Инкапсулирование хлорсодержащих карбаматов в полипептидных наночастицах, полученных ферментативным гидролизом казеина

М. М. Воробьев,^а* В. С. Хоменкова,^{а,б} О. В. Синицына,^а О. А. Левинская,^а Д. Х. Китаева,^а А. В. Калистратова,^б М. С. Ощепков,^б Л. В. Коваленко,⁶ К. А. Кочетков^{а,б}

^аИнститут элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова Российской академии наук, Российская Федерация, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28. Факс: (499) 135 5085. E-mail: mmvor@ineos.ac.ru ^бРоссийский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Российская Федерация, 125047 Москва, Миусская пл., 9. Факс: (499) 978 8660. E-mail: lkovalenko@muctr.ru

Проведено инкапсулирование биологически активного β-оксалиламинозамещенного *О*-этилкарбамата в мицеллах негидролизованного и гидролизованного казеина. Методом атомно-силовой микроскопии установлено, что контролируемый гидролиз казеина трипсином позволяет получать монодисперсные наночастицы со средним диаметром 22 нм и дисперсией 5 нм. С помощью высокочувствительного кулонометрического метода определения хлора выявлено, что полученные наночастицы включают большее количество хлорсодержащего алкилкарбамата по сравнению с исходными казеиновыми мицеллами. Солюбилизация в мицеллах позволяет получить коллоидную форму алкилкарбамата, пригодную для его практического использования.

Ключевые слова: инкапсулирование в мицеллах, казеин, алкилкарбамат, атомносиловая микроскопия, кулонометрический метод определения хлора.

Получение и изучение свойств нанокомпозиционных материалов, содержащих наночастицы биогенных, радиоактивных металлов или лекарственных веществ, — актуальное направление современных исследований^{1,2}. Многие биологически активные вещества (БАВ) не растворимы в воде, а их транспорт *in vivo* осуществляется в виде комплексов с макромолекулами и наноразмерными ассоциатами². Для доставки таких лекарств в клетку необходимо разрабатывать соответствующие транспортные формы, позволяющие увеличить эффективность действия препаратов^{3,4}.

Солюбилизация в мицеллах является одним из перспективных подходов, позволяющих повысить проникновение гидрофобных лекарственных соединений в клетку^{5,6}, что было использовано для разработки транспортных систем, в частности, на основе амфифильных белков молока — казеинов⁷.

Ранее нами был изучен процесс образования пептидных наночастиц, состоящих из продуктов ферментативного гидролиза (протеолиза) β -казеина трипсином^{8,9}. При помощи метода светорассеяния выявлено, что гидролиз исходных мицелл казеина сопровождается параллельным процессом самосборки модифицированных наночастиц, концентрация которых достигает максимума за временной период от нескольких минут до десятков минут в зависимости от используемой концентрации фермента^{8,9}. Изучение транспортных свойств та-

© 2018 «Известия Академии наук. Серия химическая»

ких наночастиц требует разработки аналитических методов, позволяющих связать характеристики наночастиц и эффективность их накопления в клетке.

В данной работе для контроля размеров мицелл и определения строения наномерных структур различного происхождения, применяемых для транспорта лекарств, использовали метод атомносиловой микроскопии (ACM)^{10,11}. Для определения количества лиганда, связанного с наночастицами, проводили количественный анализ хлора. Определение малого содержания хлора (на уровне 0.1-1.0%) проводят в процессе контроля остаточных примесей при производстве высокочистых веществ медицинского назначения, а также в элементном анализе органических соединений и полимеров. Метод определения хлора в составе органических соединений обычно состоит в минерализации веществ путем сожжения их в колбе с кислородом с последующим титрованием хлорид-ионов. В практике органического микроанализа широко используется также метод визуального меркуриметрического титрования хлорид-ионов¹². Однако при содержании хлора менее 1% и при ограниченном количестве предоставляемого на анализ вещества (10-30 мг) этот метод не обеспечивает достаточной точности, поэтому в данной работе использовали обладающий высокой чувствительностью и точностью метод кулонометрического титрования¹³.

Обсуждение полученных результатов

В качестве БАВ с низкой растворимостью в воде мы выбрали фитоактивное соединение — (*N*-этоксикарбонилкарбонил)-2-аминоэтиловый эфир *N*-(4-хлорфенил) карбаминовой кислоты (1) (далее карбамат 1).



