

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 637.14.04/.07+577.152.341

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-4-409-418>

Поступила в редакцию 15.02.2018

Received 15.02.2018

**Т. Н. Головач¹, Е. И. Тарун², Н. В. Дудчик³,
Р. В. Романович¹, И. А. Бубра¹, В. П. Курченко¹**

¹Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

²Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

³Научно-практический центр гигиены, Минск, Республика Беларусь

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ И МОЛОЗИВА

Аннотация. Изучены антиоксидантные, антимуtagenные и антигенные свойства частичных гидролизатов молочной сыворотки и молозива, полученных с применением бактериальной эндопептидазы (алкалазы). Установлено, что глубина протеолиза, качественный и количественный состав белкового компонента образцов обуславливают уровень их антирадикальной активности и степень снижения индуцированного мутирования. По данным ДСН-электрофореза, гидролизат молочной сыворотки содержит расщепленные белки-аллергены, тогда как в гидролизате молозива обнаружена высокомолекулярная фракция (>10 кДа) частично расщепленных иммуноглобулинов. Протеолиз β-лактоглобулина, обладающего высоким аллергенным потенциалом, подтвержден результатами реакции иммунопреципитации. С применением ORAC-метода показано возрастание антиоксидантного действия гидролизатов молочной сыворотки и молозива в 2,8 и 5,0 раза соответственно. Эффект снижения индуцированного мутирования для гидролизата молочной сыворотки при тестировании составил 15,7–49,2 % для штамма *Salmonella typhimurium* TA 98 и 18,8–52,1 % для штамма TA 100, что превышает показатели гидролизата молозива. Получены образцы гипоаллергенных гидролизатов молочной сыворотки и молозива с подтвержденными антиоксидантными и антимуtagenными свойствами.

Ключевые слова: молочная сыворотка, молозиво, ферментативный гидролиз, алкалаза, частичный гидролизат, белково-пептидный состав, антиоксидантная активность, антимуtagenный эффект, антигенные свойства, β-лактоглобулин

Для цитирования: Характеристика биологически активных гидролизатов белков молочной сыворотки и молозива / Т. Н. Головач [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 409–418. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-4-409-418>

T. M. Halavach¹, E. I. Tarun², N. V. Dudchik³, R. V. Romanovich¹, I. A. Bubra¹, V. P. Kurchenko¹

¹Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

³Scientific Practical Centre of Hygiene, Minsk, Republic of Belarus

DESCRIPTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE PROTEIN HYDROLYSATES OF WHEY AND COLOSTRUM

Abstract. Antioxidant, antimutagenic and antigenic properties of partial hydrolysates of whey and colostrum obtained using bacterial endopeptidase (alcalase) have been investigated. It was found that the depth of proteolysis, qualitative and quantitative composition of protein component of samples determined the level of their antiradical and antimutagenic activity. According to SDS-electrophoresis whey hydrolysate contains cleaved allergen proteins, whereas colostrum hydrolysate possesses a high molecular weight fraction (>10 kDa) of partially digested immunoglobulins. Proteolysis of β-lactoglobulin, which has a high allergenic potential, is confirmed by results of immunoprecipitation reaction. In accordance with the ORAC method antioxidant action of hydrolysed whey and colostrum increased by 2.8 and 5.0 times, respectively. Antimutagenic effect for whey hydrolysate was 15.7–49.2 % when tested on the strain *Salmonella typhimurium* TA 98 and 18.8–52.1 % for strain TA 100. It exceeded values of colostrum hydrolysate. Samples of whey and colostrum hypoallergenic hydrolysates with confirmed antioxidant and antimutagenic properties have been obtained.

Keywords: whey, colostrum, enzymatic hydrolysis, alcalase, partial hydrolysate, protein and peptide profile, antioxidant activity, antimutagenic effect, antigenic properties, β-lactoglobulin

For citation: Halavach T. M., Tarun E. I., Dudchik N. V., Romanovich R. V., Bubra I. A., Kurchenko V. P. Description of biologically active protein hydrolysates of whey and colostrum. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 4, pp. 409–418 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-4-409-418>

Введение. Создание частичных гидролизатов для продуктов специализированного питания (детского, спортивного, диетического) предполагает отсутствие высокомолекулярной белковой фракции, способной вызвать аллергические реакции, наличие пептидов различной длины и минимальное количество аминокислот. Положительный физиологический эффект при потреблении частично гидролизованных белков достигается за счет лучшего усвоения пептидов в кишечном тракте, чем нативных белков и аминокислот, а также широкого спектра биологически активных свойств [1, 2].

Для изготовления гидролизатов применяют концентраты основных белков молока (казеина и сывороточных белков). Наиболее доступным является белковое сырье, полученное в результате переработки молочной сыворотки – побочного продукта производства сыра и казеина [1]. Вместе с тем молозиво характеризуется повышенным содержанием легкоусвояемых сывороточных белков, иммуноглобулинов и природных антиоксидантов (витаминов А и Е, цинка, селена) [3], что позволяет отнести его к перспективным источникам для получения белковых гидролизатов.

