

А.И. БУДЕВИЧ, Д.М. БОГДАНОВИЧ, Е.В. ПЕТРУШКО,
Н.Л. ЗАРЕМБА

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МОЛОКА
КОЗ-ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА
ТРЕТЬЕГО И ЧЕТВЁРТОГО ГОДА ЛАКТАЦИИ**

*Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству, г. Жодино, Беларусь*

Установлены достоверные ($P < 0,01$; $0,001$) различия по физико-химическим показателям молока между животными-продуцентами лактоферрина человека и нетрансгенными козами третьего и четвертого года лактации.

Ключевые слова: козы-продуценты, лактоферрин, молоко, физико-химические показатели.

A.I. BUDEVICH, D.M. BOGDANOVICH, E.V. PETRUSHKO, N.L. ZAREMBA

**PHYSICAL AND CHEMICAL PARAMETERS OF MILK
OF GOATS PRODUCING RECOMBINANT LACTOFERRIN OF THE THIRD
AND FOURTH YEAR OF LACTATION**

*Research and Production Center of the National Academy of Sciences of Belarus
for Livestock Breeding, Zhodino, Belarus*

Reliable ($P < 0.01$; 0.001) variations in physicochemical parameters of milk were determined between animals producing human lactoferrin and non-transgenic goats of the third and fourth year of lactation.

Key words: producing goats, lactoferrin, milk, physical and chemical parameters.

Введение. Разработки в области молекулярной биологии и геной инженерии позволили развить ряд направлений трансгенеза, способствующих решению важнейших перспективных задач по повышению эффективности агропромышленного производства, разработке инновационной продукции в медицине и фармакологии, пищевой промышленности и парафармацевтике. Получение трансгенных животных в настоящее время является одним из мировых трендов организации производства физиологически активных субстанций человека именно биологического происхождения. Так, созданы овцы, производящие факторы свертывания крови человека VIII [1] и IX [2], коровы с гормоном роста человека [3] и сывороточным альбумином [4], козы, продуцирующие человеческий антитромбин III [5], тканевой активатор плазминогена [6, 7], альфа-фетопротеин человека [8], человеческие моноклональные антитела [9, 10], козы с геном паука-золотопряда

[11], антигеном малярии [12], колониестимулирующим фактором гранулоцитов человека [13] и человеческой бутирилхолинэстеразы [14], а также козы и коровы, продуцирующие с молоком активный рекомбинантный человеческий лактоферрин (рчЛФ; rhLF) [15-18]. Создание в РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» стада трансгенных коз с экспрессией человеческого лактоферрина в молочной железе позволило установить идентичность основных физико-химических характеристик рекомбинантного и природного белка из женского молока [19, 20].

Вместе с тем, интродукция чужеродной ДНК в наследственный аппарат животных с последующим синтезом целевого белка с молоком может оказаться фактором, существенно изменяющим происходящие в организме процессы его жизнедеятельности. Их мониторинг и изучение позволит более целенаправленно работать со стадом, своевременно вносить коррективы в планы размножения животных, находить и учитывать взаимообусловленные признаки, способствующие повышению продукции целевого белка, что в свою очередь будет содействовать эффективному использованию трансгенных животных в технологической цепочке разработки и создания продуктов различного назначения на основе дефицитных и уникальных субстанций человека.

В связи с вышеизложенным, **целью работы** явилось изучение динамики некоторых физико-химических показателей молока коз-продуцентов рекомбинантного лактоферрина третьего и четвертого года лактации.

Материал и методика исследований. Исследования проводились на Биотехнологическом научно-экспериментальном производстве по трансгенезу животных лаборатории воспроизводства, трансплантации эмбрионов и трансгенеза животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» в течение 2018 г.

Молоко, предназначенное для исследований, было получено от здоровых коз-продуцентов лактоферрина человека (опытная группа, n=22), а также от здоровых нетрансгенных коз (контрольная группа, n=20) живой массой 30-40 кг, вымя которых до и после доения подвергалось обработке в соответствии с гигиеническими требованиями. Групп животных формировали по принципу пар-аналогов с последующим содержанием коз в одинаковых условиях и идентичным рационом кормления в течение всего периода исследований.

Отбор образцов из отфильтрованного и тщательно перемешанного молока, полученного с помощью индивидуального передвижного доильного аппарата, проводили два раза в месяц от каждого животного в течение недели после окончания молочивного периода. Образцы по-

мешали в холодильную камеру на срок не менее двух часов для охлаждения до температуры 4 ± 2 °С. Перед началом проведения физико-химических исследований пробы разогревались в водяной бане BWB-30M до температуры 40-50 °С, тщательно перемешивались и охлаждались до 20 °С.

