
Биохимия, биотехнология и микробиология

BIOCHEMISTRY, BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 637.14.04/.07+577.152.34

АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, АНТИМУТАГЕННЫЕ И АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ КОРОВЬЕГО МОЛОЗИВА

Т. Н. ГОЛОВАЧ¹⁾, Е. И. ТАРУН²⁾, Н. В. ДУДЧИК³⁾,
Р. В. РОМАНОВИЧ¹⁾, И. А. БУБРА¹⁾, В. П. КУРЧЕНКО¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова

Белорусского государственного университета, ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

³⁾РУП «Научно-практический центр гигиены», ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Беларусь

Проведено сравнительное исследование белково-пептидного состава и биологически активных свойств гидролизованного коровьего молозива, полученного с применением различных эндопептидаз (алкалазы и нейтразы). После гидролиза алкалазой и ультрафильтрации установлено возрастание антиоксидантной активности пептидной

Образец цитирования:

Головач Т. Н., Тарун Е. И., Дудчик Н. В., Романович Р. В., Бубра И. А., Курченко В. П. Антирадикальная активность, антимутагенные и антигенные свойства ферментативных гидролизатов коровьего молозива // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 50–59.

For citation:

Halavach T. M., Tarun E. I., Dudchik N. V., Romanovich R. V., Bubra I. A., Kurchenko V. P. Antiradical activity, antimutagenic and antigenic properties of enzymatic bovine colostrum hydrolysates. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 50–59 (in Russ.).

Авторы:

Татьяна Николаевна Головач – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории прикладных проблем биологии биологического факультета.

Екатерина Ивановна Тарун – кандидат химических наук, доцент; доцент кафедры экологической химии и биохимии факультета экологической медицины.

Наталья Владимировна Дудчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий лабораторией микробиологии.

Роман Витальевич Романович – студент биологического факультета. Научный руководитель – Т. Н. Головач.

Илона Александровна Бубра – студент биологического факультета. Научный руководитель – Т. Н. Головач.

Владимир Петрович Курченко – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией прикладных проблем биологии биологического факультета.

Authors:

Tatsiana M. Halavach, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of applied biology, faculty of biology.

halavachtn@gmail.com

Ekaterina I. Tarun, PhD (chemistry), docent; associate professor at the department of environmental chemistry and biochemistry, faculty of environmental medicine.

ktarun@tut.by

Natalia V. Dudchik, doctor of science (biology), docent; head of the laboratory of microbiology.

n_dudchik@tut.by

Roman V. Romanovich, student at the faculty of biology.

muninn@tut.by

Ilona A. Bubra, student at the faculty of biology.

ilona.bubra96@gmail.com

Vladimir P. Kurchenko, PhD (biology), docent; head of the laboratory of applied biology, faculty of biology.

kurchenko@tut.by

фракции в 7,1 раза, тогда как при использовании нейтразы – в 3,5 раза. Максимальный антимутагенный эффект отмечен в экспериментах с алкалазой, что для штамма *Salmonella typhimurium* TA 98 составило 10,0–29,6 %, для штамма TA 100 равнялось 12,5–32,4 %. Ультрафильтрат гидролизата алкалазой обогащен специфическими короткоцепочечными пептидами, с которыми связаны его относительно высокие антимутагенные и антирадикальные свойства. По результатам электрофоретического анализа и реакции иммунопреципитации алкалаза эффективно расщепляет β -лактоглобулин, что обеспечивает получение гидролизата с низким аллергенным потенциалом. Нейтраза расщепляет данный белковый субстрат частично. С применением иммунохимического подхода лактоферрин выявлен во всех образцах гидролизованного молозива. Согласно экспериментальным данным возрастание антиоксидантного и антимутагенного потенциала, а также снижение антигенных свойств гидролизованного молозива обусловлены увеличением глубины протеолиза.

Ключевые слова: коровье молозиво; ферментативный гидролиз; алкалаза; нейтраза; белково-пептидный состав; антиоксидантные свойства; антимутагенная активность; антигенные свойства; β -лактоглобулин; лактоферрин.

ANTIRADICAL ACTIVITY, ANTIMUTAGENIC AND ANTIGENIC PROPERTIES OF ENZYMATIC BOVINE COLOSTRUM HYDROLYSATES

T. M. HALAVACH^a, E. I. TARUN^b, N. V. DUDCHIK^c,
R. V. ROMANOVICH^a, I. A. BUBRA^a, V. P. KURCHENKO^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bInternational Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23/1 Daŭhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus

^cScientific Practical Centre of Hygiene,
8 Akademičnaja Street, Minsk 220012, Belarus

Corresponding author: T. M. Halavach (halavachtn@gmail.com)