Соотношение казеина и сывороточных белков зрелого молока составляет 4:1, тогда как в первичном молоке оно достигает 1:2. Основными сывороточными белками являются β -лактоглобулин (β -лг), α -лактальбумин (α -ла) и бычий сывороточный альбумин (БСА). Кроме того, в молозиве повышено содержание полифункционального гликопротеина – лактоферрина (ЛФ). Среди белков молока β -лг и казеин обладают наибольшим аллергенным потенциалом. Ферментативный гидролиз белкового компонента направлен на получение гипоаллергенных пептидов за счет расщепления областей антигенных детерминант. Сложность изготовления частичных гидролизатов связана с выбором высокоактивных ферментов для эффективного расщепления сывороточных белков, обладающих компактной глобулярной структурой [3–5].

Белковая фракция молока является потенциальным источником биологически активных пептидов с иммуномодулирующим, антиоксидантным, антимуtagenным, гипотензивным, противомикробным и другим действием. Антирадикальные свойства молока обусловлены наличием казеина и сывороточных белков и, в меньшей степени, присутствием витаминно-минерального компонента. Антиоксидантная активность (АОА) нативных белков и пептидов связана с восстанавливающими свойствами аминокислотных радикалов [6]. Биологическое явление подавления мутационного процесса выражается в снижении спонтанного и индуцированного мутирования под воздействием природных и синтетических соединений. Как правило, антимуtagenный потенциал белков молока и пептидов оценивают в тесте Эймса, основанном на учете частоты обратных мутаций к прототрофности по гистидину для штаммов *Salmonella typhimurium* [7].

Актуальность работы обусловлена получением специализированных продуктов питания с заданными белково-пептидным составом и биологически активными свойствами. Научная новизна заключается в выявлении новых данных о радикал-восстанавливающем действии, антимуtagenных и антигенных свойствах ферментативных гидролизатов молочной сыворотки и молозива.

Цель работы – сравнительное исследование продуктов гидролиза молочной сыворотки и молозива сериновой протеазой (алкалазой), определение биологически активных свойств полученных частичных гидролизатов.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись экспериментальные образцы гидролизованных сывороточных белков и молозива, предметом исследования – белково-пептидный состав, радикал-восстанавливающие и антигенные свойства, антимуtagenный эффект частичных гидролизатов молочной сыворотки и молозива.

Получение частичных ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки и молозива. В работе применяли концентрат сывороточных белков, полученный методом ультрафильтрации (КСБ–УФ–80, ТУ ВУ 100377914.550–2008), молозиво сухое обезжиренное (ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», г. Москва, Российская Федерация) и сериновую эндопептидазу (алкалаза, КФ 3.4.21.62, протеаза из *Bacillus licheniformis*, активность 2,64 Е/г; Sigma, США). Ферментативную реакцию проводили при соотношении фермент/субстрат 1 %, активной кислотности среды 8 ед. рН, температуре 50 °С в течение 3–4 ч; протеазу инактивировали путем нагревания при температуре 90 °С в течение 10 мин. Для фрак-

ционирования гидролизата молозива применяли фильтры Spin-X UF Concentrator 20 (Corning, Англия) с разделяющей способностью 10 кДа.

Глубину протеолиза белков молока контролировали с использованием ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле [8]. Содержание общего азота в исходных образцах и ферментативных гидролизатах определяли по СТБ ISO 8968–1–2008, массовую долю (м. д.) сухого вещества – по ГОСТ 3626–76 (п. 3).

АОА опытных образцов определяли флуориметрическим методом. *ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)-метод* основан на измерении 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 статье Е. И. Тарун (2014) [9].

Антимутагенную активность гидролизата молочной сыворотки и ультрафильтрата гидролизата молозива (без ингибиторов протеаз) определяли в модифицированном тесте Эймса по [10]. В краткосрочном тесте для изучения антимутагенных свойств в качестве тест-моделей использовали 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 гидролизата молочной сыворотки 1,88–30 мкг и гидролизата молозива 33–8700 мкг на чашку ($n \geq 3$). Уровень снижения мутирования (I_m , %) рассчитывали по формуле $I_m = (100 - N_1/N_2) \cdot 100$, 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 Даннетта [11].

Для оценки антигенных свойств белков молока и продуктов их протеолиза применяли *двойную радиальную иммунодиффузию в агарозном геле* (по Ухтерлони) с использованием кроличьей антисыворотки (Ас) к β -лг. Метод основан на образовании гетеромерных комплексов «антиген–антитело», формирующих преципитат в агарозном геле в результате встречной диффузии Ас и компонентов раствора белка/гидролизата, анализируемых на содержание бивалентных антигенных детерминант [12].

