

Идентификация кобыльего молока и его смеси с коровьим молоком методом ВЭЖХ-анализа

В. П. Курченко^{1,*}, Е. С. Симоненко², Н. В. Сушинская¹,
Т. Н. Головач¹, А. Н. Петров³, С. В. Симоненко²



¹ Белорусский государственный университет^{ROR}, Минск, Республика Беларусь

² Научно-исследовательский институт детского питания, Истра, Россия

³ Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования^{ROR}, Видное, Россия

Дата поступления в редакцию: 14.04.2021

Дата принятия в печать: 15.05.2021



*e-mail: Kurchenko@tut.by

© В. П. Курченко, Е. С. Симоненко, Н. В. Сушинская,
Т. Н. Головач, А. Н. Петров, С. В. Симоненко, 2021

Аннотация.

Введение. Кобылье молоко является ценным пищевым продуктом, а также обладает лечебными свойствами. При создании новых функциональных продуктов питания используется смесь кобыльего и коровьего молока. Актуальность разработки методов идентификации кобыльего, коровьего молока и их смеси связано с необходимостью предотвращения их фальсификации.

Объекты и методы исследования. Сыворотки кобыльего, коровьего молока и их смеси. Белковый состав сывороток анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа Agilent 1200 с диодно-матричным Agilent G1315C детектором. Разделение компонентов проб проводили на колонке Machinery Nagel C18 4.6×250, 5 мкм.

Результаты и их обсуждение. Для анализа сывороточных белков кобыльего и коровьего молока была оптимизирована методика ВЭЖХ-анализа. Эффективное разделение сывороточных белков достигается за счет выбранного времени проведения хроматографии (60 мин), использовании линейного градиента концентрации ацетонитрила (от 0 до 50 %) и объема пробы для инъекции (20 мкл). Белком-маркером видовой принадлежности кобыльего и коровьего молока является α-лактоальбумин. Время удержания кобыльего α-лактоальбумина составляло 45,16 мин, коровьего – 40,09 мин. Различия времени удержания α-лактоальбуминов связано с наличием в первичной структуре кобыльего и коровьего молока 33 замен аминокислот. По площадям пиков α-лактоальбумина рассчитали содержание в кобыльем молоке количество добавленного коровьего молока и процент разведения кобыльего молока коровьим.

Выводы. Использование ВЭЖХ-анализа сывороточных белков дает возможность определить в 1 литре кобыльего молока до 50 мл добавленного коровьего молока.

Ключевые слова. Молоко, сывороточные белки, ВЭЖХ-анализ, сыворотка, белок

Для цитирования: Идентификация кобыльего молока и его смеси с коровьим молоком методом ВЭЖХ-анализа / В. П. Курченко [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2021. Т. 51. № 2. С. 402–412. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-402-412>.

Original article

Available online at <http://fptt.ru/eng>

HPLC Identification of Mare's Milk and Its Mix with Cow's Milk

Vladimir P. Kurchenko^{1,*}, Elena S. Simonenko², Natalia V. Sushynskaya¹,
Tatsiana N. Halavach¹, Andrey N. Petrov³, Sergey V. Simonenko²

¹ Belarusian State University^{ROR}, Minsk, Republic of Belarus

² Research Institute of Baby Food, Istra, Russia

³ All-Russian Scientific Research Institute of Canning Technology^{ROR}, Vidnoe, Russia

Received: April 14, 2021

Accepted: May 15, 2021



*e-mail: Kurchenko@tut.by

© V.P. Kurchenko, E.S. Simonenko, N.V. Sushynskaya,
T.N. Halavach, A.N. Petrov, S.V. Simonenko, 2021

Abstract.

Introduction. Mare's milk is a valuable food product with medicinal properties. In combination with cow's milk, it is used to create new functional foods. Efficient identification of mare's milk, cow's milk, and their mixes prevent falsification.

Study objects and methods. The protein composition of mare's and cow's milk whey and their mixes was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using an Agilent 1200 chromatograph with an Agilent G1315C diode array detector. Separation was performed using a column Machinery Nagel C 18 4.6×250, 5 μm.

Results and discussion. The standard HPLC method was optimized to analyse whey proteins in the milk samples. The separation of whey proteins included the following optimal parameters: chromatography time = 60 min, linear gradient of acetonitrile concentration = 0–50%, and sample volume for injection = 20 μl. Alpha-lactoalbumin proved to be the protein of mare's milk and cow's milk. The retention time of mare's α-lactoalbumin was 45.16 min, and that of cow's milk – 40.09 min. The differences in the retention time of α-lactoalbumin were associated with the presence of 33 amino acid substitutions in the primary structure of both milks. The areas of α-lactoalbumin peaks were used to calculate the amount of cow's milk added to mare's milk and the related percentage.

Conclusion. A HPLC analysis of whey proteins made it possible to determine up to 50 mL of added cow's milk in 1 liter of mare's milk.

Keywords. Milk, whey proteins, HPLC analysis, whey, protein

For citation: Kurchenko VP, Simonenko ES, Sushynskaya NV, Halavach TN, Petrov AN, Simonenko SV. HPLC Identification of Mare's Milk and Its Mix with Cow's Milk. Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(2):402–412. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-402-412>.

Введение

Кобылье молоко является ценным пищевым продуктом, т. к. химические вещества, входящие в его состав, близки к женскому молоку [1–7]. Отличительной особенностью кобыльего молока является его высокая биологическая ценность и усвояемость [8, 9]. Оно успешно используется для повышения иммунитета и при лечении различных заболеваний: хронического гепатита, туберкулеза и др. [8, 10–15]. Систематическое потребление кобыльего молока в течение 4 месяцев больными экземой приводит к уменьшению зуда и гиперемии у 30–55 % пациентов. Это связано с влиянием кобыльего молока на увеличение бифидобактерий микрофлоры кишечника. Регулярное использование кобыльего молока в питании больных с воспалительными заболеваниями кишечника приводит к уменьшению болевого синдрома [10, 16, 17]. Терапевтические эффекты кобыльего молока в гастроэнтерологии могут быть связаны с наличием в его составе лактоферрина, лизоцима и др. белков (табл. 1). Эти белки обладают бактерицидными свойствами и защищают организм от патогенных микроорганизмов, способствуя росту бифидобактерий. Следует отметить положительную роль лактоферрина в воспалительных процессах и стимулировании гуморального иммунитета [11, 18]. Благодаря наличию в кобыльем молоке большого количества сывороточных белков оно, как и материнское, относится к альбуминовому

типу [2]. Из-за сезонности получения кобыльего молока разработаны технологии его сушки с сохранением биологических свойств [19–21].

