

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-3-466-472>



Поступила 05.04.2024

Поступила после рецензирования 18.09.2024

Принята в печать 27.09.2024

© Семенова Е. С., Симоненко Е. С., Симоненко С. В., Зорин С. Н., Мазо В. К., 2024

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

Научная статья

Open access

ГИДРОЛИЗАТЫ БЕЛКОВ КОБЫЛЬЕГО МОЛОКА. ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Е. С. Семенова^{1*}, Е. С. Симоненко¹, С. В. Симоненко¹, С. Н. Зорин², В. К. Мазо²

¹ Научно-исследовательский институт детского питания — филиал Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Истра, Московская область, Россия

² Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

молочный белок, кобылье молоко, ферментный препарат, гидролиз, антигенность, молекулярно-массовое распределение

В последние годы внимание специалистов привлекает значительный рост аллергических заболеваний, особенно среди детей. Наиболее действенной мерой снижения аллергенности белков молока считается ферментативный гидролиз при участии пептидаз. Изучение особенностей протеолиза белков различными ферментами, направленное на установление оптимальных параметров процесса, является предметом исследований при получении гидролизатов с заданными свойствами: определенным пептидным и аминокислотным профилем, сниженными антигенными свойствами. При этом, для корректной доклинической оценки безопасности и потенциальной эффективности специализированных пищевых продуктов недостаточно только определение молекулярно-массового распределения пептидных фракций в составе. Необходимым дополнительным и информативным показателем снижения потенциальной аллергенности гидролизата является степень сохранности антигенных свойств исходного белка (остаточная антигенность), определяемая иммунохимическими методами. Получение и последующая комплексная оценка ферментативных гидролизатов белков кобыльего молока представляет значительный интерес, поскольку, по результатам клинических исследований, было высказано мнение о том, что кобылье молоко при аллергии к белкам коровьего молока можно считать гипоаллергенным. Целью данной работы было получение ферментативных гидролизатов белков кобыльего молока с использованием отечественных ферментов и их дальнейшая физико-химическая и иммунохимическая характеристика. Объектом исследования в качестве белкового субстрата служил белок кобыльего молока, полученный из сухого обезжиренного кобыльего молока. В работе были использованы два образца ферментов различных производителей Российской Федерации. Результаты проведенных исследований показали, что пептидные профили гидролизатов сильно различаются в зависимости от использовавшегося фермента, однако, кратность снижения антигенности практически не зависит от природы фермента, и не зависит от увеличения фермент/субстратного соотношения. На пептидный профиль и кратность снижения антигенности гидролизатов белков кобыльего молока оказывает влияние ультрафильтрационная обработка полученных гидролизатов, которая позволяет на несколько порядков снизить содержание антигенных структур в конечной продукте.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Работа выполнена на базе НИИ детского питания — филиале ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» в рамках обеспечения условий выполнения работ гранта в форме субсидии на: обеспечение проведения российскими научными организациями и (или) образовательными организациями высшего образования совместно с иностранными организациями научных исследований в рамках обеспечения реализации программы двух- и многостороннего научно-технологического взаимодействия, по соглашению между ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» и Минобрнауки России от 02 октября 2022 года № 075-15-2022-1211 по теме: «Разработка технологий получения специализированных молочных продуктов с пониженной аллергенностью для детского питания на основе гидролизатов молочных белков».

Received 05.04.2024

Accepted in revised 18.09.2024

Accepted for publication 27.09.2024

© Semenova E. S., Simonenko E. S., Simonenko S. V., Zorin S. N., Mazo V. K., 2024

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

Original scientific article

Open access

HYDROLYSATES OF MARE'S MILK PROTEINS. IMMUNOCHEMICAL AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS

Elena S. Semenova^{1*}, Elena S. Simonenko¹, Sergei V. Simonenko¹, Sergei N. Zorin², Vladimir K. Mazo²

¹ Scientific Research Institute of Baby Food — a branch Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Istra, Moscow region, Russia

² Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russia

KEY WORDS:

milk protein, mare's milk, enzyme preparation, hydrolysis, antigenicity, molecular weight distribution

ABSTRACT

In recent years, the attention of specialists has been attracted by a significant increase in allergic diseases, especially among children. Enzymatic hydrolysis with the participation of peptidases is considered the most effective measure to reduce the allergenicity of milk proteins. The study of the features of protein proteolysis by various enzymes, aimed at establishing optimal process parameters, is the subject of research in the production of hydrolysates with specified properties: a certain peptide and amino acid profile, reduced antigenic properties. At the same time, for a correct preclinical assessment of the safety and potential effectiveness of specialized food products, it is not enough only to determine the molecular weight distribution of peptide fractions in the composition. A necessary additional and informative indicator of reducing the potential allergenicity of the hydrolysate is the degree of preservation of the antigenic properties of the initial protein (residual antigenicity), determined by immunochemical methods. The preparation and subsequent comprehensive assessment of enzymatic hydrolysates of mare's milk proteins is of considerable interest, since, according to the results of clinical studies, it was suggested that upon allergy to cow's milk proteins mare's milk can be considered hypoallergenic. The purpose of this work was to obtain enzymatic hydrolysates of mare's milk proteins using domestic enzymes and their further physico-chemical and

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Семенова, Е. С., Симоненко, Е. С., Симоненко, С. В., Зорин, С. Н., Мазо, В. К. (2024). Гидролизаты белков кобыльего молока. Иммунохимическая и физико-химическая характеристика. *Пищевые системы*, 7(3), 466–472. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-3-466-472>

FOR CITATION: Semenova, E. S., Simonenko, E. S., Simonenko, S. V., Zorin, S. N., Mazo, V. K. (2024). Hydrolysates of mare's milk proteins. *Immunochimical and physico-chemical characteristics. Food Systems*, 7(3), 466–472. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-3-466-472>

immunochemical characteristics. The object of the study was mare's milk protein obtained from skimmed mare's milk powder as a protein substrate. Two samples of enzymes from various manufacturers of the Russian Federation were used in the work. The results of the conducted studies show that the peptide profiles of hydrolysates vary greatly depending on the enzyme used, however, the multiplicity of antigenicity reduction practically does not depend on the nature of the enzyme, and does not depend on an increase in the enzyme/substrate ratio. The peptide profile and the multiplicity of reducing the antigenicity of hydrolysates of mare's milk proteins are influenced by ultrafiltration treatment of the obtained hydrolysates, which allows reducing the content of antigenic structures in the final product by several orders of magnitude.