Результаты и их обсуждение. С применением различных методических подходов проведено исследование белкового компонента частичных гидролизатов молочной сыворотки и молозива, изучены их биологически активные свойства (в частности, антирадикальный потенциал, антимутагенный и антигенный эффекты).

Молекулярно-массовое распределение продуктов ферментативного гидролиза белков молока алкалазой определено с применением денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле. На электрофореграмме отражен типичный состав молочной сыворотки (рис. 1, а, дорожка 2): преобладающими белками являлись β -лг (молекулярная масса 18 кДа) и α -ла (14 кДа), обнаружены БСА (66 кДа), ЛФ (80 кДа), иммуноглобулины (Igs, 50 кДа) и следовые количества казеина (19–25 кДа). Для образцов нативного молозива (рис. 1, б, дорожка 2) показано относительно высокое содержание Igs, сопоставимое с ним количество казеина, наличие α -ла, β -лг и других белков сывороточной фракции (БСА и ЛФ). В гидролизате молочной сыворотки установлен практически полный протеолиз β -лг, α -ла и минорных белков на промежуточные пептиды (рис. 1, а, дорожка 3). В гидролизате молозива выявлены многочисленные продукты частичного протеолиза Igs, установлено расщепление казеиновой фракции, а также α -ла, β -лг и минорных сывороточных белков (рис. 1, б, дорожка 3). Данные образцы являются частичными ферментативными гидролизатами белков молока.

Согласно результатам определения общего белка в гидролизованных образцах и соответствующих ультрафильтратах, в гидролизате молочной сыворотки содержится около 98 % фракции с $m_r \leq 10$ кДа, в расщепленном молозиве – 29,1 %. В соответствии с проведенными ранее исследованиями [13, 14] и полученными в настоящей работе экспериментальными данными

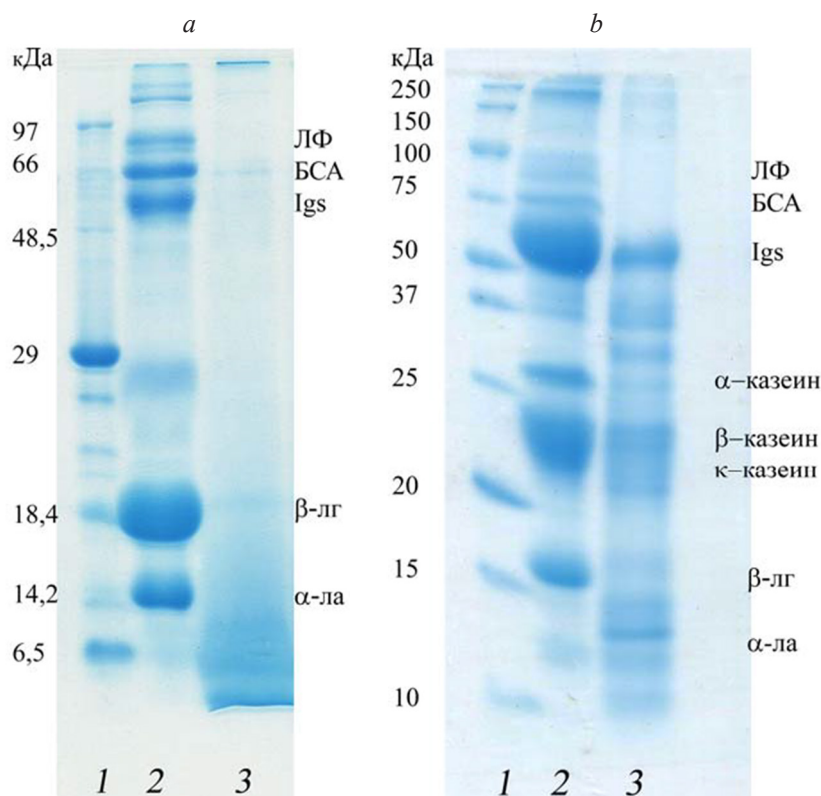


Рис. 1. ДСН-электрофореграмма опытного образца гидролизата молочной сыворотки (*a*) и гидролизата молозива (*b*) (*a*: 1 – маркер, 2 – молочная сыворотка (контроль), 3 – гидролизат сывороточных белков; *b*: 1 – маркер, 2 – обезжиренное молозиво (контроль), 3 – гидролизат обезжиренного молозива)

Fig. 1. SDS-electrophoregram of the whey hydrolysate test sample (*a*) and colostrum hydrolysate (*b*) (*a*: 1 – marker, 2 – whey (control), 3 – hydrolysate of whey proteins; *b*: 1 – marker, 2 – skimmed colostrum (control), 3 – hydrolysate of skimmed colostrum)

алкалаза за счет широкой сайт-специфичности обеспечивает расщепление казеина и преобладающих сывороточных белков на короткоцепочечные пептиды. Наряду с этим в гидролизате молозива содержатся продукты протеолиза иммуноглобулиновой фракции с молекулярной массой >10 кДа. Следовательно, для экспериментального образца молочной сыворотки, расщепленного алкалазой, характерна бóльшая глубина гидролиза белковых субстратов, чем в ферментативной реакции с молозивом.

