

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-4-560-567>

Поступила 04.10.2024

Поступила после рецензирования 25.11.2024

Принята в печать 29.11.2024

© Лепилкина О. В., Григорьева А. И., 2024

<https://www.fsjour.com/jour>

Обзорная статья

Open access

## ПРОТЕОМНЫЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕЛКОВ МОЛОКА

Лепилкина О. В.\*, Григорьева А. И.

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоседеления и сыроделения, Углич, Ярославская область, Россия

### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

молочные  
белки, пептиды,  
электрофорез,  
хроматография,  
вестерн-блоттинг,  
масс-спектрометрия

В обзоре представлены наиболее распространенные методы протеомики, основанные на разделении и идентификации белков, с примерами их использования для исследования белковой системы молока и молочных продуктов. Описана сущность электрофоретических и хроматографических методов разделения белков и пептидов и их идентификации с помощью вестерн-блоттинга и масс-спектрометрии. Приведены основные разновидности методов электрофореза (нативный, двумерный, в полиакриламидном геле с мочевиной, иммуноэлектрофорез, капиллярный) и методов хроматографии (газовая, жидкостная, ионообменная, гель-фильтрация, аффинная). Отмечено, что основным направлением исследований с применением указанных методов, имеющим как научное, так и прикладное значение, является выявление фальсификаций состава молока и молочных продуктов. Такие фальсификации связаны с преднамеренным добавлением сухого молока и подсырной сыворотки, а также с подменой молока-сырья на молоко других животных, что недопустимо при производстве сыров с защищенным наименованием места происхождения (PDO) или с защищенным географическим указанием (PGI). Другим важным направлением исследований является изучение протеолитических процессов, протекающих при созревании сыров. На основании этих процессов можно устанавливать степень зрелости сыра и его видовую принадлежность, которая зависит от технологии изготовления. Учитывая многообразный ассортимент сыров разных стран, таких исследований явно недостаточно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Работа выполнена по государственному заданию № FGUS-2024-0007 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН.

Received 04.10.2024

Accepted in revised 25.11.2024

Accepted for publication 29.11.2024

© Lepilkina O. V., Grigorieva A. I., 2024

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Review article

Open access

## PROTEOMIC METHODS FOR SEPARATION AND IDENTIFICATION OF MILK PROTEINS

Olga V. Lepilkina\*, Anastasia I. Grigorieva

All-Russian Research Institute of Butter and Cheese Making, Uglich, Yaroslavl Region, Russia

### KEY WORDS:

milk proteins, peptides,  
electrophoresis,  
chromatography,  
western blotting, mass  
spectrometry

### ABSTRACT

The review presents the most common proteomics methods based on separation and identification of proteins, with examples of their use for studying the protein system of milk and dairy products. The essence of electrophoretic and chromatographic methods for separating proteins and peptides and their identification using Western blotting and mass spectrometry is described. The main types of electrophoresis methods (native, two-dimensional, in polyacrylamide gel with urea, immunoelectrophoresis, capillary) and chromatography methods (gas, liquid, ion exchange, gel filtration, affinity) are given. It is noted that the main direction of research using these methods, which has both scientific and applied significance, is the detection of falsifications in the composition of milk and dairy products. Such falsifications are associated with the deliberate addition of dry milk and cheese whey, as well as with the replacement of raw milk by milk from other animals, which is unacceptable in the production of cheeses with a protected designation of origin (PDO) or a protected geographical indication (PGI). Another area is research into the proteolytic processes that occur during the maturation of cheeses, on the basis of which their degree of maturity and species can be determined depending on the manufacturing technology. Given the wide range of cheeses from different countries, such research is clearly insufficient.

FUNDING: The work was performed according to the state task No. FGUS-2024-0007 of the V. M. Gorbatov Federal Scientific Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences.

### 1. Введение

Протеом коровьего молока представляет собой комплекс белков, состоящий из казеинов ( $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеин), сывороточных белков ( $\beta$ -лактоглобулин,  $\alpha$ -лактальбумин, лактоферрин, бычий сывороточный альбумин, иммуноглобулины) и белков оболочки жировых глобул [1]. Этот перечень лишь частично отражает сложность молочного протеома, которая обусловлена наличием многочисленных генетических вариантов [2,3] и посттрансляционных модификаций [4,5], происходящих на протяжении всего цикла жизни белков: от синтеза в вымени лактирующего животного до процесса пищеварения в желудочно-кишечном тракте человека [6,7,8]. На протеом молока существенное влияние оказывают вид и порода животных [9], особенности их кормления [10], стадия лактации и условия содержа-

ния [11]. Посттрансляционные модификации белков с нарушением функциональных свойств возникают из-за заболеваний животных, в частности, маститом [12,13].

Структура и форма белков молока динамична и изменчива, так как они обладают способностью к разнообразным внутри- и межмолекулярным взаимодействиям. В процессе преобразования молока в тот или иной молочный продукт белки подвержены влиянию многих факторов, под действием которых происходит их изменение с приобретением новых свойств. Так, например, результатом термической обработки молока является гликозилирование белков вследствие взаимодействия аминокислоты лизина (как в казеинах, так и в сывороточных белках) с лактозой (ранняя реакция Майяра) [14]. Денатурация сывороточных белков при высокой температуре

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Лепилкина, О. В., Григорьева, А. И. (2024). Протеомные методы разделения и идентификации белков молока. *Пищевые системы*, 7(4), 560–567. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-4-560-567>

FOR CITATION: Lepilkina, O. V., Grigorieva, A. I. (2024). Proteomic methods for separation and identification of milk proteins. *Food Systems*, 7(4), 560–567. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-4-560-567>

приводит к образованию сложной смеси агрегатов сывороточного белка и покрытых сывороточным белком мицелл казеина [15]. Влияние высокой температуры проявляется также в изменении пептидного профиля с повышением числа выявляемых полипептидов из-за разрушения оболочек жировых шариков и выхода оболочечных белков в плазму молока [16,17]. Влияние pH среды выражается в изменении конформации и функциональной активности белков вследствие изменения заряда их молекул [18,19].

Протеолитические процессы, протекающие под действием ферментов (нативных, молоковертывающих, продуцируемых молочнокислыми микроорганизмами), вызывают наиболее существенные изменения протеома молока, приводя к образованию пептидов с различной молекулярной массой, аминокислот и продуктов их дальнейшего распада [20,21]. Одним из недавних открытий является то, что все молочные белки содержат последовательности, которые обладают биологической/физиологической активностью при высвобождении в результате протеолиза. Наиболее изученными являются фосфопептиды, пептиды, ингибирующие ангиотензинпревращающий фермент, пептиды, модифицирующие тромбоциты, а также опиатные, иммуномодулирующие, антиаллергенные, антимикробные пептиды и казеиномакропептиды, обладающие многими биологическими свойствами [1,5,22,23].

Изменчивость протеома молока, структура, функции и взаимодействие белков в зависимости от множества факторов представляет интерес для исследователей на протяжении многих десятилетий [24]. Протеомные исследования начались задолго до появления термина «протеом», который впервые был предложен австралийским ученым M. R. Wilkins [25] и принят в 1994 г. на 2 Международном конгрессе по двумерному электрофорезу в г. Сиена, Италия. Интерес научного сообщества к этим исследованиям не только не исчезает, но и усиливается из-за появления новых методических возможностей разделения и идентификации белков.

В этой статье представлен обзор наиболее распространенных в настоящее время методов протеомики, в основу которых положены процедуры разделения и идентификации белков, с примерами их использования при исследовании белковой системы молока и молочных продуктов.

## 2. Объекты и методы

Методология проведенного исследования заключалась в поиске, чтении, анализе и систематизации литературных источников, освещающих признанные в мировой практике методы изучения белков. Поиск публикаций проводили в библиографических базах Google Scholar, Scopus, Web of Science, Elsevier, eLIBRARY.RU, RSCI. С целью оценки ретроспективных изменений методов протеомики поиск охватывал временной период 1980–2024 гг. Из многообразия используемых методов протеомики отбирались методы, основанные на разделении и идентификации белков. Учитывая их широкую область применения, основным критерием при отборе статей для последующего анализа была их причастность к исследованиям белков молока и молочных продуктов.

## 3. Методы разделения белков

Разделение белков — это первая стадия протеомных исследований, необходимая для их последующей идентификации. Для этого чаще всего используются электрофоретические и хроматографические методы в различных вариациях.

