

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2422>
<https://elibrary.ru/GXNVFU>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Пептиды трипсинового гидролизата молозива коров



С. А. Тихонов^{1,*}, Н. В. Тихонова¹, Х. Х. Турсунов²,
И. Г. Данилова³, В. А. Лазарев¹

¹ Уральский государственный экономический университет^{ROR}, Екатеринбург, Россия

² Андижанский государственный медицинский институт^{ROR}, Андижан, Узбекистан

³ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук^{ROR}, Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию: 30.06.2022

Принята после рецензирования: 08.09.2022

Принята к публикации: 04.10.2022

*С. А. Тихонов: tihonov75@bk.ru,

<https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

Н. В. Тихонова: <https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>

И. Г. Данилова: <https://orcid.org/0000-0001-6841-1197>

В. А. Лазарев: <https://orcid.org/0000-0002-0470-7324>

© С. А. Тихонов, Н. В. Тихонова, Х. Х. Турсунов,
И. Г. Данилова, В. А. Лазарев, 2023



Аннотация.

Молозиво коров из-за содержания биологически активных веществ, в частности иммуноглобулинов, пептидов и цитокинов, является перспективным сырьем для производства продуктов функциональной направленности. Пептиды молозива обладают антимикробным действием. Биодоступность действующих начал молозива повышается при его ферментации протеолитическими ферментами. Цель исследования – выделение и характеристика пептидов надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров, а также оценка их антимикробной и противогрибковой активностей. Для эксперимента использовали надосадочную жидкость трипсинового гидролизата молозива коров, выделенную методом центрифугирования при 3900 об/мин в течение 7 мин. Надосадочную жидкость разделяли методом препаративной хроматографии. Пептидный состав надосадочной жидкости ферментативного гидролизата определяли на МАЛДИ-ТОФ масс-спектрометре, расшифровку белковых последовательностей проводили с помощью базы данных Mascot. Для изучения белкового состава надосадочной жидкости гидролизата проводили осаждение белков сульфатом аммония. Антимикробную активность определяли диско-диффузионным методом. Культивирование штаммов бактерий проводили на плотной питательной среде LB при температуре 37 °С. Для оценки противомикробного действия пептидов провели эксперимент на крысах линии Вистар, инфицированных внутрибрюшинно *Salmonella enteritidis* 92.

В надосадочном трипсиновом гидролизате молозива коров выделили 4 пептида, один из которых относится к коротким пептидам, три – к полипептидам. Выделенные пептиды имели различную молекулярную массу – 8,4, 6,5, 13,0 и 18 кДа. Установлено, что ферментативный гидролизат надосадочной жидкости молозива коров обладал бактерицидным действием к грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* и грамположительной бактерии *Bacillus subtilis*, а также антигрибковой активностью против *Candida albicans*. Введение крысам, инфицированным *S. enteritidis* 92, внутрь трипсинового гидролизата надосадочной жидкости молозива коров способствовало их выживаемости, снижению ЛД₅₀ и увеличению среднего срока гибели животных с 2 до 4 суток.

Полученные данные свидетельствуют об антимикробном действии пептидов молозива и возможных иммуностропных свойствах. Практическая значимость проведенного исследования заключается в перспективности использования пептидов надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров для производства продуктов функциональной направленности с антимикробными свойствами.

Ключевые слова. Молозиво, молочный белок, фермент, гидролиз, антимикробная активность, противогрибковая активность, биологически активные вещества

Для цитирования: Пептиды трипсинового гидролизата молозива коров / С. Л. Тихонов [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 1. С. 150–158. (На англ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2422>

Peptides of Trypsin Hydrolyzate in Bovine Colostrum



Sergei L. Tikhonov^{1,*}, Natalia V. Tikhonova¹,
Khatam Kh. Tursunov², Irina G. Danilova³,
Vladimir A. Lazarev¹

¹ Ural State University of Economics , Yekaterinburg, Russia

² Andijan State Medical Institute , Andijan, Uzbekistan

³ Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences ,
Yekaterinburg, Russia

Received: 30.06.2022

Revised: 08.09.2022

Accepted: 04.10.2022

*Sergei L. Tikhonov: tikhonov75@bk.ru,

<https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

Natalia V. Tikhonova: <https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>

Irina G. Danilova: <https://orcid.org/0000-0001-6841-1197>

Vladimir A. Lazarev: <https://orcid.org/0000-0002-0470-7324>

© S.L. Tikhonov, N.V. Tikhonova, Kh.Kh. Tursunov,

I.G. Danilova, V.A. Lazarev, 2023



Abstract.

Bovine colostrum contains biologically active substances, e.g., immunoglobulins, peptides, and cytokines, which makes it a logical component of numerous functional products. Colostrum peptides also possess antimicrobial activity. This bioavailability increases during colostrum fermentation with proteolytic enzymes. The research objective was to describe peptides isolated from the trypsin hydrolyzate supernatant of bovine colostrum and to evaluate their antimicrobial and antifungal properties. The supernatant of trypsin hydrolyzate of bovine colostrum was isolated by centrifugation at 3900 rpm for 7 min. The supernatant was separated by preparative chromatography. Its peptide composition was determined on a MALDI-TOF mass spectrometer, while the protein sequences were deciphered using the Mascot database. Proteins were precipitated with ammonium sulfate, and the antimicrobial activity was measured by the disk-diffusion method against gram-positive and gram-negative bacteria and diploid fungi. Strains were cultivated on a thick LB nutrient medium at 37°C. The antimicrobial activity was defined experimentally on Wistar rats infected intraperitoneally with *Salmonella enteritidis* 92.

The trypsin hydrolyzate supernatant of bovine colostrum revealed four peptides, one of which belonged to short peptides, while the remaining three belonged to polypeptides. The isolated peptides had different molecular weights of 8.4, 6.5, 13.0, and 8 kDa. The enzymatic hydrolyzate proved bactericidal against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* and demonstrated antifungal activity against *Candida albicans*. When rats infected with *S. enteritidis* 92 were administered with trypsin hydrolyzate, it promoted their survival, decreased LD₅₀, and increased the mean day of death period from 2 to 4 days.

The research proved the antimicrobial effect of colostrum peptides and suggested their immunotropic properties. The peptides obtained from the trypsin hydrolyzate supernatant of bovine colostrum can be recommended for functional food industry as part of antimicrobial products.

Keywords. Colostrum, milk protein, enzyme, hydrolysis, antimicrobial activity, antifungal activity, biologically active substances

For citation: Tikhonov SL, Tikhonova NV, Tursunov KhKh, Danilova IG, Lazarev VA. Peptides of Trypsin Hydrolyzate in Bovine Colostrum. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(1):150–158. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2422>

Введение

Молозиво – это сложная биологическая жидкость. По мнению N. Głowska и M. Woźniewicz, наличие в молозиве коров факторов роста, иммуноглобулинов, пептидов, цитокинов, лактоферрина и гормонов позволяет сделать предположение о том, что его употребление может улучшить функционирование пищеварительной, иммунной и нейроэндокринной систем, а также повысить

физическую работоспособность [1]. Молозиво рекомендуется использовать в питании спортсменов в периоды высокоинтенсивных тренировок из-за его высокой концентрации иммуноглобулинов и способности увеличивать буферную емкость мышц. Однако в научной литературе отсутствуют данные о рекомендуемых дозах молозива, используемых для увеличения физической работоспособности [1].

По данным исследований [2–4] молочные продукты и молозиво характеризуются высоким содержанием иммуноглобулинов, минеральных веществ, витаминов, факторов роста и иммунных клеток, а также микроРНК – коротких некодирующих молекул РНК, которые могут регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Они действуют как ключевые регуляторы различных биологических процессов и процессов развития. МикроРНК в молозиве являются сигнальными молекулами. Они упакованы во внеклеточные пузырьки, что делает их устойчивыми к агрессивным условиям желудочно-кишечного тракта, поэтому они могут попасть в тонкий кишечник, где всасываются и попадают в кровоток. МикроРНК стимулируют жизнеспособность, пролиферацию и активность стволовых клеток кишечного эпителия. Кроме того, микроРНК играют ключевую роль в развитии всей иммунной системы: регулируют дифференцировку В- и Т-клеток и влияют на выработку интерлейкина макрофагами [2].

В работе К. Chandwe и Р. Kelly представлены доказательства эффективности молозива коров при воспалительных заболеваниях кишечника и инфекционной диарее [5].

Результаты исследований [6, 7] как *in vitro*, так и *in vivo* свидетельствуют о пользе применения молозива коров при желудочно-кишечных заболеваниях.

Более половины всех детей с расстройствами аутистического спектра имеют сопутствующие заболевания желудочно-кишечного тракта, включая хронические запоры, диарею и синдром раздраженного кишечника. Тяжесть этих симптомов коррелирует со степенью микробного дисбактериоза желудочно-кишечного тракта. В исследовании М. R. Sanctuary и др. проведена оценка эффективности пробиотика (*Bifidobacterium infantis*) в сочетании с продуктом из молозива коров в качестве источника пребиотических олигосахаридов, а также была дана оценка состояния желудочно-кишечного тракта, микробиома и иммунных факторов у детей с расстройством аутистического спектра и сопутствующими заболеваниями желудочно-кишечного тракта [8]. У больных, получавших оба вида лечения, наблюдалось уменьшение частоты симптомов раздраженного желудочно-кишечного тракта и дисбактериоза, а также снижение частоты определенных отклонений в поведении. Улучшение может быть объяснено ослаблением выработки IL-13 и TNF- α [8].

Биодоступность действующих начал молозива повышается при его ферментации протеолитическими ферментами в результате образования пептидов. В исследовании А. L. Jørgensen и др. дана характеристика биологической активности пептидов, выделенных из молозива коров, на мышинных

кишечных клетках (mIC(c12)) [9]. Установлено, что высокая биологическая активность пептидов отмечалась у молозива, обработанного протеазами. Идентифицированные биологически активные пептиды в молозиве находятся в казеиновой фракции молозива, как показано идентификацией MALDI MS/MS.

В исследовании А. L. Jørgensen и др. полезные эффекты при употреблении молозива объясняются наличием биологически активных пептидов, полученных из интактных белков [9]. Эти пептиды могут высвобождаться в процессе желудочно-кишечного переваривания или ферментации молозива. Следовательно, ферментативные гидролизаты молозива коров представляются потенциальным источником биологически активных нативных белков и пептидных фракций с целью их включения в качестве полезных для здоровья ингредиентов в различные пищевые продукты [10–12].

Молочные пептиды перестали быть только квинтэссенцией питания, они приобрели важное терапевтическое значение. Доказано, что пептиды молозива являются ингибиторами SARS-CoV2 [13]. Употребление ферментированного молозива, сырого и микрофильтрованного молока от коров, вакцинированных против SARS-CoV-2, может обеспечить краткосрочную защиту от инфекции SARS-CoV-2 [14]. М. L. Kütt и J. Stagsted доказали антимикробное действие пептидов молозива [15].

Эффективным способом получения биологически активных пептидов является ферментативный гидролиз белка с использованием протеолитических ферментных препаратов [16]. Для гидролиза часто используют ферменты животного происхождения, в частности трипсин [17].

Целью исследования являлось выделение пептидов надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров, их характеристика и оценка антимикробной и противогрибковой активностей.

Объекты и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали трипсиновый гидролизат молозива коров, полученный по следующей технологии: удаление жировой фракции центрифугированием при 3900 об/мин в течение 10 мин на центрифуге СМ-12-06 (TAGLER, Россия); введение фермента трипсина (Самсон-Мед, Россия) (0,15 % от массы молозива) на приготовленном фосфатно-буферном растворе (динатрий гидрофосфат додекагидрата (Россполимер, Россия)) при рН 7,4; гидролиз в течение 12 ч при температуре 36 °С; повышение температуры до 75 °С для инактивации фермента. В таблице 1 представлены физико-химические показатели трипсинового гидролизата молозива коров.

Таблица 1. Физико-химические показатели трипсинового гидролизата молозива коров

Table 1. Physicochemical parameters of trypsin hydrolyzate of bovine colostrum

Показатель	Характеристика
Массовая доля белка, %	13,18 ± 0,09
Массовая доля жира, %	0,15 ± 0,01
Массовая доля золы, %	9,50 ± 0,02
Массовая доля сухих веществ, %	24,17 ± 0,42
Плотность, г/см ³	1,05 ± 0,03
Кислотность, °Т	4,78 ± 0,12

Для эксперимента использовали надосадочную жидкость трипсинового гидролизата молозива коров, выделенную методом центрифугирования при 3900 об/мин в течение 7 мин.

Надосадочную жидкость разделяли методом препаративной хроматографии на силикагеле, элюэнт PBS и EtOH в изократическом соотношении 9:1 соответственно. Пептидный состав надосадочной жидкости трипсинового гидролизата определяли на МАЛДИ-ТОФ масс-спектрометре, расшифровку белковых последовательностей проводили с помощью базы данных Mascot.

Для более полного изучения белкового состава надосадочной жидкости гидролизата проводили осаждение белков сульфатом аммония. После осаждения образцы центрифугировали при скорости вращения ротора 3900 об/мин в течение 7 мин и собирали белковый осадок. Белковый осадок очищали от солей и неорганических примесей на колонке с Amberlit XAD2, элюэнт:буфер А: 10 mM CH₃COONa pH = 6, 10 mM CH₃COONa pH = 4, 10 mM KCl/HCl pH = 1,5 с градиентом соли буфер А + 0,2, 0,4 и 1 % NaCl. Фракции каждого образца изучали на наличие белка методом Брэдфорда. Полученные фракции пептидов из раствора образцов были разделены методом препаративной хроматографии на силикагеле, элюэнт PBS и EtOH в изократическом соотношении 9:1 соответственно. После разделения получили фракцию mPT, которую исследовали методом МАЛДИ-ТОФ.

Антимикробную активность надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров изучали диско-диффузионным методом на грамположительных и грамотрицательных бактериях. В качестве тест-штаммов выбрали *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*.

Культивирование штаммов бактерий проводили на плотной питательной среде LB (агар – 1,5 %, триптон – 1 %, дрожжевой экстракт – 0,5 %, NaCl – 1 %) и жидкой питательной среде LB (триптон – 1 %, дрожжевой экстракт – 0,5 %, NaCl – 1 %) при температуре 37 °С.

Диффузионный метод определения антимикробной активности гидролизатов заключался в следующем: тест-штамм высевали на агаризованную питательную среду газоном, и одновременно на газон помещали надосадочную жидкость трипсинового гидролизата молозива коров. В качестве контроля использовался бумажный диск с питательной средой, в качестве препарата сравнения – диск с антибиотиком (Канамицин из стандартного набора). Чашки Петри инкубировали в течение 24,0 ± 0,5 ч при температуре, соответствующей оптимальной температуре роста каждого тест-штамм микроорганизма. Результаты учитывались по наличию и размеру (в мм) прозрачной зоны отсутствия роста микроорганизмов вокруг диска.

Для оценки противомикробного действия пептидов провели эксперимент. Сформировали 9 групп крыс линии Вистар по 4 головы в каждой (самцы 3 месячного возраста). 1 группа животных интактная (контроль) получала внутривентрикулярно 0,4 мл воды ежедневно в течение 7 дней, 2, 3, 4 и 5 группы – 0,3 мл надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров ежедневно в течение 7 дней. Через сутки после введения надосадочной жидкости ферментативного гидролизата молозива коров лабораторным животным 2–9 групп внутрибрюшинно вводили суточную культуру *Salmonella enteritidis* 92 в дозах 5 КОЕ – 2 и 5 группы, 100 КОЕ – 3 и 6 группы, 500 КОЕ – 4 и 8 группы, 5000 КОЕ – 5 и 9 группы. Наблюдение за животными длилось в течение 21 суток после заражения. Оценка эффективности действия надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров проводили путем определения ЛД₅₀ количества выживших и среднего срока гибели животных.

Все манипуляции с животными были осуществлены в соответствии с Директивой Совета ЕС 2010/63/EU и одобрены этическим комитетом ИИФ УрО РАН.

Результаты и их обсуждение

В результате фракционирования надосадочной жидкости трипсинового гидролизата (Т) получено три пептидные фракции (ТТ1, ТТ2 и ТТ3) с различной молекулярной массой.

На рисунке 1 представлена хроматограмма образца Т надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров.

На рисунке 2 представлены масс-спектры образцов пептидных фракций ТТ1, ТТ2 и ТТ3 надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров.

Молекулярная масса пептидов надосадочной жидкостью трипсинового гидролизата молозива коров различна и составляет: пептид ТТ1 – 8,4 кДа, ТТ2 – 6,5 кДа и ТТ3 – 13,0 кДа.

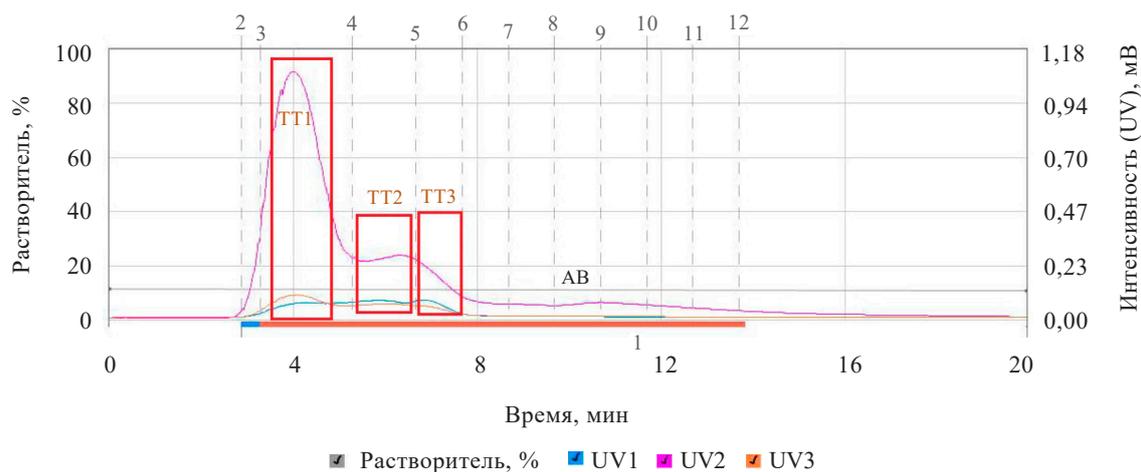


Рисунок 1. Хроматограмма образца Т надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров

Figure 1. Supernatant of trypsin hydrolyzate of bovine colostrum: peptides T

Таблица 2. Белковые последовательности пептидов TT1, TT2 и TT3 надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров

Table 2. Protein sequences of peptide samples TT1, TT2, and TT3 of trypsin hydrolyzate supernatant of bovine colostrum

Наименование пептида	Аминокислотная последовательность
TT1	EGKSPRQ CLK SR G RK GY
TT2	PK CD YKRRS GP ALR TAK
TT3	LARKTSK IK

Примечание: А – аланин; D – аспарагиновая кислота; Q – глутамин; E – глутаминовая кислота; G – глицин; I – изолейцин; L – лейцин; K – лизин; P – пролин; S – серин; T – треонин; Y – тирозин; R – аргинин; D – аспарагиновая кислота.
 Note: A – alanine; D – aspartic acid; Q – glutamine; E – glutamic acid; G – glycine; I – isoleucine; L – leucine; K – lysine; P – proline; S – serine; T – threonine; Y – tyrosine; R – arginine; D – aspartic acid.

В таблице 2 представлена аминокислотная последовательность пептидов TT1, TT2 и TT3. Пептид TT3 состоит из 9 аминокислот (нонапептид) и относится к коротким пептидам. Пептиды TT1 и TT2 имеют в своем составе 17 аминокислот и относятся к полипептидам. Согласно данным, приведенным в работе [17], выделенный пептид TT1 является пептидом NCI_CGAP_Brn23 Клон к ДНК *Homo sapiens*, сходен с пептидом TR: O35085 O35085 ARX НОМЕОПРОТЕИН и выполняет важную роль при эмбриональном развитии центральной нервной системы. Пептиды TT2 и TT3 не идентифицированы.

Провели исследования пептидного состава белков, осажденных сульфатом аммония надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров. Хроматограмма представлена на рисунке 3.

При осаждении сульфатом аммония белков надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров выделен пептид (TT4) с аминокислотой последовательностью EK LAKNK LAR GLK RK и молекулярной массой 18,0 кДа. Указанный пептид идентифицируется как CO950255 protein, *sus scrofa*, функции которого не изучены.

Таким образом, в надосадочном трипсиновом гидролизате молозива коров выделены 4 пептида, один из которых относится к коротким пептидам, 3 – к полипептидам. Все исследуемые пептиды имеют различную молекулярную массу.

Полученные данные согласуются с исследованием [18], авторы которого утверждают, что трипсиновый гидролизат молозива коров характеризуется наличием биологически активных пептидов. Авторами доказана стимуляция пролиферативной активности линии эпителиальных клеток кишечника человека Т84 пепсиновым и трипсиновым гидролизатом молозива коров. Результаты исследования позволяют предположить, что пептиды молозива коров являются потенциальными биологически активными веществами, используемыми для восстановления желудочно-кишечного тракта при инфекциях [19].

Г. А. Birkemo и др. провели первое исследование, в котором охарактеризовали пептиды с антимикробной активностью, присутствующие в свежем коровьем молозиве [20]. В результате исследования с помощью хроматографии выделено три пептида свежего молозива и доказана их антимикробная активность против *Escherichia coli* DH5alpha. Два пептида с антимикробной активностью – казецидин 17 и казецидин 15 – были идентичны последовательностям в С-конце бычьего бета-казеина (YQEPVLGPVVRGPFPIV и YQEPVLGPVVRGPFPI) и имели молекулярные массы 1881,00 и 1669,06 Да

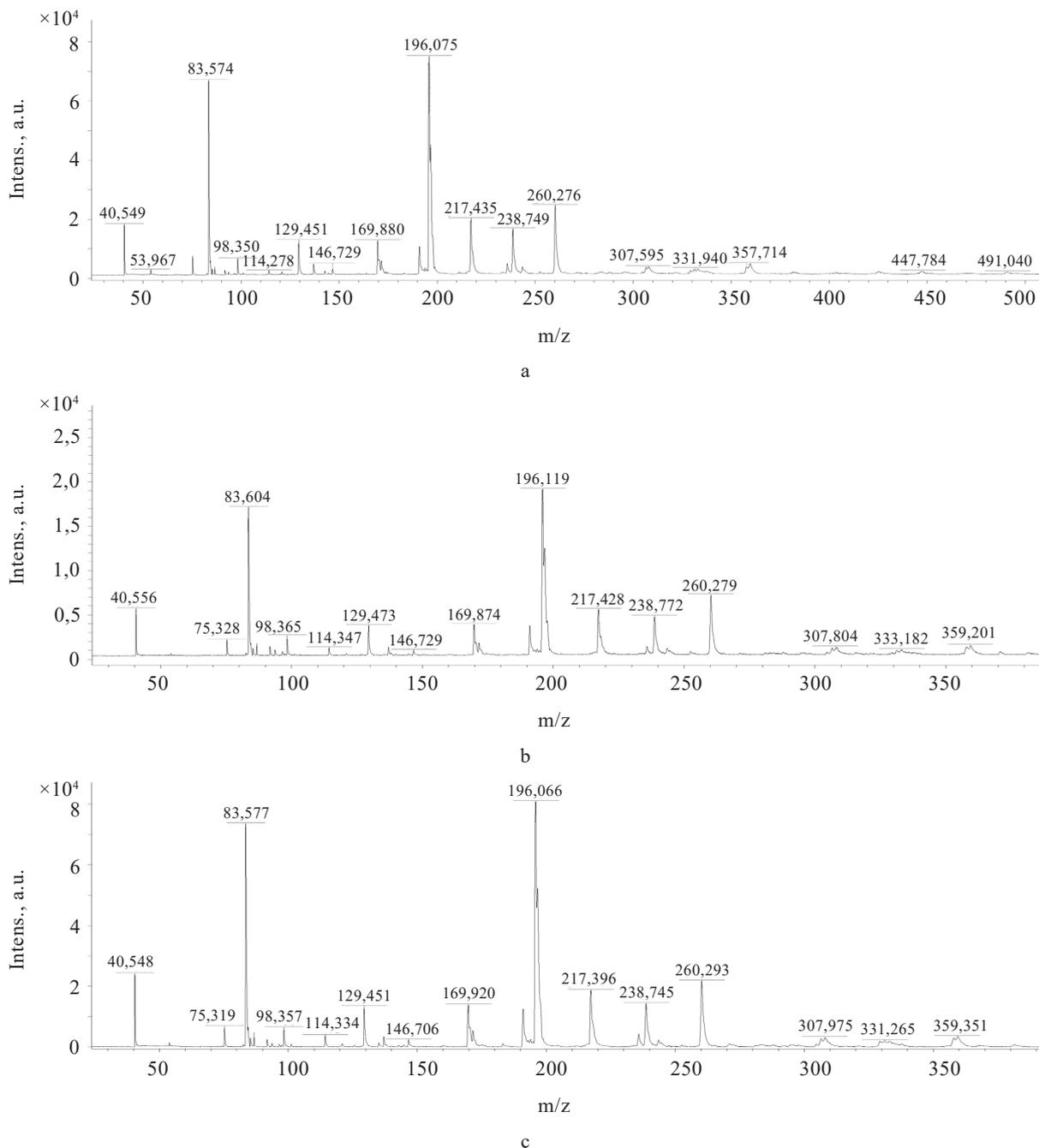


Рисунок 2. Масс-спектры образцов ТТ1 (а), ТТ (б) и ТТ3 (с)

Figure 2. Mass spectrum: Samples TT1 (a), TT (b), and TT3 (c)

соответственно. Третьим пептидом был израцидин, который имеет массу 2763,80 Да и последовательность RPKHPKHKQGLPQEVNENLLRF. Казецидин 17 и казецидин 15 имели идентичные минимальные концентрации ингибирования (МИС) против *E. coli* DPC6053, составляющие 0,4 мг/мл. Структурное моделирование показало, что амфифильные структуры обладают идентичными ингибирующими и

структурными свойствами. Значение МИС израцидина против *E. coli* DPC6053 составило 0,2 мг/мл [20].

Провели исследования антимикробных свойств надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров на грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также диплоидного грибка *Candida albicans*. В качестве тест-штаммов бактерий выбрали *E. coli*, *Bacillus subtilis* и *C. albicans*.

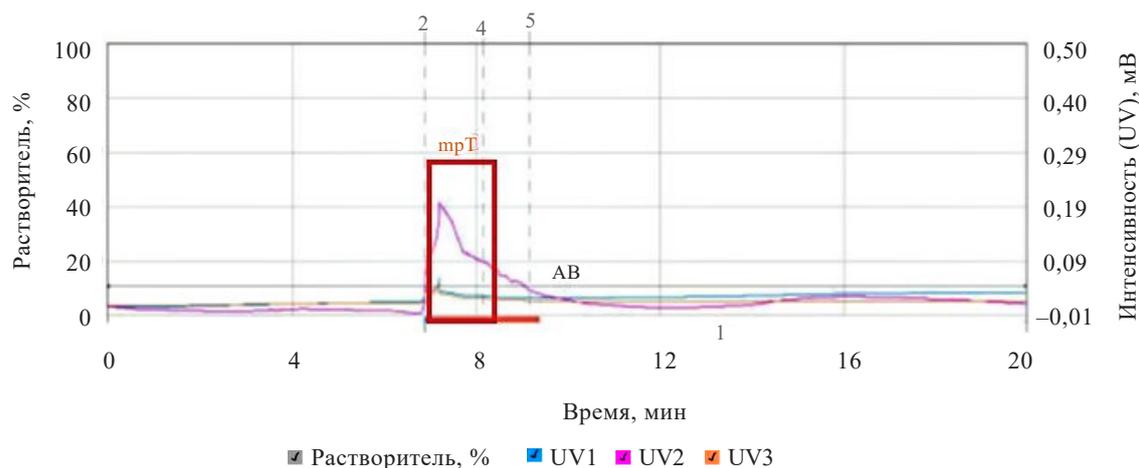


Рисунок 3. Хроматограмма пептидов при осаждении сульфатом аммония белков надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров

Figure 3. Peptides during the precipitation of proteins from trypsin hydrolysate supernatant of bovine colostrum with ammonium sulfate

Таблица 3. Антимикробная и противогрибковая активность надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров

Table 3. Antimicrobial and antifungal activity of the trypsin hydrolysate supernatant of bovine colostrum

Наименование образца	Диаметр зоны лизиса, мм		
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>
Трипсиновый гидролизат надосадочной жидкости молозива коров	3	5	7
Контроль	0	0	0
Антибиотик	25	26	0

Таблица 4. Влияние трипсинового гидролизата надосадочной жидкости молозива коров на выживаемость крыс линии Вистар, зараженных *Salmonella enteritidis* 92

Table 4. Effect of trypsin hydrolysate on the survival of rats infected with *Salmonella enteritidis* 92

Группа	Количество выживших животных, г	Средний срок гибели, сутки
1 группа (контроль)	4	–
2 группа (доза <i>Salmonella enteritidis</i> , 5 КОЕ + гидролизат)	4	–
3 группа (доза <i>Salmonella enteritidis</i> , 100 КОЕ + гидролизат)	4	–
4 группа (доза <i>Salmonella enteritidis</i> , 500 КОЕ + гидролизат)	2	4
5 группа (доза <i>Salmonella enteritidis</i> , 5000 КОЕ + гидролизат)	0	3
6 группа (доза <i>Salmonella enteritidis</i> , 5 КОЕ)	4	–
7 группа (доза <i>Salmonella enteritidis</i> , 100 КОЕ)	2	2
8 группа (доза <i>Salmonella enteritidis</i> , 500 КОЕ)	1	2
9 группа (доза <i>Salmonella enteritidis</i> , 5000 КОЕ)	0	2

В таблице 3 представлены результаты исследования антимикробной и противогрибковой активностей надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров.

Из данных таблицы 3 следует, что трипсиновый гидролизат надосадочной жидкости молозива коров обладает бактерицидным действием к грамотрицательной бактерии *E. coli* (диаметр зоны лизиса

3 мм) и грамположительной бактерии *B. subtilis* (диаметр зоны лизиса 5 мм), а также антигрибковой активностью против *C. albicans*.

В таблице 4 представлены результаты исследования влияния трипсинового гидролизата надосадочной жидкости молозива коров на выживаемость крыс линии Вистар, зараженных *Salmonella enteritidis* 92.

Введение внутрь трипсинового гидролизата надосадочной жидкости молозива коров инфицированным *S. enteritidis* 92 крысам способствует выживаемости животных, что свидетельствует об антимикробном действии пептидов молозива. Количество выживших животных в 4 группе, зараженных дозой 500 КОЕ *S. enteritidis* и получавших гидролизат, составило 2 головы (50 %), в то время как в 7 группе животных – 1 голова (25 %). ЛД₅₀ крыс линии Вистар составляет 100 КОЕ *S. enteritidis*. При введении внутрь инфицированным животным *S. enteritidis* трипсинового гидролизата надосадочной жидкости молозива коров ЛД₅₀ составляет 500 КОЕ *S. enteritidis*. Средний срок гибели инфицированных животных, получавших гидролизат, ниже на 50 %. В группе животных, инфицированных сальмонеллезом в дозе 5000 КОЕ, средний срок гибели составляет 2 суток, а в группе крыс, получавших гидролизат и зараженных аналогичной дозой, – 3 суток.

Результаты исследования согласуются с данными, полученными авторами [21]. Они утверждают, что молозиво коров является практичным и эффективным профилактическим средством против желудочно-кишечных заболеваний. Для профилактики диареи, вызванной ЕТЕС, доступен коммерческий продукт Travelan. Несмотря на его клиническую эффективность в отношении сальмонелл, основные иммунные компоненты и антимикробная активность, которые способствуют защите, остаются неопределенными [21].

Полученные нами данные показывают наличие в трипсиновом гидролизате надосадочной жидкости молозива коров наличие четырех антимикробных пептидов, которые могут играть биозащитную роль в ограничении заражения патогенами. Это согласуется с исследованиями, в которых доказано антимикробное и иммуностропное действие молозива коров. Кроме того, авторы [22] утверждают, что молозиво коров повышает защитный барьер тонкой кишки и положительно влияет на перистальтику толстой кишки. Однако для использования молозива в качестве продукта для улучшения здоровья кишечника оно должно быть биологически активным после обработки. Повышение целостности защитного барьера кишечника и антимикробные свойства молозива связаны с высвобождением коротких пептидов в результате ферментативной обработки. Благоприятное влияние молозива на целостность барьера тонкой кишки наблюдалось после обработки протеолитическими ферментами. Это согласуется с исследованиями, проведенными нами, и подтверждает возможность разработки функционального пищевого продукта, направленного на улучшение здоровья кишечника.

Р. J. Playford и др. утверждают, что пероральное введение биоактивных пептидов имеет потенциальные клинические преимущества, но его применение ограничено из-за протеолиза ферментами же-

лудка и поджелудочной железы [23]. Следовательно, внедрять пептиды в качестве антимикробных средств для перорального использования необходимо в комплексе с веществами, обеспечивающими их стабильность к перевариванию. В исследовании [23] доказана устойчивость пептидов молозива коров при совместном введении в организм лабораторных крыс казеина и/или соевой муки с высокой ингибирующей протеазу активностью. Установлено, что соя и казеин повышали биостойкость пептидов молозива по отношению к пищеварительным ферментам.

Выводы

В результате исследования выделены пептиды из надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива, дана их характеристика и проведена оценка антимикробной и противогрибковой активностей. Предварительно методом центрифугирования провели фракционирование трипсинового гидролизата молозива коров. В надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров выделены три пептидные фракции (ТТ1, ТТ2 и ТТ3), отличающиеся различной аминокислотной последовательностью и молекулярной массой. Один из выделенных пептидов относится к коротким, т. е. имеет в своем составе 9 аминокислот, два других – к полипептидам и состоят из 17 аминокислот. Пептид ТТ1 идентифицирован как пептид NCI_CGAP_Brn23, который выполняет важную роль при эмбриональном развитии центральной нервной системы. Пептиды ТТ2 и ТТ3 не идентифицированы. Из осажденных сульфатом аммония надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров выделен полипептид с молекулярной массой 18,0 кДа. Полученный пептид идентифицируется как CO950255 protein, sus scrofa, но функции его не изучены. Пептиды трипсинового гидролизата молозива коров обладают активностью против грамположительной бактерии *Escherichia coli*, грамотрицательной бактерии *Bacillus subtilis* и диплоидного грибка *Candida albicans*. На лабораторных крысах линии Вистар, инфицированных *Salmonella enteritidis* 92 различными дозами, доказано, что введение внутрь трипсинового гидролизата надосадочной жидкости молозива способствует выживаемости инфицированных животных и снижает ЛД₅₀ и средний срок гибели крыс. Полученные данные свидетельствуют об антимикробном действии пептидов трипсинового гидролизата молозива коров и возможных иммуностропных свойствах.

Критерии авторства

Авторы в равной степени принимали участие в исследовании и оформлении рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Główka N, Woźniewicz M. Potential use of *Colostrum bovinum* supplementation in athletes – A review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2019;18(2):115–123. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2019.0654>
2. Van Hese I, Goossens K, Vandaele L, Opsomer G. *Invited review*: MicroRNAs in bovine colostrum – Focus on their origin and potential health benefits for the calf. *Journal of Dairy Science*. 2020;103(1):1–15. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16959>
3. Sukhikh SA, Astakhova LA, Golubcova YuV, Lukin AA, Prosekova EA, Milent'eva IS, et al. Functional dairy products enriched with plant ingredients. *Foods and Raw Materials*. 2019;7(2):428–438. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-428-438>
4. Kharitonov VD, Asafov VA, Iskakova EL, Tankova NL, Halavach TM, Kurchenko VP. Quality control of colostrum and protein calf milk replacers. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2021;51(1):188–195. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-188-195>
5. Chandwe K, Kelly P. Colostrum therapy for human gastrointestinal health and disease. *Nutrients*. 2021;13(6). <https://doi.org/10.3390/nu13061956>
6. Menchetti L, Traina G, Tomasello G, Casagrande-Proietti P, Leonardi L, Barbato O, et al. Potential benefits of colostrum in gastrointestinal diseases. *Frontiers in Bioscience-Scholar*. 2016;8(2):331–351. <https://doi.org/10.2741/S467>
7. Playford RJ, Weiser MJ. Bovine colostrum: Its constituents and uses. *Nutrients*. 2021;13(1). <https://doi.org/10.3390/nu13010265>
8. Sanctuary MR, Kain JN, Chen SY, Kalanetra K, Lemay DG, Rose DR, et al. Pilot study of probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *PLoS ONE*. 2019;14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210064>
9. Jørgensen ALW, Juul-Madsen HR, Stagsted J. Colostrum and bioactive, colostrum peptides differentially modulate the innate immune response of intestinal epithelial cells. *Journal of Peptide Science*. 2010;16(1):21–30. <https://doi.org/10.1002/psc.1190>
10. Korhonen HJ. Production and properties of health-promoting proteins and peptides from bovine colostrum and milk. *Cellular and Molecular Biology*. 2013;59(1):12–24.
11. Novoselova MV, Prosekov AY. Technological options for the production of lactoferrin. *Foods and Raw Materials*. 2016;4(1):90–101. <http://doi.org/10.21179/2308-4057-2016-1-90-101>
12. Koroleva OV, Agarkova EYu, Botina SG, Nikolaev IV, Ponomareva NV, Melnikova EI, et al. Functional properties of fermented milk products with whey protein hydrolysates. *Dairy Industry*. 2013;(11):52–55. (In Russ.). [Функциональные свойства кисломолочных продуктов с гидролизатами сывороточных белков / О. В. Королёва [и др.] // Молочная промышленность. 2013. № 11. С. 52–55.]
13. Pradeep H, Najma U, Aparna HS. Milk peptides as novel multi-targeted therapeutic candidates for SARS-CoV2. *The Protein Journal*. 2021;40(3):310–327. <https://doi.org/10.1007/s10930-021-09983-8>
14. Rezaei Ahvanooei MR, Norouzian MA, Vahmani P. Beneficial Effects of vitamins, minerals, and bioactive peptides on strengthening the immune system against COVID-19 and the role of cow's milk in the supply of these nutrients. *Biological Trace Element Research*. 2021;200(11):4664–4677. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-03045-x>
15. Kütt M-L, Stagsted J. Caseins from bovine colostrum and milk strongly bind piscidin-1, an antimicrobial peptide from fish. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014;70:364–372. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.063>
16. Shteinfer-Kuzmine A, Amsalem Z, Arif T, Zooravlov A, Shoshan-Barmatz V. Selective induction of cancer cell death by VDAC1-based peptides and their potential use in cancer therapy. *Molecular Oncology*. 2018;12(7):1077–1103. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12313>
17. Ko S-C, Kim D, Jeon Y-J. Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(7):2294–2302. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.022>
18. Poirier K, Van Esch H, Friocourt G, Saillour Y, Bahi N, Backer S, et al. Neuroanatomical distribution of ARX in brain and its localisation in GABAergic neurons. *Molecular Brain Research*. 2004;122(1):35–46. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2003.11.021>

19. Morgan AJ, Riley LG, Sheehy PA, Wynn PC. The influence of protein fractions from bovine colostrum digested in vivo and in vitro on human intestinal epithelial cell proliferation. *Journal of Dairy Research*. 2014;81(1):73–81. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000654>
20. Birkemo GA, O’Sullivan O, Ross RP, Hill C. Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;106(1):233–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03996.x>
21. Sears KT, Tennant SM, Reymann MK, Simon R, Konstantopoulos N, Blackwelder WC, *et al.* Bioactive immune components of anti-diarrheagenic enterotoxigenic *Escherichia coli* hyperimmune bovine colostrum products. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2017;24(8). <https://doi.org/10.1128/CVI.00186-16>
22. Anderson RC, Dalziel JE, Haggarty NW, Dunstan KE, Gopal PK, Roy NC. *Short communication*: Processed bovine colostrum milk protein concentrate increases epithelial barrier integrity of Caco-2 cell layers. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(12):10772–10778. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16951>
23. Playford RJ, Weiser MJ, Marchbank T. Methods to improve efficacy of orally administered bioactive peptides using bovine colostrum as an exemplar. *PLoS ONE*. 2021;16(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253422>