Измерения показателей массовой доли жира (%), массовой доли белка (%), массовой доли лактозы (%) и титруемой кислотности (°T) выполнялись на ультразвуковом анализаторе молока Ekomilkultra (Болгария).

Полученные результаты обработаны с помощью приложения Microsoft Office Excel.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Изменения показателя молочной продуктивности между одновозрастными животными контрольной (nTg) и опытной (Tg) групп в течение исследуемого периода носили однотипный характер (рисунки 1 и 2).

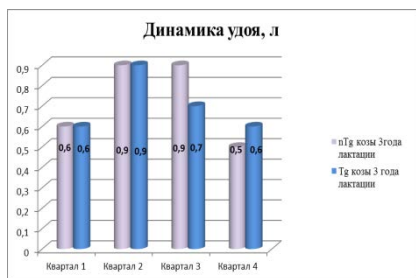


Рисунок 1 – Молочная продуктивность nTg и Tg животных 3 года лактации

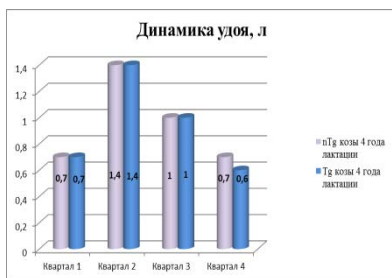


Рисунок 2 – Молочная продуктивность nTg и Tg животных 4 года лактации

Так, в группах nTg и Tg животных третьего года лактации среднегодовой удой составил 0,7 л. У коз четвертого года nTg и Tg групп продуктивность животных повысилась на 30 % и достигла показателя в 1 л.

Следует отметить, что в течение лактации наблюдались поквартальные изменения в продуктивности животных. Так, наивысший удой у коз отмечен во II и III кварталах – 0,9 и 1,2 л, при этом снижение продуктивности произошло в I и IV кварталах – 0,6 и 0,7 л (для животных третьего и четвертого года соответственно).

Полученные данные по физико-химическому составу сырья показали, что в суммарных значениях показатели молока, такие как массовые доли белка и лактозы для Tg животных обеих возрастных групп достоверно ($P < 0,01$; $0,001$), превосходили контрольные группы во все сезоны года. Так, содержание белка было выше на 0,2 п.п., соответственно, в опытной группе по сравнению с контрольной для животных

третьего и четвёртого года лактации. Показатель массовой доли лактозы был одинаковым в опытной группе для коз третьего и четвёртого года и составил 5,0 % соответственно. Подобная тенденция отмечалась и в контрольной группе животных (4,7 %).

Таким образом, превосходство Tg животных по содержанию лактозы в сырьевом продукте составило 0,3 п. п. (рисунки 3 и 4).

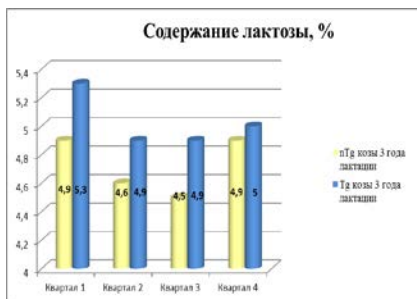


Рисунок 3 – Содержание лактозы в молоке nTg и Tg животных 3 года лактации

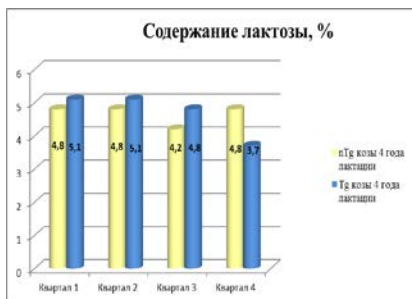


Рисунок 4 – Содержание лактозы в молоке nTg и Tg животных 4 года лактации

Вместе с тем, сравнительный анализ состава молока между группами коз третьего и четвёртого года лактации показал, что имеются незначительные различия в учитываемых показателях (рисунки 5 и 6). Так, массовая доля белка у животных по третьей лактации контрольной группы была ниже на 0,1 п. п. по сравнению с козами четвёртой (3,2 против 3,3 % соответственно), в группе продуцентов рЧЛФ отмечалась обратная тенденция – значение указанного показателя было выше на 0,1 п. п. у животных четвёртого года по сравнению с третьим.