FUNDING: The research was performed on the basis of the Research Institute of Baby Nutrition — a branch of the FGBUN "Federal Research Center for Nutrition and Biotechnology" in the framework of ensuring the conditions for performing the work of a grant in the form of a subsidy for: ensuring that Russian scientific organizations and (or) educational organizations of higher education conduct scientific research together with foreign organizations as part of providing implementation of the program of bilateral and multilateral scientific and technological cooperation, according to the contract between the Federal State Budgetary Institution "Federal Research Center for Nutrition and Biotechnology" and the Ministry of Education and Science of Russia dated October 02, 2022 No. 075-15-2022-1211 on the topic: "Development of a technology for obtaining specialized dairy products with reduced allergenicity for baby food based on milk protein hydrolysates".

1. Введение

В настоящее время у детей (особенно первого года жизни) широко распространены пищевая аллергия и непереносимость белков пищи [1]. Исследования показывают, что наиболее распространенными функциональными желудочно-кишечными расстройствами у детей раннего возраста в течении первого года жизни были срыгивание и колики, а наиболее распространенными функциональными желудочно-кишечными расстройствами у детей в возрасте 2–3 лет являются запор и диарея [2,3]. Кроме того, на фоне продолжающегося за последние годы роста распространенности аллергических заболеваний у детей, отмечается отягчающее влияние аллергических реакций на течение других патологических процессов, в частности на атопические заболевания [4,5]. Вместе с тем возросло и число взрослых с различными нарушениями функции пищеварения, для которых в той или иной форме характерна непереносимость пищевого белка [1]. Помимо этого, важны вопросы получения продуктов для энтерального зондового питания (для людей в состоянии шока, посттравматического стресса, послеоперационных состояниях после хирургических вмешательств на органах брюшной полости и т.д.).

В этой связи большую остроту и актуальность приобретает проблема создания специализированных пищевых продуктов, содержащих источники полноценного белка, не вызывающего пищевой непереносимости (в частном случае пищевой аллергии), при этом легкоусвояемого и обладающего удовлетворительными органолептическими свойствами. Наиболее приемлемы для этих целей ферментативные гидролизаты пищевых белков (ФГПБ) с различной степенью гидролиза, полученные с использованием современных ферментных препаратов и технологических подходов, позволяющих решить поставленные задачи. Среди таких подходов наиболее широко распространены мембранные технологии (ультра- и нанофильтрация), которые позволяют в мягких условиях менять аминокислотный и пептидный профиль гидролизатов и улучшать их иммунохимические и органолептические свойства [6].

В подавляющем большинстве в составе специализированных пищевых продуктов диетического питания (лечебных и профилактических) используются ферментативные гидролизаты белков коровьего молока (как казеиновой, так и сывороточной фракции). При этом для гидролизатов молочных белков, включаемых в состав лечебных гипоаллергенных продуктов, требуется высокая кратность снижения антигенности (КА) (не менее $1,0 \times 10^5$). Отметим, что аллергия к белкам коровьего молока составляет большую долю всех видов пищевой аллергии, особенно в детском возрасте [7,8] и распространена максимально широко.

Кроме того, в настоящее время в РФ отсутствуют ферменты, позволяющие добиваться кратности снижения антигенности исходного субстрата необходимой для гипоаллергенных лечебных продуктов (например, Alcalase из штамма *Bacillus licheniformis*, Neutrase из штамма *Bacillus amyloliquefaciens*, грибная комплексная протеаза Flavourzyme и др. производства Novozymes, Дания). В то же время аллергия на белки кобыльего молока встречается гораздо реже [9].

Кобылье молоко, обладает высокой усвояемостью, пищевой и биологической ценностью [10]. В кобыльем молоке белковый компонент на 60% представлен лактоальбуминами и лактоглобулинами, свободными аминокислотами и пептидами [11].

Авторы клинического исследования [12], посвященного иммунокоррекции у пациентов с аллергией к белкам коровьего молока, высказывают мнение о том, что кобылье молоко при аллергии к белкам коровьего молока можно считать гипоаллергенным у пациентов

с аллергией к казеину, альфа-лактоальбумину, бета-лактоглобулину и сывороточному альбумину коровьего молока. Это может быть связано также с тем, что белки кобыльего молока быстро гидролизуются желудочно-кишечными ферментами человека по сравнению с белками коровьего молока [13].

В работе [14] *in vivo* и *in vitro* было показано, что у детей с доказанной аллергией на коровье молоко не наблюдалось в 96% случаев непереносимости на кобылье молоко.

В работе [15] на 25 детях с IgE-опосредованной аллергией на коровье молоко были проведены кожные тесты с использованием коровьего молока и кобыльего молока. Полученные данные свидетельствуют о том, что кобылье молоко можно рассматривать как замену коровьего молока у большинства детей с таким заболеванием.

В работе [16] сравнивали аллергенность коровьего и кобыльего молока на мышиной модели Balb/c. Количество мышей с тяжелыми респираторными симптомами было значительно ниже в группе с сенсибилизацией к кобыльему молоку по сравнению с группой, сенсибилизированной коровьим молоком. Уровни специфического иммуноглобулина (Ig) E, IgG1 в сыворотке крови и гистамина в плазме также были выше у мышей, сенсибилизированных коровьим молоком, по сравнению с животными, сенсибилизированными кобыльим молоком. Кроме того, более высокие уровни интерлейкина (IL) 4 и IL-17A и более низкие уровни интерферона- γ (IFN- γ) и IL-10 наблюдались у мышей с сенсибилизацией к коровьему молоку по сравнению с кобыльим молоком.

В работе [17] исследовали иммуномодулирующее действие кобыльего молока при его введении сенсибилизированным белками коровьего молока. Было показано, что введение кобыльего молока снижало уровни сывороточного IgE у сенсибилизированных мышей, а также увеличение популяции регуляторных T-клеток (CD4+Foxp3+). Введение кобыльего молока также снижало уровни мРНК IL-4 и приводило к более высоким транскриптам TLR-4 (Toll-подобного рецептора 4). Кроме этого, введение кобыльего молока вызывало увеличение числа кишечных *Bifidobacterium* spp. Делается вывод о иммуномодулирующем действии кобыльего молока, но дальнейшие исследования в клинике должны быть посвящены ферментативным гидролизатам белков кобыльего молока.