A comparative analysis of protein and peptide profile, biological active properties of hydrolysed bovine colostrum obtained using various endopeptidases (alcalase and neutrase) was performed. It was found that hydrolysis with alcalase and ultrafiltration led to increase in antioxidant activity of the peptide fraction by 7.1 times whereas using neutrase by 3.5 times. Maximum antimutagenic effect was shown for experiment with alcalase, that attained 10.0–29.6 % for strain *Salmonella typhimurium* TA 98 and 12.5–32.4 % for strain TA 100. Ultrafiltrate of hydrolysate using alcalase is enriched with specific short-chain peptides which determine its relatively high antimutagenic and antiradical properties. According to SDS-electrophoresis and reaction of immunoprecipitation alcalase effectively cleaves β -lactoglobulin, that provides a hydrolysate producing with low allergen potential. Neutrase cleaves this protein substrate partially. Using immunochemical analysis lactoferrin was detected in all samples of hydrolysed colostrum. In accordance with experimental data the raise in antioxidant and antimutagenic potential and also the decline in antigenic properties of hydrolysed colostrum are due to an increase in depth of proteolysis.

Key words: bovine colostrum; enzymatic hydrolysis; alcalase; neutrase; protein and peptide profile; antioxidant properties; antimutagenic activity; antigenic properties; β -lactoglobulin; lactoferrin.

Введение

Молозиво, или первичное молоко, существенно отличается от зрелого молока по пищевой ценности и составу биологически активных веществ. Оно характеризуется повышенным содержанием легкоусвояемых сывороточных белков, защитных иммунных компонентов (иммуноглобулины, лактоферрины, лейкоциты-макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты), а также природных антиоксидантов (витамины А и Е, цинк, селен) [1]. Вместе с тем белки молока (казеиновая и сывороточная фракции) являются предшественниками биологически активных пептидов с иммуномодулирующим, антиоксидантным, антимутагенным, гипотензивным, противомикробным, противовирусным и другими действиями [2].

Наряду с высокой ценностью компонентного состава коровье молоко содержит более 20 белков, способных вызвать аллергические реакции у человека. Основными из них являются казеины и сывороточные белки: β -лактоглобулин (β -лг), α -лактоальбумин (α -ла) и бычий сывороточный альбумин (БСА). β -Лактоглобулин составляет около 12 % общего белка молока и 60 % молочной сыворотки и обладает наибольшим аллергенным потенциалом среди сывороточных белков. Ферментативный гидролиз казеина и сывороточных белков направлен на получение пептидов с низким аллергенным действием

за счет расщепления областей антигенных детерминант [3]. Следует отметить, что в молозиве повышено содержание лактоферрина (ЛФ) – белка с широким спектром физиологических активностей. В связи с этим целесообразным является получение ферментативных гидролизатов молозива, которые содержат ЛФ и расщепленные белки-аллергены.

Для получения ферментативных гидролизатов с заданными показателями (пептидный профиль, биологические активности) используют различные эндо- и экзопептидазы, среди которых можно выделить ферменты микробного (алкалаза, нейтраза, флейворзим), растительного (папаин, фицин) и животного (пепсин, трипсин) происхождения [4]. Особенности ферментативного расщепления белковых субстратов определяются оптимальными условиями каталитической активности фермента, его субстратной специфичностью и сайт-специфичностью, физико-химическими свойствами расщепляемых белков.

Антирадикальный эффект зрелого молока и молозива определяется главным образом антиоксидантной активностью (АОА) казеина и сывороточных белков, в меньшей степени – наличием небелковой составляющей (витаминно-минеральный компонент). АОА нативных белков и продуктов их ферментативного расщепления обусловлена восстанавливающими свойствами аминокислотных радикалов [5; 6].

Биологическое явление подавления мутационного процесса, или антимутагенез, выражается в снижении спонтанного и индуцированного мутирования под воздействием природных и синтетических соединений. Большинство сведений о влиянии биологически активных веществ на спонтанный и индуцированный мутагенез получены в экспериментах *in vitro* на прокариотических тест-моделях. Предложены количественный метод и критериальный показатель оценки антимутагенного потенциала, основанные на модификации теста Эймса [6].

Актуальность работы обусловлена необходимостью детального изучения гидролизованной белковой фракции молозива с применением современной методической базы для получения специализированных продуктов питания с заданными белково-пептидным составом и биологически активными свойствами. Научная новизна заключается в выявлении новых данных об антирадикальном действии, антимутагенных и антигенных свойствах ферментативных гидролизатов коровьего молозива, а также применении комплексного подхода для установления взаимосвязи физико-химических показателей и биологических активностей нативных белков молозива и продуктов их гидролиза различными протеазами.

Цель настоящей работы – характеристика белково-пептидного состава и биологически активных свойств гидролизованного коровьего молозива. Объекты исследования – экспериментальные образцы ферментативных гидролизатов молозива. Предмет исследования – молекулярно-массовое распределение белкового компонента, антиоксидантный эффект, антигенные и антимутагенные свойства гидролизованного молозива.