β-Оксалиламинозамещенные О-этил-N-арилкарбаматы представляют собой новый класс фитоактивных соединений, обладающих рострегуляторной и другими видами активности^{14,15}. Они являются структурными аналогами гербицидных и рострегуляторных бискарбаматов, к которым относятся как хорошо известные фенмедифам и картолин-2, так и новые β-алкилкарбамоилзамещенные О-этил-Nарилкарбаматы¹⁶. β-Оксалиламинозамещенные О-этилкарбаматы и мочевины — устойчивые кристаллические соединения с низкой растворимостью в воде. В соединении 1 содержится один атом хлора (массовая доля хлора составляет 11.4%), которого нет в белке. Это позволило нам, анализируя количество хлора, определять какое количество лиганда связалось с наночастицами.

Процесс изучения связывания соединения 1 с наночастицами в настояще работе основан на сравнении количественных показателей содержания хлора, присутствующего в комплексе хлорсодержащего лиганда с казеиновыми наночастицами, при различных условиях инкапсулирования. Процентное содержание хлора в таких комплексах и, соответственно, количество биологически активного вещества, связанного с полипептидными наночастицами, определяли с большой точностью при помощи элементного анализа осадка, полученного после центрифугирования.

Для приготовления пептидных наночастиц проводили гидролиз казеина трипсином (ЕС 3.4.21.4) в 20 мM натрий-фосфатном буфере. Реакцию протеолиза останавливали добавлением соевого ингибитора трипсина при соотношении трипсин : ингибитор = 1 : 3 (по массе).

Время остановки реакции (степень гидролиза пептидных связей) выбирали, учитывая кинетические закономерности гидролиза казеина трипсином. Скорость гидролиза пептидных связей ($V_{3\kappa c \Pi} = \Delta N / \Delta t$, где ΔN — изменение числа пептидных связей) является убывающей функцией степени гидролиза пептидных связей ($d = N/S_0 \cdot 100\%$, где S_0 — содержание аминного азота в полностью гидролизованном казеине) (рис. 1). Анализ очередности гидролиза специфичных для трипсина пептидных связей Arg-X и Lys-X (X — произвольный аминокислотный остаток) был выполнен в рамках двухстадийной модели протеоли-

за^{8,9}. Это позволило вычислить теоретическую зависимость скорости трипсинолиза пептидных связей от степени гидролиза казеина ($V_{\text{reop}}(d)$) без учета изменения связывания субстрата ферментом в ходе реакции (см. рис. 1). Отклонение $V_{\rm reop}$ от $V_{\rm эксп}$ (величина $\Delta V = V_{\text{теор}} - V_{\text{эксп}}$) начинает увеличиваться на ранних этапах протеолиза и достигает максимального значения при степени гидролиза, равной примерно 0.5% (рис. 2). Рост ΔV , по-видимому, объясняется тем, что при деградации казеиновой мицеллы происходит экспонирование в сторону растворителя гидрофобных фрагментов полипептидной цепи, соответственно, увеличивается непродуктивное связывание субстратов с ферментом^{8,9}. Мы предположили, что условия, при которых достигается максимальное связывание фермента ($d \approx 0.5\%$), могут соответствовать эффективному связыванию лиганда, и поэтому в качестве целевого значения степени гидролиза при приготовлении частиц выбрали величину 0.5%.

В результате протеолиза за время, соответствующее достижению максимума концентрации наночастиц по кинетическим данным протеолиза^{8,9}, получаются осесимметричные частицы (рис. 3).

Исходные казеиновые мицеллы имеют широкое распределение частиц по размерам со средним диаметром 37 нм и дисперсией распределения 12 нм (рис. 4). Частицы, полученные с помощью протеолиза за время, которое обеспечивает максимальную концентрацию частиц, имеют узкое распределение по размерам со средним диаметром 22 нм и дисперсией распределения 5 нм (рис. 5). Таким образом, в результате протеолиза убирается «хвост» крупных частиц в области 30—70 нм и получаются более мелкие наночастицы, обладающие большим соотношением по-



Рис. 1. Сравнение экспериментальной скорости гидролиза пептидных связей $V_{_{3KCII}} = \Delta N/\Delta t$ (*I*) и теоретической скорости $V_{_{TeOP}}$ (*2*), предсказанной двухстадийной моделью протеолиза^{8,9} при отсутствии изменения связывания фермента с субстратом в ходе протеолиза (*d* — степень гидролиза пептидных связей).