Работ по получению ферментативных гидролизатов белков кобыльего молока, немного. В основном они посвящены кумысу, содержащему в своем составе биологически активные пептиды, обладающие ингибирующей активностью ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) [18,19]. Было показано, что фракция, обладающая ингибирующей АПФ активностью, лежит в диапазоне молекулярных масса менее 3,0 кД. В работе [20] вели гидролиз белка кобыльего молока Сумбава с помощью протеазы *Bacillus thuringensis*. Были получены гидролизаты, способные проявлять антибактериальную и антиоксидантную активность, а пептидная фракция с молекулярным размером <3 кДа, полученная в результате 30-минутного гидролиза, обладает максимальной антибактериальной активностью и наиболее эффективна против грамотрицательных бактерий.

В работе [21] изучали ингибирующее АПФ и антиоксидантное действия гидролизатов казеина кобыльего молока, полученных с трипсином, пепсином и комбинацией этих ферментов, *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что гидролизаты, полученные из комбинации ферментов пепсина и трипсина, проявляли более высокую ингибирующую АПФ активность. Также гидролизаты казеина коровьего молока показали достоверное ($p < 0,05$) ингибирование перекисного окисления липидов и гидроксильного радикала

по сравнению со стандартным антиоксидантом (ВНА, бета-гидроксидная кислота). Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидролизаты казеина кобыльего молока содержат биоактивные пептиды, ответственные за ингибирование АПФ и антиоксидантные эффекты, и, таким образом, могут быть использованы для лечения и контроля гипертонии.

В этой связи получение и последующая комплексная оценка ферментативных гидролизатов белков кобыльего молока представляет значительный интерес. Вполне можно допустить, что гидролизаты белков кобыльего молока даже со средней степенью гидролиза, могут быть использованы в составе лечебных гипоаллергенных продуктов. Они могут быть получены с использованием коммерчески доступных ферментов отечественного производства и отечественного мембранного оборудования.

Цель работы: получение ферментативных гидролизатов белков кобыльего молока с использованием отечественных ферментов, их физико-химическая и иммунохимическая характеристика.

2. Объекты и методы

2.1. Получение белка кобыльего молока

Белок кобыльего молока (БКМ) получали из сухого обезжиренного кобыльего молока (ООО «Снайп», РФ) с содержанием белка 22,1% по следующей схеме. 400 г сухого обезжиренного кобыльего молока растворяли в 8000 мл дистиллированной воды в течение 30 минут при комнатной температуре с верхнеприводной мешалкой. Полученную смесь центрифугировали в течение 30 минут при 3000 об/мин на центрифуге «BECKMAN J-6B» (Beckman Coulter, США) и отбирали супернатант.

Супернатант подвергали ультрафильтрации в тангенциальном потоке через мембрану на основе полиэфирсульфона с размерами пор 10кДа (установка мембранной фильтрации на основе фильтродержателя АСФ-018 (ВЛАДИСАРТ, Россия), со сбором высокомолекулярной фракции и с последующим диализом на этой же мембране и сбором ретентата. Полнота обессоливания продукта оценивалась измерением% сухих веществ в пермеате с использованием ручного рефрактометра «WSH HAND REFRACTOMETER» (W.S.R. TOKYO, Япония). Ретентат лиофилизировали на лиофильной сушилке ЛС-500, (ПРОИНТЕХ, Россия).

Массовую долю белка в ретентате оценивали методом Кьельдала. Метод основан на минерализации органического вещества анализируемой пробы продукта концентрированной серной кислотой в присутствии катализатора с образованием сероокислого аммония, переведении его в аммиак, отгонке последнего в раствор борной кислоты, количественном учете аммиака титриметрическим методом и расчете массовой доли белка в анализируемой пробе.

2.2. Получение гидролизатов белков кобыльего молока

Гидролизаты БКМ получали ферментализом с использованием двух ферментов: трипсин (ООО «Биопрогресс», Россия) и протозим (ТД «БИОПЕПАРАТ», Россия).

2.3. Гидролиз трипсином

12,0 г БКМ растворяли на водяной бане «BW-5» (BEING, КНР) в 1000 мл дистиллированной воды с верхнеприводной мешалкой при температуре 50 ± 1 °C в течение 2 часов. Доводили pH раствора БКМ до 7,9 0,5% смесью КОН/NaOH (в соотношении 2/1) и вносили трипсин в количестве 2,0% или 5,0% от массы субстрата. Вели реакцию в течение 3 часов при 50 ± 1 °C и поддержании pH 7,4–7,6 той же смесью КОН/NaOH. Ферментализ БКМ останавливали инактивацией фермента нагреванием раствора в течение 15 минут при 75 °C. Полученный продукт (гидролизат БКМ) охлаждали до комнатной температуры и подвергали ультрафильтрации через мембрану с размерами пор 10 кДа со сбором пермеата, который лиофильно высушивали на лиофильной сушилке ЛС-500, (ПРОИНТЕХ, Россия).

2.4. Гидролиз протозимом

12,0 г БКМ растворяли на водяной бане «BW-5» (BEING, КНР) в 1000 мл дистиллированной воды с при температуре $+60 \pm 1$ °C в течение 2 часов. Доводили pH до 8,6 0,5% смесью КОН/NaOH (в соотношении 2/1) и вносили протозим в количестве 2,0% и 5,0% от массы субстрата. Вели реакцию в течение 3 часов при 50 ± 1 °C и поддержании pH 8,4–8,6 той же смесью КОН/NaOH. По окончании проводили инактивацию фермента нагреванием в течение 15 минут при 75 °C. Полученный продукт охлаждали до комнатной температуры и подвергали ультрафильтрации через мембрану с размерами пор 10 кДа со сбором пермеата, который лиофильно высушивали на лиофильной сушилке ЛС-500, (ПРОИНТЕХ, Россия).

2.5. Оценка молекулярно-массового распределения пептидных фракций гидролизатов БКМ

Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций в составе полученных гидролизатов оценивали методом эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого давления («СТАЙЕР», ЗАО «АКВИЛОН», РФ) на колонке «Супероза 12» (1 × 30 см, Pharmacia, Швеция, предварительно откалиброванной по стандартным глобулярным водорастворимым белкам («SERVA», Германия и «Pharmacia», Швеция) [22].