Кобылье молоко находит все более широкое применение при разработке функциональных продуктов питания, обладающих лечебно-профилактическим действием. Таким продуктом является кумыс, который широко используется при лечении различных заболеваний. Его отличает низкое содержание белка, что снижает его питательные свойства.

В новых формулах пищевых продуктов используется смесь кобыльего и коровьего молока. Обогащение кобыльего молока коровьим при производстве кумыса приводит к изменению его реологических свойств. Это связано с тем, что основным белком коровьего молока является казеин, который составляет 78–85 %. Он представлен рядом форм, которые различаются по содержанию: 43–55 % составляет группа α-казеинов, 24–35 % – β-казеин, 8–15 % – κ-казеин [22–24].

Первичная структура α_s1-, α_s2-, β- и κ-казеина имеет невысокую гомологию [22, 23]. Изoeлектрические точки всех форм казеинов лежат в области pH 4,6–4,7 [25]. Функциональные свойства компонентов казеиновой фракции молока также различны. α_s1-, α_s2- и β-казеин относятся к фосфопротеидам и осаждаются в присутствии кальция в отличие от κ-казеина. Однако α_s1-, α_s2-, β- и κ-казеин имеют общие уникальные свойства, выделяющие их среди других белков молока. Это фосфорилированные белки

Таблица 1. Состав и содержание сывороточных белков в кобыльем, коровьем и женском молоке [2]

Table 1. Composition and content of whey proteins in mare's milk, cow's milk, and human milk [2]

Состав сывороточных белков	Значение	Кобылье молоко	Коровье молоко	Женское молоко
Содержание сывороточных белков в молоке, %	Среднее	38,79	17,54	53,52
β -лактоглобулин	Среднее (мин–макс)	30,75 25,3–36,3	53,59 52,9–53,6	0
α -лактальбумин	Среднее (мин–макс)	28,55 27,5–29,7	20,10 18,4–20,1	42,37 30,3–45,4
Иммуноглобулины	Среднее (мин–макс)	19,77 18,7–20,9	11,73 10,1–11,7	18,15 15,1–19,7
Альбумин сыворотки	Среднее (мин–макс)	4,45 4,4–4,5	6,20 5,5–76,7	7,56 4,5–9,1
Лактоферрин	Среднее	9,89	8,38	30,26
Лизоцим	Среднее	6,59	–	1,66

с относительно высоким содержанием пролина (10 Про в α_s1 -казеине и 35 Про в β -казеине), молекулярной массой 19–25 кДа и невыраженной третичной структурой, лишенной дисульфидных мостиков [22]. к-казеин, в отличие от α - и β -казеинов, является кальций устойчивой фракцией белков молока, т. к. содержит только один фосфосериновый остаток. В связи с этим к-казеин практически не связывает ионы кальция и не теряет растворимости в их присутствии. Также растворимость к-казеина связана с наличием в его структуре галактозы, N-ацетилгалактозамина и N-ацетилнейраминовой кислоты. Они содержат значительное количество гидроксильных групп, что обеспечивает молекуле белка высокий отрицательный заряд. В комплексе с α - и β -казеинами к-казеин образует стабильные мицеллы [22].

В мицелле казеины распределены нерегулярно: выделяют центральную гидрофобную и периферическую гидрофильную области, в которой располагаются основные сайты фосфорилирования. Гидрофильная область обуславливает связывание с кальцием и транспортную функцию белков.

Располагаясь на поверхности мицелл, к-казеин выступает в виде защитного коллоида по отношению к кальций неустойчивым белкам [26]. Четвертичная структура казеинов представляет собой непрочно связанные друг с другом мицеллы. Мицелла казеина состоит из субмицелл диаметром 10–20 нм, которые состоят из α_s1 -, α_s2 -, β - и к-казеинов в соотношении 3:1:3:1. Субмицеллы связываются друг с другом за счет кальций-фосфатных мостиков. Они формируются таким образом, чтобы гидрофобные участки располагались в центральной части мицеллы, а гидрофильные области к-казеина и фосфатные группы α_s1 -, α_s2 - и β -казеинов – на поверхности, создавая отрицательный заряд мицелл. В присутствии кальция, цитратов и фосфатов фракции казеинов самоассоциируются и,

взаимодействуя друг с другом, образуют ассоциаты различных размеров [26]. Исследования показали, что мицеллы казеина коровьего молока являются высокоорганизованными структурными единицами сферической формы диаметром от 40 до 300 нм.

Устойчивость мицелл казеинов зависит от pH, ионной силы и температуры. В процессе ферментации кисломолочного продукта изменяется pH в кислую область. При этом ионы водорода связываются с ионизированными COOH-группами казеинов, что ведет к уменьшению числа отрицательных зарядов на поверхности белковых частиц. Это приведет к нарушению гидратной оболочки мицелл и снижению растворимости белка. Когда величина pH становится близкой к изоэлектрической точке казеинов, то его мицеллы коагулируют и образуют сгусток молока [23, 26]. Реологические свойства такого кисломолочного продукта из коровьего молока отличаются от кумыса, изготовленного из кобыльего молока. В кобыльем молоке содержание казеина значительно меньше, чем в коровьем, и составляет 50 %. Мицеллы казеина содержат β -казеин. Доля к-казеина в кобыльем молоке меньше, чем в коровьем. Различия состава казеинов в коровьем и кобыльем молоке ведет к различиям в структурной организации их мицелл. В результате ферментации кобыльего молока коагуляция казеинов менее выражена, чем в коровьем. При добавлении к кобыльему молоку различного количества коровьего процесс ферментации приведет к образованию плотного сгустка полученного кисломолочного продукта и улучшению его реологических свойств.

