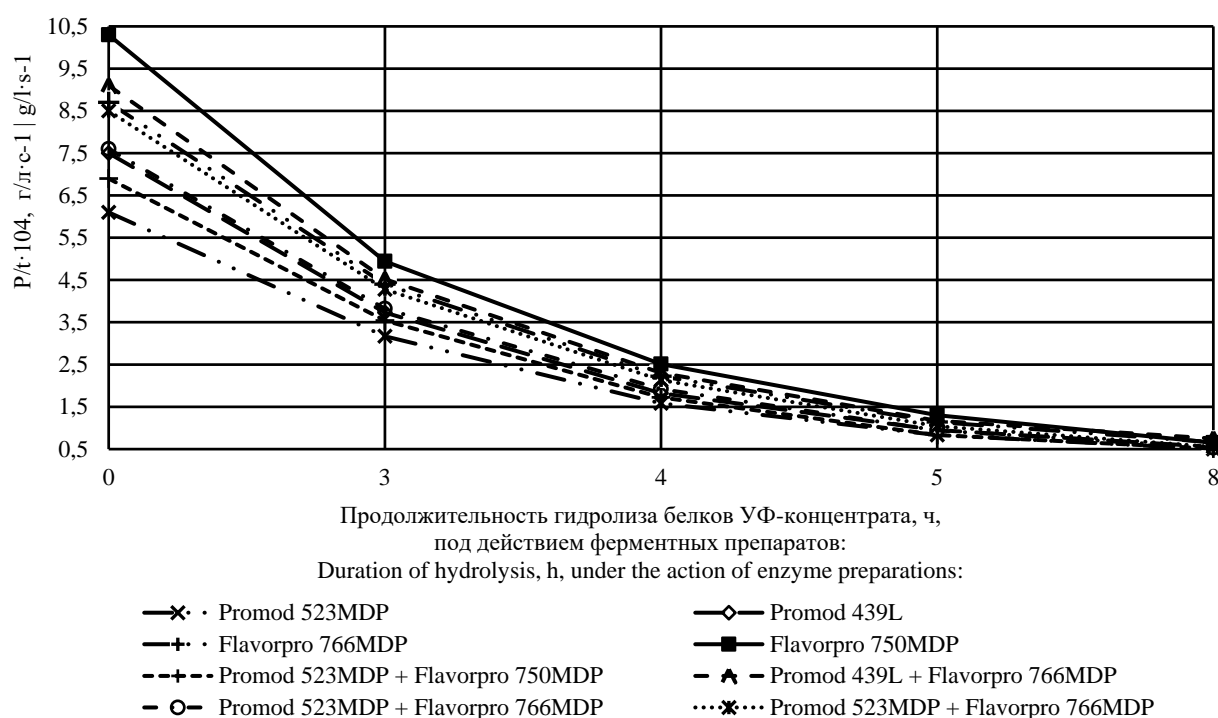


Рисунок 1. Изменение скорости ферментативной реакции в процессе гидролиза

Figure 1. Change in the rate of enzymatic reaction during hydrolysis

Таблица 2.

Кинетические параметры реакции протеолиза различными препаратами

Table 2.

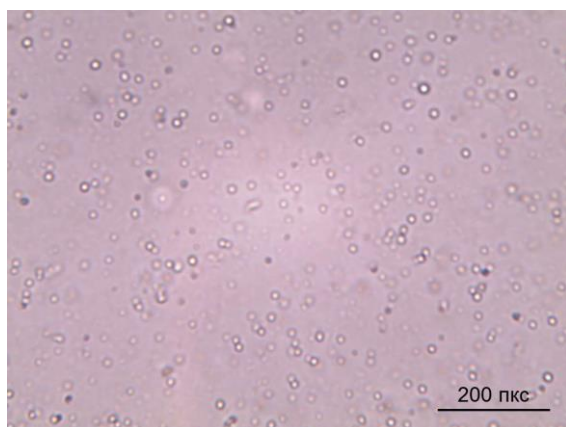
Kinetic parameters of the proteolysis reaction by various enzymes