Материалы и методы исследований

В работе использовали сухое обезжиренное молозиво (Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Москва, Россия), ферменты алкалазу (КФ 3.4.21.62, протеаза из *Bacillus licheniformis*, 2,4 ЕА/г; *Sigma*, США) и нейтразу (КФ 3.4.24.28, протеаза из *Bacillus amyloliquefaciens*, 0,8 ЕА/г; *Sigma*, США). Готовили 5 % растворы молозива в фосфатном буфере (рН 7,0 и рН 8,0); полученные растворы центрифугировали для удаления нерастворимых частиц при 6000 об/мин в течение 30 мин; надосадочную жидкость использовали для гидролиза. Ферментативное расщепление проводили при соотношении «фермент – субстрат» 1 : 3 % для алкалазы и нейтразы соответственно при температуре 50 °С и активной кислотности среды рН 8,0 (оптимум для алкалазы) и рН 7,0 (при гидролизе нейтразой) в течение 3 ч. Реакцию катализа алкалазой останавливали фенолметилсульфонилфторидом (*Sigma*, США), нейтразу ингибировали внесением этилендиаминтетрауксусной кислоты (*Sigma*, США). Пробы замораживали при –20 °С для последующего анализа. В целях фракционирования гидролизатов применяли фильтры Spin-X UF Concentrator 20 (*Corning*, Англия) с разделяющей способностью 10 кДа.

Глубину протеолиза белков молока контролировали с использованием денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле [7]. Содержание общего азота в образцах обезжиренного молозива, ферментативных гидролизатах и ультрафильтратах гидролизатов определяли по СТБ ISO 8968-1–2008, массовую долю (м. д.) сухого вещества – по ГОСТ 3626–76 (п. 3).

В целях оценки АОА опытных образцов применяли флуориметрический метод – ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). ORAC-метод основан на измерении во времени уменьшения интенсивности флуоресценции флуоресцеина (ФЛ), что наблюдается при его связывании с кислородными радикалами. Антиоксиданты в реакционной среде, взаимодействуя с радикалами, замедляют свободнорадикальное

окисление ФЛ. Степень уменьшения флуоресценции – это мера степени деградации ФЛ под воздействием кислородных радикалов. Подход, использованный в работе, основан на определении АОА образцов по их способности связывать свободные радикалы, образованные в системе Фентона. В экспериментальной работе применяли методику, описанную в [8].

Для оценки антигенных свойств белков молока и продуктов их протеолиза применяли *двойную радиальную иммунодиффузию в агарозном геле* (по Ухтерлони) с использованием кроличьих антисывороток (Ас) к β -лг и ЛФ. Метод основан на образовании гетеромерных комплексов – [антиген – антитело]–, формирующих преципитат в агарозном геле в результате встречной диффузии Ас и компонентов раствора белка или гидролизата, анализируемых на содержание бивалентных антигенных детерминант [9].

Антимутагенную активность ультрафильтратов ферментативных гидролизатов молозива (без ингибиторов протеаз) определяли в модифицированном тесте Эймса по [10]. В краткосрочном тесте для изучения антимутагенных свойств тест-моделями выступали индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100. В качестве прямых мутагенов применяли этидиум бромид для штамма *S. typhimurium* TA 98 и азид натрия – для штамма TA 100. Антимутагенную активность оценивали в ряду концентраций гидролизатов молозива 0,033–8,7 мг на чашку не менее чем в трех повторностях. Уровень снижения мутирования (I_m , %) рассчитывали по предложенной формуле

$$I_m = 100 - \frac{N_1}{N_2} \cdot 100,$$

где N_1 – число ревертантов в опыте; N_2 – число ревертантов в позитивном контроле. Для проверки статистической значимости результатов проводили расчет по методу множественных сравнений Даннета [11].

Результаты исследований и их обсуждение

Представлены экспериментальные данные об алгоритме исследования белкового компонента нативного и гидролизованного коровьего молозива, оценке его антирадикального потенциала, антимутагенных и антигенных свойств.

Результаты анализа белково-пептидного состава обезжиренного молозива и его гидролизатов методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле отражены на рис. 1. Для образцов нативного молозива установлено высокое содержание фракции иммуноглобулинов (Igs, молекулярная масса составляет 50 кДа), сопоставимое с ним количество казеина (19–25 кДа), наличие БСА (66 кДа), ЛФ (80 кДа) и других белков сывороточной фракции (α -ла, β -лг – 14 и 18 кДа соответственно) (рис. 1, дорожки 2 и 5).

В гидролизате молозива, полученном с применением алкалазы, выявлены многочисленные продукты частичного протеолиза Igs, установлено расщепление казеина, а также сывороточных белков α -ла и β -лг (см. рис. 1, дорожка 3). Напротив, в гидролизате молозива, полученном при использовании нейтразы, сохраняются нативные Igs, отмечается частичное расщепление казеина и β -лг (см. рис. 1, дорожка 6). Ультрафильтраты гидролизатов содержат низкомолекулярную фракцию пептидов, которые не определяются данным методом (см. рис. 1, дорожки 4 и 7).

Таким образом, для экспериментального образца молозива, расщепленного алкалазой, характерна большая глубина гидролиза белковых субстратов, чем в ферментативной реакции с нейтразой.