Возрастающая потребность в кобыльем молоке при создании новых функциональных продуктов приводит к его фальсификации путем добавления большого количества доступного коровьего молока. Это существенно снижает качество и безопасность

таких продуктов. В связи с этим актуальной задачей является разработка метода идентификации кобыльего молока и его смеси с коровьим. Этот метод может найти применение при идентификации сухого кобыльего молока и кисломолочных продуктов из него. В настоящее время отсутствуют методы идентификации кобыльего молока и его смеси с коровьим.

Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволяет идентифицировать видовую принадлежность молока по белкам, входящим в его состав. Анализ может быть проведен по сывороточным белкам молока [27, 28]. Белки сыворотки кобыльего и коровьего молока различаются по аминокислотному составу. В связи с этим они имеют различное сродство к гидрофобной матрице C18, которой заполнена хроматографическая колонка. Разделение белков сыворотки молока и оценка их количественного содержания позволит идентифицировать процент разведения кобыльего молока коровьим. Для использования ВЭЖХ-анализа кобыльего и коровьего молока необходимо оптимизировать время разделения белков и условия использования линейного градиента концентрации ацетонитрила.

Целью работы являлась разработка методов идентификации кобыльего, коровьего молока и их смеси.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили сыворотки кобыльего, коровьего молока и их смесей. В работе использовали 3 образца кобыльего и коровьего питьевого молока, а также 2 образца сухого кобыльего молока (KZ.3510317.24.01788) ТОО «ЕвразияИнвест Ltd» (Республика Казахстан).

Подготовка проб сыворотки кобыльего, коровьего молока и их смесей для проведения анализа. Кобылье и коровье молоко содержит большое количество казеина, который затрудняет использование электрофоретических и хроматографических методов их идентификации. Для определения видовой принадлежности кобыльего, коровьего молока и их смесей использована сыворотка, которую получали путем кислотной коагуляции казеина. Свежее цельное кобылье или коровье молоко охлаждали до 5 °С и центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 30 мин. Отделяли верхнюю фракцию липидов. Обезжиренное молоко фильтровали через капроновый фильтр. В обезжиренное молоко, которое нагревали в термостате Precitherm PFV при температуре 37 °С, постепенно вносили 50 % раствор HCl до достижения pH 4,5. При этом значении pH происходит коагуляция казеина. Через 30 мин свернувшееся молоко охлаждали до комнатной температуры и отделяли осадок казеина центрифугированием при 5 тыс. об/мин в течение

10 мин. Внесением к полученной сыворотке 1 М раствора NaOH доводили pH до 6,5. Полученные пробы хранили при 4 °С. Для ВЭЖХ-анализа использовались полученные сыворотки кобыльего и коровьего молока и их смеси в соотношениях 90:10, 75:25, 60:40, 45:55, 30:70 и 15:85 % соответственно.

Методика ВЭЖХ анализа сывороток кобыльего, коровьего молока и их смесей. Белковый состав сывороток кобыльего, коровьего молока и их смесей анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа Agilent 1200 с диодно-матричным Agilent G1315C детектором. Разделение компонентов проб проводили на колонке Machinery Nagel C18 4.6×250, 5 мкм (США) при температуре 25 °С и скорости элюции 1 мл/мин. Поглощение элюата измеряли при 214 и 280 нм. Объем пробы для инъекции составлял 20 мкл с концентрацией белка, эквивалентной 2 мг/мл. Перед нанесением на колонку все пробы фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Для разделения белков сывороток молока был использован градиентный режим элюирования с изменением содержания ацетонитрила подвижной фазы В от 0 до 50 % в 0,1 % трифторуксусной кислоте. Фаза А – 0,1 % трифторуксусной кислоты в воде. Время хроматографического разделения составляло 60 мин. Количественный анализ хроматограмм с диодно-матричным детектором проводили с использованием компьютерного обеспечения Agilent Technologies Inc. (США) [27, 29]. Измерения произведены в трех независимых опытах.

Результаты и их обсуждение

Пригодными методами для идентификации видовой принадлежности молока различных видов сельскохозяйственных животных являются методы разделения белков молока различными электрофоретическими методами и высокоэффективной жидкостной хроматографией.

В кобыльем и коровьем молоке существуют значительные различия в содержании сывороточных белков: β-лактоглобулина (β-лг), α-лактоальбумина (α-ла) и сывороточного альбумина (табл. 1) Для идентификации видовой принадлежности молока различных видов копытных животных удобно использовать сывороточные белки. Благодаря межвидовым различиям в первичной структуре β-лг, α-ла и сывороточного альбумина их физико-химические свойства будут существенно различаться [27–30].

Несмотря на различие в первичной, вторичной и третичной структуре белков молока различных видов копытных животных, они имеют близкие молекулярные массы. Для идентификации белковых соединений различного происхождения широко используется метод их электрофоретического разделения в