Скорость элюирования составляла 0,4 мл/мин, в качестве элюента использовали 0,2М NaCl с добавлением азида натрия, оптическую плотность измеряли на проточном ультрафиолетовом детекторе УФ-132 (ООО «Химвтоматика», Россия). Хроматограммы интегрировали весовым методом в диапазоне молекулярных масс от свободного до полного объема колонки. Перед нанесением образца на колонку его подвергали микрофильтрации через шприцевой фильтр 0,2 мкм.

2.6. Иммуноферментный метод оценки антигенности белка кобыльего молока и его гидролизатов

Определение содержания антигенных детерминант в составе БКМ и гидролизатов БКМ проводили непрямым иммуноферментным анализом (ИФА) согласно [23] с определенной модификацией, используя в качестве стандарта выделенный нами БКМ, гипериммунную кроличью антисыворотку против БКМ и антивидовый конъюгат с пероксидазой против IgG (L+H) кролика (Филиал «Медгамал» НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Россия).

В предварительных экспериментах для построения калибровочной кривой было подобрано оптимальное разведение моноспецифической поликлональной кроличьей антисыворотки против БКМ. Оно составило 1/32000 и соответствовало раствору (не содержащему БКМ) с оптической плотностью 1,4–1,6 оптических единиц (нулевая концентрация).

На Рисунке 1 приведена калибровочная кривая, по которой рассчитывалось содержание интактного (антигенов БКМ) БКМ в исследованных образцах.



Рисунок 1. Калибровочная кривая для определения кратности снижения антигенности в гидролизатах БКМ

Figure 1. Calibration curve for detecting the multiplicity of reducing the antigenicity of hydrolysates of mare's milk proteins

Примечание: по оси абсцисс — % связывания, рассчитывается по формуле:

$$J(n) (\%) = 100 \times [B_0(n) - Bn] / B_0(n) \quad (1)$$

Где:

$B_0(n)$ — среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для нулевого связывания;

Bn — среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для каждого разведения стандартного раствора БКМ; по оси ординат — значение десятичного логарифма концентрации, которое затем переводятся в значения концентрации в мкг/мл.

По данной калибровочной кривой рассчитывали кратность снижения антигенности (КА) ферментативных гидролизатов БКМ относительно исходного белка по формуле:

$$КА = C_{П 50\%} / C_{БКМ 50\%}, \quad (2)$$

где:

$C_{П 50\%}$ — концентрация раствора исследуемого образца, соответствующая 50% связыванию конъюгата, мкг/мл;

$C_{БКМ 50\%}$ — концентрация стандартного раствора БКМ, соответствующая 50% связыванию конъюгата, мкг/мл.

2.7. Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics 20 (IBM, США). Для всех показателей, представленных в таблице, вычисляли среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (m). Статистические различия

оценивали с использованием критерия Стьюдента. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

3. Результаты и обсуждение

Из 400 г сухого обезжиренного кобыльего молока было получено 60,8 г сухого продукта (соответствует 15,9% от исходной массы), в котором содержание белка (по Кьельдалю) составило 79,2%.

В Таблице 1 приведены количественные оценки выхода конечных продуктов (сухих гидролизатов) из сходного БКМ.

Различия между группами показывают, что увеличение фермент/субстратного соотношения от 2% до 5% фермента не влияет на выход конечного продукта, что указывает на нецелесообразность повышения количества вносимого фермента более 2%.

Полученные гидролизаты были практически белого цвета и хорошо растворялись в воде.

На Рисунке 2 приведены хроматограммы гидролизатов БКМ, полученные с использованием трипсина (2% и 5%) после ультрафильтрации.

На Рисунке 3 приведены хроматограммы гидролизатов БКМ, полученные с использованием протозима (2% и 5%) после ультрафильтрации.

По оси абсцисс $V_{св.}$ соответствует свободному объему хроматографической колонки. Он соответствует времени удерживания (или объему выхода), белков с молекулярными массами, превышающими максимальную, на калибровочной кривой колонки, а $V_{пол.}$ —

Таблица 1. Массы конечных сухих гидролизатов

Table 1. Masses of the final dry hydrolysates

Фермент	% выхода
2,0% Трипсин	44,9±0,4
5,0% Трипсин	46,5±0,3
2,0% Протозим	48,1±0,3
5,0% Протозим	48,8±0,5

Примечание: различия не достоверны (>0.05).

полный объем колонки, соответствующий выходу самых легких структур (с наименьшей молекулярной массой, которые в процессе хроматографии заходят во все поры гранул хроматографического материала).

В Таблице 2 приведены результаты интегрирования этих хроматограмм, количественно характеризующие молекулярно — массовое распределение пептидных фракций в их составе.

Из приведенных результатов видно, что пептидные профили гидролизатов сильно различаются в зависимости от использовавшегося фермента, что обусловлено различной специфичностью их действия, связанной с из природой (трипсин выделен из поджелудочной железы свиней, а протозим является бактериальной щелочной протеазой из *Bacillus licheniformis*). Однако, кратность снижения антигенности (относительно антигенности исходного субстрата) и практически не зависит от природы фермента (Таблица 3). Так же, из приведенных результатов видно, что увеличение