### 3.1. Электрофорез

Электрофорез — это процесс разделения макромолекул, присутствующих в геле или жидкости, на основе их связывающей способности, размера и заряда под действием электрического поля.

Электрофоретические методы разделения белков послужили началом развития протеомики. Принцип их работы заключается в движении заряженных молекул под действием электрического поля. Разделение белков происходит вследствие их различной подвижности, зависящей от суммарного заряда молекул, от их молекулярных масс и от конфигурации молекул.

Электроразаряженность белковых молекул обусловлена наличием на их поверхности функциональных групп, способных к электрической диссоциации. В белковых молекулах одновременно присутствуют как положительно, так и отрицательно заряженные группы. По этой причине суммарные заряды разных белков могут значительно отличаться друг от друга. Величина суммарного заряда молекулы определяется количеством заряженных групп, их природой, а также кислотностью (pH) окружающей среды. Суммарный заряд макромолекулы может изменяться при ее взаимодействии с низкомолекулярными ионами и другими заряженными молекулами [26].

Электрофорез проводят с использованием гелей (крахмальных, полиакриламидных, агарозных, полиакриламидно-агарозных). В настоящее время наиболее распространенным и широко применяемым является полиакриламидный гель. Он позволяет не только разделять смеси белков, содержащих большое число разных молекул, но и характеризовать их по заряду и молекулярной массе. В отличие от других гелей, полиакриламидный гель имеет ряд преимуществ: он прозрачен, химически стабилен, инертен, устойчив к изменениям pH и температуры. Используя различную концентрацию полимера, можно получать гели с широким диапазоном размеров пор, что обеспечивает его высокую разрешающую способность. Можно также изменять электрический заряд макромолекул путем изменения pH буферного раствора, а введением в буферный раствор денатурирующих агентов или детергентов — изменять их конформацию [1]. Таким образом, вариации условий осуществления электрофореза позволяют решать различные задачи протеомики.

#### 3.1.1. Нативный гель-электрофорез

Нативный гель-электрофорез (PAGE от англ. Polyacrylamide Gel Electrophoresis) является самым простым методом электрофоретического разделения белков. Этот метод сохраняет белки в их нативной конформации. Разделение белков в данном случае основано только на заряде и трении при движении молекул белка через гель. Скорость движения белка через матрицу геля — электрофоретическая подвижность — будет зависеть от размера и формы молекулы, от вязкости буфера и от размера пор гелевой сетки. Маленькие белки будут мигрировать через гель быстрее, чем более крупные белки, которые испытывают большее сопротивление миграции [1,27].

Поскольку различные фракции казеина имеют близкие значения изоэлектрических точек (pI), нативный электрофорез не подходит для разделения фракций казеина. Однако этот метод позволяет идентифицировать сывороточные белки и может быть полезен для обнаружения любых изменений нативной конформации в заданных условиях [27].

Интересен опыт применения нативного электрофореза для обнаружения межвидовой фальсификации молока. Авторы M. Pesic, M. Barac, M. Vrvic et al. [28] использовали этот метод для одновременного качественного и количественного определения присутствия коровьего молока в козьем и овечьем молоке. Количественная оценка была основана на измерении интенсивности полос  $\beta$ -лактоглобулина и  $\alpha$ -лактальбумина коровьего молока в смесях с козьим и овечьим молоком. Установлены линейные зависимости интенсивности полос  $\beta$ -лактоглобулина и  $\alpha$ -лактальбумина от объемного процента добавленного коровьего молока (коэффициент корреляции от 0,9950 до 0,9998), по которым можно определить количество коровьего молока в широком диапазоне (от 3–5% до 90%) в смесях козьего/коровьего и овечьего/коровьего молока.

Нативный электрофорез в сочетании с другими электрофоретическими методами позволяет выявить влияние различных физических воздействий на белки молока, вызывающие конформационные изменения их молекул. Например, взаимодействие казеина и сывороточных белков, индуцированное нагреванием, можно оценить путем сравнения электрофоретических профилей, полученных методами нативного PAGE и SDS-PAGE. Результаты таких исследований представлены в работе [29], где изучены тепловые взаимодействия между сывороточными белками и казеинами в козьем и коровьем молоке. Было установлено, что после нагревания молока (90 °C 10 мин) менее 3% общего количества  $\beta$ -лактоглобулина оставались стабильными как в козьем, так и в коровьем молоке. В коровьем молоке  $\alpha$ -лактальбумин был более термостабилен, чем его аналог в козьем молоке (29,6% против 3,82%). Практически все денатурированные сывороточные белки козьего молока (> 95%) были связаны с мицеллами казеина, образования растворимых комплексов не наблюдалось. Результаты данных исследований могут быть полезны для понимания различий в технологическо-функциональных свойствах козьего и коровьего молока.

#### 3.1.2. Двумерный гель-электрофорез

Метод разделения белков двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле (2D-GE) был разработан в 1975 г. и положил начало протеомики как науки. С момента первого описания в научной литературе [30] двумерный гель-электрофорез претерпел некоторые модификации, но до настоящего времени является предпочтительным методом разделения белков [31,32,33,34].

Разделение белков в 2D-GE происходит по двум свойствам: по изоэлектрической точке (в первом измерении) и по молекулярной массе (во втором измерении, перпендикулярном к первому).

Для разделения по изоэлектрической точке (метод изоэлектрического фокусирования [1]) используют полиакриламидный гель с большими порами, через которые свободно проникают даже самые крупные макромолекулы. Гель содержит ковалентно пришитые амфолиты, создающие градиент pH. Под действием постоянного электрического поля молекулы белков перемещаются в область pH, соответствующую по величине изоэлектрической точке (pI) данного белка. Изоэлектрическое фокусирование заканчивается при достижении равновесного состояния, когда все протеоформы достигли областей pH, соответствующих их pI.

Разделение белков по массе (во втором измерении) обеспечивается добавлением в гель натрия додецилсульфата (SDS), который представляет собой анионное поверхностно-активное вещество — детергент. При его взаимодействии с белком происходит сольubilизация белка детергентом, в результате которой вся поверхность белковой молекулы покрывается множеством отрицательных зарядов. Совместное использование полиакриламидного геля и натрия додецилсульфата (метод SDS-PAGE) устраняет влияние структуры и заряда, вследствие чего белки разделяются по молекулярной массе. В результате все белки, во-первых, сохраняют только свою первичную структуру и, во-вторых, имеют большой отрицательный заряд. При загрузке в гелевую матрицу и помещении в электрическое поле отрицательно заряженные молекулы белка мигрируют к аноду и разделяются за счет эффекта молекулярного просеивания [1,35].

Двумерный гель-электрофорез является весьма эффективным методом при разделении белков, имеющих схожие молекулярные массы или изоэлектрические точки. К недостаткам этого метода можно отнести сравнительно узкий диапазон молекулярных масс разделяемых белков: от 8 до 150 кДа. Кроме того, данный метод ограничен в обнаружении минорных и экстремальных белков, что требует предварительной подготовки образцов [1]. Низкая эффективность отмечается и при анализе гидрофобных белков [31].

Boehmer с соавторами [36] применили двумерный гель-электрофорез (2D-GE) в сочетании с масс-спектрометрией MALDI-TOF для анализа белкового состава сыворотки коровьего молока. Исследование было направлено на сравнение здорового молока и молока, инфицированного бактерией *Escherichia coli*. Анализ образцов сыворотки, взятых до и после заражения (спустя 18 часов), выявил существенные различия в белковых профилях. В маститной сыворотке по сравнению с обычной сывороткой наблюдалось большее количество дифференциально экспрессируемых белков. Профили 2D-GE молочной сыворотки от здоровых коров демонстрировали обилие белков казеина, включая варианты  $\alpha_{S1}$ -казеина,  $\beta$ -казеина и  $\kappa$ -казеина, а также сывороточных белков, сывороточного альбумина,  $\beta$ -лактоглобулина и  $\alpha$ -лактальбумина. Также через 18 часов после заражения были обнаружены антимикробные пептиды кателицидин, индолицидин и бактенецин 5 и 7, а также белки  $\beta$ -фибриноген,  $\alpha$ -2-HS-гликопротеин, S100-A12 и  $\alpha$ -1-антипротеиназа. Наиболее примечательным было обнаружение в образцах маститной сыворотки белка острой фазы  $\alpha$ -1-кислого гликопротеина. На основании результатов исследований авторы считают, что применение метода двумерного гель-электрофореза с последующей времяпролетной масс-спектрометрией позволяет быстро изучить изменения содержания белка в молоке при колимформном мастите и помочь в идентификации биомаркеров этого заболевания.