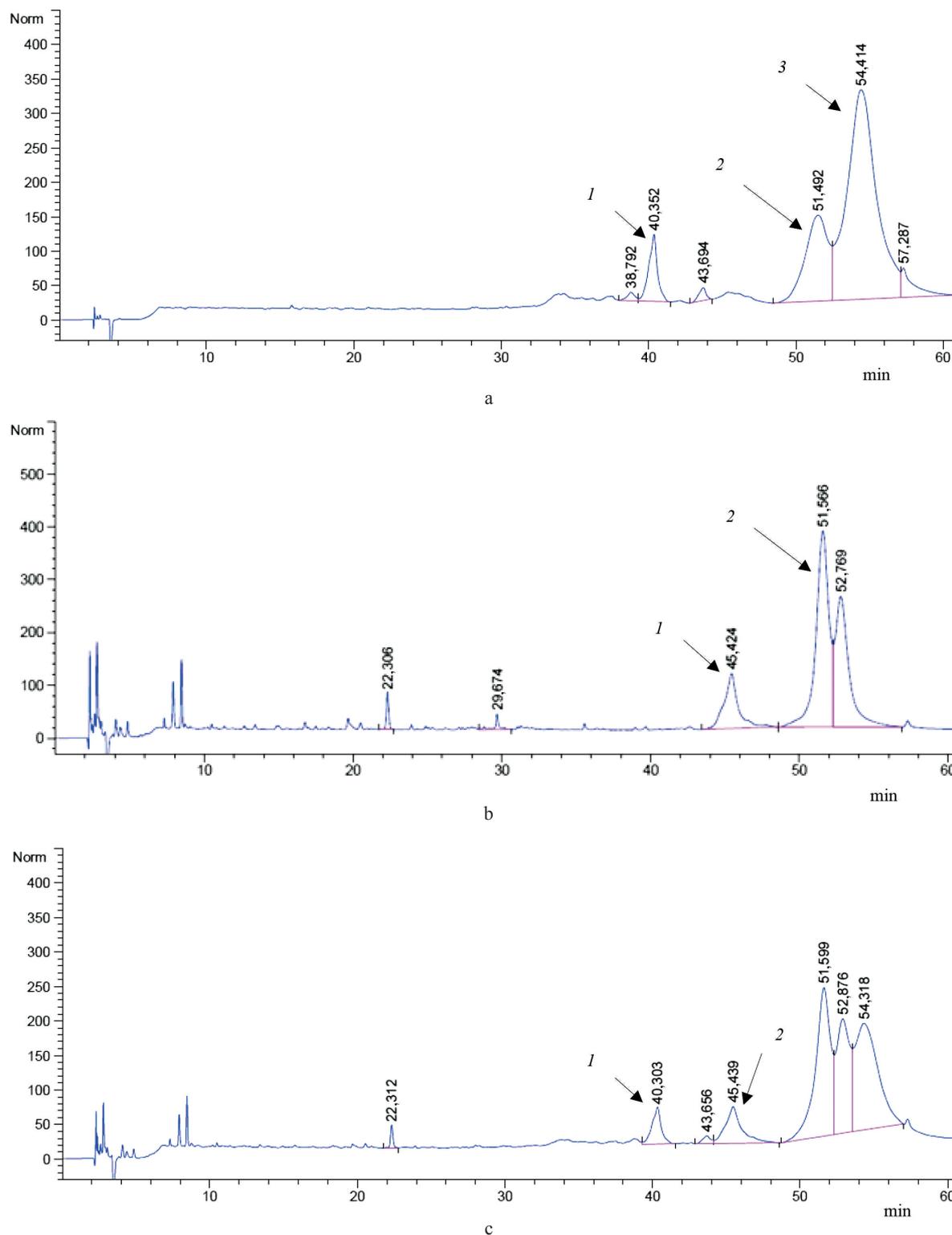


Рисунок 1. Хроматографический профиль ВЭЖХ анализа белков сыворотки:
 а – коровьего молока (1 – α -лактоальбумин, 2 – А форма β -лактоглобулина, 3 – Б форма β -лактоглобулина);
 б – кобыльего молока (1 – α -лактоальбумин, 2 – β -лактоглобулина); с – смеси кобыльего и коровьего молока при их соотношении 45:55 % (1 – α -лактоальбумин кобыльего молока 2 – α -лактоальбумин коровьего молока) при 214 нм

Figure 1. HPLC analysis of whey proteins: a – cow's milk (1 – α -lactoalbumin, 2 – A form of β -lactoglobulin, 3 – B form of β -lactoglobulin); b – mare's milk (1 – α -lactoalbumin, 2 – β -lactoglobulin); c – mix of mare's and cow's milks at a ratio of 45:55% (1 – α -lactoalbumin of mare's milk 2 – α -lactoalbumin of cow's milk) at 214 nm

Таблица 2. Время удержания на хроматографической колонке и площадь пиков белков сыворотки кобыльего и коровьего молока и их смеси в ВЭЖХ-анализе

Table 2. Retention time on the chromatographic column and the area of the peaks of proteins in the whey samples according to HPLC analysis

Сывороточные белки	Показатели ВЭЖХ-анализа	Сыворотка коровьего молока	Сыворотка кобыльего молока	Смесь сывороток кобыльего и коровьего молока, 45:55 %
α-лактоальбумин	Время удержания, мин	40,352	45,424	40,303 45,439
	Площадь пика, %	6,2980	14,629	4,642 8,187
β-лактоглобулин	Время удержания, мин, А форма Б форма	51,492 54,414	51,566	
	Площадь пика, % А форма Б форма	21,102 66,620	48,417	

полиакриламидном геле. В результате денатурации белков додецилсульфатом натрия они различаются только по их молекулярной массе и имеют близкие заряды. Ранее экспериментально показано, что метод электрофоретического разделения денатурированных белков козьего, коровьего и человеческого молока не позволяет определить их видовую принадлежность [27].

Использование ВЭЖХ для разделения белков сыворотки кобыльего, коровьего молока и их смеси основано на значительных отличиях их первичной структуры. Замена аминокислот в первичной структуре белков сывороток кобыльего и коровьего молока приводит к различиям в их физико-химических свойствах, что позволяет оптимизировать процесс их разделения в ВЭЖХ-анализе. Для оптимизации разделения сывороточных белков было подобрано время проведения хроматографии (60 мин), использован линейный градиент концентрации ацетонитрила (от 0 до 50 %) и объем пробы для инъекции (20 мкл).

На рисунках 1–3 представлены результаты оптимизированного ВЭЖХ анализа нативных белков сывороток кобыльего и коровьего молока и их смеси. Из полученных хроматограмм рассчитано время удержания белков и площади их пиков, которые представлены в таблице 2.

Анализ результатов разделения белков сыворотки коровьего молока показал, что содержание α-ла и β-лг соответствует ранним полученным результатам, представленными в таблице 1 [2]. Время удержания β-лг коровьего молока А и Б форм различается (рис. 1а, пики 2 и 3). С наибольшей частотой встречаются генетические варианты β-лг А и В с молекулярной массой 18 362 Да и 18 276 Да соответственно. Отличия в аминокислотных последовательностях заключается заменой Gly→Asp в позиции 64 и Ala→Val в позиции 118

для вариантов А и В соответственно. Первичная структура β-лг представлена цепью из 162 аминокислот с 5 цистеиновыми остатками, четыре из которых образуют дисульфидные мостики (Cys66–Cys160 и Cys106–Cys119) с пятым свободным тиолом (Cys121). Вторичная структура белка содержит β-складчатые слои (43 %), α-спирали (10 %) и неорганизованные структуры (47 %), включая β-петли [22, 29, 31, 32]. В кобыльем молоке β-лг представлен одной формой и время его удержания на хроматографической колонке совпадает с временем удержанием А формы коровьего β-лг (рис. 1а пик 2, 1б пик 2). Это свидетельствует о сходстве их физико-химических свойств и первичной структуры.