Рис. 2. Изменение связывания фермента в ходе протеолиза $(\Delta V = V_{\text{теор}} - V_{\text{эксп}}; d$ — степень гидролиза пептидных связей).



Рис. 3. Изображение пептидных наночастиц, полученных трипсинолизом казеина.

верхность : объем, что благоприятно для массопереноса БАВ.

Эксперименты по инкапсулированию проводили путем медленного добавления раствора карбамата 1



Рис. 4. Распределение мицелл негидролизованного казеина по диаметрам.



Рис. 5. Распределение мицелл гидролизованного казеина по диаметрам.

в ацетонитриле в водный раствор наночастиц. После центрифугирования полученного раствора (8000 об \cdot мин⁻¹, 1 ч) и высушивания осадка в нем определяли содержание хлора.

Из полученных результатов (см. табл. 1 и рис. 6) следует, что трипсинолиз казеина (20 и 30 г · π^{-1}) сначала в течение 6 мин позволяет получить пептидные наночастицы, в которых инкапсулировано большее количество соединения 1 (содержания хлора 0.85% и 0.90%) по сравнению с частицами, полученными без протеолиза (0.52% и 0.47% соответственно). Протеолиз казеина за 30 мин приводит к снижению содержания хлора в наночастицах до 0.53%, что, по-видимому, связано с разрушением наночастиц трипсином.

Таблица 1. Влияние ферментативного гидролиза казеина на включение хлорсодержащего карбамата I в полипептидные наночастицы

Условия получения наночастицы	Концентрация субстрата/г•л ⁻¹	Концентрация трипсина/мг • л ⁻¹	Степень гидролиза пептидных связей ^а (%)	Содержание хлора в осадке (%) (<i>p</i> = 0.95, <i>n</i> = 7)
Без протеолиза	20	_	0	0.52 ± 0.02
Без протеолиза	30	_	0	0.47 ± 0.03
Протеолиз трипсином (6 мин) ^b	20	0.5	0.48	0.85 ± 0.05
Протеолиз трипсином (6 мин) ^b	30	1	0.37	0.90 ± 0.05
Протеолиз трипсином (30 мин) ^b	20	0.5	2.1	0.53 ± 0.02

^{*a*} Степень гидролиза пептидных связей (*d*) — доля пептидных связей, дополнительно гидролизованных трипсином за 6 и 30 мин гидролиза. ^{*b*} Протеолиз казеина трипсином при 37 °C в 20 м*M* натрий-фосфатном буфере pH 7.9.



Рис. 6. Примеры кривых кулонометрического титрования хлорид-ионов в пробах, полученных до протеолиза казеина (20 $\Gamma \cdot \pi^{-1}$) (*1*) и после протеолиза в течение 6 мин (*2*).

Степень гидролиза пептидных связей порядка 0.5% (гидролиз одной пептидной связи на молекулу β -казеина, содержащую 209 аминокислотных остатков) обеспечивает агрегацию фрагментов полипептидной цепи и последующее образование наночастиц^{8,9}. Скорость гидролиза пептидной связи Arg₂₅-Ile₂₆ в несколько раз превышает скорость гидролиза остальных специфичных для трипсина пептидных связей β -казеина¹⁷. В результате потери заряженного N-концевого фрагмента, в котором сосредоточены все остатки фосфосеринов, остальная часть полипептидной цепи β -казеина, включая гидрофобный С-концевой фрагмент, должна более активно участвовать в гидрофобных взаимодействиях, в том числе и в мицеллообразовании.

Таким образом, использование пептидных наночастиц, состоящих из продуктов ферментативного гидролиза (протеолиза) казеина трипсином, вместо негидролизованного казеина приводит к увеличению количества биологически активного вещества, включающегося в наночастицы. Полученные данные подтверждают, что кулонометр «Эксперт-006» в комплекте с электролитической ячейкой с серебряными электродами¹³ обеспечивает определение хлора в пептидных наночастицах с инкапсулированным карбаматом **1** при содержании его ниже 1%.