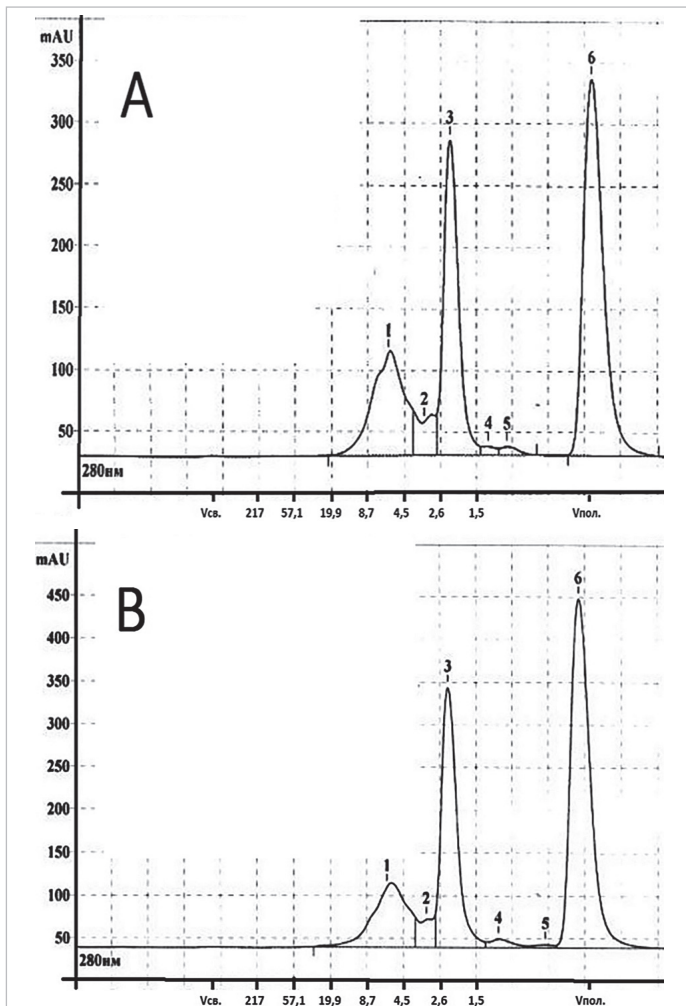


Рисунок 2. Хроматограммы гидролизатов БКМ, полученные с использованием трипсина (2% — А и 5% — В) после ультрафильтрации 10 кДа.

По оси абсцисс — молекулярная масса (кДа);
По оси ординат — оптическая плотность при 280 нм (mAu — относительные единицы, пропорциональные оптической плотности).

Figure 2. Chromatograms of hydrolysates of mare's milk proteins obtained using trypsin (2% - A and 5% - B) after ultrafiltration 10 kDa.

On the x-axis — molecular weight (kDa);
On the y-axis — optical density at 280 nm (mAu — arbitrary units proportional to the optical density).

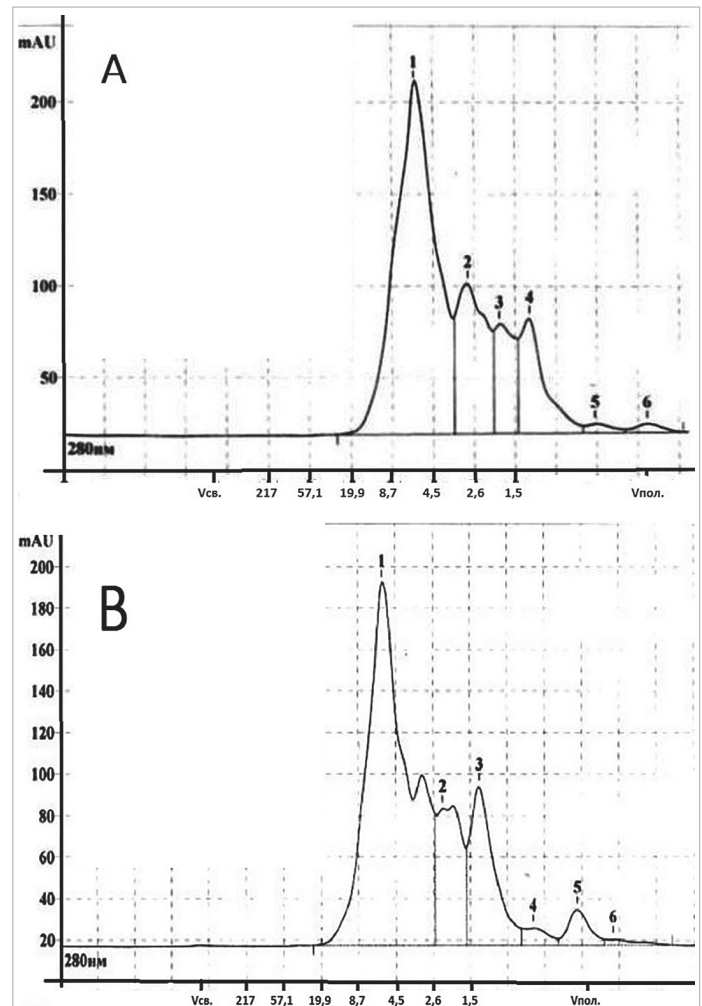


Рисунок 3. Хроматограммы гидролизатов БКМ, полученные с использованием протозима (2% — А и 5% — В) после ультрафильтрации 10 кДа.

По оси абсцисс — молекулярная масса (кДа);
По оси ординат — оптическая плотность при 280 нм (mAu — относительные единицы, пропорциональные оптической плотности).

Figure 3. Chromatograms of hydrolysates of mare's milk proteins obtained using protozyme (2% - A and 5% - B) after ultrafiltration 10 kDa.

On the x-axis — molecular weight (kDa);
On the y-axis — optical density at 280 nm (mAu — arbitrary units proportional to the optical density).

Таблица 2. Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций в гидролизатах

Table 2. Molecular weight distribution of peptide fractions in hydrolysates

№	Образец	% содержание фракции в различных диапазонах молекулярных масс, кДа			
		более 10,0 кДа	10,0–5,0 кДа	5,0–1,0 кДа	менее 1,0 кДа
1	Гидролизат БКМ 2% трипсин	2,9±0,2*	17,5±0,9***	34,4±1,7***	45,3±2,3***
2	Гидролизат БКМ 5% трипсин	0,9±0,1*	11±0,6***	39,4±2,0***	48,7±2,4***
3	Гидролизат БКМ 2% протозим	0,5±0,2***	29,5±1,5***	62,7±3,1***	7,3±0,3***
4	Гидролизат БКМ 5% протозим	0,8±0,3	29,8±1,5	60,8±3,1***	8,5±0,4***

* для гидролизатов с трипсином различия достоверны ($p < 0.05$) для фракций более 10,0 кДа;
 ** для гидролизатов с протозимом различия не достоверны (> 0.05);
 *** различия достоверны при сравнении гидролизатов с трипсином и протозимом ($p < 0.05$) для фракций менее 10,0 кДа с одинаковым соотношением фермент/субстрат (№ 1 и 3; 2 и 4) в диапазонах молекулярных масс менее 10 кДа.