### 3.1.3. Электрофорез в полиакриламидном геле с мочевиной (Urea PAGE).

Мочевина, как и натрий додецилсульфат, является известным денатурантом белков. Ее целесообразно использовать при разделении белков, прежде всего, казеинов, склонных к агрегации и осаждению, а также для разделения белков, которые мало различаются по изоэлектрической точке и по молекулярной массе [1,27].

Денатурация белка в полиакриламидном геле в присутствии мочевины происходит вследствие взаимодействия мочевины с белком через водородные связи с участием пептидов основной цепи. Она может выступать как донором, так и акцептором водорода, что делает мочевины предпочтительной молекулой для образования водородных связей. Пептидные связи также могут выступать в качестве донора и акцептора водорода. В результате мочевина разрушает внутримолекулярные водородные связи, участвующие в образовании вторичной, третичной и четвертичной структуры белка, что приводит к его денатурации. Мочевина также может удалять упорядоченные молекулы воды из карманов белковых молекул и нарушать гидрофобные взаимодействия. Связывание мочевины с белком не меняет суммарный заряд белка, так как мочевина имеет нейтральный суммарный заряд [27].

Urea PAGE изначально хорошо зарекомендовал себя при исследовании белковой системы сыров: электрофоретические характеристики молочных белков, выделенных из различных образцов сыра, существенно различались [37]. И до настоящего времени он успешно используется не только для выявления видовых различий сыров, но и для исследования протеолитических процессов, протекающих при их созревании. Так, авторы Mane и Sweeney [38] применили электрофорез в полиакриламидном геле с мочевиной для исследования протеолиза в ирландском фермерском сыре Камамбер с целью выявления особенностей процесса его созревания. Наблюдения в течение 10 недель показали деградацию казеинов: первоначально из-за действия химозина и плазмина, а позже — из-за протеиназ *Penicillium camemberti*. Были определены протеолитические особенности протеиназ *Penicillium camemberti* в отношении казеинов в гидролизатах молока и идентифицированы 64, 6, 28 и 2 сайта расщепления в  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеине соответственно. Получена новая информация о пептидах, образующихся во время созревания, и установлены фрагменты молекул, наиболее восприимчивые к протеолизу: для  $\alpha_{S1}$ -казеина — 1–40, 79–114 и 168–199; для  $\alpha_{S2}$ -казеина — 42–79 и 97–116; для  $\beta$ -казеина — 40–57, 101–125, 143–189 и 165–209; для  $\kappa$ -казеина — 31–81 и 124–137.

Для изучения изменений конформации и четвертичной структуры белков широко используется электрофорез в полиакриламидном геле с поперечным градиентом мочевины. Методически это осуществляется сравнением структур, полученных для нативной субъединицы и для денатурированного белка в гелях с градиентным изменением концентрации мочевины [39]. При электрофорезе в градиентном геле мочевины эффективный размер молекулы белка из-за разворачивания значительно изменяется вдоль поперечного линейного градиента концентрации мочевины, а суммарный заряд молекулы не меняется. Развернутый белок мигрирует медленнее, чем нативный белок. Это позволяет отслеживать конформационные переходы, стимулируемые мочевиной, путем измерения относительной подвижности белка в зависимости от концентрации мочевины. Благодаря разделению структурно различных молекул в геле, электрофорез в градиенте мочевины потенциально способен обнаруживать и идентифицировать количественно переходные кинетические промежуточные продукты, заселяемые во время разворачивания и рефолдинга белка, которые не обнаруживаются в равновесных экспериментах [40].

### 3.1.4. Иммуноэлектрофорез

Под общим термином «иммуноэлектрофорез» подразумевается ряд методов разделения и характеристики белков, основанных на электрофорезе и на реакции с антителами. В качестве антител во всех вариантах иммуноэлектрофореза используются иммуноглобулины — защитные белки, которые иммунная система производит для борьбы с вирусами, бактериями, паразитами и аллергенами. Этот тип электрофореза превосходит остальные по чувствительности и разрешающей способности.

Иммуноэлектрофоретические методы были разработаны и широко использовались во второй половине XX века, в том числе для исследования молочных белков. В хронологической последовательности появились такие варианты метода: иммуноэлектрофоретический анализ (одномерный иммуноэлектрофорез), перекрестный иммуноэлектрофорез (двумерный количественный иммуноэлектрофорез), ракетно-иммуноэлектрофорез (одномерный количественный иммуноэлектрофорез), реактивный иммуноэлектрофорез с плавлением, аффинный иммуноэлектрофорез.

С помощью одномерного иммуноэлектрофореза было изучено влияние нагревания на белки молока [41], проведена идентификация белков коровьего молока [42]. Методом перекрестного иммуноэлектрофореза был проведен сравнительный анализ мембранных белков различных видов млекопитающих [43] и исследован белковый состав оболочек жировых глобул коровьего молока [44,45].

В настоящее время иммуноэлектрофорез в исследованиях белков молока (также, как и в исследованиях белков мяса) широко не распространен, что может быть связано со сложной подготовкой геля и процедур иммуноокрашивания, а также из-за необходимости использования специфических антител [46].

### 3.1.5. Капиллярный электрофорез

Метод капиллярного электрофореза основан на разделении заряженных компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля за счет подачи высокого напряжения к концам капилляра [47].

Метод капиллярного электрофореза с момента своего возникновения в 80-е годы XX века постоянно совершенствуется. За последние

10 лет он превратился в мощный и эффективный инструмент анализа пищевых продуктов. Его аналитические возможности существенно расширены, а именно: понижены пределы обнаружения искоемых веществ вследствие применения новых подходов к внутрикапиллярному концентрированию, а также повышена эффективность разделения за счет использования ковалентно связанных и динамических покрытий стенок кварцевого капилляра с применением наночастиц и наноструктурированных полимеров [48].

С момента своего возникновения метод подвергался постоянным доработкам с целью повышения эффективности разделения за счет модификации внутреннего покрытия капилляра и состава подвижной фазы. Так, например, авторами / исследователями De Jong и др. [49] было предложено использовать капилляр с гидрофильным покрытием, снижающим адсорбцию разделяемых веществ на его стенках, а в качестве подвижной фазы использовать водный раствор, содержащий 6 М мочевины и метилгидроксипропилцеллюлозу, с низким значением pH (2,5–3,0). При этих условиях проходило полное разделение сывороточных белков и казеинов в коровьем, козьем, овечьем молоке, а также термически поврежденного казеина.

Разделение молочных белков капиллярным электрофорезом позволило осуществить его практическое применение в части обнаружения фальсификаций молока и молочных продуктов. Cartoni с соавторами [50] описано использование капиллярного электрофореза для идентификации и количественного определения коровьего молока в продуктах из козьего молока по присутствию определенных сывороточных белков. Chen и Zang [51] установили возможность использования этого метода для выявления фальсификации натурального молока сухим молоком по соотношению  $\beta$ -казеина к  $\alpha$ -лактальбумину.

Капиллярный электрофорез позволяет проводить анализ белков и крупных пептидов с высоким разрешением и может быть успешно применен для оценки степени первичного протеолиза в различных видах сыра [52,53,54].

Как известно, первоначальное расщепление казеина в сыре происходит из-за совместного действия молокосвертывающего фермента и плазмينا [55]. При этом соотношение  $\alpha$ <sub>1</sub>-I-казеин/ $\alpha$ <sub>1</sub>-казеин можно рассматривать как показатель протеолитической активности химозина, а соотношение  $\gamma$ -казеин/ $\beta$ -казеин — как показатель протеолитической активности плазмينا. Такой подход применили итальянские исследователи [56] для оценки подлинности национального сыра Fontina с защищенным обозначением происхождения (PDO) из сырого молока в сравнении с аналогом — сыром Fontal. Разложение фракций казеина они проводили с использованием капиллярной колонки с гидрофильным покрытием, методом капиллярного зонного электрофореза. Установленные различия объяснялись отклонениями параметров технологических процессов при изготовлении сыра Fontal от строго установленных для сыра Fontina. В первую очередь это касалось температуры второго нагревания и типа применяемого молокосвертывающего фермента.