Согласно результатам определения общего белка в нативных и гидролизованных образцах в гидролизате молозива, обезжиренного алкалазой, содержится $(29,1 \pm 1,2)$ % фракции с молекулярной массой, меньшей или равной 10 кДа, а при использовании нейтразы – $(32,6 \pm 1,0)$ %. Наряду с сопоставимым количеством низкомолекулярной фракции в обоих гидролизатах алкалаза за счет широкой сайт-специфичности обеспечивает расщепление белковых субстратов (казеина, α -ла и β -лг) на короткоцепочечные пептиды.

На следующем этапе работы представлена *характеристика антирадикальной активности образцов нативного и гидролизованного молозива согласно данным ORAC-метода*.

Определена АОА нативных и ферментативно расщепленных образцов по их способности связывать свободные радикалы, что приводит к замедлению свободнорадикального окисления ФЛ. Согласно полученным данным строили графики зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации сухого вещества в анализируемых образцах. Далее, рассчитывали концентрацию пробы IC_{50} , соответствующую 50 % подавлению флуоресценции. Возрастание ингибирования свободнорадикального окисления ФЛ с 20 до 90 % отмечено при внесении в систему 0,1–1000,0 мкг/мл экспериментальных образцов. Максимальный антирадикальный эффект отмечен в экспериментах с применением ферментативных гидролизатов молозива и их ультрафильтратов.

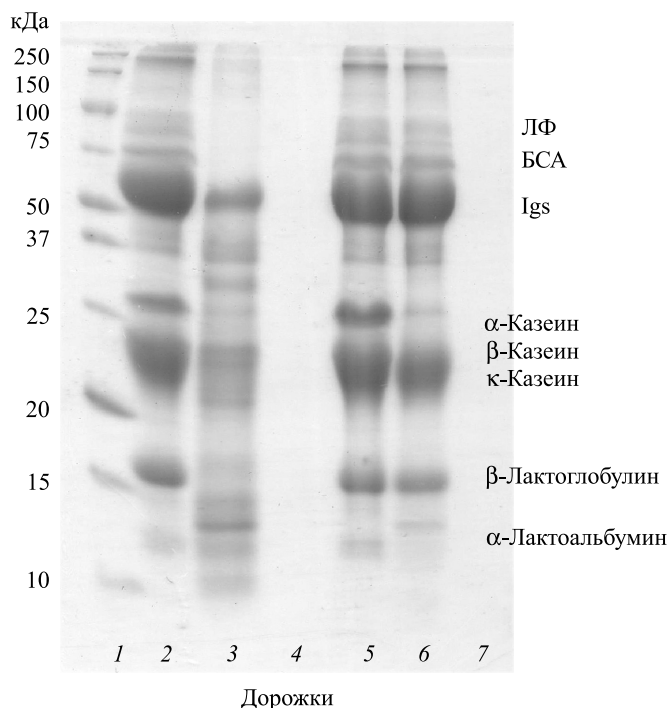


Рис. 1. Электрофореграмма опытных образцов обезжиренного молозива, его гидролизатов и ультрафильтратов гидролизатов: 1 – маркер; 2 – обезжиренное молозиво (контроль, без алкалазы); 3 – гидролизат обезжиренного молозива (внесение алкалазы); 4 – фильтрат гидролизата молозива (алкалаза); 5 – обезжиренное молозиво (контроль, без нейтразы); 6 – гидролизат обезжиренного молозива (внесение нейтразы); 7 – фильтрат гидролизата молозива (нейтраза)

Fig. 1. Electrophoregram of test samples of skimmed colostrum, its hydrolysates and ultrafiltrates of hydrolysates: 1 – marker; 2 – skimmed colostrum (control, without alcalase); 3 – hydrolysate of skimmed colostrum (addition of alcalase); 4 – filtrate of colostrum hydrolysate (alcalase); 5 – skimmed colostrum (control, without neutrase); 6 – hydrolysate of skimmed colostrum (addition of neutrase); 7 – filtrate of colostrum hydrolysate (neutrase)

Содержание белка в образцах нативного и гидролизованного молозива составило 28,7–33,9 мг/мл, тогда как в ультрафильтратах гидролизатов оно равнялось 8,7–10,7 мг/мл. Вместе с тем массовая доля белка в исходном обезжиренном молоке и гидролизатах по отношению к сухому веществу достигала 50,8–58,1 %, а в ультрафильтратах гидролизатов – лишь 23,6–30,5 %. В связи с этим уровень АОА рассчитывали на содержание как сухого вещества, так и белка, чтобы объективно оценить вклад белковой и небелковой составляющих.