Это обстоятельство не позволяет использовать сывороточный β-лг в качестве маркера кобыльего молока. В оптимизированных условиях проведения ВЭЖХ-анализа удалось добиться значительного различия времени удержания α-ла коровьего и кобыльего молока, которое составило 40,35 и 45,24 минуты соответственно (рис. 1а пик 1, 1б пик 1). Этот сывороточный белок может быть использован в качестве маркера при идентификации кобыльего молока и его смеси с коровьим.

Лактоальбумин – второй по значимости глобулярный белок сывороточной фракции кобыльего и коровьего молока (табл. 1). В отличие от β-лг α-ла присутствует в женском молоке. Молекулярная масса мономера α-ла коровьего молока составляет 14 178 Да, изоэлектрическая точка – рI 4,6. В белке не обнаружены свободные сульфгидрильные группы, но выявлены четыре дисульфидных мостика. Они расположены в аминокислотных позициях 6 и 120, 28 и 111, 61 и 77, 73 и 91 и ограничивают гибкость структуры α-ла в определенных условиях. Лактоальбумин содержит несколько участков с регулярной вторичной структурой: α-спирали (40 %), 310-спирали (20 %),

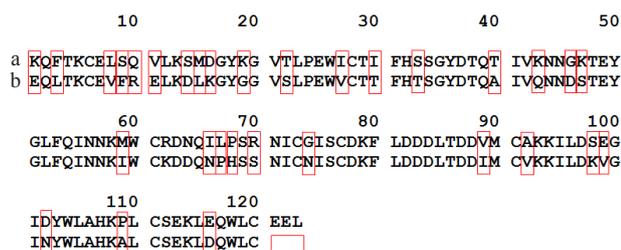


Рисунок 2. Первичная структура кобыльего (а) и коровьего (b) α-лактоальбумина [36]

Figure 2. Primary structure of mare's (a) and cow's (b) α-lactoalbumin [36]

β-структуры (6 %) и значительное количество (44 %) неорганизованных участков [22]. α-спираль является наиболее распространенной вторичной структурой белков и характеризуется плотными витками вокруг длинной оси молекулы и стабилизированными водородными связями между Н и О пептидных групп. 3₁₀-спираль очень «тугая», имеющая в сечении форму треугольника. В образовании β-складчатых структур преобладают обычно глицин и аланин.

Лактоальбумин проявляет двойную функцию: связывает β-1,4-галактозилтрансферазу с образованием регуляторной субъединицы для синтеза лактозы. Кроме того, он способен вызывать апоптоз клеток. Белок представляет собой металлопротеин, связанный с кальцием, который необходим для создания складчатости и структурной стабильности [33, 34]. Он может существовать в димерной форме с молекулярной массой 28 кДа, которая индуцирует гибель клеток, в то время как мономерный α-лактоальбумин 14 кДа неактивен [34, 35].

В процессе хроматографии время удержания α-ла кобыльего и коровьего молока связано со значительными различиями в их первичной и вторичной структуре. Сравнительный анализ первичной структуры кобыльего и коровьего α-ла показывает наличие 33 замен аминокислот (рис. 2) [36]. Такое большое количество замен аминокислот в первичной структуре лактоальбуминов приводит к изменению их вторичной структуры. В связи с этим они имеют различное сродство к гидрофобному сорбенту колонки Machinery Nagel C18, которая использовалась для разделения белков сыворотки молока. Вследствие значительных отличий первичной структуры сывороточных α-ла и различий в ВЭЖХ-анализе этот белок является белком-маркером видовой принадлежности кобыльего, коровьего молока и их смеси.

По площадям пиков хроматограмм белков сыворотки кобыльего, коровьего молока и их смеси в соотношениях 90:10, 75:25, 60:40, 45:55, 30:70 и 15:85 % соответственно дана оценка содержания α-ла в

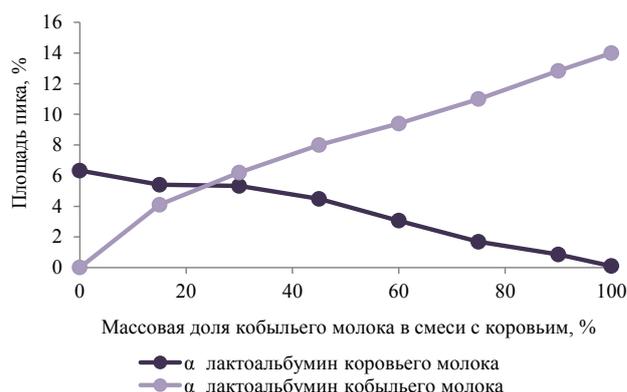


Рисунок 3. Зависимость содержания α-лактоальбумина в сыворотке кобыльего молока при добавлении в нее сыворотки коровьего молока (инъекция 20 мкл сыворотки в ВЭЖХ-анализе)

Figure 3. Effect of cow's milk whey on α-lactoalbumin content in mare's milk whey (injection of 20 μl of whey during HPLC analysis)

исследованных образцах. На рисунке 3 по результатам использования ВЭЖХ-анализа показано содержание α-ла в сыворотках кобыльего молока в зависимости от ее разведения сывороткой коровьего молока.

При оценке содержания α-ла в сыворотке кобыльего молока и ее смеси с сывороткой коровьего можно определить процент разведения кобыльего молока коровьим. Предложенная методика позволяет определить 10 % добавленного коровьего молока к кобыльему. Для понижения нижнего предела определения α-ла коровьего молока в смеси с кобыльем можно использовать для инъекции не 20 мкл сыворотки, а 40 мкл образца. Это позволит определить минимум 5 % добавленного коровьего молока. Методика может быть использована для идентификации видовой принадлежности кобыльего молока, сухого кобыльего молока и кисломолочных продуктов из него.