Показано, что пептидные наночастицы, состоящие из продуктов ферментативного гидролиза (протеолиза) казеина трипсином, включают большее количество биологически активного вещества по сравнению с негидролизованным казеином. Использование атомно-силовой микроскопии и высокочувствительного кулонометрического метода определения хлора эффективно для контроля и оптимизации условий получения пептидных наночастиц с помощью ограниченного протеолиза.

Экспериментальная часть

Материалы. β-Казеин с чистотой ≥98%, трипсин, гидрофосфата натрия додекагидрат Na₂HPO₄ · 12H₂O, дигидрофосфата натрия дигидрат NaH₂PO₄ · 2H₂O — все продукты компании «Sigma-Aldrich» аналитической степени чистоты — были использованы без дополнительной очистки. Измерения величины pH буферного раствора проведены на pH-метре «pH-150MИ». Центрифугирование растворов осуществляли при помощи центрифуги «OПн-8» периодического действия с частотой вращения 8000 об мин⁻¹. Спектры ЯМР ¹Н регистрировали на приборе «Bruker WP-400» (400 МГц), растворитель — $CDCl_3$.

Атомно-силовая микроскопия. Анализ полученных наночастиц проводили методом атомно-силовой микроскопии с использованием микроскопа «ФемтоСкан» (ООО «Центр перспективных технологий», Россия). Образцы, взятые из реакционной смеси, разводили в 100 раз водой («Milli-Q»). Сразу после этого 2.5 мкл анализируемого образца наносили на свежесколотую поверхность слюды и высушивали на воздухе. Исследования проводили в открытой атмосфере в условиях окружающей среды по описанным ранее методикам¹⁸. Использовали кантилеверы «Mikromasch» с резонансной частотой 325 кГц и радиусом закругления острия зонда около 10 нм. АСМ-изображения были обработаны и проанализированы с помощью программного обеспечения ФемтоСкан Онлайн. В работе приведены диаметры наночастиц, высохших на подложке.

О-(N-Этоксикарбонилкарбонил-2-аминоэтил)-N-(4хлорфенил)карбамат (1). В круглодонной колбе на 50 мл растворили 0.60 г (3.7 ммоля) О-этил-N-2-гидроксиэтилоксалиламида в 5 мл толуола. К полученному раствору при комнатной температуре при перемешивании прилили раствор 0.57 г (3.7 ммоля) *п*-хлорфенилизоцианата в 4 мл толуола. К смеси при перемешивании добавили 4 капли триэтиламина. Реакционную массу перемешивали в течение 1 ч при 20 °C. Выпавший осадок отфильтровали и перекристаллизовали из PrⁱOH. Выход целевого продукта 190%, т.пл. 179-180 °С. Найдено (%): С, 49.11; Н, 5.27; N, 13.40. С₁₃Н₁₅СlN₂О₅. Вычислено (%): С, 49.61; Н, 4.80; Сl, 11.26; N, 8.90; О, 25.42. Спектр ЯМР ¹Н (400 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., *J*/Гц): 1.27 (т, 3 H, CH₃, *J* = 4); 3.45 (д.т, 2 H, NHC<u>H</u>₂, J = 8, J = 4); 4.19 (t, 2 H, C<u>H</u>₂CH₂NH, J = 4); 4.24 (kb, 2 H, CH_2CH_3 , J = 8); 7.33 (д, 2 H, CH_{apom} , J = 8); 7.49 (д, 2 H, $CH_{apom}, J = 8$); 9.05 (r, 1 H, $CH_2CH_2NH, J = 4$); 9.84 (c, 1 H, СНС<u>NH</u>). Спектр ЯМР ¹³С (100 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д.): 14.3 (<u>CH</u>₃); 39.1 (NH<u>C</u>H₂); 62.5 (CH₃C<u>H</u>₂O–); 62.7 (CH₂<u>C</u>H₂O–); 120.1 (HN-C-CH); 126.5 (CICCH); 129.1 (CIC); 138.6 (HN-<u>C</u>-CH); 153.7 (O<u>C</u>(O)C-); 157.7 (O<u>C</u>(O)NH); 161.0 (C(O)<u>C</u>(O)NH). ИК-спектр, v/см⁻¹: 1542.77 (NH, N–C=O, амид); 1696.90 (С(О), амид); 1724.68 (С(О)-, эфир); 3306.92 (NH).