Антирадикальная активность образцов нативного и гидролизованного молозива согласно данным ORAC-метода. АОА экспериментальных образцов определена по их способности связывать свободные радикалы, что приводит к замедлению свободнорадикального окисления ФЛ. В соответствии с полученными данными строили графики зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации сухого вещества в анализируемых образцах. Возрастание ингибирования свободнорадикального окисления ФЛ от 20 до 90 % отмечено при внесении в систему 0,1–1000 мкг/см³ нативных КСБ и обезжиренного молозива, 0,1–500 мкг/см³ экспериментальных образцов гидролизатов молочной сыворотки и молозива. Далее определяли концентрацию пробы IC₅₀, соответствующую 50 %-ному подавлению флуоресценции.

Содержание белка в образцах нативного и гидролизованного обезжиренного молозива составило 28,7–31,3 мг/см³, тогда как соотношение белка к сухому веществу – 50,8–55,3 %. Кроме того, м. д. белка в концентрате сывороточных белков и соответствующем ферментативном гидролизате достигала 88,4–90,2 %, а соотношение белок/сухое вещество – 95,2–97,1 %. В связи с этим уровень АОА рассчитывали как на содержание сухого вещества, так и на содержание белка, чтобы объективно оценить вклад белковой и небелковой составляющих.

В табл. 1 представлены результаты сравнительного анализа радикал-восстанавливающей активности исходных и гидролизованных образцов молочной сыворотки и молозива.

Т а б л и ц а 1. Характеристика антиоксидантных свойств исходных образцов, гидролизатов молочной сыворотки и молозива

T a b l e 1. Characteristic of antioxidant properties of initial samples, whey and colostrum hydrolysates

Образец	IC ₅₀ , мкг (сухого вещества)/см ³	IC ₅₀ , мкг (белка)/см ³
Молочная сыворотка: контроль (без алкалазы)	85,6 ± 4,2	83,12 ± 4,1
гидролизат белков молочной сыворотки	31,1 ± 2,2	29,6 ± 2,1
Обезжиренное молозиво: контроль (без алкалазы)	180,0 ± 2,2	99,5 ± 1,2
гидролизат обезжиренного молозива	35,7 ± 1,5	18,1 ± 0,7

Значение IC₅₀ для образца исходной молочной сыворотки составило 85,6 ± 4,2 мкг (сухого вещества)/см³ и 83,12 ± 4,1 мкг (белка)/см³, тогда как для гидролизованных сывороточных белков – 31,1 ± 2,2 и 29,6 ± 2,1 соответственно. В результате ферментативной реакции с алкалазой антирадикальная активность гидролизата молочной сыворотки возросла в 2,8 раза. Наряду с этим значение IC₅₀ для образца нативного обезжиренного молозива составило 180,0 ± 2,2 мкг (сухого вещества)/см³ и 99,5 ± 1,2 мкг (белка)/см³. После гидролиза алкалазой антиоксидантный потенциал увеличился в 5 раз (в расчете на сухое вещество); показатель IC₅₀ достигал 35,7 ± 1,5 мкг (сухого вещества)/см³ и 18,1 ± 0,7 мкг (белка)/см³. В расчете на содержание сухого вещества для полученных гидролизатов молочной сыворотки и молозива показан сопоставимый уровень антирадикальной активности. В случае расчета на содержание белка отмечено превышение АОА гидролизованного молозива в 1,6 раза по сравнению с продуктами гидролиза КСБ.

Согласно данным В. N. P. Sah с соавт. (2014) [7], изучены антиоксидантные и антимуtagenные свойства пептидных фракций из образцов йогурта, полученных путем ферментации молока комбинациями пробиотических молочнокислых бактерий *Lb. acidophilus* (ATCC® 4356™), *Lb. casei* (ATCC® 393™) и *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (ATCC® BAA52™). При определении АОА оценивали восстановление катион-радикала (ABTS^{•+}, полученного на основе диаммониевой соли 2,2'-азино-бис[3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты]). Увеличение степени расщепления белков молока коррелировало с возрастанием их антирадикальных свойств.

С использованием ORAC-метода для ультрафильтратов гидролизатов сывороточных белков (пептидных фракций с молекулярной массой <5 кДа), полученных с применением алкалазы, нейтразы, флейворзима и Cocolase PP, также отмечен высокий антирадикальный потенциал по сравнению с нерасщепленным белком [15]. Для гидролизатов сывороточных белков алкалазой установлены протон-донорные свойства и способность ингибировать окисление липидов [16].