Таблица 3. Кратность снижения антигенности гидролизатов БКМ, полученных с трипсином и протозимом

Table 3. Multiplicity of a decrease in antigenicity of hydrolysates of mare's milk proteins obtained with trypsin and protozyme

№	Гидролизат	Кратность снижения антигенности	БКМ, вес. %
1	Трипсин 2%	1400 ± 100*	0,0709 ± 0,0050*
2	Трипсин 5%	1600 ± 100	0,0610 ± 0,0030
3	Протозим 2%	1900 ± 40*	0,0527 ± 0,0012*
4	Протозим 5%	2000 ± 100	0,0502 ± 0,0031

* Различия достоверны между группами 1 и 3 ($p < 0,05$).

фермент/субстратного соотношения от 2% до 5% практически не влияет на пептидный профиль и кратность снижения антигенности (или содержание антигенных структур исходного белка) в гидролизатах БКМ, полученных с использованием протозима. Это связано с ультрафильтрационной обработкой полученных гидролизатов, которая позволяет на несколько порядков снизить содержание антигенных структур в конечной продукте [24,25].

Отметим, что такие значения кратности снижения антигенности (1400–2000) применительно к белкам сыворотки коровьего молока недостаточны для их использования в составе лечебных гипоаллергенных продуктов, где эти значения должны составлять 10000 и более [26]. Кроме этого, такие гидролизаты горькие и характеризуются высокой осмоляльностью, а применение нанопористой мембраны [6] для снижения горечи и осмоляльности приводит к значительному удорожанию процесса. Поэтому можно предположить, что т. к. белки кобыльего молока изначально обладают значительно меньшей аллергенностью по сравнению с белками молочной сыворотки [12], то кобылье молоко можно считать хорошей заменой коровьего молока для большинства детей с тяжелой аллергией на коровье молоко [14, 15], что подтверждено положительным клиническим и иммунологическим эффектом [16,17] в результате исследований. И, таким образом, гидролизаты белков кобыльего молока с относительно невысокой кратностью снижения антигенности могут быть использованы в составе профилактических и лечебных продуктов.

Так, в работе [27] показано, что введение в рацион крыс ферментативного гидролизата белков кобыльего молока приводило к снижению в 1,9 раза уровня антител IgG к ОВА ($p < 0,001$) наряду со значимым увеличением концентрации ИЛ-12(p70) ($p < 0,05$, по сравнению с животными, получавшими в составе рациона гидролизат белков сыворотки коровьего молока на модели внутрибрюшинной сенсибилизации животных куриным овальбумином. Это может быть связано

со специфическим составом гликопептидов, образующихся при ферментализации молочного белка 2 видов дойных животных.

Такое снижение антигенности в полученных гидролизатах позволяет их использовать в составе специализированных гипоаллергенных профилактических продуктов, а также продуктах, предназначенных для лиц с нарушениями желудочно-кишечного тракта, не связанными с аллергическими реакциями. Кроме этого, для получения гидролизатов с значением КСА 1×10^5 и выше, необходимо использование других коммерческих ферментов (например «Alcalase», «Flavourzyme» производства (Novozymes, Дания), аналоги которых в РФ к настоящему времени в промышленных масштабах не производятся.

Направлением дальнейших исследований ферментативных гидролизатов белков кобыльего молока, которые могут использоваться в составе специализированных пищевых продуктов лечебного и профилактического назначения, должна быть доклиническая экспериментальная оценка их потенциальной аллергенности *in vitro* [28,29,30] и иммуномодулирующих свойств в эксперименте [31].

Кроме этого, технологические подходы к получению гидролизатов белков кобыльего молока требуют дальнейшей проработки как с целью увеличения конечного выхода продукта, так и улучшения их органолептических свойств.

4. Выводы

Проведены исследования процесса гидролиза белков кобыльего молока, с целью получения пептидных фракций в составе полученных гидролизатов, последующего определения их пептидного профиля, а также определения содержания антигенных детерминант в составе БКМ и гидролизатов БКМ. В результате проведенного исследования экспериментально обоснована эффективность ферментных препаратов отечественного производства Трипсин и Протозим. Из приведенных результатов видно, что пептидные профили гидролизатов сильно различаются в зависимости от использовавшегося фермента, однако, кратность снижения антигенности практически не зависит от природы фермента, и не зависит от увеличения фермент/субстратного соотношения от 2% до 5%. На пептидный профиль и кратность снижения антигенности гидролизатов БКМ оказывает значительное влияние ультрафильтрационная обработка полученных гидролизатов, которая позволяет на несколько порядков снизить содержание антигенных структур в конечной продукте.

Анализ полученных данных, свидетельствует, что для рекомендаций по включению таких гидролизатов в состав конкретных специализированных продуктов необходимо проведение комплексной их доклинической оценки. Полученные результаты могут быть учтены для масштабирования процесса получения ферментативных гидролизатов белков кобыльего молока.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- Ногаллер, А. М., Гушин, И. С., Мазо, В. К., Гмошинский, И. В. (2008). Пищевая аллергия и непереносимость пищевых продуктов. Москва: Медицина, 2008. [Nogaller, A. M., Gushchin, I. S., Mazo, V. K., Gmshinsky, I. V. (2008). Food allergy and food intolerance. Moscow: Medicine, 2008. (In Russian)]
- Vandenplas, Y., Abkari, A., Bellaiche, M., Benninga, M., Chouraqui, J. P., Çokura, F. et al. (2015). Prevalence and health outcomes of functional gastrointestinal symptoms in infants from birth to 12 months of age. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 61(5), 531–537. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000949>
- van Tilburg, M. A. L., Nyman, P. E., Walker, L., Rouster, A., Palsson, O. S., Kim, S. M. et al. (2015). Prevalence of functional gastrointestinal disorders in infants and toddlers. *The Journal of Pediatrics*, 166(3), 684–689. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.11.039>
- Балаболкин, И. И. (2003). Современная концепция патогенеза и принципы терапии аллергических заболеваний у детей. *Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского*, 82(4), 52–57. [Balabolkin, I. I. (2003). Pediatric allergic diseases — contemporary view on pathogenesis and main principles of treatment. *Pediatriya. Zhurnal im G. N. Speranskogo*, 82(4), 52–57. (In Russian)]
- Wahn, U. (1998). Environmental factors facilitating allergic sensitization and atopic manifestation in early childhood. *Nutrition Research*, 18(8), 1363–1371. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(98\)00115-8](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(98)00115-8)
- Гмошинский, И. В., Зилова, И. С., Зорин, С. Н., Демкина, Е. Ю. (2012). Мембранные технологии — инновационный метод повышения биологической ценности белка для питания детей раннего возраста. *Вопросы современной педиатрии*, 11(3), 57–64. [Gmshinsky, I. V., Zilova, I. S., Zorin, S. N., Demkina, E. J. (2012). Membrane technologies — an innovative method of protein biological value increasing in young children feeding. *Current Pediatrics*, 11(3), 57–64. (In Russian)]
- Bahna, S.L. (1987). Milk allergy in infancy. *Annals of Allergy*, 59(5), 131–136.
- Businco, L., Bruno, G., Giampietro, P. G. (1999). Prevention and management of food allergy. *Acta Paediatrica*, 88(s430), 104–109. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1999.tb01309.x>