Ферментный препарат Enzyme	Максимальная скорость реакции Maximum reaction rate $V_{max} \cdot 10^{-4}, g \cdot l^{-1} \cdot s^{-1}$	Константа «специфичности» Specificity constant $V_{max}/K_m, s^{-1}/mmol$
Promod 523MDP	$6,1 \pm 0,4$	2011
Promod 439L	$7,5 \pm 0,3$	3785
Flavorpro 766MDP	$8,7 \pm 0,2$	1438
Flavorpro 750MDP	$10,3 \pm 0,2$	2910
Promod 523MDP + Flavorpro 750MDP	$6,9 \pm 0,3$	2561
Promod 439L + Flavorpro 766MDP	$9,1 \pm 0,2$	4237
Promod 523MDP + Flavorpro 766MDP	$7,6 \pm 0,3$	1824
Promod 439L + Flavorpro 750MDP	$8,5 \pm 0,2$	3973

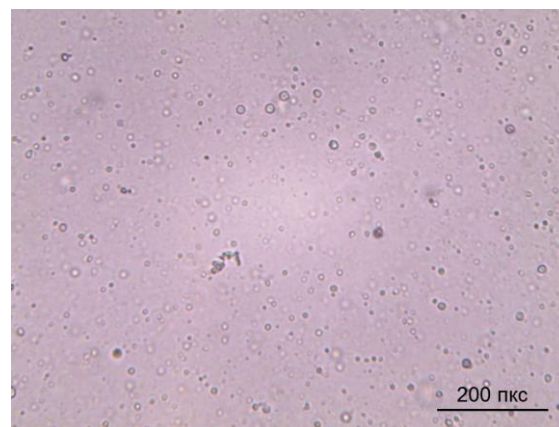
В процессе гидролиза ферментными препаратами с максимальной скоростью гидролиза возможно также образование значительного количества свободных аминокислот, которые помимо отрицательного влияния на органолептические свойства могут приводить к увеличению осмотичности гидролизатов и снижению их биологической ценности, поскольку скорость всасывания свободных аминокислот в тонком кишечнике человека существенно ниже по сравнению с олигопептидами [15]. Поэтому на основании проведенных исследований сделан вывод о целесообразности применения ферментных препаратов Promod 439L и Flavorpro

766MDP для эффективного гидролиза сывороточных белков в УФ-концентрате подсырной сыворотки в количестве 1,5 и 3,0% соответственно от общего содержания белка в субстрате.

Поскольку полученный гидролизат планируется применять в технологии молочных продуктов для частичной замены обезжиренного молока в нормализованной смеси и снижения таким образом их аллергенности, важной его характеристикой является растворимость азотсодержащих компонентов. Этот показатель значительно увеличивается с повышением степени гидролиза, что обусловлено изменением заряда белков и пептидов (рисунок 2).



(a)



(b)

Рисунок 2. Микроструктура изученных образцов (увеличение 600/0,85): а) УФ-концентрат подсырной сыворотки; б) гидролизат сывороточных белков, полученный с применением ферментных препаратов Flavorpro 766MDP и Promod 439L

Figure 2. Microstructure of the studied samples (magnification 600/0.85): a) UF-concentrate of cheese whey; b) hydrolysate of whey proteins obtained with the use of enzyme preparations Flavorpro 766MDP and Promod 439L

При снижении на поверхности пептидов гидрофобных участков общая растворимость азотсодержащих компонентов увеличивается.

### Заключение

Полученный гидролизат может быть реализован в технологии широкого ассортимента молочных и кисломолочных продуктов

для снижения их остаточной антигенности путем частичной замены в рецептуре обезжиренного молока.

### Благодарности

Работа осуществлялась в рамках гранта Президента РФ на 2020–2021 гг. для молодых ученых – кандидатов наук, соглашение № 075-15-2020-322 (МК-1267.2020.11).