В работе В. Hernández-Ledesma с соавт. (2007) [17] с применением системы «ABTS^{•+}–тролокс» определена радикал-восстанавливающая активность ультрафильтратов (3 кДа) 8 гидролизованных композиций для детского питания, содержащих различные соотношения казеина и сывороточных белков. Так, после гидролиза пепсином и панкреатином и ультрафильтрации значения IC₅₀ достигали 60,11–198,11 мкг (белка)/см³. Согласно исследованию N. S. Oh с соавт. (2014) [18] для нативных белков молока и гидролизатов алкалазой также показан различный уровень АОА. При восстановлении ABTS-радикала значения IC₅₀ исходного и гидролизованного КСБ составили 395 ± 38 и 2,1 ± 0,3 мг/см³ соответственно, а в случае казеината натрия – 47,2 ± 0,8 и 1,17 ± 0,03 мг/см³. В целом, для обоих белковых субстратов установлено значительное увеличение антирадикального потенциала после гидролиза алкалазой.

Согласно литературным источникам [7, 15–18] и собственным экспериментальным данным, уровень антирадикальной активности определяется глубиной протеолиза, а также качественным и количественным составом белкового компонента. По итогам экспериментальной работы показано возрастание антиоксидантных свойств гидролизованных белков молочной сыворотки и молозива в 2,8 и 5,0 раза соответственно.

Антимуtagenные свойства экспериментальных образцов гидролизата сывороточных белков и гидролизата молозива (пептидной фракции с $m_r \leq 10$ кДа). Выявлено, что продукты протеолиза молочной сыворотки и молозива в диапазоне концентраций 1,88–30 и 33–8700 мкг на чашку

соответственно не проявляли бактериостатический или бактерицидный эффект в отношении тест-моделей *S. typhimurium* TA 98 и TA 100, что могло бы привести к получению ложноположительных результатов. Статистически значимое снижение индуцированного мутирования установлено для всех вариантов эксперимента с использованием опытных образцов гидролизатов. Выявленные различия в числе ревертантов в контроле и опыте были статистически достоверны ($p < 0,05$) при внесении в тест-систему исследуемых образцов гидролизатов, что отражено в табл. 2–5.

Наиболее выраженный эффект снижения уровня мутирования отмечен в экспериментах с опытным образцом гидролизата молочной сыворотки, что составило 15,7–49,2 % для штамма *S. typhimurium* TA 98 и 18,8–52,1 % для штамма TA 100. В случае гидролизата молозива эффект снижения индуцированного мутирования при тестировании достигал 10,0–29,6 % на штамме *S. typhimurium* TA 98 и 12,5–32,4 % на штамме TA 100.

Согласно данным литературы, М. В. Е. Turbay с соавт. (2012) [19] изучали биологически активные свойства α - и β -казеина, ферментированного термофильными молочнокислыми бактериями *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 581. Показано снижение мутагенного действия 4-нитрохинолин-1-оксида на *S. typhimurium* TA 98 и TA 100 при внесении в тест-систему гидролизатов α - и β -казеина. Как упоминалось выше, в исследовании В. N. P. Sah с соавт. (2014) [7] определены антимутагенные и антиоксидантные свойства пептидных фракций из образцов йогурта. Образцы вносили в концентрациях 10, 50 и 100 мкг смеси пептидов на чашку; в качестве мутагена использовали азид натрия (0,1–5,0 мкг на чашку). Для пептидных фракций со степенью гидролиза 5,38–11,91 % снижение индуцированного мутирования составило 15,87–26,35 %. Увеличение степени гидролиза белков молока коррелировало с возрастанием антимутагенных и антирадикальных свойств.

Т а б л и ц а 2. Статистическая оценка антимутагенной активности опытного образца гидролизата молочной сыворотки в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 98

T a b l e 2. Statistical evaluation of antimutagenic activity of the whey hydrolysate test sample by the Ames test performed on the strain *S. typhimurium* TA 98

К-во образца, мкг на чашку	К-во ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
30	97 \pm 6	49,2
15	105 \pm 12	45,0
7,5	116 \pm 5	39,3
3,75	147 \pm 12	23,0
1,88	161 \pm 33	15,7
0	21 \pm 2	–
Контроль позитивный	191 \pm 12	–

П р и м е ч а н и е. Мутаген – этидиум бромид, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген – в стандартных пределах.

Т а б л и ц а 3. Статистическая оценка антимутагенной активности опытного образца гидролизата молочной сыворотки в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 100

T a b l e 3. Statistical evaluation of antimutagenic activity of the whey hydrolysate test sample by the Ames test performed on the strain *S. typhimurium* TA 100

К-во образца, мкг на чашку	К-во ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
30	346 \pm 11	52,1
15	368 \pm 25	49,0
7,5	454 \pm 61	37,1
3,75	541 \pm 52	25,1
1,88	586 \pm 53	18,8
0	98 \pm 2	–
Контроль позитивный	722 \pm 75	–

П р и м е ч а н и е. Мутаген – азид натрия, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген – в стандартных пределах.