9. Lajnaf, R., Feki, S., Ben Ameer, S., Attia, H., Kammoun, T., Ayadi, M. A. et al. (2023). Recent advances in selective allergies to mammalian milk proteins not associated with Cow's Milk Proteins Allergy. *Food and Chemical Toxicology*, 178, Article 115929. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.115929>
10. Курченко, В. П., Симоненко, Е. С., Сушинская, Н. В., Головач, Т. Н., Петров, А. Н., Симоненко, С. В. (2021). Идентификация кобыльего молока и его смеси с коровьим молоком методом ВЭЖХ-анализа. *Техника и технология пищевых производств*, 51(2), 402–412. [Kurchenko, V. P., Simonenko, E. S., Sushinskaya, N. V., Golovach, T. N., Petrov, A. N., Simonenko, S. V. (2021). HPLC identification of mare's milk and its mix with cow's milk. *Food Processing: Techniques and Technology*, 51(2), 402–412. (In Russian)] <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-402-412>
11. Jastrzębska, E., Wadas, E., Daszkiewicz, T., Pietrzak-Fiećko, R. (2017). Nutritional value and health-promoting properties of mare's milk—a review. *Czech Journal of Animal Science*, 62(12), 511–518. <https://doi.org/10.17221/61/2016-CJAS>
12. Жарин, В. А. (2017). Иммунокоррекция у пациентов с аллергией к белкам коровьего молока. *Военная медицина*, 2(45), 44–49. [Zharin, V. A. (2017). Immunocorrection in patients with food allergy to cow's milk protein. *Military Medicine*, 2(45), 44–49. (In Russian)]
13. Uniacke-Lowe, T., Huppertz, T., Fox, P. F. (2010). Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. *International Dairy Journal*, 20(9), 609–629. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.007>
14. Barreto, Í. M. L. G., Rangel, A. H. D. N., Urbano, S. A., Bezerra, J. D. S., Oliveira, C. A. D. A. (2019). Equine milk and its potential use in the human diet. *Food Science and Technology*, 39(Suppl 1), 1–7. <https://doi.org/10.1590/fst.11218>
15. Businco, L., Giampietro, P. G., Lucenti, P., Lucaroni, F., Pini, C., Di Felice, G. et al. (2000). Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(5), 1031–1034. <http://doi.org/10.1067/mai.2000.106577>
16. Duan, C., Ma, L., Cai, L., Li, X., Ma, F., Chen, J. et al. (2021). Comparison of allergenicity among cow, goat, and horse milks using a murine model of atopy. *Food and Function*, 12, 5417–5428. <https://doi.org/10.1039/D1FO00492A>
17. Fotschki, J., Szyc, A. M., Laparra, J. M., Markiewicz, L. H., Wróblewska, B. (2016). Immune-modulating properties of horse milk administered to mice sensitized to cow milk. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9395–9404. <http://doi.org/10.3168/jds.2016-11499>
18. Chen, Y., Wang, Z., Chen, X., Liu, Y., Zhang, H., Sun, T. (2010). Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from koumiss, a traditional fermented mare's milk. *Journal of Dairy Science*, 93(3), 884–892. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2672>
19. Ricci, I., Artacho, R., Olalla, M. (2010). Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(5), 390–402. <https://doi.org/10.1080/10408390802304198>
20. Kusumaningtyas, E., Widiastuti, R., Kusumaningrum, H. D., Suhartono, M. T. (2018). Bioactivities and analysis of peptides from Sumbawa horse milk generated by bacillus thuringiensis protease. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 21(4), 244–254. <https://doi.org/10.14334/jitv.v21i4.1627>
21. Ugwu, C. P., Abarshi, M. M., Mada, S. B., Sanusi, B., Nzelibe, H. C. (2019). Camel and horse milk casein hydrolysates exhibit angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidative effects in vitro and in silico. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25, 1595–1604. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-09802-2>
22. Семенова, Е. С., Симоненко, Е. С., Симоненко, С. В., Зорин, С. Н., Петров, Н. А., Мазо, В. К. (2023). Исследование параметров процесса гидролиза белков молока с использованием ферментных препаратов отечественного производства. *Пищевые системы*, 6(2), 224–232. [Semenova, E. S., Simonenko, E. S., Simonenko, S. V., Zorin, S. N., Petrov, N. A., Mazo, V. K. (2023). Study of the process of hydrolysis of milk proteins using enzyme preparations of domestic and production. *Food Systems*, 6(2), 224–232. (In Russian)] <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-2-224-232>
23. Зверева, Е. А., Смирнова, Н. И., Жердев, А. В., Дзантиев, Б. Б., Юрова, Е. А., Денисович, Е. Ю. и др. (2013). Разработка методики определения бета-лактоглобулина в молоке и молочных продуктах с применением метода иммуноферментного анализа. *Современные проблемы науки и образования*, 5, Статья 477. [Zvereva, E. A., Smirnova, N. I., Zherdev, A. V., Dzantiev, B. B., Yurova, E. A., Denisovich, E. Yu. et al. (2013). Development of method for determination of beta-lactoglobulin in milk and milk products by enzyme-linked immunosorbent assay. *Modern Problems of Science and Education*, 5, Article 477. (In Russian)]
24. Головач, Т. Н., Курченко, В. П., Сурвило, Л. И. (2011). Антигенные свойства нативных и термообработанных сывороточных белков и их ферментативных частичных гидролизатов. *Труды Белорусского государственного университета*, 6(1), 209–223. [Golovach, T. N., Kurchenko, V. P., Survilo, L. I. (2011). Antigenic properties of native and thermodenatured whey proteins and their fermentative partial hydrolysates. *Proceedings of BSU*, 6(1), 209–223. (In Russian)]
25. Головач, Т. Н., Червяковский, Е. М., Курченко, В. П. (2011). Физико-химическая и иммунохимическая характеристика частичного гидролизата сывороточных белков. *Пищевая промышленность: наука и технология*, 1(11), 28–34. [Golovach, T. N., Chervyakovsky, E. M., Kurchenko, V. P. (2011). Physicochemical and immunochemical characteristics of partial hydrolysate of whey proteins. *Food Industry: Science and Technology*, 1(11), 28–34. (In Russian)]
26. Зорин, С. Н. (2019). Ферментативные гидролизаты пищевых белков для специализированных пищевых продуктов диетического (лечебного и профилактического) питания. *Вопросы питания*, 88(3) 23–31. [Zorin, S. N. (2019). Enzymatic hydrolysates of foods for therapeutic and prophylactic nutrition. *Voprosy Pitaniia [Problems of Nutrition]*, 88(3), 23–31. (In Russian)] <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10026>
27. Симоненко, Е. С., Симоненко, С. В., Гмошинский, И. В., Ригер, Н. А., Шумакова, А. А., Зорин, С. Н. (2024). Влияние лактоферрина и ферментативных гидролизатов белков коровьего и кобыльего молока на анафилактическую чувствительность и цитокиновый профиль крыс. *Вопросы питания*, 93(2), 31–40. [Simonenko, E. S., Simonenko, S. V., Gmoshinsky, I. V., Rieger, N. A., Shumakova, A. A., Zorin, S. N. (2024). Effect of lactoferrin and enzymatic hydrolysates of cow and mare milk proteins on anaphylactic sensitivity and cytokine profile of rats. *Voprosy Pitaniia [Problems of Nutrition]*, 93(2), 31–40. (In Russian)] <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2024-93-2-31-40>
28. Мунблит, Д. Б., Корсунский, И. А. (2016). Определение специфических IgG-антител к пищевым продуктам в диагностике пищевой аллергии: миф или реальность? *ПМЖ*, 24(18), 1206–1209. [Munblit, D. B., Korsunsky, I. A. (2016). Detection of specific IgG against foods in food allergy diagnosis: Myth or reality? *PMJ*, 24(18), 1206–1209. (In Russian)]
29. Агафонов, В. Е., Гервазиева, В. Б. (2012). IgG антитела к пищевым белкам у больных атопическим дерматитом. *Медицинский вестник Северного Кавказа*, 3, 66–69. [Agafonov, V. E., Gervazieva, V. B. (2012). IgG antibodies to food proteins in patients with atopic dermatitis. *Medical News of the North Caucasus*, 3, 66–69. (In Russian)]
30. Bielory, L., Terr, A. I. (2014). Unconventional theories and unproven methods in allergy. Chapter in a book: Middleton's Allergy. Saunders, 2014. <http://doi.org/10.1016/B978-0-323-08593-9.00102-9>
31. Kiewiet, M. B. G., Gros, M., van Neerven, R. J. J., Faas, M. M., de Vos, P. (2015). Immunomodulating properties of protein hydrolysates for application in cow's milk allergy. *Pediatric Allergy and Immunology*, 26(3), 206–217. <https://doi.org/10.1111/pai.12354>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Семенова Елена Сергеевна — младший научный сотрудник, лаборатория опытно-экспериментальных технологических исследований, Научно-исследовательский институт детского питания — филиал Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, 143500 Московская область, Истра, ул. Московская, 48
Тел.: +7–498–313–03–96
E-mail: lab6@niidp.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3848-7478>
* автор для контактов