Определение содержания хлора. Определение содержания хлора в полипептидных частицах с карбаматом 1 проводили на цифровом кулонометрическом анализаторе «Эксперт-006» производства ООО «Эконикс-Эксперт» (Москва) после минерализации веществ. Минерализацию полипептидов осуществляли сожжением навесок 10-30 мг полипептидов на платиновой спирали в колбе емкостью 700 мл, наполненной кислородом^{12,13}. В качестве поглотителя использовали щелочной раствор пероксида водорода. В этих условиях все галогенсодержащие продукты горения (Cl₂, HCl, HClO) переходят в хлорид-ионы. После разрушения избытка пероксида кипячением поглотительный раствор переносили в мерные колбы и разбавляли до 25 мл. Содержание хлора определяли методом кулонометрического титрования проб (2.5 или 5 мл) в 20 мл фонового раствора электрогенерированными ионами серебра при постоянном токе 1.273 мА с биамперометрической индикацией конечной точки титрования, индикаторный ток 20 мкА.14 Работы проводили с электролитической ячейкой, в которой два генераторных и два индикаторных электрода представляли собой отрезки серебряной проволоки (l = 50 мм, Ø = 1 мм), погруженные в стакан емкостью 50 мл. В фоновый раствор — 0.2 *М* раствор HNO₃ в 10%-ном растворе АсОН — добавляли 10 капель 1%-ного раствора желатины. На рисунке 6 приведены примеры кривых кулонометрического титрования хлорид-ионов в пробах, полученных до протеолиза казеина и в течение 6 мин после протеолиза. Проводили метрологическую обработку результатов титрования 7—10 параллельных проб и рассчитывали содержание хлора в навесках полипептидов. Относительная погрешность определения составляла от 4 до 6% при доверительной вероятности p = 0.95.

Определение аминного азота. Для определения аминного азота в пробах использовали так называемый метод OPA¹⁹, который основан на реакции о-фталевого альдегида и 2-меркаптоэтанола с аминогруппами, образующимися при гидролизе пептидных связей. ОРА-реактив был приготовлен смешением 25 мл 100 ммоль \cdot n^{-1} тетрагидробората натрия, 2.5 мл 20%-ного раствора додецилсульфат натрия, 40 мг о-фталиевого альдегида и 100 мкл 2-меркаптоэтанола. Конечный объем ОРА-реактива доводили дистиллированной водой до 50 мл. К каждому образцу (40 мкл), отобранному при времени гидролиза t, добавляли 2 мл ОРА-реактива, встряхивали, выдерживали в течение 5 мин при комнатной температуре, а затем определяли интенсивность поглощения при 340 нм. Исходя из полученных величин поглощения определяли концентрации аминного азота N(t) с использованием калибровочной прямой, построенной с помощью растворов изолейцина. Относительная погрешность определения N(t) составляла 4.8% при доверительной вероятности *p* = 0.95. Скорость гидролиза пептидных связей V_{эксп} вычисляли, используя разницу значений аминного азота в последовательно взятых пробах $N(t_1)$ и $N(t_2)$, полученных за время протеолиза t_1 и t_2 ($V_{_{ЭКСП}} = (N(t_1) - N(t_2))/(t_1 - t_2)$).

Строение полученного соединения изучено с использованием оборудования Центра исследования строения молекул ИНЭОС РАН.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных наук (проекты № 15-29-05785 офи_м, № 16-03-00061а и № 18-33-01128 мол_а).

Список литературы

- О. И. Верная, В. П. Шабатин, А. В. Нуждина, Н. Д. Звукова, Д. И. Хватов, А. М. Семенов, В. И. Лозинский, Т. И. Шабатина, М. Я. Мельников, Изв. АН. Сер. хим., 2017, 2152 [О. І. Vernaya, V. P. Shabatin, A. V. Nuzhdina, N. D. Zvukova, D. I. Khvatov, A. M. Semenov, V. I. Lozinsky, T. I. Shabatina, M. Ya. Mel'nikov, Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.), 2017, 66, 2152].
- Н. И. Горшков, С. В. Шатик, А. В. Токарев, И. И. Гаврилова, О. В. Назарова, А. Ю. Мурко, В. Д. Красиков, Е. Ф. Панарин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2017, 156 [N. I. Gorshkov, S. V. Shatik, A. V. Tokarev, I. I. Gavrilova, O. V. Nazarova, A. Yu. Murco, V. D. Krasikov, E. F. Panarin, *Russ. Chem. Bull.* (*Int. Ed.*), 2017, **66**, 156].
- A. Miguel, A. C. Cerqueira, D. P. Helder, P. E. R. Silva, *Food Eng. Rev.*, 2014, 6, 1–19.