Результаты сравнительного анализа антирадикальной активности образцов нативного и гидролизованного молозива, полученных с применением различных протеаз, представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Характеристика антиоксидантных свойств
нативного и гидролизованного коровьего молозива**

Table 1

Characteristic of antioxidant properties of native and hydrolysed bovine colostrum

Наименование образца	IC ₅₀ , микрограммов сухого вещества на 1 мл	IC ₅₀ , микрограммов белка на 1 мл
Обезжиренное молозиво (контроль, без алкалазы)	180,0 ± 2,2	99,5 ± 1,2
Гидролизат обезжиренного молозива (внесение алкалазы)	35,7 ± 1,5	18,1 ± 0,7
Фильтрат гидролизата молозива (внесение алкалазы)	25,4 ± 2,3	6,2 ± 0,5
Обезжиренное молозиво (контроль, без нейтразы)	199,5 ± 7,7	104,0 ± 4,0

Окончание табл. 1
Ending table 1

Наименование образца	IC ₅₀ , микрограммов сухого вещества на 1 мл	IC ₅₀ , микрограммов белка на 1 мл
Гидролизат обезжиренного молозива (внесение нейтразы)	105,7 ± 4,6	61,4 ± 2,7
Фильтрат гидролизата молозива (внесение нейтразы)	56,2 ± 1,6	17,1 ± 0,5

Значения IC₅₀ для образцов нативного обезжиренного молозива достигали 180,0–199,5 мкг сухого вещества на 1 мл и 99,5–104,0 мкг белка на 1 мл. В результате ферментативного гидролиза алкалазой и нейтразой АОА увеличилась в 5,0 и 1,9 раза соответственно (в расчете на сухое вещество). После ультрафильтрации образцов зафиксировано возрастание антирадикальных свойств продуктов гидролиза алкалазой дополнительно в 1,4 и 2,9 раза согласно содержанию сухого вещества и белка, в случае расщепления нейтразой – в 1,9 и 3,6 раза. В соответствии с экспериментальными данными АОА ультрафильтрата не столь существенно превышает показатели, установленные после гидролиза алкалазой (в расчете на сухое вещество). Напротив, в связи с относительно невысокой глубиной гидролиза белков нейтразой образец после ультрафильтрации обогащается пептидной фракцией, обуславливающей антирадикальную активность.

В целом АОА ультрафильтрата гидролизата, полученного с применением алкалазы, возросла в 7,1 раза по сравнению с нативным коровьим молозивом, в случае нейтразы – в 3,5 раза (в расчете на сухое вещество). Установлено, что с увеличением глубины гидролиза белковых субстратов наблюдается возрастание их антирадикальной активности. Максимальный антиоксидантный потенциал показан для гидролизата молозива, изготовленного с использованием алкалазы, и соответствующего ультрафильтрата.

Изучены *антимутагенные свойства экспериментальных образцов ультрафильтратов гидролизатов молозива (пептидной фракции с молекулярной массой, меньшей или равной 10 кДа)*. При выборе диапазона концентраций объектов исследования учитывали антибактериальный эффект, а также результаты, полученные ранее при оценке антимутагенной активности сывороточных белков молока и их ферментативных гидролизатов [12]. Выявлено, что гидролизаты молозива в диапазоне концентраций 0,033–8,7 мг на чашку не проявляли бактериостатический или бактерицидный эффект в отношении тест-модели *S. typhimurium* штаммов TA 98 и TA 100, что могло бы привести к ложноположительным результатам.

Статистически значимое снижение индуцированного мутирования установлено для всех вариантов эксперимента с использованием опытных образцов гидролизатов молозива. Выявленные различия в числе ревертантов в контроле и опыте были статистически достоверны ($p < 0,05$) при внесении в тест-систему 0,033–8,7 мг образцов гидролизатов на чашку, что отражено в табл. 2–5. Наиболее выраженный эффект снижения уровня мутирования отмечен в экспериментах с опытным образцом гидролизата молозива, полученным с применением алкалазы, что для штамма *S. typhimurium* TA 98 составило 10,0–29,6 % и для штамма TA 100 равнялось 12,5–32,4 %. В случае гидролизата, полученного с использованием нейтразы, эффект снижения индуцированного мутирования при тестировании на штамме *S. typhimurium* TA 98 достигал 8,4–15,6 % и на штамме TA 100 он составил 7,9–12,6 %.

По результатам проведенного ранее электрофоретического анализа для экспериментального образца молозива, расщепленного алкалазой, характерна большая глубина гидролиза белковых субстратов, чем в ферментативной реакции с нейтразой.

Таблица 2

Статистическая оценка антимутагенной активности опытного образца гидролизата молозива (*гидролиз алкалазой*) в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 98

Table 2

Statistical evaluation of antimutagenic activity of the colostrum hydrolysate test sample (*hydrolysis with alcalase*) by the Ames test performed on the strain *S. typhimurium* TA 98

Количество образца, миллиграммов на чашку	Количество ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
8,7	176 ± 6	29,6
2,175	191 ± 12	23,6

Окончание табл. 2
Ending table 2

Количество образца, миллиграммов на чашку	Количество ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
0,544	197 ± 5	21,2
0,136	211 ± 12	15,6
0,033	225 ± 9	10,0
0	21 ± 2	—
Контроль позитивный	250 ± 23	—

Примечание. Мутаген – этидиум бромид, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген был в стандартных пределах.