Симоненко Елена Сергеевна — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, лаборатория технологий продуктов питания детей и дошкольного и школьного возраста, Научно-исследовательский институт детского питания — филиал Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, 143500, Московская область, Истра, ул. Московская, 48
Тел.: +7–498–313–03–96
E-mail: nir@niidp.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2878-8069>

Симоненко Сергей Владимирович — доктор технических наук, директор, Научно-исследовательский институт детского питания — филиал Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, 143500, Московская область, Истра, ул. Московская, 48
Тел.: +7–498–313–03–96
E-mail: dir@niidp.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6999-5048>

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Elena S. Semenova, Junior Researcher, Laboratory of Experimental Technological Research, Scientific Research Institute of Baby Food — a branch Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety 48, Moskovskaya str., Moscow region, 143500, Istra, Russia
Tel.: +7–498–313–03–96
E-mail: lab6@niidp.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3848-7478>
* corresponding author

Elena S. Simoneko, Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Food Technologies for Children and Preschool and School Age, Scientific Research Institute of Baby Food — a branch Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety 48, Moskovskaya str., Moscow region, 143500, Istra, Russia
Tel.: +7–498–313–03–96
E-mail: nir@niidp.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2878-8069>

Sergey V. Simoneko, Doctor of Technical Sciences, Director, Scientific Research Institute of Baby Food — a branch Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety 48, Moskovskaya str., Moscow region, 143500, Istra, Russia
Tel.: +7–498–313–03–96
E-mail: dir@niidp.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6999-5048>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
<p>Зорин Сергей Николаевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория пищевых биотехнологий и специализированных продуктов, Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14 Тел.: +7-495-698-53-71 E-mail: zorin@ion.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2689-6098</p>	<p>Sergey N. Zorin, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Food Biotechnologies and Specialized Products, Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety 2/14, Ustyinsky proezd, 109240, Moscow, Russia Tel.: +7-495-698-53-71 E-mail: zorin@ion.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2689-6098</p>
<p>Мазо Владимир Кимович — доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, лаборатория пищевых биотехнологий и специализированных продуктов, Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14 Тел.: +7-495-698-53-71 E-mail: mazo@ion.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3237-7967</p>	<p>Vladimir K. Mazo, Doctor of Biological Sciences, Professor, Leading Researcher, Laboratory of Food Biotechnologies and Specialized Products, Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety 2/14, Ustyinsky proezd, 109240, Moscow, Russia Tel.: +7-495-698-53-71 E-mail: mazo@ion.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3237-7967</p>
Критерии авторства	Contribution
<p>Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.</p>	<p>The author has the sole responsibility for writing the manuscript and is responsible for plagiarism.</p>
Конфликт интересов	Conflict of interest
<p>Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.</p>	<p>The authors declare no conflict of interest.</p>