На капиллярном электрофорезе обычно основаны рутинные методы профилирования белков коровьего молока, которые не позволяют однозначно подтвердить идентичность разделенных белков. Поэтому максимальная эффективность применения капиллярного электрофореза предусматривает его сочетание с масс-спектрометрией — наиболее распространенным методом идентификации белков. Ghafoori и др. [57] предложили новый метод капиллярного электрофореза-масс-спектрометрии в режиме положительной ионизации электрораспылением. В оптимизированных условиях этот метод позволил разделить и идентифицировать на интактном уровне основные белки коровьей молочной сыворотки и казеина менее чем за 15 минут.

### 3.2. Хроматография

Хроматография — процесс разделения веществ, находящихся в смеси или в растворе, на составляющие компоненты в системе двух фаз, одна из которых неподвижна, а другая перемещается относительно первой. Перемещение способствует миграции веществ, при этом неподвижная фаза не изменяется, а каждый компонент движется независимо от других с собственной скоростью.

По агрегатному состоянию системы, в которой происходит разделение веществ, хроматография разделяется на газовую и жидкостную. По механизму разделения — на распределительную, адсорбционную, ионообменную, гель-хроматографию, аффинную. Возможно сочетание нескольких одновременно протекающих процессов с различными механизмами разделения, но один из них всегда является доминирующим.

#### 3.2.1. Газовая хроматография

В газовой хроматографии подвижной фазой является газ. В зависимости от состояния неподвижной фазы газовая хроматография подразделяется на газо-адсорбционную (когда неподвижной фазой является твердый адсорбент) и газо-жидкостную (когда неподвижной фазой является жидкость или, точнее, пленка жидкости на поверхности частиц твердого адсорбента).

Газовая хроматография в основном используется для исследования летучих ароматических соединений, присутствующих в молоке и в молочных продуктах, в первую очередь в сыре [58]. Образующиеся в результате протеолиза пептиды разного размера и свободные аминокислоты способствуют образованию вкуса, общего для большинства сыров, а свободные аминокислоты являются важными предшественниками широкого спектра катаболических реакций, которые производят летучие соединения, формирующие вкус и аромат сыров [59].

#### 3.2.2. Жидкостная хроматография

В основе этого метода лежит адсорбция определяемых компонентов, находящихся в растворенном состоянии, твердым веществом, играющим роль неподвижной фазы. В качестве адсорбентов в адсорбционно-жидкостной хроматографии применяются органические и неорганические вещества: сахароза, крахмал, оксид алюминия, силикагель, активированный уголь и др. Разделение компонентов смеси происходит вследствие различия их физических свойств (электрического заряда, молекулярной массы, гидрофобности), обуславливающих их сродство к каждой фазе. Чем лучше вещество растворимо в жидкой подвижной фазе, тем дальше оно продвинется по направлению тока растворителя, демонстрируя низкое сродство к неподвижной фазе. Вещества, плохо растворимые в подвижной фазе, расположатся ближе к точке нанесения. Таким образом, сначала из колонки элюируются соединения с низким сродством к неподвижной фазе, за которыми следуют более прочно удерживаемые соединения [60].

К методам жидкостной хроматографии относятся ионообменная хроматография, гель-фильтрация, аффинная хроматография. Особое место в этом ряду занимает высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), называемая также жидкостной хроматографией высокого давления. Это наиболее перспективный и широко используемый аналитический вариант классической колоночной хроматографии в современном приборном исполнении.

#### 3.2.3. Ионообменная хроматография

Основана на способности некоторых твердых веществ (ионитов) обмениваться ионами с подлежащими разделению веществами. Применяемые в ионообменной хроматографии иониты могут быть как органическими, так и неорганическими. Способность к ионному обмену определяется строением ионита, представляющего собой каркас, на котором закреплены активные группы ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{NH}_2\text{Cl}$ ,  $-\text{NH}_2\text{Cl}$  и др.). В зависимости от обмена катионов или анионов иониты делят на катиониты, аниониты и амфолиты. На принципах ионообменной хроматографии основано разделение аминокислот в аминокислотных анализаторах [61,62].

#### 3.2.4. Гель-фильтрация (гельпроникающая хроматография)

Гельпроникающая хроматография основана на различии в размерах, форме и молекулярных массах белков и пептидов. Этот метод предполагает отсутствие взаимодействия между неподвижной фазой (гелем) и растворенным веществом. Разделение происходит в хроматографических колонках, заполненных сферическими частицами набухшего геля (размером 10–500 мкм) из полимерных материалов. Частицы геля проницаемы благодаря внутренним каналам, которые характеризуются определенным средним диаметром. При прохождении раствора образца через гранулы пористого геля разделение молекул происходит исключительно по их размеру. Чем меньше молекулы, тем легче они проникают сквозь поры внутрь гранул геля и поэтому дольше задерживаются там. Путь их прохождения через колонку получается длиннее, чем у более крупных молекул белков и пептидов, которые не способны проникать внутрь пористых гранул геля.

Известно применение метода гель-фильтрации для оценки процесса созревания сыров путем анализа так называемых пептидных профилей [63]. Различия в качественном составе пептидных фракций и их количественные соотношения позволяют изучить особенности протекания протеолитических процессов при созревании сыров, а также выявить видовые различия зрелых сыров, изготавливаемые по разным технологиям.

#### 3.2.5. Аффинная хроматография

Сущность метода аффинной хроматографии заключается в специфическом взаимодействии белков с особыми веществами — лигандами, закрепленными на неподвижной фазе. Используемые

молекулы лигандов не должны вызывать неестественные взаимодействия и изменять конформацию присоединяемого к ним белка. Распространенным вариантом аффинной хроматографии является иммуноаффинная хроматография с использованием антител в качестве лигандов.

При пропускании смеси белков через колонку все молекулы, которые не обладают сродством к лиганду, закрепленному на носителе, пройдут не задерживаясь. А белок, имеющий сродство к аффинному лиганду, будет адсорбироваться на колонке. После этого адсорбированный белок с колонки вымывают буферными смесями с измененной величиной pH, ионной силой, а также введением в состав элюента веществ, ослабляющих связи между белками и лигандами.

Применительно к молочным белкам аффинная хроматография была применена для выделения  $\beta$ -лактоглобулина из молочной сыворотки, а также для извлечения мелких белков из изолятов сывороточного белка. Этот метод может быть использован также для концентрирования, выделения и идентификации второстепенных катионных белков, таких как лактоферрин и другие факторы роста [64,65], меланина [66].

Вышеописанные методы разделения белков необходимы и обязательны для их последующей идентификации и потому в протеомном анализе они используются в комбинации с методами, позволяющими обнаружить и распознать отдельные белки.

#### 4. Методы идентификации белков

К наиболее популярным методам идентификации белков после их разделения электрофоретическими или хроматографическими методами относятся вестерн-блоттинг и масс-спектрометрический анализ.

##### 4.1. Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг представляет собой процедуру, целью которой является обнаружение определенного (специфического) белка в исследуемом объекте. Белки обычно анализируются после разделения с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в соответствии с их массой или с помощью двумерного электрофореза в геле (2-DE) в соответствии с их  $pI$  и массой. Затем разделенные белки переносятся на мембраны, где конкретные интересующие белки могут быть обнаружены с помощью антител, распознающих цель [67,68,69].

Количественный вестерн-блоттинг состоит из четырех основных этапов: 1 — разделение белков по размеру; 2 — перенос белка на твердую подложку (мембрану); 3 — маркировка целевого белка с использованием соответствующих первичных и вторичных антител для визуализации; 4 — полуколичественный анализ [70].

С момента своего возникновения в 1979 г. [71,72] блоттинг белков постоянно развивался. В настоящее время существуют различные способы и средства его осуществления. Перенос белков может осуществляться методами, основанными на принципах простой диффузии, вакуумного потока растворителя, электрофоретического элюирования и др. Один из последних вариантов осуществления этого метода представлен в протоколе, разработанном колумбийскими учеными [73].