Таблица 3

Статистическая оценка антимутагенной активности опытного образца гидролизата молозива (*гидролиз алкалазой*) в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 100

Table 3

Statistical evaluation of antimutagenic activity of the colostrum hydrolysate test sample (*hydrolysis with alcalase*) by the Ames test performed on the strain *S. typhimurium* TA 100

Количество образца, миллиграммов на чашку	Количество ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
8,7	588 ± 23	32,4
2,175	617 ± 24	29,1
0,544	696 ± 27	20,0
0,136	713 ± 13	18,0
0,033	761 ± 17	12,5
0	88 ± 7	—
Контроль позитивный	870 ± 56	—

Примечание. Мутаген – аزيد натрия, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген был в стандартных пределах.

Таблица 4

Статистическая оценка антимутагенной активности опытного образца гидролизата молозива (*гидролиз нейтразой*) в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 98

Table 4

Statistical evaluation of antimutagenic activity of the colostrum hydrolysate test sample (*hydrolysis with neutrase*) by the Ames test performed on the strain *S. typhimurium* TA 98

Количество образца, миллиграммов на чашку	Количество ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
8,7	211 ± 9	15,6
2,175	214 ± 10	14,4
0,544	220 ± 15	12,0
0,136	225 ± 12	10,0
0,033	229 ± 13	8,4
0	21 ± 2	—
Контроль позитивный	250 ± 23	—

Примечание. Мутаген – этидиум бромид, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген был в стандартных пределах.

Таблица 5

Статистическая оценка антимутагенной активности опытного образца гидролизата молозива (гидролиз нейтразой) в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 100

Table 5

Statistical evaluation of antimutagenic activity of the colostrum hydrolysate test sample (hydrolysis with neutrase) by the Ames test performed on the strain *S. typhimurium* TA 100

Количество образца, миллиграммов на чашку	Количество ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
8,7	760 $\pm$ 28	12,6
2,175	772 $\pm$ 23	11,3
0,544	775 $\pm$ 27	10,9
0,136	797 $\pm$ 12	8,4
0,033	801 $\pm$ 13	7,9
0	88 $\pm$ 7	–
Контроль позитивный	870 $\pm$ 56	–

Примечание. Мутаген – азид натрия, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген был в стандартных пределах.

Наряду с сопоставимым количеством низкомолекулярной фракции в обоих гидролизатах алкалаза за счет широкой сайт-специфичности обеспечивает расщепление белковых субстратов (казеина, α -ла и β -лг) на короткоцепочечные пептиды. С увеличением глубины гидролиза белковых субстратов показано возрастание их антимутагенной активности. Более высокий антимутагенный потенциал установлен для гидролизата молозива (пептидной фракции с молекулярной массой, меньшей или равной 10 кДа), изготовленного с помощью алкалазы.

Полученные нами экспериментальные данные сопоставимы с результатами ряда авторов. Так, в [13] изучали биологически активные свойства α - и β -казеина, ферментированного термофильными молочнокислыми бактериями *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 581. Показано снижение мутагенного действия 4-нитрохиолин-1-оксида на штаммах *S. typhimurium* TA 98 и TA 100 при внесении в тест-систему гидролизатов α - и β -казеина, при этом антимутагенный эффект гидролизатов увеличился с возрастанием степени гидролиза белковых субстратов.

В соответствии с [6] определены антимутагенные и антиоксидантные свойства пептидных фракций из образцов йогурта, полученных путем ферментации молока комбинациями пробиотических молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* (ATCC® 4356™), *Lb. casei* (ATCC® 393™) и *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (ATCC® BAA52™). В качестве мутагена в систему вносили азид натрия (0,1–5,0 мкг на чашку). При измерении уровня АОО оценивали восстановление катион-радикала (ABTS^{•+}, полученного на основе диаммониевой соли 2,2'-азино-бис[3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты]). В эксперименте для изученных пептидных фракций со степенью гидролиза 5,38–11,91 % антимутагенный эффект составил 15,87–26,35 %, тогда как IC₅₀ достигала 2,43–1,63 мг/мл. Увеличение степени расщепления белков молока коррелировало с возрастанием антимутагенных и антирадикальных свойств.

Согласно литературным источникам [6; 14] и собственным экспериментальным данным показано возрастание антимутагенного и антиоксидантного потенциала гидролизованных белков молока с увеличением глубины протеолиза.

Исследованы антигенные свойства одного из основных аллергенов молока (β -лг) до гидролиза и после гидролиза молозива ферментами алкалазой и нейтразой. Кроме того, с применением иммунохимического подхода оценена сохранность в гидролизатах ценного белка ЛФ.