### Литература


- 1 Contesini F.J., de Melo R.R., Sato H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application // Critical Reviews in Biotechnology. 2018. V. 38. № 3. P. 321–334. doi:10.1080/07388551.2017.1354354.
- 2 Kostenko K., Bratsikhin A., Borisenko A., Salmanova D. et al. Computer modeling of whey protein  $\beta$ -lactoglobulin behavior in the activated liquid systems // Journal of Hygienic Engineering and Design. 2017. V. 20. P. 70–74.
- 3 Vorob'ev M.M. Proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin by trypsin: simulation by two-step model and experimental verification by intrinsic tryptophan // Fluorescence Symmetry. 2019. V. 11. P. 153. doi:10.3390/sym11020153.
- 4 Толкачева А.А., Черенков Д.А., Корнеева О.С., Пономарев П.Г. Ферменты промышленного назначения – обзор рынка ферментных препаратов и перспективы его развития // Вестник ВГУИТ. 2017. Т. 79. № 4 (74). С. 197–203. doi: 10.20914/2310-1202-2017-4-197-203.
- 5 Рябцева С.А., Храпцов А.Г., Будкевич Р.О., Анисимов Г.С. и др. Физиологические эффекты, механизмы действия и применение лактулозы // Вопросы питания. 2020. Т. 89. № 2. С. 5–20. doi: 10.24411/0042-8833-2020-10012.
- 6 Vorob'ev M.M., Raob N.M., Kochetkova K.A. Kinetic modeling of demasking and hydrolysis of peptide bonds during proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin by trypsin // Doklady Akademii Nauk. 2016. V. 471. № 4. P. 487–491.
- 7 Пономарева Н.В., Мельникова Е.И., Богданова Е.В. Биоконверсия молочных белков для снижения остаточной антигенности // Биотехнология. 2015. Т. 31. № 1. С. 70–74.
- 8 Мельникова Е.И., Пономарева Н.В. Состав и свойства гидролизата  $\beta$ -лактоглобулина со сниженной остаточной антигенностью // Молочная промышленность. 2015. № 8. С. 46–47.
- 9 Souza P.M., Aliakbarian B., Ferreira Filho E.X., Magalhães P.O. et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus* // International Journal of Biological Macromolecules. 2015. V. 81. № 11. P. 17–21.
- 10 Choi B., Rempala G.A., Kim J.K. Beyond the Michaelis-Menten equation: accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters // Scientific reports. 2017. V. 17018. doi:10.1038/s41598-017-17072-z.
- 11 Schulte P.M. The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment // Journal of Experimental Biology. 2015. V. 218. P. 1856–1866. doi: 10.1242/jeb.118851.
- 12 Виннов А., Баль-Прилипко Л. Выбор ферментов для гидролиза промышленных белковых субстратов // Продовольственная индустрия АПК. 2013. № 3 (23). С. 9–13.
- 13 Zainol N., Ismail S.N. Evaluation of enzyme kinetic parameters to produce methanol using Michaelis-Menten equation // Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis. 2019. V. 14. № 2. P. 436–442. doi: 10.9767/bcrec.14.2.3317.436-442.
- 14 Acquah C., Stefano E.D., Udenigwe C.C. Role of hydrophobicity in food peptide functionality and bioactivity // Journal of Food Bioactives. 2018. V. 4. P. 88–98. doi: 10.31665/JFB.2018.4164.
- 15 MacDonald A., Singh R.H., Rocha J.C., van Spronsen F.J. Optimising amino acid absorption: essential to improve nitrogen balance and metabolic control in phenylketonuria // Nutrition Research Reviews. 2019. V. 32 (1). P. 70–78. doi: 10.1017/S0954422418000173.