В публикациях, освещающих использование вестерн-блоттинга при изучении молочных белков, преобладают направления, связанные с обнаружением фальсификации состава молока и молочных продуктов. Среди них следует отметить работу Chávez и др. [74] о применении вестерн-блоттинга с использованием поликлональных антител для обнаружения гликомакропептида в молоке и в других пищевых системах, содержащих подсырную сыворотку. Это может быть полезно при установлении фальсификации молока подсырной сывороткой, присутствие которой можно обнаружить идентификацией гликомакропептида. В данном случае гликомакропептид является специфическим маркером, т. к. он отсутствует в молоке, но присутствует в сыворотке, образующейся при производстве сыра. Это является результатом свертывания молока сычужным ферментом под действием химозина, когда молочный белок ( $\kappa$ -казеин) распадается на два пептида. Более крупный пептид, называемый пара- $\kappa$ -казеином (остатки 1–105), остается в структуре образующегося геля, а меньший — гликомакропептид (остатки 106–169) — переходит в сыворотку. Он представляет собой гликозилированный растворимый пептид с молекулярной массой 6,8 кДа без гликозидной части. Гликомакропептид является специфическим компонентом подсырной сыворотки и должен отсутствовать в нефальсифицированном молоке. Авторы сообщают, что с помощью вестерн-блоттинга можно обнаружить в молоке 0,001% гликомакропептида, 0,5% жидкой и 0,001% сухой подсырной сыворотки.

Следует отметить, что гликомакропептид, выделяемый из подсырной сыворотки, обладает высокими питательными свойствами и относится к функциональным ингредиентам. Некоторые компании по производству молочных продуктов уже коммерциализируют его, чтобы воспользоваться его потенциалом в качестве пищевой добавки. Вместе с тем он является маркером фальсификации молока подсырной сывороткой, который использовался в различных методах анализа, в том числе ВЭЖХ [75].

В работе Molina и соавторов [76] сывороточные белки молока  $\alpha$ -лактальбумин и  $\beta$ -лактоглобулин рассматриваются как фальсифицирующие агенты в соевом молоке. Для их обнаружения был применен метод вестерн-блоттинга после разделения соевых и молочных белков с помощью SDS-PAGE. После электрофоретического разделения была проведена иммунодетекция с антисыворотками против  $\alpha$ -лактальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина. Авторы утверждают о возможности обнаружения фальсификации сывороточными белками молока в различных видах соевого молока (в сухом соевом молоке и соевых детских смесях) на минимальном уровне 0,1%.

В работе этих же ученых [77] представлены результаты исследований по обнаружению пастеризованного и ультрапастеризованного коровьего молока, а также термически денатурированных сывороточных белков коровьего молока в сырах, изготовленных из молока других животных (овечьего, козьего и буйволиного). Для этого использовался вестерн-блоттинг  $\beta$ -лактоглобулина, выделенного из казеиновой фракции, с иммунодетекцией антисывороткой. Изучалась селективность антисывороток в реакции с нативным и денатурированным  $\beta$ -лактоглобулином. Установлено, что иммуноблоттинг нативных пластинок PAGE сывороточных белков из сыра позволяет обнаруживать денатурированные под действием тепла сывороточные белки коровьего молока или пастеризованное коровье молоко, добавленные в сыр даже в количестве менее 1%.

В публикации турецких ученых [78] приведены результаты сравнительных исследований электрофоретических профилей фракций казеина в коровьем и буйволином молоке. Образцы молока были проанализированы на предмет молекулярной массы их фракций казеина с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга. Установлено, что казеиновые фракции  $\alpha_s$ ,  $\beta$  и  $\kappa$  в буйволином молоке имеют более высокие молекулярные массы, чем те же фракции в коровьем молоке. Это может быть использовано для идентификации молока коров и буйволиц. Кроме того, был сделан вывод о том, что буйволиное молоко может положительно влиять на реологические свойства и выход изготавливаемых из него молочных продуктов.

##### 4.2. Масс-спектрометрия

В основе метода лежит ионизация молекул белков и пептидов с последующим разделением ионов в вакууме электрическим или магнитным полем в зависимости от их массы и заряда, влияющих на скорость перемещения. Метод реализуется в приборах — масс-спектрометрах.

Сначала осуществляется ионизация молекул, затем — перевод ионов в газовую фазу в вакуумной части масс-спектрометра. Глубокий вакуум необходим для обеспечения беспрепятственного движения ионов, т. к. при его отсутствии ионы рассеиваются и теряют заряд. На заряженную частицу, движущуюся в магнитном или электрическом поле, действует сила Лоренца, искажающая ее траекторию. Определяется разница траекторий ионизированных молекул, по которой рассчитываются соотношения их масс и зарядов ( $m/z$ ). Подсчет доли каждого компонента осуществляется путем измерения интенсивности ионного потока. Масс-спектр вещества представляет собой совокупность значений отношения массы к заряду ( $m/z$ ) всех ионизированных молекул, представленных в зависимости от интенсивности ионного тока.

Существует множество модификаций масс-спектрометрического анализа, отличающихся как методами ионизации молекул белков и пептидов, так и методами их идентификации. Способы ионизации могут быть: бомбардировка быстрыми атомами (FAB — fast atom bombardment); матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI — matrix assisted desorption/ionization); ионизация электрораспылением (ESI — electrospray ionization). Наиболее распространенными из них являются ионизация электрораспылением (ESI) и матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI). Эти методы считаются щадящими, т. к. не вызывают разрушения относительно хрупких пептидных молекул во время ионизации [79].

В методе ионизации электрораспылением (ESI) образец в форме раствора распыляется через небольшой игольчатый излучатель под высоким напряжением на вход масс-спектрометра. Поскольку это

непрерывное распыление, его можно легко соединить с элюатом из жидкостной хроматографии (ЖХ), что позволяет проводить онлайн ЖХ-ESI-масс-спектрометрию.

Метод лазерной десорбции-ионизации с матрицей (MALDI) включает смешивание образца с матрицей, сушку его на стальной мишени, а затем облучение высушенного пятна образца лазером. MALDI довольно сложно взаимодействует в тандеме с жидкостной хроматографией, но может обеспечить быстрый анализ очень небольших количеств анализируемого вещества. Обычно он комбинируется с времяпролетным масс-анализатором. Используемый при этом времяпролетный метод (ToF — *Time of Flight*) позволяет определять скорость движения частицы по времени пролета от мишени до детектора [79].

Масс-спектрометрия предусматривает два подхода к идентификации белков: методом «сверху вниз» (top-down) и методом «снизу вверх» (bottom-up).

Метод top-down основывается на масс-спектрометрическом анализе неповрежденных белковых молекул. В методе bottom-up применяется предварительное энзиматическое расщепление белка для получения набора пептидных фрагментов. Расшифровка полученных спектров пептидов осуществляется путем сопоставления с пептидными базами данных и по совокупности пептидов дается характеристика и идентификация исходного белка [80].

Следует отметить, что расшифровка масс-спектров и интерпретация полученной информации является важнейшим этапом масс-спектрометрического анализа. Эта процедура требует проведения компьютерной обработки результатов и обращения к базам масс-спектральных данных, таким как NIST (США), MassBank (Япония).

В настоящее время масс-спектрометрия признана основным методом анализа белков, благодаря информативности, чувствительности и экспрессности. Этот метод позволяет не только быстро и надежно определять первичную структуру белков, но и изучать структуры более сложного порядка, а также устанавливать тип и место посттрансляционных модификаций [81].

Масс-спектрометрия высокого разрешения подтвердила свою важность для надежной характеристики протеоформ белков коровьего молока, особенно протеоформ с небольшими различиями в молекулярной массе, таких как  $\beta$ -казеин A1 и A2, отличающихся всего одной аминокислотой. Такая точность необходима для точной и однозначной идентификации молока со специфическим составом  $\beta$ -казеина (например, молока A2A2, которое широко известно как молоко A2) [57]. Тандемная масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением (ESI-MS/MS) успешно применяется для иденти-

фикации биоактивных пептидов в пищевых матрицах, в том числе в сырах [82].

Масс-спектрометрия как высокоточный аналитический метод нашла широкое применение в контроле качества молочных продуктов. С ее помощью ученые могут обнаруживать различные загрязнения, такие как токсичные металлы (свинец и кадмий [83]), оценивать жизнеспособность полезных бактерий (бифидобактерий [84]), контролировать гормональный фон (определяя уровень эстрогенов [85]), а также выявлять фальсификацию путем обнаружения добавок сухого молока в натуральном коровьем [86]. Присутствие сухого молока в натуральном молоке в работе [86] обнаруживалось с помощью MALDI-TOF MS по наличию специфических пептидов, модифицированных под воздействием высоких температур, применяемых при сушке молока.