- 4. V. P. Torchilin, Pharm. Res., 2007, 24, 1-16.
- Е. Д. Никольская, О. А. Жунина, Н. Г. Яббаров, В. А. Зенин, О. Г. Терещенко, М. В. Фомичева, М. Р. Фаустова, М. Б. Сокол, А. В. Лобанов, Е. С. Северин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2017, 1867 [Е. D. Nikol'skaya, О. А. Zhunina, N. G. Yabbarov, V. A. Zenin, O. G. Tereshchenko, M. V. Fomicheva, M. R. Faustova, M. B. Sokol, A. V. Lobanov, E. S. Severin, *Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.)*, 2017, **66**, 1867].
- L. Ya. Zakharova, R. R. Kashapov, T. N. Pashirova, A. B. Mirgorodskaya, O. G. Sinyashin, *Mendeleev Commun.*, 2016, 26, 457–468.
- 7. Y. D. Livney, Curr. Opin. Colloid & Interface Science, 2010, 15, 73–83.
- M. M. Vorob'ev, V. Vogel, W. Mäntele, *Inter. Dairy J.*, 2013, 30, 33–38.
- M. M. Vorob'ev, K. Strauss, V. Vogel, W. Mäntele, *Food Biophys.*, 2015, 10, 309–315.
- J. Sitterberg, A. Zcetin, C. Ehrhardt, U. Bakowsky, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2010, 74, 2–13.
- N. K. Davydova, O. V. Sinitsyna, V. N. Sergeev, I. Perevyazko, E. E. Laukhina, *RSC Advances*, 2016, 6, 58212–58217.
- Методы количественного органического микроанализа, под ред. Н. Э. Гельман, Москва, Химия, 1987, 293 с.
- 13. А. Г. Буяновская, Д. Х. Китаева, О. А. Левинская, Тез. докл. Третьего съезда аналитиков России (Москва, 8—13 октября 2017 г.), ГЕОХИ РАН, Москва, с. 31. http://www. wssanalytchem.org/car2017/Publications/2017-Abstracts. pdf.
- М. М. Воробьев, Л. В. Коваленко, А. В. Калистратова, М. С. Ощепков, В. С. Филиппова, А. А. Ходак, К. А. Кочетков, Докл. PAH, 2017, 473, 669–672 [М. М. Vorob'ev, L. V. Kovalenko, A. V. Kalistratova, M. S. Oshchepkov, V. S. Filippova, A. A. Khodak, K. A. Kochetkov, Dokl. Chem. (Engl. Transl.), 2017, 473, 84–87].
- Л. В. Коваленко, А. В. Калистратова, М. С. Ощепков, Е. А. Глухоедова, И. Н. Соловьева, М. М. Воробьев, К. А. Кочетков, С. Д. Каракотов, Бутлеровские сообщ., 2017, 50, 45—51 [L. V. Kovalenko, A. V. Kalistratova, M. S. Oshchepkov, E. A. Glukhoedova, I. N. Solovieva, M. M. Vorobiev, K. A. Kochetkov, S. D. Karakotov, Butlerov Commun. (Engl. Transl.), 2017, 50, 45—51].
- Л. В. Коваленко, А. В. Калистратова, М. С. Ощепков, М. М. Воробьев, К. А. Кочетков, Пат. РФ № 2632466, 2017.
- M. M. Vorob'ev, M. Dalgalarrondo, J.-M. Chobert, T. Haertle, Biopolymers, 2000, 54, 355–364.
- И. В. Яминский, А. С. Филонов, О. В. Синицына, Г. Б. Мешков, *Наноиндустрия*, 2016, **64**, 42–46.
- F. C. Church, H. E. Swaisgood, D. H. Porter, G. L. Catignani, J. Dairy Sci., 1983, 66, 1218.

Поступила в редакцию 12 апреля 2018; после доработки — 4 июня 2018; принята к публикации 18 июня 2018