Т а б л и ц а 4. Статистическая оценка антимутагенной активности опытного образца гидролизата молозива в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 98

T a b l e 4. Statistical evaluation of antimutagenic activity of the colostrum hydrolysate test by the Ames test performed on the strain *S. typhimurium* TA 98

К-во образца, мкг на чашку	К-во ревертантов, $\bar{x} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
8700	176 ± 6	29,6
2175	191 ± 12	23,6
544	197 ± 5	21,2
136	211 ± 12	15,6
33	225 ± 9	10,0
0	21 ± 2	–
Контроль позитивный	250 ± 23	–

П р и м е ч а н и е. Мутаген – этидиум бромид, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген – в стандартных пределах.

Т а б л и ц а 5. Статистическая оценка антимутагенной активности опытного образца гидролизата молозива в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 100

T a b l e 5. 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

К-во образца, мг на чашку	К-во ревертантов, $\bar{x} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
8700	588 ± 23	32,4
2175	617 ± 24	29,1
544	696 ± 27	20,0
136	713 ± 13	18,0
33	761 ± 17	12,5
0	88 ± 7	–
Контроль позитивный	870 ± 56	–

П р и м е ч а н и е. Мутаген – азид натрия, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген – в стандартных пределах.

В соответствии с данными литературы [7, 19] и полученными нами результатами показано возрастание антимутагенного потенциала гидролизованных белков молока. Наряду с сопоставимым количеством фракции с молекулярной массой 10 кДа в экспериментальных образцах (гидролизатах сывороточных белков и молозива) более высокий антимутагенный эффект установлен для гидролизата белков молочной сыворотки.

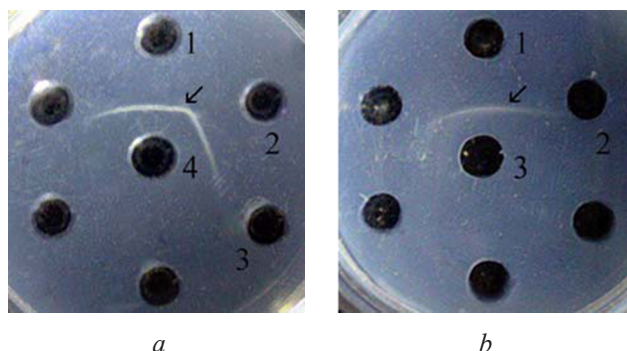


Рис. 2. Анализ антигенных свойств гидролизатов молозива (а) и молочной сыворотки (b) в реакции двойной радиальной иммунодиффузии (а: 1 – β-лг (белок-антиген, контроль), 2 – обезжиренное молозиво (контроль, без фермента), 3 – гидролизат обезжиренного молозива (внесение алкалазы), 4 – Ас против β-лг; b: 1 – молочная сыворотка (контроль, без фермента), 2 – гидролизат молочной сыворотки (внесение алкалазы), 3 – Ас против β-лг). Стрелкой указан преципитат

Fig. 2. Analysis of antigenic properties of colostrum hydrolysate (a) and whey hydrolysate (b) in reaction of the double radial immunodiffusion (a: 1 – β-lg (protein-antigen, control), 2 – skimmed colostrum (control, without enzyme), 3 – hydrolysate of skimmed colostrum (addition of alcalase), 4 – As against β-lg; b: 1 – whey (control, without enzyme), 2 – whey hydrolysate (addition of alcalase), 3 – As against β-lg). Arrow indicates the precipitate

Антигенные свойства одного из основных аллергенов молока (β -лг) до и после гидролиза молочной сыворотки и молозива алкалазой. В ходе эксперимента определяли наличие бивалентных антигенных детерминант β -лг в образцах нативных и гидролизованных молочной сыворотки и молозива (рис. 2). Преципитат обнаружен в реакции антисыворотки с образцом нативного молозива (рис. 2, а, 2) и молочной сыворотки (рис. 2, б, 1). Вместе с тем β -лг расщепляется алкалазой и не выявляется иммунохимически в гидролизате молозива (рис. 2, а, 3) и сывороточных белков (рис. 2, б, 2), что подтверждается результатами ДСН-электрофоретического анализа (см. рис. 1).

Так, опытные образцы гидролизатов не содержат нативный β -лг, обладающий высоким аллергенным потенциалом. На основании экспериментальных данных и проведенных ранее исследований [13] установлено, что применение высокоактивной эндопептидазы (алкалазы) обеспечивает получение гипоаллергенного белкового компонента на основе молочной сыворотки и молозива.