Чаще всего масс-спектрометрия используется в сочетании с жидкостной (ЖХ-МС) и газовой хроматографией (ГХ-МС). Комбинация двух селективных методов позволяет разделять и измерять количество интересующих белков и пептидов в сложных смесях и обнаруживать определенные соединения в соответствии с их элементными и структурными характеристиками.

## 5. Выводы

Для исследования белковой системы молока и молочных продуктов применяются различные методы протеомики. Наиболее распространенными являются методы, основанные на разделении и идентификации белков и пептидов. Для разделения белковых фракций используются различные варианты электрофореза и хроматографии, а для идентификации — спектрометрия и вестерн-блоттинг.

Помимо научной ценности, эти методы имеют важное практическое значение. Прежде всего, оно выражается в выявлении различного рода фальсификаций состава молока и молочных продуктов. Это может быть добавление в молоко и молочные продукты сухого молока или подсырной сыворотки, а также подмена молочного сырья молоком других животных, что недопустимо, например, при производстве сыров с защищенным наименованием места происхождения (PDO) или с защищенным географическим указанием (PGI).

К перспективным направлениям использования протеомных методов следует отнести исследования протеолитических процессов, протекающих при созревании сыров, а также установление их видовых различий в зависимости от технологии изготовления. Несмотря на большой потенциал протеомных методов, особенно методов разделения и идентификации белков, требуется проведение дополнительных исследований в данной области.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- Goulding, D. A., Fox, P. F., O'Mahony, J. A. (2020). Milk proteins: An overview. Chapter in a book: *Milk Proteins* (Third Edition). Academic Press, 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815251-5.00002-5>
- Buzás, H., Székelyhidi, R., Szafner, G., Szabó, K., Süle, J., Bukovics, S. et al. (2022). Developed rapid and simple RP-HPLC method for simultaneous separation and quantification of bovine milk protein fractions and their genetic variants. *Analytical Biochemistry*, 658, Article 114939. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114939>
- Caroli, A. M., Savino, S., Bulgari, O., Monti, E. (2016). Detecting  $\beta$ -casein variation in bovine milk. *Molecules*, 21(2), Article 141. <https://doi.org/10.3390/molecules21020141>
- Xiao, J., Wang, J., Gan, R., Wu, D., Xu, Y., Peng, L. et al. (2022). Quantitative N-glycoproteome analysis of bovine milk and yogurt. *Current Research in Food Science*, 5, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2022.01.003>
- Stastna, M. (2024). Advances in separation and identification of biologically important milk proteins and peptides. *Electrophoresis*, 45(1–2), 101–119. <https://doi.org/10.1002/elps.202300084>
- Baptista, D. P., Gigante, M. L. (2021). Bioactive peptides in ripened cheeses: Release during technological processes and resistance to the gastrointestinal tract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(10), 4010–4017. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11143>
- Lorieau, L., Halabi, A., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D., Flourey, J. (2018). Impact of the dairy product structure and protein nature on the proteolysis and amino acid bioaccessibility during in vitro digestion. *Food Hydrocolloids*, 82, 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.019>
- Beil, E., Holland J. W., Boland, M. (2020). Post-translational modifications of caseins. Chapter in a book: *Milk Proteins* (Third Edition). Academic Press, 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815251-5.00005-0>
- Rout, P. K., Verma, M. (2021). Post translational modifications of milk proteins in geographically diverse goat breeds. *Scientific Reports*, 11(1), Article 5619. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85094-9>
- Leduc, A., Le Guillou, S., Bianchi, L., Correia, L. O., Gelé, M., Pires, J. et al. (2022). Milk proteins as a feed restriction signature indicating the metabolic adaptation of dairy cows. *Scientific Reports*, 12(1), Article 18886. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21804-1>
- Lu, J., Antunes Fernandes, E., Páez Cano, A. E., Vinitwatanakun, J., Boeren, S., van Hooijdonk, T. et al. (2013). Changes in milk proteome and metabolome associated with dry period length, energy balance, and lactation stage in postparturient dairy cows. *Journal of Proteome Research*, 12(7), 3288–3296. <https://doi.org/10.1021/pr4001306>
- Olumee-Shabon, Z., Boehmer, J. L. (2018). Proteomic analysis of goat milk. Chapter in a book: *Goat Science*. InTech, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70082>
- Ceciliani, F., Eckersall, D., Burchmore, R., Lecchi, C. (2014). Proteomics in veterinary medicine: Applications and trends in disease pathogenesis and diagnostics. *Veterinary Pathology*, 51(2), 351–362. <https://doi.org/10.1177/0300985813502819>
- Aalaie, K., Rayner, M., Sjöholm, I. (2019). Chemical methods and techniques to monitor early Maillard reaction in milk products; A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(12), 1829–1839. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1431202>
- Башаева, Д. В., Хаертдинов, Р. Р. (2008). Изменение белков молока при тепловой обработке. *Молочная промышленность*, 7, 74–75. [Bashaeva, D. V., Khaerdinov, R. R. (2008). Changes in milk proteins at heat treatment. *Dairy Industry*, 7, 74–75. (In Russian)]
- Балакирева, Ю. В., Зайцев, С. Ю., Каримова, Ф. Г., Акулов, А. Н., Ахмадулина, Ф. Ю. (2012). Влияние режима пастеризации на полипептидный состав молока. *Фундаментальные исследования*, 2–1, 170–173. [Balakireva, J. V., Zaitsev, C. Y., Karimova, F. G., Akulov, A. N., Akhmadullina, F. Y., Karimova, F. G. (2015). Electrophoretic research of influence heat treatment to cow milk's polypeptides. *Fundamental Research*, 2–16, 3544–3548. (In Russian)]
- Щербакова, Ю. В., Акулов, А. Н., Ахмадулина, Ф. Ю., Каримова, Ф. Г. (2015). Электрофоретические исследования влияния тепловой обработки на полипептидный состав молока. *Фундаментальные исследования*, 2–16, 3544–3548. [Scherbakova, Y. V., Akulov, A. N., Akhmadullina, F. Y., Karimova, F. G. (2015). Electrophoretic research of influence heat treatment to cow milk's polypeptides. *Fundamental Research*, 2–16, 3544–3548. (In Russian)]
- Vasbinder, A. J., de Kruijff, C. G. (2003). Casein–whey protein interactions in heated milk: The influence of pH. *International Dairy Journal*, 13(8), 669–677. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(03\)00120-1](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(03)00120-1)
- Баникова, А. В., Евдокимов, И. А. (2015). Функционально-технологические свойства сывороточных белковых продуктов: влияние изменений условий