Выводы

По результатам проведенных исследований показана возможность использования ВЭЖХ для идентификации видовой принадлежности кобыльего молока и его смеси с коровьим молоком. Для анализа используются молочные сыворотки указанных объектов исследования. Белками-маркерами коровьего и кобыльего молока в ВЭЖХ-анализе являются α-лактоальбумины. При использовании линейного градиента концентрации ацетонитрила время удержания кобыльего α-лактоальбумина составляет 45,16 мин, коровьего – 40,09 мин. Показано, что в первичной структуре кобыльего α-ла имеется 27,5 % замен аминокислот по сравнению с первичной

структурой коровьего α -ла. Эти замены привели к изменению физико-химических свойств и уменьшению гидрофобности кобыльего α -ла. Благодаря этому явлению уменьшилось время удержания этого белка на используемом гидрофобном сорбенте в ВЭЖХ-анализе. При оценке количественного содержания сывороточного α -лактоальбумина можно определить процент разведения кобыльего молока коровьим. Методика позволяет определить минимум 5 % добавленного коровьего молока к кобыльему.

Предлагаемая методика идентификации видовой принадлежности кобыльего молока имеет большие преимущества, по сравнению с другими методами, т. к. позволяет в течение 1 часа определить состав сывороточных белков кобыльего, коровьего молока и их смеси. Использование этой методики дает возможность определить в 1 литре кобыльего молока до 50 мл добавленного коровьего.

Критерии авторства

В. П. Курченко – руководство проектом, сбор и обобщение материала. Е. С. Симоненко – сбор и обобщение материала, написание раздела статьи по методам исследования. Н. В. Сушинская и

А. Н. Петров – проведение экспериментальных работ по ВЭЖХ-анализу белков сыворотки кобыльего и коровьего молока. Т. Н. Головач – сбор, обобщение материала по свойствам белков кобыльего молока. С. В. Симоненко – руководил проектом, написание введения в статью.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

V.P. Kurchenko supervised the project, collected the data, and analyzed the material. E.S. Simonenko collected the data, analyzed the material, and described the methods. N.V. Sushynskaya and A.N. Petrov performed the HPLC analysis. T.N. Halavach collected and generalized the material on the properties of mare's milk proteins. S.V. Simonenko supervised the project and wrote the introduction.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы

1. Lv J.-P., Wang L.-M. Bioactive components in kefir and koumiss // Bioactive components in milk and dairy products / Y. W. Park editor. Wiley-Blackwell, 2009. P. 251–262. <https://doi.org/10.1002/9780813821504.ch10>.
2. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species / K. Potocnik [et al.] // Mljekarstvo. 2011. Vol. 61. № 2. P. 107–113.
3. Дайырова С. М. Изучение жирно-кислотного состава сухого кобыльего молока // Фармация Казахстана. 2016. Т. 181. № 6. С. 19–21.
4. Якунин А. В., Синявский Ю. А., Ибраимов Ы. С. Оценка пищевой ценности кобыльего молока и кисломолочных продуктов на его основе и возможности их использования в детском питании // Вопросы современной педиатрии. 2017. Т. 16. № 3. С. 235–240. <https://doi.org/10.15690/vsp.v16i3.1734>.
5. Thoroughbred mare's milk exhibits a unique and diverse free oligosaccharide profile / S. Karav [et al.] // FEBS Open Bio. 2018. Vol. 8. № 8. P. 1219–1229. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12460>.
6. Chemical composition and lipid profile of mare colostrum and milk of the quarter horse breed / I. M. L. G. Barreto [et al.] // PLoS ONE. 2020. Vol. 15. № 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238921>.
7. Hill D. R., Newburg D. S. Clinical applications of bioactive milk components // Nutrition Reviews. 2015. Vol. 73. № 7. P. 463–476. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv009>.
8. Mazhitova A., Kulmyrzaev A. Физиологически функциональные компоненты кобыльего молока (обзорная статья) // Журнал технических наук Манас. 2015. Т. 3. № 2. С. 1–8.
9. Mazhitova A. T., Kulmyrzaev A. A. Determination of amino acid profile of mare milk produced in the highlands of the Kyrgyz Republic during the milking season // Journal of Dairy Science. 2016. Vol. 99. № 4. P. 2480–2487. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9717>.
10. Dietetic effects of oral intervention with mare's milk on the Severity Scoring of Atopic Dermatitis, on faecal microbiota and on immunological parameters in patients with atopic dermatitis / C. Foekel [et al.] // International Journal of Food Sciences and Nutrition. 2009. Vol. 60. № 7. P. 41–52. <https://doi.org/10.1080/09637480802249082>.
11. Кобылье молоко в гастроэнтерологии (обзорная статья) / Б. Р. Бимбетов [и др.] // Медицина (Алматы). 2019. Т. 207. № 9. С. 73–78.
12. Production technology, nutritional, and microbiological investigation of traditionally fermented mare milk (Chigee) from Xilin Gol in China / L. Guo [et al.] // Food Science and Nutrition. 2019. Vol. 8. № 1. P. 257–264. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1298>.