В эксперименте определяли наличие бивалентных антигенных детерминант β -лг в образцах нативного и гидролизованного молозива (рис. 2, а). Преципитат образовался в реакции антисыворотки с образцом нативного молозива и гидролизата, полученного с применением нейтразы (см. рис. 2, а, 2 и 5). Вместе с тем β -лг расщепляется алкалазой и не выявляется иммунохимически (см. рис. 2, а, 3), что подтверждается результатами электрофоретического анализа (см. рис. 1, дорожка 3).

Фильтраты обоих гидролизатов не содержат бивалентных антигенных детерминант β -лг, которые были расщеплены либо ферментативно, либо удалены в процессе ультрафильтрации (см. рис. 2, а, 4 и 6). Так, применение высокоактивной сериновой протеазы (алкалазы) обеспечивает получение гипоаллергенных ферментативных гидролизатов коровьего молозива.

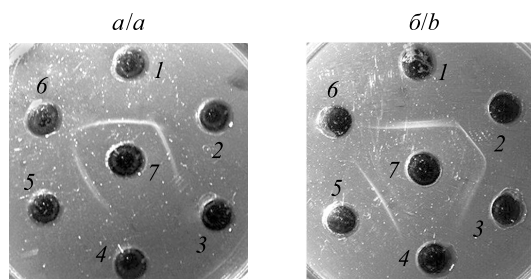


Рис. 2. Двойная радиальная иммунодиффузия в агарозном геле с применением антисывороток против β -лг (а) и ЛФ (б): оценка антигенных свойств β -лг (а) и сохранности ЛФ (б) до ферментативного гидролиза алкалазой и нейтразой и после него:

1 – белок-антиген (контроль): β -лг – 0,06 мг/мл (а), ЛФ – 1,0 мг/мл (б);

2 – молозиво (контроль, без фермента), 0,3 мг/мл (а), 30 мг/мл (б);

3 – гидролизат молозива (внесение алкалазы), 0,3 мг/мл (а), 30 мг/мл (б);

4 – фильтрат гидролизата молозива (алкалаза), 10 мг/мл;

5 – гидролизат молозива (внесение нейтразы), 0,3 мг/мл (а), 30 мг/мл (б);

6 – фильтрат гидролизата молозива (нейтразы), 10 мг/мл; 7 – Ас против β -лг (а) или ЛФ (б)

Fig. 2. Double radial immunodiffusion in an agarose gel using antiserum against β -lg (a) and LF (b): evaluation of antigenic properties of β -lg (a) and safety of LF (b) before and after enzymatic hydrolysis with alcalase and neutrase: 1 – protein-antigen (control): β -lg – 0.06 mg/ml (a), LF – 1.0 mg/ml (b);

2 – colostrum (control, without enzyme), 0.3 mg/ml (a), 30 mg/ml (b);

3 – colostrum hydrolysate (addition of alcalase), 0.3 mg/ml (a), 30 mg/ml (b);

4 – filtrate of colostrum hydrolysate (alcalase), 10 mg/ml;

5 – colostrum hydrolysate (addition of neutrase), 0.3 mg/ml (a), 30 mg/ml (b);

6 – filtrate of colostrum hydrolysate (neutrase), 10 mg/ml; 7 – As against β -lg (a) or LF (b)

По данным двойной радиальной иммунодиффузии, лактоферрин обнаружен в образцах исходного и гидролизованного молозива (см. рис. 2, б, 2, 3 и 5); полученные ультрафильтраты не содержат данный белок (см. рис. 2, б, 4 и 6). Согласно результатам электрофореза следовое количество ЛФ выявлено в гидролизате молозива, полученном с применением нейтразы (см. рис. 1, дорожка б), однако данный белок не обнаружен после ферментативного расщепления алкалазой (см. рис. 1, дорожка 3). Очевидно, под действием сериновой протеазы образуется продукт частичного протеолиза ЛФ, содержащий бивалентные антигенные детерминанты, что обуславливает образование преципитата в реакции иммунодиффузии.

Заключение

Таким образом, представлена сравнительная характеристика биологически активных свойств ферментативных гидролизатов коровьего молозива, полученных с применением сериновой протеазы (алкалазы) и металлопротеазы (нейтразы). Для образца, подвергнутого гидролизу алкалазой и ультрафильтрации, установлено возрастание антирадикальных свойств в 7,1 раза, при расщеплении нейтразой – в 3,5 раза. В случае анализа пептидной фракции, полученной после гидролиза алкалазой, снижение уровня мутирования в тест-системе составило 10,0–29,6 % для штамма *S. typhimurium* TA 98, 12,5–32,4 % – для штамма TA 100, что превышает показатели, характерные для продуктов расщепления нейтразой. По результатам электрофоретического разделения образцов и иммунопреципитации алкалаза эффективнее расщепляет белки молозива, чем нейтразы, что обуславливает низкий аллергенный потенциал полученной пептидной фракции. В соответствии с данными иммунохимического анализа лактоферрин обнаружен в образцах нативного и гидролизованного молозива. Установлено, что уменьшение антигенных свойств гидролизатов и увеличение антирадикального и антимуtagenного действий пептидной фракции связаны с возрастанием степени расщепления белкового компонента молозива.