## References

- Contesini F.J., de Melo R.R., Sato H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. Critical Reviews in Biotechnology. 2018. vol. 38. no. 3. pp. 321–334. doi:10.1080/07388551.2017.1354354.
- Kostenko K., Bratsikhin A., Borisenko A., Salmanova D. et al. Computer modeling of whey protein  $\beta$ -lactoglobulin behavior in the activated liquid systems. Journal of Hygienic Engineering and Design. 2017. vol. 20. pp. 70–74.
- Vorob'ev M.M. Proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin by trypsin: simulation by two-step model and experimental verification by intrinsic tryptophan. Fluorescence Symmetry. 2019. vol. 11. pp. 153. doi:10.3390/sym11020153.
- Tolkacheva A.A., Cherenkov D.A., Korneeva O.S., Ponomarev P.G. Industrial enzymes – overview of the market for enzyme preparations and prospects for its development. Proceedings of VSUET. 2017. vol. 79. no. 4 (74). pp. 197–203. doi: 10.20914/2310-1202-2017-4-197-203. (in Russian).
- Ryabtseva S.A., Khramtsov A.G., Budkevich R.O., Anisimov G.S. et al. Physiological effects, mechanisms of action and application of lactulose. Voprosy Pitaniya. 2020. vol. 89. no. 2. pp. 5–20. doi: 10.24411/0042-8833-2020-10012. (in Russian).
- Vorob'ev M.M., Raob N.M., Kochetkova K.A. Kinetic modeling of demasking and hydrolysis of peptide bonds during proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin by trypsin. Doklady Akademii Nauk. 2016. vol. 471. no. 4. pp. 487–491.
- Ponomareva N.V., Mel'nikova E.I., Bogdanova E.V. Bioconversion of milk proteins in order to reduce residual antigenicity. Biotechnology. 2015. vol. 31. no. 1. pp. 70–74.
- Ponomareva N.V., Melnikova E.I. Composition and properties of  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysate with reduced residual antigenicity. Dairy Industry. 2015. no. 8. pp. 46–47. (in Russian).
- Souza P.M., Aliakbarian B., Ferreira Filho E.X., Magalhães P.O. et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. International Journal of Biological Macromolecules. 2015. vol. 81. no. 11. pp. 17–21.
- Choi B., Rempala G.A., Kim J.K. Beyond the Michaelis-Menten equation: accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. Scientific Reports. 2017. vol. 17018. doi:10.1038/s41598-017-17072-z.
- Schulte P.M. The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. Journal of Experimental Biology. 2015. vol. 218. pp. 1856–1866. doi: 10.1242/jeb.118851.
- Vinnov A., Bal'-Prilipko L. Selection of enzymes for hydrolysis of industrial protein substrates. Food Industry of the Agroindustrial Complex. 2013. no. 3 (23). pp. 9–13. (in Russian).
- Zainol N., Ismail S.N. Evaluation of enzyme kinetic parameters to produce methanol using Michaelis-Menten equation. Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis. 2019. vol. 14. no. 2. pp. 436–442. doi: 10.9767/bcrec.14.2.3317.436-442.
- Acquah C., Stefano E.D., Udenigwe C.C. Role of hydrophobicity in food peptide functionality and bioactivity. Journal of Food Bioactives. 2018. vol. 4. pp. 88–98. doi: 10.31665/JFB.2018.4164.
- MacDonald A., Singh R.H., Rocha J.C., van Spronsen F.J. Optimising amino acid absorption: essential to improve nitrogen balance and metabolic control in phenylketonuria. Nutrition Research Reviews. 2019. vol. 32 (1). pp. 70–78. doi: 10.1017/S0954422418000173.

## Сведения об авторах

**Елена И. Мельникова** д.т.н., профессор, кафедра технологии продуктов животного происхождения, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, melnikova@molvest.ru  
 <https://orcid.org/0000-0002-3474-2534>

**Екатерина В. Богданова** к.т.н., доцент, кафедра технологии продуктов животного происхождения, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, ek-v-b@yandex.ru  
 <https://orcid.org/0000-0001-5053-2273>


## Вклад авторов

**Елена И. Мельникова** консультация в ходе исследования  
**Екатерина В. Богданова** написала рукопись, корректировала её до подачи в редакцию и несет ответственность за плагиат

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Information about authors

**Elena I. Melnikova** Dr. Sci. (Engin.), professor, animal-derived food technology department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, melnikova@molvest.ru  
 <https://orcid.org/0000-0002-3474-2534>

**Ekaterina V. Bogdanova** Cand. Sci. (Engin.), associate professor, animal-derived food technology department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, ek-v-b@yandex.ru  
 <https://orcid.org/0000-0001-5053-2273>

## Contribution

**Elena I. Melnikova** consultation during the study  
**Ekaterina V. Bogdanova** wrote the manuscript, correct it before filing in editing and is responsible for plagiarism

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Поступила 12/11/2020	После редакции 23/11/2020	Принята в печать 01/12/2020
Received 12/11/2020	Accepted in revised 23/11/2020	Accepted 01/12/2020