13. Comparison of the efficacy of alpha-lactalbumin from equine, bovine, and human milk in the growth of intestinal IEC-6 cells / Xijier [et al.] // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2012. Vol. 76. № 4. P. 843–846. <https://doi.org/10.1271/bbb.110896>.
14. *In vitro* screening of mare's milk antimicrobial effect and antiproliferative activity / A. Guri [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. 2015. Vol. 363. № 2. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv234>.
15. Verhulst L., Kerre S., Goossens A. The unsuspected power of mare's milk // *Contact Dermatitis*. 2016. Vol. 74. № 6. P. 376–377. <https://doi.org/10.1111/cod.12541>.
16. Color stability of fermented mare's milk and a fermented beverage from cow's milk adapted to mare's milk composition / J. Teichert [et al.] // *Foods*. 2020. Vol. 9. № 2. <https://doi.org/10.3390/foods9020217>.
17. A UPLC-Q-TOF-MS-based metabolomics approach for the evaluation of fermented mare's milk to koumiss / Y. Xia [et al.] // *Food Chemistry*. 2020. Vol. 320. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126619>.
18. Ganzorig K., Urashima T., Fukuda K. Exploring potential bioactive peptides in fermented bactrian camel's milk and mare's milk made by mongolian nomads // *Foods*. 2020. Vol. 9. № 12. <https://doi.org/10.3390/foods9121817>.
19. Усупкожоева А. А., Элеманова Р. III. Влияние температурного режима сушки на качественные показатели сухого кобыльего молока // *Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания*. 2017. Т. 20. № 6. С. 39–45.
20. Синявский Ю. А., Сарсембаев Х. С. Разработка и экспериментальная оценка эффективности нового специализированного пищевого продукта на основе сухого кобыльего молока при физической нагрузке // *Вопросы питания*. 2020. Т. 89. № 6. С. 91–103. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10082>.
21. Lactose-riched Mongolian mare's milk improves physical fatigue and exercise performance in mice / Y.-J. Hsu [et al.] // *International Journal of Medical Sciences*. 2021. Vol. 18. № 2. P. 564–574. <https://doi.org/10.7150/ijms.53098>.
22. Horne D. S. Casein micelle structure: models and muddles // *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2006. Vol. 11. № 2–3. P. 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>.
23. Casein micelles and their internal structure / C. G. De Kruif [et al.] // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2012. Vol. 171–172. P. 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002>.
24. Layman D. K., Lonnerdal B., Fernstrom J. D. Applications for α -lactalbumin in human nutrition // *Nutrition Reviews*. 2018. Vol. 76. № 6. P. 444–460. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy004>.
25. Usage of chitosan in dairy products production / I. A. Evdokimov [et al.] // *Foods and Raw Materials*. 2015. Vol. 3. № 2. P. 29–39. <https://doi.org/10.12737/13117>.
26. Nagy K., Varo G., Szalontai B. κ -Casein terminates casein micelle build-up by its “soft” secondary structure // *European Biophysics Journal*. 2012. Vol. 41. № 11. P. 959–968. <https://doi.org/10.1007/s00249-012-0854-0>.
27. Методы идентификации женского, козьего и коровьего молока / С. В. Симоненко [и др.] // *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2009. Т. 4. № 2. С. 256–260.
28. *Short communication*: Caseins and α -lactalbumin content of camel milk (*Camelus dromedarius*) determined by capillary electrophoresis / H. Mohamed [et al.] // *Journal of Dairy Science*. 2020. Vol. 103. № 12. P. 11094–11099. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19122>.
29. Identification and characterization of yak α -lactalbumin and β -lactoglobulin / L. Wang [et al.] // *Journal of Dairy Science*. 2020. Vol. 104. № 3. P. 2520–2528. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18546>.
30. Production of highly purified fractions of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey using high hydrostatic pressure / A. Marciniak [et al.] // *Journal of Dairy Science*. 2020. Vol. 103. № 9. P. 7939–7950. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17817>.
31. Sawyer L., Kontopidis G. The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000. Vol. 1482. № 1–2. P. 136–148. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00160-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00160-6).
32. α -Lactalbumin: Of camels and cows / J. M. Redington [et al.] // *Protein and Peptide Letters*. 2016. Vol. 23. № 12. P. 1072–1080. <https://doi.org/10.2174/0929866523666160517123738>.
33. Permyakov E. A., Berliner L. J. α -Lactalbumin: structure and function // *FEBS Letters*. 2000. Vol. 473. № 3. P. 269–274. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01546-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01546-5).
34. Disorder in milk proteins: α -Lactalbumin. Part B. A multifunctional whey protein acting as an oligomeric molten globular “oil container” in the anti-tumorigenic drugs, lipotides / V. N. Uversky [et al.] // *Current Protein and Peptide Science*. 2016. Vol. 17. № 6. P. 612–628. <https://doi.org/10.2174/1389203717666151203003151>.
35. Dimeric but not monomeric α -lactalbumin potentiates apoptosis by up regulation of ATF3 and reduction of histone deacetylase activity in primary and immortalised cells / J. A. Sharp [et al.] // *Cellular Signalling*. 2017. Vol. 33. P. 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.02.007>.
36. NCBI. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 24.03.2021).