- среды и вида обработки. *Молочная промышленность*, 2, 42–44. [Bannikova, A. V., Evdokimov, I. A. (2015). Functional and technological properties of whey protein products: Effects of the changes of environmental conditions and type of treatment. *Dairy Industry*, 2, 42–44. (In Russian)]
20. Лепилкина, О. В., Григорьева, А. И. (2023). Ферментативный протеолиз при преобразовании молока в сыр. *Пищевые системы*, 6(1), 36–45. [Lepilkina, O. V., Grigorieva, A. I. (2023). Enzymatic proteolysis during the conversion of milk into cheese. *Food Systems*, 6(1), 36–45. (In Russian)] <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45>
  21. Ardö, Y. (2021). Enzymes in cheese ripening. Chapter in a book: *Agents of Change. Food Engineering Series*. Springer, Cham, 2021. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_15)
  22. Кручинин, А. Г., Агаркова, Е. Ю. (2020). Биологически активные пептиды молока: обзор. *Пищевая промышленность*, 12, 92–96. [Kruchinin A. G., Agarkova E. Yu. (2020). Biologically active peptides of milk: A review. *Food Industry*, 12, 92–96. (In Russian)] <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10151>
  23. Милентьева, И. С., Давыденко, Н. И., Расщепкин, А. Н. (2020). Подбор рабочих параметров для проведения направленного протеолиза казеина с целью получения биопептидов. *Техника и технология пищевых производств*, 50(4), 726–735. [Milentyeva, I. S., Davydenko, N. I., Rasshchepkin, A. N. (2020). Casein proteolysis in bioactive peptide production: Optimal operating parameters. *Food Processing: Techniques and Technology*, 50(4), 726–735. (In Russian)] <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-726-735>
  24. Patterson, S. D., Aebersold, R. H. (2003). Proteomics: The first decade and beyond. *Nature Genetics*, 33(S3), 311–323. <https://doi.org/10.1038/ng1106>
  25. Anderson, N. L., Anderson, N. G. (1998). Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19(11), 1853–1861. <https://doi.org/10.1002/elps.1150191103>
  26. Lund, M., Jönsson, B. (2005). On the charge regulation of proteins. *Biochemistry*, 44(15), 5722–5727. <https://doi.org/10.1021/bi047630o>
  27. Sharma, N., Sharma, R., Rajput, Y. S., Mann, B., Singh, R., Gandhi, K. (2021). Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution. *International Dairy Journal*, 114, Article 104920. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104920>
  28. Pesic, M., Barac, M., Vrvic, M., Ristic, N., Macej, O., Stanojevic, S. (2011). Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. *Food Chemistry*, 125(4), 1443–1449. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.045>
  29. Pesic, M. B., Barac, M. B., Stanojevic, S. P., Ristic, N. M., Macej, O. D., Vrvic, M. M. (2012). Heat induced casein–whey protein interactions at natural pH of milk: A comparison between caprine and bovine milk. *Small Ruminant Research*, 108(1–3), 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.06.013>
  30. O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007–4021. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41496-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41496-8)
  31. Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics*, 73(11), 2064–2077. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.05.016>
  32. Wilkins, M. R., Sanchez, J.-C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphrey-Smith, I., Hochstrasser, D. F. et al. (1996). Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 19–50. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>
  33. Klose, J., Kobalz, U. (1995). Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 16(1), 1034–1059. <https://doi.org/10.1002/elps.11501601175>
  34. Westermeier, R. (2014). Looking at proteins from two dimensions: A review on five decades of 2D electrophoresis. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 120(5), 168–172. <https://doi.org/10.3109/13813455.2014.945188>
  35. Roy, S., Kumar, V. (2014). A practical approach on SDS PAGE for separation of protein. *International Journal of Science and Research*, 3(8), 955–960.
  36. Boehmer, J. L., Bannerman, D. D., Shefcheck, K., Ward, J. L. (2008). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine milk during experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 91(11), 4206–4218. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1297>
  37. Van Hekken, D. L., Thompson, M. P. (1992). Application of PhastSystem® to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 75(5), 1204–1210. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77868-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77868-0)
  38. Mane, A., McSweeney, P. L. H. (2019). Proteolysis in Irish farmhouse Camembert cheese during ripening. *Journal of Food Biochemistry*, 44(1), Article e13101. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13101>
  39. Gentile, F., Veneziani, B. M., Sellitto, C. (1997). Polyacrylamide gel electrophoresis in discontinuous transverse urea-gradient gels. *Analytical Biochemistry*, 244(2), 228–232. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9863>
  40. Kalnine, N. N., Schachman, H. K. (2002). Quantitative urea gradient gel electrophoresis for studies of dissociation and unfolding of oligomeric proteins. *Biophysical Chemistry*, 101–102, 133–144. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00154-0](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00154-0)
  41. Aurand, L. W., Brown, J. W., Lecce, J. G. (1963). Effect of heat on the proteins of milk as revealed by gel and immunoelectrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 46(11), 1177–1182. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(63\)89241-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(63)89241-3)
  42. Martinez-Resa, P., Alvarez-Moreno, C., Hermida, F., Chordi, A. (1969). Identification by immunoelectrophoresis of bovine milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 52(1), 1–7. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86490-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86490-8)
  43. Bjerrum, O. J. (1975). Quantitative immunoelectrophoresis for comparative analysis of membrane proteins from various mammalian species. *International Journal of Biochemistry*, 6(7), 513–519. [https://doi.org/10.1016/0020-711x\(75\)90032-4](https://doi.org/10.1016/0020-711x(75)90032-4)
  44. Nielsen, C. S., Bjerrum, O. J. (1977). Crossed immunoelectrophoresis of bovine milk fat globule membrane protein solubilized with non-ionic detergent. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 466(3), 496–509. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(77\)90342-x](https://doi.org/10.1016/0005-2736(77)90342-x)
  45. Mather, I. H., Tamplin, C. B., Irving, M. G. (1980). Separation of the proteins of bovine milk-fat-globule membrane by electrofocusing with retention of enzymatic and immunological activity. *European Journal of Biochemistry*, 110(2), 327–336. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04871.x>
  46. Крюченко, Е. В., Замула, В. С., Кузлякина, Ю. А., Чернуха, И. М. (2020). Обзор современных методов обнаружения аллергенов в пищевой продукции. *Все о мясе*, 5S, 169–172. [Kryuchenko, E. V., Zamula, V. S., Kuzlyakina, Yu. A., Chernukha, I. M. (2020). Overview of modern methods for detecting allergens in food. *Vsyo o Myase*, 5S, 169–172. (In Russian)] <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2020-5S-169-172>
  47. Зипаев, Д. В., Тулина, А. А., Кожухов, А. Н. (2020). Использование метода капиллярного электрофореза в оценке пищевых продуктов и напитков. *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*, 82(1), 82–87. [Zipae, D. V., Tulina, A. A., Kozhukhov, A. N. (2020). The use of capillary electrophoresis in the evaluation of food and beverages. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*, 82(1), 82–87. (In Russian)] <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2020-1-82-87>
  48. Карцова, Л. А., Макеева, Д. В., Бессонова, Е. А. (2020). Современное состояние метода капиллярного электрофореза. *Журнал аналитической химии*, 75(12), 1059–1079. [Kartsova, L. A., Makeeva, D. V., Bessonova, E. A. (2020). Current status of capillary electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry*, 75(12), 1497–1513. (In Russian)] <https://doi.org/10.31857/S0044550220120087>
  49. De Jong, N., Visser, S., Olieman, C. (1993). Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 652(1), 207–213. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80661-q](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80661-q)
  50. Cartoni, G., Coccioli, F., Jasionowska, R., Masci, M. (1999). Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *Journal of Chromatography A*, 846(1–2), 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01032-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01032-2)
  51. Chen, F.-T. A., Zang, J.-H. (1992). Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of AOAC International*, 75(5), 905–909. <https://doi.org/10.1093/jaoac/75.5.905>
  52. D'Incecco, P., Limbo, S., Hogenboom, J., Rosi, V., Gobbi, S., Pellegrino, L. (2020). Impact of extending hard-cheese ripening: A multiparameter characterization of parmigiano reggiano cheese ripened up to 50 months. *Foods*, 9(3), Article 268. <https://doi.org/10.3390/foods9030268>
  53. Masotti, F., De Noni, I., Cattaneo, S., Brasca, M., Rosi, V., Stuknyte, M. et al. (2013). Occurrence, origin and fate of pyroglutamyl- $\gamma_5$ -casein in cheese. *International Journal of Food Science*, 35(2), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.06.002>
  54. Alves, L. S., Merheb-Dini, C., Gomes, E., da Silva, R., Gigante, M. L. (2015). Yield, changes in proteolysis, and sensory quality of Prato cheese produced with different coagulants. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7490–7499. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7119>
  55. Ardö, Y., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., Upadhyay, V. K., Fox, P. F. (2017). Biochemistry of cheese ripening: Proteolysis. Chapter in a book: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417012-4.00018-1>
  56. Pellegrino, L., Hogenboom, J. A., Rosi, V., D'Incecco, P. (2021). Evaluating the authenticity of the raw-milk cheese fontina (PDO) with respect to similar cheeses. *Foods*, 10(2), Article 350. <https://doi.org/10.3390/foods10020350>
  57. Ghafoori, Z., Tehrani, T., Pont, L., Benavente, F. (2022). Separation and characterization of bovine milk proteins by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 45(18), 3614–3623. <https://doi.org/10.1002/jssc.202200423>
  58. Maslov, B. L. (2023). Biochemistry of aroma compounds in cheese. *Mljekarstvo*, 73(4), 211–224. <https://doi.org/10.15567/Mljekarstvo.2023.0401>
  59. McSweeney, P. L. H., Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80(3), 293–324. <https://doi.org/10.1051/Lait:2000127>
  60. Henke, H. (1999). *Liquid Chromatography*. Vogel Business Media, 1999. (In German)
  61. Рудаков, О. Б., Рудакова, Л. В. (2019). Аминокислотный анализ белков молока. *Переработка молока*, 12(242), 32–35. [Rudakov, O. B., Rudakova, L. V. (2019). Amino acid analysis of milk proteins. *Milk Processing*, 12(242), 32–35. (In Russian)] <https://doi.org/10.33465/2222-5455-2019-12-32-35>
  62. Волнин, А. А., Шералиев, Ф. Д., Шапошников, М. Н., Зайцев, С. Ю., Багиров, В. А. (2017). Применение ионообменной хроматографии при оценке биологической ценности белков молока овец. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2(1), 494–498. [Volnin, A. A., Sheraliev, F. D., Shaposhnikov, M. N., Zaitsev, S. Yu., Bagirov, V. A. (2017). Application of ion-exchange chromatography in assessing the biological value of sheep milk proteins. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2(1), 494–498. (In Russian)]
  63. Мягконосов, Д. С., Мордвинова, В. А., Абрамов, Д. В., Делицкая, И. Н. (2014). Особенности протеолиза у сыров различных видовых групп. *Сыростроение и маслоделие*, 2, 24–27. [Myagkonosov, D. S., Mordvinova, V. A., Abramov, D. V., Delitskaya, I. N. (2014). Special features of proteolysis in different groups of cheese types. *Cheese- and Buttermaking*, 2, 24–27. (In Russian)]
  64. Метель, В. С., Куликова, И. К., Анисимов, Г. С. (2018). Анализ современных методов фракционирования молочного сырья. *Вестник Северо-Кавказского федерального университета*, 2(65), 27–32. [Metel', V., Kulikova, I., Anisimov, G. (2018). Analysis of modern methods of milk protein fractionation. *Newsletter of North-Caucasus Federal University*, 2(65), 27–32. (In Russian)]
  65. Насибулин, Р. Р., Николаев, А. А. (2021). Разработка способа выделения лактоферрина верблюда. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 6, 11–16. [Nasibulin, R. R., Nikolaev, A. A. (2021). Development of a method for isolation of camel lactoferrin. *International Journal of Applied and Fundamental Research*, 6, 11–16. (In Russian)]
  66. Öztürk, S., Demir, N. (2021). Development of a novel IMAC sorbent for the identification of melamine in dairy products by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 100, Article 103931. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103931>