Заключение. Проведено сравнительное исследование продуктов протеолиза молочной сыворотки и обезжиренного молозива алкалазой, охарактеризованы антиоксидантные, антимуtagenные и антигенные свойства полученных частичных гидролизатов. Ферментативный гидролизат молочной сыворотки представлен пептидным компонентом с молекулярной массой ≤ 10 кДа, тогда как в гидролизате молозива обнаружена высокомолекулярная фракция частично расщепленных иммуноглобулинов. Показано, что антимуtagenный эффект и уровень антиоксидантной активности зависят как от глубины протеолиза, так и от состава белкового компонента опытных образцов. Установлено возрастание антиоксидантных свойств гидролизованных белков молочной сыворотки и молозива в 2,8 и 5,0 раза соответственно. Наиболее выраженный антимуtagenный эффект при тестировании отмечен для гидролизата молочной сыворотки: 15,7–49,2 % на штамме *S. typhimurium* TA 98 и 18,8–52,1 % на штамме TA 100. По данным ДСН-электрофореза и реакции иммунопреципитации, в опытных образцах не выявлен нативный β -лг, являющийся одним из основных аллергенов коровьего молока. Перспективным является применение гидролизованного молозива наряду с достаточно широким использованием частичных гидролизатов молочной сыворотки в качестве белкового компонента специализированных продуктов диетического профилактического питания.

Список использованных источников

1. Schaafsma, G. Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition / G. Schaafsma // Eur. J. Clin. Nutr. – 2009. – Vol. 63, N 10. – P. 1161–1168. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.56>
2. Sánchez, A. Bioactive peptides: a review / A. Sánchez, A. Vázquez // J. Food Safety. – 2017. – Vol. 1, N 1. – P. 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>
3. Conte, F. A study on the quality of bovine colostrum: physical, chemical and safety assessment / F. Conte, S. Scarantino // Int. Food Res. J. – 2013. – Vol. 20, N 2. – P. 925–931.
4. El-Agamy, E. I. The challenge of cow milk protein allergy / E. I. El-Agamy // Small Rumin. Res. – 2007. – Vol. 68, N 1–2. – P. 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.016>
5. Wal, J.-M. Bovine milk allergenicity / J.-M. Wal // Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2004. – Vol. 93, N 5. – P. S2–S11. [https://doi.org/10.1016/s1081-1206\(10\)61726-7](https://doi.org/10.1016/s1081-1206(10)61726-7)
6. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk / A. Zulueta [et al.] // Int. Dairy J. – 2009. – Vol. 19, N 6–7. – P. 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.02.003>
7. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt / B. N. P. Sah [et al.] // Food Chem. – 2014. – Vol. 156, N 1. – P. 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.105>
8. Остерман, Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование / Л. А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
9. Тарун, Е. И. Сравнение антиоксидантных активностей галловой, кофейной и хлорогеновой кислот / Е. И. Тарун // Тр. БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2014. – Т. 9, ч. 1. – С. 186–191.
10. Дудчик, Н. В. Количественная оценка антимуtagenной активности растительной композиции в краткосрочном тесте / Н. В. Дудчик // Здоровье и окружающая среда. – 2014. – Т. 1, № 24. – С. 218–221.
11. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. Ю. А. Данилова; под ред. Н. Е. Бузикашвили, Д. В. Самойлова. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
12. Иммунологические методы / Х. Амброзиус [и др.]; под ред. Г. Фримеля; пер. с нем. А. П. Тарасова. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
13. Halavach, T. M. Enzymatic hydrolysis of milk proteins as a basis of specialized food products biotechnology / T. M. Halavach, V. P. Kurchenko, A. I. Albulov // Nauka i Studia. – 2016. – Vol. 3. – P. 1196–1207.

14. Способ получения гидролизата белков молока (варианты): пат. 16161 Респ. Беларусь, МПК А 23 J 3/34, А 23 J 1/20, С 12 N 1/20 / Т. Н. Головач, Н. К. Жабанос, Н. Н. Фурик, В. П. Курченко; заявитель РУП «Институт мясо-молочной промышленности». – N а 20101723; заявл. 2010.11.30; опубл. 2012.08.30 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2012. – N 4. – С. 58–59.

15. O’Keefe, M. B. Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells / M. B. O’Keefe, R. J. FitzGerald // *Int. Dairy J.* – 2014. – Vol. 36, N 2. – P. 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.013>

16. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase / X. Peng [et al.] // *Int. Dairy J.* – 2010. – Vol. 20, N 5. – P. 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.019>

17. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin / B. Hernández-Ledesma [et al.] // *Int. Dairy J.* – 2007. – Vol. 17, N 1. – P. 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.012>

18. The dual effects of Maillard reaction and enzymatic hydrolysis on the antioxidant activity of milk proteins / N. S. Oh [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2013. – Vol. 96, N 8. – P. 4899–4911. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6613>

19. 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 / M. B. E. Turbay [et al.] // *J. Dairy Sc.* – 2012. – Vol. 95, N 3. – P. 1108–1118. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4735>

References

1. Schaafsma G. Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2009, vol. 63, no. 10, pp. 1161–1168. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.56>

2. Sánchez A., Vázquez A. Bioactive peptides: a review. *Journal of Food Safety*, 2017, vol. 1, no. 1, pp. 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>

3. Conte F., Scarantino S. A study on the quality of bovine colostrum: physical, chemical and safety assessment. *International Food Research Journal*, 2013, vol. 20, no. 2, pp. 925–931.

4. El-Agamy E. I. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 2007, vol. 68, no. 1–2, pp. 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.016>

5. Wal J.-M. Bovine milk allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 2004, vol. 93, no. 5, pp. S2–S11. [https://doi.org/10.1016/s1081-1206\(10\)61726-7](https://doi.org/10.1016/s1081-1206(10)61726-7)

6. Zulueta A., Maurizi A., Frígola A., Esteve M. J., Coli R., Burini G. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *International Dairy Journal*, 2009, vol. 19, no. 6–7, pp. 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.02.003>

7. Sah B. N. P., Vasiljevic T., McKechnie S., Donkor O. N. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chemistry*, 2014, vol. 156, no. 1, pp. 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.105>

8. Osterman L. A. *Methods for studying proteins and nucleic acids: electrophoresis and ultracentrifugation*. Moscow, Nauka Publ., 1981. 288 p. (in Russian).

9. Tarun E. I. Comparison of antioxidant activities of gallic, coffee and chlorogenic acids. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Fiziologicheskie, biokhimiicheskie i molekulyarnye osnovy funkcionirovaniya biosistem* [Proceedings of the Belarusian State University. Physiological, biochemical and molecular bases of functioning of biosystems], 2014, vol. 9, pt. 1, pp. 186–191 (in Russian).

10. Dudchik N. V. Quantitative evaluation of antimutagenic activity of plant composition in a short-term test. *Zdorov’e i okruzhayushchaya sreda* [Health and Environment], 2014, vol. 1, no. 24, pp. 218–221 (in Russian).

11. Glantz S. A. *Primer of Biostatistics. 4th ed.* New York, McGraw-Hill Inc., 1997. 473 p. (Russ. ed.: Glants S. *Mediko-biologicheskaya statistika*. Moscow, Praktika Publ., 1998. 459 p.).

12. Friemel H. (ed.). *Immunologische Arbeitsmethoden. 3. Aufl.* Jena, VEB Gustav Fischer Verlag, 1984. 522 S. (Russ. ed.: Frimel’ G. (red.). *Immunologicheskie metody*. Moscow, Meditsina Publ., 1987. 472 p.).

13. 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, pp. 1196–1207.

14. Golovach T. N., Zhabanos N. K., Furik N. N., Kurchenko V. P. *Method for preparation of milk protein hydrolysate (variants)*. Patent Republic of Belarus, no. 16161, 2012 (in Russian).

15. O’Keefe M. B., FitzGerald R. J. Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells. *International Dairy Journal*, 2014, vol. 36, no. 2, pp. 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.013>

16. Peng X., Kong B., Xia X., Liu Q. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *International Dairy Journal*, 2010, vol. 20, no. 5, pp. 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.019>

17. Hernández-Ledesma B., Quirós A., Amigo L., Recio I. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 2007, vol. 17, no. 1, pp. 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.012>

18. Oh N. S., Lee H. A., Lee J. Y., Joung J. Y., Lee K. B., Kim Y., Lee K. W., Kim S. H. The dual effects of Maillard reaction and enzymatic hydrolysis on the antioxidant activity of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 2013, vol. 96, no. 8, pp. 4899–4911. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6613>

19. Turbay M. B. E., de Moreno de LeBlanc A., Perdígón G., Savoy de Giori G., Hebert E. M. 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. *Journal of Dairy Science*, 2012, vol. 95, no. 3, pp. 1108–1118. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4735>

Информация об авторах

Головач Татьяна Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: halavachtn@gmail.com

Тарун Екатерина Ивановна – канд. хим. наук, доцент. Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ktarun@tut.by

Дудчик Наталья Владимировна – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Научно-практический центр гигиены (ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: n_dudchik@tut.by

Романович Роман Витальевич – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: muninn@tut.by

Бубра Илона Александровна – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ilona.bubra96@gmail.com

Курченко Владимир Петрович – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kurchenko@tut.by

Information about the authors

Tatsiana M. Halavach – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: halavachtn@gmail.com

Ekaterina I. Tarun – Ph. D. (Chem.), Assistant Professor. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Republic of Belarus). E-mail: tarun@tut.by

Natalia V. Dudchik – D. Sc. (Biol.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Scientific Practical Centre of Hygiene (8, Akademicheskaya Str., 220012, Republic of Belarus). E-mail: n_dudchik@tut.by

Roman V. Romanovich – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: muninn@tut.by

Ilona A. Bubra – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ilona.bubra96@gmail.com

Vladimir P. Kurchenko – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kurchenko@tut.by