References

1. Lv J-P, Wang L-M. Bioactive components in kefir and koumiss. In: Park YW, editor. Bioactive components in milk and dairy products. Wiley-Blackwell; 2009. pp. 251–262. <https://doi.org/10.1002/9780813821504.ch10>.
2. Potocnik K, Gantner V, Kuterovac K, Cividini A. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo*. 2011;61(2):107–113.
3. Daiyrova SM. Evaluation of the chemical composition of dry mare's milk. *Farmatsiya Kazakhstana [Pharmacy of Kazakhstan]*. 2016;181(6):19–21. (In Russ.).
4. Yakunin AV, Sinyavskiy YuA, Ibraimov YS. Assessment of the nutritional value of mare's milk and fermented mare's milk products and the possibility of their use in baby food. *Current Pediatrics*. 2017;16(3):235–240. (In Russ.). <https://doi.org/10.15690/vsp.v16i3.1734>.
5. Karav S, Salcedo J, Frese SA, Barile D. Thoroughbred mare's milk exhibits a unique and diverse free oligosaccharide profile. *FEBS Open Bio*. 2018;8(8):1219–1229. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12460>.
6. Barreto IMLG, Urbano SA, Oliveira CAA, Macêdo CS, Borba LHF, Chags BME, et al. Chemical composition and lipid profile of mare colostrum and milk of the quarter horse breed. *PLoS ONE*. 2020;15(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238921>.
7. Hill DR, Newburg DS. Clinical applications of bioactive milk components. *Nutrition Reviews*. 2015;73(7):463–476. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv009>.
8. Mazhitova A, Kulmyrzaev A. Review: Physiologically functional components of mare's milk. *MANAS Journal of Engineering*. 2015;3(2):1–8. (In Russ.).
9. Mazhitova AT, Kulmyrzaev AA. Determination of amino acid profile of mare milk produced in the highlands of the Kyrgyz Republic during the milking season. *Journal of Dairy Science*. 2016;99(4):2480–2487. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9717>.
10. Foekel C, Schubert R, Kaatz M, Schmidt I, Bauer A, Hipler U-C, et al. Dietetic effects of oral intervention with mare's milk on the Severity Scoring of Atopic Dermatitis, on faecal microbiota and on immunological parameters in patients with atopic dermatitis. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2009;60(7):41–52. <https://doi.org/10.1080/09637480802249082>.
11. Bimbetov BR, Zhangabylov AK, Benberin VV, Aitbaeva SYe, Bakytzhanuly A, Ospanova LZh. Mare's milk in gastroenterology (review article). *Medicine (Almaty)*. 2019;207(9):73–78. (In Russ.).
12. Guo L, Xu W-L, Li C-D, Ya M, Guo Y-S, Qian J-P, et al. Production technology, nutritional, and microbiological investigation of traditionally fermented mare milk (Chigee) from Xilin Gol in China. *Food Science and Nutrition*. 2019;8(1):257–264. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1298>.
13. Xijier, Mori Y, Fukuoka M, Cairangzhuoma, Inagaki M, Iwamoto S, et al. Comparison of the efficacy of alpha-lactalbumin from equine, bovine, and human milk in the growth of intestinal IEC-6 cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2012;76(4):843–846. <https://doi.org/10.1271/bbb.110896>.
14. Guri A, Paligot M, Crèvecoeur S, Piedboeuf B, Claes J, Daube G, et al. *In vitro* screening of mare's milk antimicrobial effect and antiproliferative activity. *FEMS Microbiology Letters*. 2015;363(2). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv234>.
15. Verhulst L, Kerre S, Goossens A. The unsuspected power of mare's milk. *Contact Dermatitis*. 2016;74(6):376–377. <https://doi.org/10.1111/cod.12541>.
16. Teichert J, Cais-Sokolińska D, Danków R, Pikul J, Chudy S, Bierzuńska P, et al. Color stability of fermented mare's milk and a fermented beverage from cow's milk adapted to mare's milk composition. *Foods*. 2020;9(2). <https://doi.org/10.3390/foods9020217>.
17. Xia Y, Yu J, Miao W, Shuang Q. A UPLC-Q-TOF-MS-based metabolomics approach for the evaluation of fermented mare's milk to koumiss. *Food Chemistry*. 2020;320. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126619>.
18. Ganzorig K, Urashima T, Fukuda K. Exploring potential bioactive peptides in fermented bactrian camel's milk and mare's milk made by mongolian nomads. *Foods*. 2020;9(12). <https://doi.org/10.3390/foods9121817>.
19. Usupkozhoeva AA, Elemanova RSh. The influence of temperature drying mode to quality indicators of dry mare's milk. *Technologies of the Food and Processing Industry of the Agro-Industrial Complex-Healthy Food Products*. 2017;20(6):39–45. (In Russ.).
20. Sinyavskiy YuA, Sarsembayev KhS. The development and experimental evaluation of the effectiveness of a new specialized food based on dried mare's milk during exercise. *Problems of Nutrition*. 2020;89(6):91–103. (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10082>.
21. Hsu Y-J, Jhang W-L, Lee M-C, Bat-Otgon B, Narantungalag E, Huang C-C. Lactose-riched Mongolian mare's milk improves physical fatigue and exercise performance in mice. *International Journal of Medical Sciences*. 2021;18(2):564–574. <https://doi.org/10.7150/ijms.53098>.
22. Horne DS. Casein micelle structure: models and muddles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2006;11(2–3):148–153. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>.

23. De Kruif CG, Huppertz T, Urban VS, Petukhov AV. Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2012;171–172:36–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002>.
24. Layman DK, Lonnerdal B, Fernstrom JD. Applications for α -lactalbumin in human nutrition. *Nutrition Reviews*. 2018;76(6):444–460. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy004>.
25. Evdokimov IA, Alieva LR, Varlamov VP, Kharitonov VD, Butkevich TV, Kurchenko VP. Usage of chitosan in dairy products production. *Foods and Raw Materials*. 2015;3(2):29–39. <https://doi.org/10.12737/13117>.
26. Nagy K, Varo G, Szalontai B. κ -Casein terminates casein micelle build-up by its ‘soft’ secondary structure. *European Biophysics Journal*. 2012;41(11):959–968. <https://doi.org/10.1007/s00249-012-0854-0>.
27. Simonenko SV, Gavrilenko NV, Chervyakovskiy EM, Kurchenko VP. Metody identifikatsii zhenskogo, koz’ego i korov’ego moloka [Methods for identification of human, goat’s, and cow’s milk]. *Proceedings of the Belarusian State University. Series of Physiological, Biochemical and Molecular Biology Sciences*. 2009;4(2):256–260. (In Russ.).
28. Mohamed H, Johansson M, Lundh Å, Nagy P, Kamal-Eldin A. *Short communication*: Caseins and α -lactalbumin content of camel milk (*Camelus dromedarius*) determined by capillary electrophoresis. *Journal of Dairy Science*. 2020;103(12):11094–11099. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19122>.
29. Wang L, Ma Y, Li H, Yang F, Cheng J. Identification and characterization of yak α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*. 2020;104(3):2520–2528. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18546>.
30. Marciniak A, Suwal S, Touhami S, Chamberland J, Pouliot Y, Doyen A. Production of highly purified fractions of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey using high hydrostatic pressure. *Journal of Dairy Science*. 2020;103(9):7939–7950. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17817>.
31. Sawyer L, Kontopidis G. The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000;1482(1–2):136–148. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00160-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00160-6).
32. Redington JM, Breydo L, Almehdar HA, Redwan EM, Uversky VN. α -Lactalbumin: Of camels and cows. *Protein and Peptide Letters*. 2016;23(12):1072–1080. <https://doi.org/10.2174/0929866523666160517123738>.
33. Permyakov EA, Berliner LJ. α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*. 2000;473(3):269–274. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01546-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01546-5).
34. Uversky VN, Permyakov SE, Breydo L, Redwan EM, Almehdar HA, Permyakov EA. Disorder in milk proteins: α -Lactalbumin. Part B. A multifunctional whey protein acting as an oligomeric molten globular “oil container” in the anti-tumorigenic drugs, lipotides. *Current Protein and Peptide Science*. 2016;1(6):612–628. <https://doi.org/10.2174/1389203717666151203003151>.
35. Sharp JA, Brennan AJ, Polekhina G, Ascher DB, Lefevre C, Nicholas KR. Dimeric but not monomeric α -lactalbumin potentiates apoptosis by up regulation of ATF3 and reduction of histone deacetylase activity in primary and immortalised cells. *Cellular Signalling*. 2017;33:86–97. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.02.007>.
36. NCBI [Internet]. [cited 2021 Mar 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.