67. Moritz, C. P. (2020). 40 years Western blotting: A scientific birthday toast. *Journal of Proteomics*, 212, Article 103575. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103575>
68. Naryzhny, S. N. (2009). Blue Dry Western: Simple, economic, informative, and fast way of immunodetection. *Analytical Biochemistry*, 392(1), 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.037>
69. Kurien B. T., Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>
70. Omondi, C., Chou, A., Fond, K. A., Morioka, K., Joseph, N. R., Sacramento, J. A. et al. (2024). Improving rigor and reproducibility in western blot experiments with the blotRig analysis *Scientific Reports*, 14(1), Article 21644. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70096-0>
71. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
72. Burnette, W. N. (1981). «Western blotting»: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
73. Recalde-Reyes, D. P., Calderon, J. L. (2023). Electroforesis de proteínas y Western blot DENV. protocols.io. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.kxygx963dg8j/v1>
74. Chávez, N. A., Salinas, E., Jauregui, J., Palomares, L. A., Macías, K. (2008). Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by western blot immunoassay. *Food and Agricultural Immunology*, 19(4), 265–272. <https://doi.org/10.1080/09540100802381042>
75. Vera-Bravo, R., Hernández, A. V., Peña, S., Alarcón, C., Loaiza, A. E., Celis, C. A. (2022). Cheese whey milk adulteration determination using casein glycomacropeptide as an indicator by HPLC. *Foods*, 11(20), Article 3201. <https://doi.org/10.3390/foods11203201>
76. Molina, E., Amigo, L., Ramos, M. (1998). Detection of bovine milk proteins in soymilk by western blotting. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1691–1694. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.12.1691>
77. Molina, E., Fernández-Fournier, A., De Frutos, M., Ramos, M. (1996). Western blotting of native and denatured bovine  $\beta$ -lactoglobulin to detect addition of bovine milk in cheese. *Journal of Dairy Science*, 79(2), 191–197. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76350-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76350-6)
78. Dışhan, A., Gönülalan, Z., Alparslan, Y. (2019). Comparative analysis of cow and water buffalo milk casein fractions by Western Blotting. *Firat University Veterinary Journal of Health Sciences*, 33(2), 77–82.
79. Merkle, E. D., Kaiser, B. L. D., Kreuzer, H. (2019). A proteomics tutorial. Chapter in a Book: Applications in Forensic Proteomics: Protein Identification and Profiling. American Chemical Society, 2019. <https://doi.org/10.1021/bk-2019-1339.ch002>
80. Gross, J. H. (2019). Massenspektrometrie: Spektroskopiekurs kompakt. Springer Spektrum, 2019.
81. Лебедев, А. Т., Артеменко, К. А., Самгина, Т. Ю. (2012). Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. М.: Техносфера, 2012. [Lebedev, A. T., Artemenko, K. A., Samgina, T. Yu., (2012). Fundamentals of mass spectrometry of proteins and peptides. Moscow: Tekhnosfera, 2012. (In Russian)]
82. Bouroutzika, E., Proikakis, S., Anagnostopoulos, A. K., Katsafadou, A. I., Fthenakis, G. C., Tsangaris, G. Th. (2021). Proteomics analysis in dairy products: Cheese, a review. *Applied Sciences*, 11(16), Article 7622. <https://doi.org/10.3390/app11167622>
83. Mehraşbi, M. R., Peyda, M., Feizolahi, R., Taromi, A., Homayuni, P., Fathi, S. et al. (2023). Comparison of three digestion methods for determination of lead and cadmium in milk and dairy products. *Environmental Health Engineering and Management*, 10(2), 191–196. <https://doi.org/10.34172/ehem.2023.21>
84. Sibanda, T., Marole, T. A., Thomashoff, U., Thantsha, M., Buys, E. (2024). Bifidobacterium species viability in dairy-based probiotic foods: Challenges and innovative approaches for accurate viability determination and monitoring of probiotic functionality. *Frontiers in Microbiology*, 15, Article 1327010. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1327010>
85. Chang, J., Zhou, J., Gao, M., Zhang, H., Wang, T. (2022). Research advances in the analysis of estrogenic endocrine disrupting compounds in milk and dairy products. *Foods*, 11(19), Article 3057. <https://doi.org/10.3390/Foods11193057>
86. Calvano, C. D., Monopoli, A., Loizzo, P., Faccia, M., Zambonin, C. (2013). Proteomic approach based on MALDI-TOF MS to detect powdered milk in fresh cow's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1609–1617. <https://doi.org/10.1021/jf302999s>

| СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  | AUTHOR INFORMATION                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Принадлежность к организации                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  | Affiliation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |
| <b>Лепилкина Ольга Валентиновна</b> — доктор технических наук, главный научный сотрудник, отдел физической химии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслосахарной промышленности и сыроделия 152613, Ярославская обл., Углич, Красноармейский бульвар, 19<br>Tel.: +7-910-965-51-61<br>E-mail: ov.lepilkina@fncps.ru<br>ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-2375-3959">https://orcid.org/0000-0002-2375-3959</a><br>* автор для контактов |  | <b>Olga. V. Lepilkina</b> , Doctor of Technical Sciences, Leading Scientific Worker, Department of Physical Chemistry, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, 152613, Yaroslavl Region, Uglich, Russia<br>Tel.: +7-910-965-51-61<br>E-mail: ov.lepilkina@fncps.ru<br>ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-2375-3959">https://orcid.org/0000-0002-2375-3959</a><br>* corresponding author |  |
| <b>Григорьева Анастасия Игоревна</b> — младший научный сотрудник, отдел физической химии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслосахарной промышленности и сыроделия 152613, Ярославская обл., Углич, Красноармейский бульвар, 19<br>Tel.: +7-901-051-62-46<br>E-mail: a.grigoriyeva@fncps.ru<br>ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0003-4364-0342">https://orcid.org/0000-0003-4364-0342</a>                                                 |  | <b>Anastasija I. Grigorieva</b> , Junior Researcher, Department of Physical Chemistry, All-Russian Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, 152613, Yaroslavl Region, Uglich, Russia<br>Tel.: +7-901-051-62-46,<br>E-mail: a.grigoriyeva@fncps.ru<br>ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0003-4364-0342">https://orcid.org/0000-0003-4364-0342</a>                                                                    |  |
| Критерии авторства                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  | Contribution                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |
| Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  | The author has the sole responsibility for writing the manuscript and is responsible for plagiarism.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
| Конфликт интересов                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  | Conflict of interest                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
| Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  | The authors declare no conflict of interest.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |