

Определение содержания иммуноглобулина G в молозиве и продукте на его основе

Дарья Николаевна Калугина, канд. техн. наук, научный сотрудник

Елена Анатольевна Юрова, канд. техн. наук, старший научный сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности

E-mail: e_yurova@vniimi.org

Исследовано содержание иммуноглобулина G (IgG) в сухом молозиве и БАД на его основе методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли (ДСН-ПААГ). Белковый профиль исследуемых образцов был эквивалентным и включал лактоферрин, альбумин сыворотки крови, казеиновые фракции — α_{s1} - и α_{s2} -казеины, β -казеин, α -лактальбумин, β -лактоглобулин. Метод ДСН-ПААГ-электрофореза позволяет определить не только IgG, но и его «тяжелую» форму, молекулярная масса которой в молозиве составила 55,23 кДа, БАД — 54,92 кДа. Общее содержание IgG в молозиве — 296,35 кДа, БАД — 305,31 кДа. Соотношения сывороточных белков и казеиновых в молозиве и БАД (55:45 и 51:49 соответственно) подтверждают перспективность применения молозива в качестве компонента для производства продуктов специализированного питания.

Ключевые слова: молозиво, белок, молекулярная масса белков, иммуноглобулин G, ДСН-ПААГ-электрофорез.

Kalugina D.N., Yurova E.A. Determination of the content of immunoglobulin G in colostrum and a product based on it All-Russian Dairy Research Institute

The article presents the results of studies of the content of immunoglobulin G (IgG) in dry colostrum and a biologically active additive based on it by electrophoresis in polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate according to Lamml (SDS-PAGE). Protein profile of the studied samples is equivalent and includes lactoferrin, serum albumin, casein fractions — α_{s1} - and α_{s2} -caseins, β -casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin. SDS-PAGE-electrophoresis method makes it possible to determine not only IgG, but also its «heavy» form, the molecular weight of which in colostrum was 55,23 kDa and in a product based on it — 54,92 kDa. Total content IgG in colostrum was 296,35 kDa and in a product based on it — 305,31 kDa. The ratio of whey proteins to casein proteins in colostrum and dietary supplements was 55:45 and 51:49 respectively, which indicates the possible use of colostrum as a component for the production of specialized nutrition products.

Key words: colostrum, protein, molecular weight of proteins, immunoglobulin G, SDS-PAGE-electrophoresis.

Молозиво — это секрет молочной железы, который образуется в поздний период беременности и потребляется новорожденными в первые часы жизни [1–5]. Оно является ценным продуктом, так как обладает более высокой биологической и питательной ценностью, чем сырое молоко [1, 4, 6]. Молозиво содержит необходимые для молодого организма белки, жиры, углеводы, минеральные вещества, которые стимулируют клеточные и гуморальные системы иммунной защиты, способствующие выживанию и развитию новорожденного [3, 5, 7]. Актуальным направлением является использование молозива в производстве продуктов специализированного питания в качестве биологически активной добавки [2, 5, 6, 8].

Важнейший иммунобиологический показатель качества молозива — концентрация иммуноглобулинов, обеспечивающих формирование пассивного иммунитета и играющих решающую роль в предотвращении инфекционных заболеваний в ранний постнатальный период у новорожденных [1–3, 5, 7]. Молозиво содержит три основных изоформа иммуноглобулинов — IgG, IgA и IgM, а также ряд подклассов IgG [2, 3].

На долю основного компонента молозива крупного рогатого скота — IgG (с подтипами IgG₁ и IgG₂) приходится от 85 до 95 % общей концентрации всех иммуноглобулинов [2, 4, 7]. В молозиве коров преобладает изотип IgG₁, тогда как уровень IgG₂ значительно ниже. Вторым наиболее распространенным иммуноглобулином является IgM. За ним следует IgA, который в основном продуцируется плазматическими клетками молочной железы. Соотношение иммуноглобулинов IgG:IgM:IgA составляет 3:2:1 [1, 2, 4, 6].

Содержание изоформ IgM и IgA в молозиве значительно меньше, чем IgG, и достигает 7 и 5 % от общего количества иммуноглобулинов соответственно [1, 2, 4, 7]. Согласно исследованиям Ю. Н. Федорова и соавторов [2], IgA молозива защищает поверхность слизистой оболочки кишечника новорожденных телят, нейтрализует патогены, препятствуя их прикреплению к поверхности клеток. IgM считается первичным защитным механизмом против септицемии, фиксирует комплемент и является главным компонентом агглютинирующих антител [2, 6, 9].

Поскольку основную часть иммуноглобулинов составляет IgG, то в большинстве случаев количествен-

но оценивают именно его концентрацию. Этот показатель определяет качество белкового состава молозива [1, 2, 5, 7, 9]. Как правило, молозиво имеет высокое качество при содержании IgG ≥ 50 мг/см³ [2, 4, 7, 9]. Концентрация иммуноглобулинов в молозиве динамична и может сильно варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как порода, условия содержания животных, кормление. Однако основным фактором является время после отела. Максимальное количество иммуноглобулинов в молозиве наблюдается в первые 12 ч после отела [1, 2, 4, 7, 9]. По данным различных исследований определены средние концентрации иммуноглобулинов в молозиве коров, включая первые и пятые сутки после отела (табл. 1).

L. W. Gapper, A. Dunn, J. Ahmann, R. Mehra исследовали аналитические методы оценки концентрации IgG [1, 3, 7, 10]. В целом такие методы аналогичны методам, используемым для оценки составных компонентов белка. В первую очередь применяется хроматография, в том числе жидкостная (ЖХ), обращенно-фазовая жидкостная (ОФ-ЖХ), эксклюзивная (ЭХ), ионообменная (ИХХ) и афинная (АХ) [1, 3, 7].

Таблица 1
Основные группы иммуноглобулинов [2, 3, 6–9]

Иммуноглобулин	Молекулярная масса, кДа	Концентрация, мг/см ³	
		Молоко	Молозиво
IgG (в сумме)	146–162	0,15–0,80	32,0–212,0
IgG ₁	146–162	0,30–0,60	20,0–200,0
IgG ₂	146–154	0,06–0,12	3,0–16,0
IgM	900	0,03–0,06	4,0–9,0
IgA	385–430	0,04–0,13	0,5–5,0

К другой группе относятся электрофоретические методы количественного определения иммуноглобулинов: электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ) и капиллярный электрофорез (КЭФ) [3, 7, 10, 12].

Также важная группа методов — иммунные и иммунохимические, основанные на специфическом взаимодействии между антигеном и антителом. К ним относят радиальную иммунодиффузию (РИД), нефелометрию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунологический анализ с латеральным потоком и методы поверхностного плазменного резонанса (ППР) [1, 3, 7, 10].

В отдельных случаях применяют физические методы, основанные на корреляции измеряемого физического параметра (например, плотности, удельного веса, вязкости, твердости и мутности) с концентрацией определяемого компонента. Для этих методов существуют некоторые трудности определения, связанные с многокомпонентностью исследуемых объектов, сложным составом белков, особенно иммуноглобулинов, поэтому их применение всегда эксклюзивно и достаточно редко [7, 10].

Использование молозива как биологической добавки помогает уменьшить вирусные и микробные инфекции, а также может обеспечить улучшенную иммунную активность [7, 8, 12]. Поскольку качество молозива зависит от содержания IgG, необходимы достоверные методы оценки этого показателя. Все разработанные методы имеют определенные сложности с воспроизводимостью результатов. Хроматографические методы не позволяют разделять иммуноглобулины по изотипам, а определяют их общее содержание. Методом капиллярного электрофореза можно разделить иммуноглобулины по изотипам и молекулярной массе, но при этом затруднено их количествен-

ное определение. Несмотря на то что предложено множество прямых и косвенных методов определения IgG, самым распространенным остается ДСН-ПААГ-электрофорез.

Цель исследования — определение содержания IgG в сухом молозиве и продукте на его основе. В качестве объектов исследований использовали сухое молозиво с массовой долей жира 27 % и БАД на основе молозива с массовой долей жира 20 %.

Пробы отбирали и подготавливали для анализа в соответствии с установленными методиками измерений. Содержание белка, сывороточных и казеиновых белков, небелкового азота определяли методом Кьельдаля согласно ГОСТ 34454–2018, ГОСТ 34536–2019, СТБ ISO 17997–1–2012, ГОСТ Р 55246–2012.

Молекулярно-массовое распределение белков и пептидов изучали методом ДСН-ПААГ-электрофореза. Профили белков анализировали в 5 %-ном концентрирующем и 12 %-ном разделяющем геле с помощью системы диск-электрофореза с источником питания PowerPack Power Supply Universal для электрофореза (Bio-Rad Laboratories, США) при напряжении от 10 до 18 мА. В качестве стандарта молекулярной массы использовали массы белков RAV10 в диапазоне от 6,5 до 270 кДа. Гели окрашивали раствором для быстрого окрашивания кумасси синим (Elabscience, США). Изображение по-

лучали с помощью системы визуализации UVP EC3 для анализа изображений гелей (UVP Bioimaging systems, США) и программного обеспечения VisionWorksLS (версия 7.1 RC3.24).

Результаты исследований показали, что молозиво и продукт, разработанный на его основе, содержали высокий уровень белка (табл. 2). Соотношения сывороточных белков и казеиновых в молозиве и БАД составили 55:45 и 51:49 соответственно, что говорит о перспективности применения молозива в качестве компонента для производства продуктов специализированного питания.

На рисунке представлен профиль разделения белков молозива и продукта на его основе с помощью метода ДСН-ПААГ-электрофореза. Белковый профиль исследуемых образцов был эквивалентным и включал лактоферрин, альбумин сыворотки крови (БСА), казеиновые фракции — α_{s1} - и α_{s2} -казеины, β -казеин и белки сывороточной фракции — α -лактальбумин, β -лактоглобулин.

Применяемая методика позволила определить иммуноглобулин G и одну из его форм, а именно «тяжелую». Согласно литературным источникам [7, 11], особенность IgG заключается в том, что они имеют одинаковую базовую молекулярную структуру, состоящую из двух идентичных тяжелых (длинных) и двух легких (коротких) цепей, соединенных дисульфидными связями. Полученные результаты оценивали с учетом особенностей строения иммуноглобулинов и других идентифицированных белковых фракций.

Для расчета содержания белковых фракций применяли программное обеспечение VisionWorksLS, с помощью которого анализировали белковый профиль и рассчитывали молекулярную массу белков (табл. 3). Молекулярная масса казеиновой фракции варьировала от 28,9 до 34,6 кДа. Диапазон молекуляр-

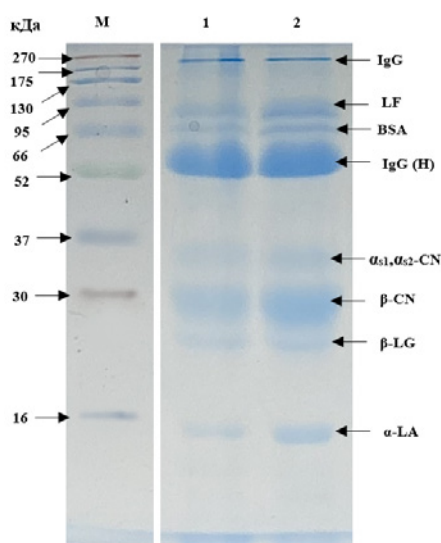
Таблица 2
Белковый состав

Показатель	Молозиво	БАД на основе молозива
Массовая доля белка, %	48,55±0,22	47,33±0,22
Содержание, %: общего азота	7,61±0,012	7,42±0,012
сывороточных белков	26,21±0,15	24,07±0,15
казеиновых белков	22,14±0,10	23,11±0,10
небелкового азота	1,091±0,003	0,782±0,003

Молекулярно-массовое распределение белков

Таблица 3

Белок	Молекулярно-массовое распределение, кДа	
	Молозиво	БАД на основе молозива
Иммуноглобулин G	241,12	250,39
Лактоферрин	85,31	88,91
Альбумин сыворотки крови	68,22	68,22
Иммуноглобулин G («тяжелый»)	55,23	54,92
α_{s1} - и α_{s2} -казеины	34,50	34,63
β -казеин	29,62	28,94
β -лактоглобулин	24,16	23,98
α -лактальбумин	15,66	14,37



ДСН-ПААГ-электрофорез сухого молозива и биологически активной добавки на основе молозива. Дорожки: М – окрашенный маркер молекулярной массы белков в диапазоне от 6,5 до 270 кДа; 1 – сухое молозиво; 2 – БАД на основе молозива. Линии: IgG – иммуноглобулин G; Lf – лактоферрин; BSA – альбумин сыворотки крови (БСА); IgG (H) – иммуноглобулин G, «тяжелая» форма; α_{s1} , α_{s2} -CN – α_{s1} - и α_{s2} -казеины; β -CN – β -казеин; β -LG – β -лактоглобулин; α -LA – α -лактальбумин

ной массы IgG составил от 54,9 до 250,4 кДа, что подтверждает достоверность полученных данных и позволяет идентифицировать белковую фракцию как IgG.

Общее содержание IgG в молозиве составило 296,35 кДа, в продукте на его основе — 305,31 кДа. Этот факт свидетельствует о сохранности иммуноглобулинов после температурной обработки в процессе сушки.

Выводы

• Метод ДСН-ПААГ-электрофореза позволяет определить количественное содержание и молекулярную мас-

су IgG в таких объектах, как молозиво и БАД на его основе.

• Выявлено наличие «тяжелой» формы IgG, молекулярная масса которой составила 55,23 кДа в молозиве и 54,92 кДа в БАД.

• Сухое молозиво отличается повышенным содержанием белка. Соотношение сывороточных белков и белков казеиновой фракции в молозиве и коровьем молоке различается. Содержание сывороточных белков в молозиве в 2 раза выше.

• Соотношение сывороточных белков и казеиновых в молозиве и БАД (55:45 и 51:49 соответственно) делает их перспективными компонентами для производства продуктов специализированного питания, в том числе сухих молочных смесей для питания детей раннего возраста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Dunn, A.** Evaluation of factors associated with immunoglobulin G, fat, protein, and lactose concentrations in bovine colostrum and colostrum management practices in grassland-based dairy systems in Northern Ireland/A. Dunn [et al.]// *Journal of Dairy Science*. 2017. V. 100. Is. 3. P. 2068–2079. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11724>
2. **Федоров, Ю. Н.** Иммунобиологическая характеристика, состав и свойства молозива крупного рогатого скота/Ю. Н. Федоров [и др.]// *Инновационные подходы к развитию устойчивых аграрно-пищевых систем: материалы Международной научно-практической конференции под общей редакцией академика РАН И. Ф. Горлова*. — Волгоград: ООО «СФЕРА», 2022. С. 115–123.
3. **Ahmann, J.** Determining Immunoglobulin Content of Bovine Colostrum and Factors Affecting the Outcome: A Review/J. Ahmann,

J. Steinhoff-Wagner, W. Büscher// *Animals*. 2021. V. 11 (12). P. 3587. <https://doi.org/10.3390/ani1123587>

4. **Леонтьева, С. А.** Молозиво коров — перспективное сырье для производства пищевых продуктов/С. А. Леонтьева [и др.]// *Food industry*. 2021. Т. 6. № 2. С. 23–33. DOI 10.29141/2500-1922-2021-6-2-3

5. **Головач, Т. Н.** Нативное и ферментированное коровье молозиво как компонент продуктов функционального назначения/Т. Н. Головач [и др.]// *Труды БГУ*. 2014. Т. 9. Ч. 2. С. 224–235.

6. **Атюнина, Ю. В.** Потребительские свойства молозива и перспективы его использования в производстве специализированных продуктов/Ю. В. Атюнина, В. В. Машков, З. В. Волокитина// *Вестник науки*. 2019. Т. 1. № 4 (13). С. 4–8.

7. **Gapper, L. W.** Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review/L. W. Gapper, D. E. J. Copestake, D. E. Otter// *Journal of AOAC International*. 2007. V. 89. № 5. P. 93–109. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1391-z>

8. **Galdino, A. B. da S.** Bovine colostrum: benefits for the human respiratory system and potential contributions for clinical management of COVID-19/A. B. da S. Galdino [et al.]// *Food and Agricultural Immunology*. 2021. V. 32 (1). P. 143–162. <https://doi.org/10.1080/09540105.2021.1892594>

9. **Arslan, A.** Bovine Colostrum and Its Potential for Human Health and Nutrition/A. Arslan [et al.]// *Frontiers in Nutrition*. 2021. V. 8. P. 651721. DOI: 10.3389/fnut.2021.651721

10. **Mehra, R.** Nutritional attributes of bovine colostrum components in human health and disease: A comprehensive review/R. Mehra [et al.]// *Food Bioscience*. 2021. V. 40. P. 100907. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100907>

11. **Hurley, W. L.** Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk/W. L. Hurley, P. K. Theil// *Nutrients*. 2011. V. 3. P. 442–474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>

12. **Бигаева, А. В.** Использование электрофореза в полиакриламидном геле в анализе белковых молочных комплексов/А. В. Бигаева// *Сборник тезисов X Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых под общей редакцией А. Ю. Просекова*. — Кемерово, 2022. С. 186–188.