Библиографические ссылки

1. Conte F., Scarantino S. A study on the quality of bovine colostrum: physical, chemical and safety assessment // Int. Food Research J. 2013. Vol. 20, № 2. P. 925–931.
2. Mills S., Ross R. P., Hill C., et al. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health // Int. Dairy J. 2011. Vol. 21, issue 6. P. 377–401. DOI: 10.1016/j.idairyj.2010.12.011.
3. El-Agamy E. I. The challenge of cow milk protein allergy // Small Rumin. Res. 2007. Vol. 68. P. 64–72.
4. Halavach T. M., Kurchenko V. P., Albulov A. I. Enzymatic hydrolysis of milk proteins as a basis of specialized food products biotechnology // Nauka i studia. 2016. Vol. 3. P. 1196–1207.

5. Zulueta A., Maurizi A., Frigola A., et al. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk // *Int. Dairy J.* 2009. Vol. 19, issues 6–7. P. 380–385. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.02.003.
6. Sah B. N., Vasiljevic T., McKechnie S., et al. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt // *Food Chem.* 2014. Vol. 156. P. 264–270. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.105.
7. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М. : Наука, 1981.
8. Тарун Е. И. Сравнение антиоксидантных активностей галловой, кофейной и хлорогеновой кислот // *Тр. БГУ.* 2014. Т. 9 : в 2 ч. Ч. 1. С. 186–191.
9. Фримель Х. Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. М. : Медицина, 1987.
10. Дудчик Н. В. Количественная оценка антимутагенной активности растительной композиции в краткосрочном тесте // *Здоровье и окружающая среда.* 2014. Вып. 24, т. 1. С. 218–221.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. М. : Практика, 1998.
12. Golovach T. N., Dudchik N. V., Veremeenko E. G., et al. Evaluation of antimutagenic and antifungal properties, parameters of acute toxicity and sensitizing activity of enzymatic whey protein hydrolysate // *Foods and Raw Mater.* 2016. Vol. 4, № 2. P. 38–47. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-38-47.
13. Espeche Turbay M. B., A. de Moreno de LeBlanc, Perdigón G., et al. β -Casein hydrolysate generated by the cell envelope-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 581 protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice // *J. Dairy Sci.* 2012. Vol. 95, issue 3. P. 1108–1118. DOI: 10.3168/jds.2011-4735.

References

1. Conte F., Scarantino S. A study on the quality of bovine colostrum: physical, chemical and safety assessment. *Int. Food Research J.* 2013. Vol. 20, No. 2. P. 925–931.
2. Mills S., Ross R. P., Hill C., et al. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* 2011. Vol. 21, issue 6. P. 377–401. DOI: 10.1016/j.idairyj.2010.12.011.
3. El-Agamy E. I. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Rumin. Res.* 2007. Vol. 68. P. 64–72.
4. Halavach T. M., Kurchenko V. P., Albulov A. I. Enzymatic hydrolysis of milk proteins as a basis of specialized food products biotechnology. *Nauka i studia.* 2016. Vol. 3. P. 1196–1207.
5. Zulueta A., Maurizi A., Frigola A., et al. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *Int. Dairy J.* 2009. Vol. 19, issues 6–7. P. 380–385. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.02.003.
6. Sah B. N., Vasiljevic T., McKechnie S., et al. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chem.* 2014. Vol. 156. P. 264–270. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.105.
7. Osterman L. A. [Methods for studying proteins and nucleic acids: electrophoresis and ultracentrifugation]. Moscow : Nauka, 1981 (in Russ.).
8. Tarun E. I. [Comparison of antioxidant activities of gallic, coffee and chlorogenic acids]. *Proc. BSU.* 2014. Vol. 9 : in 2 parts. Part 1. P. 186–191 (in Russ.).
9. Frimel H. [Immunological methods]. Moscow : Meditsina, 1987 (in Russ.).
10. Dudchik N. V. [Quantitative evaluation of antimutagenic activity of plant composition in a short-term test]. *Zdor. okruzh. sreda.* 2014. Issue 24, vol. 1. P. 218–221 (in Russ.).
11. Glanz S. [Medico-biological statistics]. Moscow : Praktika, 1998 (in Russ.).
12. Golovach T. N., Dudchik N. V., Veremeenko E. G., et al. Evaluation of antimutagenic and antifungal properties, parameters of acute toxicity and sensitizing activity of enzymatic whey protein hydrolysate. *Foods and Raw Mater.* 2016. Vol. 4, No. 2. P. 38–47. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-38-47.
13. Espeche Turbay M. B., A. de Moreno de LeBlanc, Perdigón G., et al. β -Casein hydrolysate generated by the cell envelope-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 581 protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *J. Dairy Sci.* 2012. Vol. 95, issue 3. P. 1108–1118. DOI: 10.3168/jds.2011-4735.

Статья поступила в редколлегию 15.01.2018.
Received by editorial board 15.01.2018.