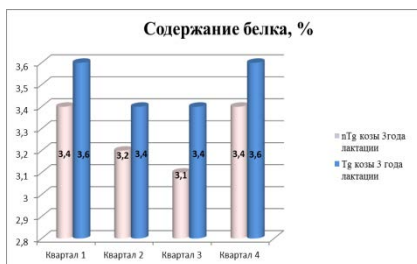


Рисунок 5 – Содержание белка в молоке nTg и Tg животных 3 года лактации

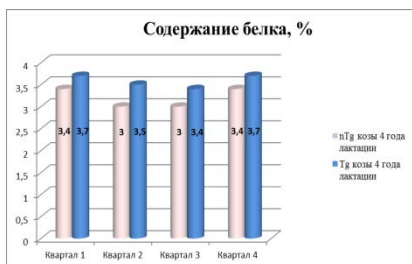


Рисунок 6 – Содержание белка в молоке nTg и Tg животных 4 года лактации

Массовая доля жира в течение всего исследуемого периода у Tg животных была достоверно ($P < 0,01$, $0,001$) меньше по сравнению с nTg козами (рисунки 7 и 8).

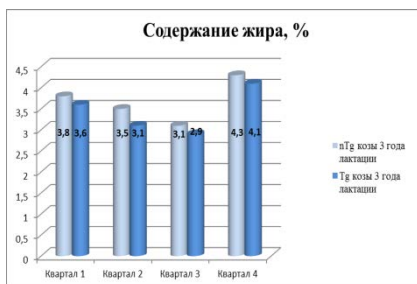


Рисунок 7 – Содержание жира в молоке nTg и Tg животных 3 года лактации

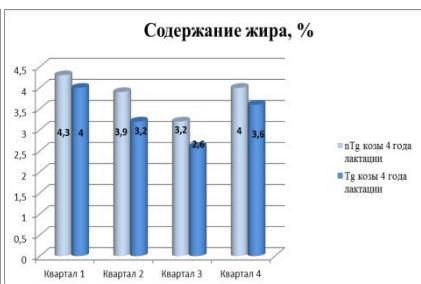


Рисунок 8 – Содержание жира в молоке nTg и Tg животных 4 года лактации

Полученные данные свидетельствуют о снижении значения показателя жирности сырья на 0,3 п.п. между группами коз третьего года лактации (3,7 против 3,4 %) и на 0,5 п. п. между животными четвертого года лактации (3,9 против 3,4 %) соответственно. О данном факте сообщалось в наших предыдущих исследованиях [21]. Можно констатировать, что продуцирование молочной железой дополнительного белка способствует изменению концентрации других составляющих молока, при этом обеспечивается равновесие данной сложной полидисперсной системы.

На рисунках 9 и 10 показаны изменения в физико-химических свойствах молока по показателю титруемой кислотности в зависимости от сезона лактации животных.

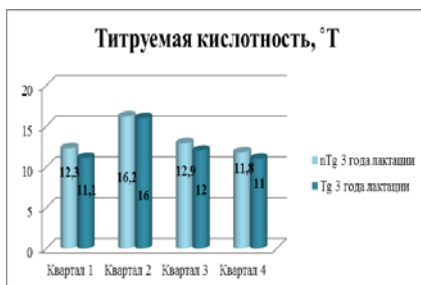


Рисунок 9 – Титруемая кислотность в молоке ке nTg и Tg животных 3 года лактации

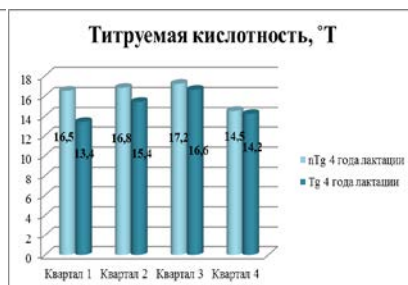


Рисунок 10 – Титруемая кислотность в молоке nTg и Tg животных 4 года лактации

Так, кислотность была выше в весенне-летний период и ниже в осенне-зимний. Кроме того, молоко коз четвертого года контрольной группы отличалось более высоким (на 18 %) значением данного показателя по сравнению с образцами сырья животных третьей лактации (16,2 против 13,3 °Т), при этом в опытной группе разница составила

16 % (14,9 против 12,5 °Т соответственно). Следует отметить, что показатель кислотности молока в группе трансгенов был ниже по сравнению с пТg козами на 6 и 8 % для животных третьего и четвертого года лактации соответственно.

Можно предположить, что одной из причин различий в показателе кислотности между контрольной и опытной группами животных является более высокая концентрация белковой фракции в молоке Тg коз, которая в значительной степени оказывает влияние на вышеупомянутое свойство сырья.

Заключение. 1. Установлено, что животные более поздней лактации как продуценты лактоферрина человека, так и обычные козы отличаются более высокой (на 30 %) молочной продуктивностью по сравнению с менее возрастными животными.

2. Выявлено, что содержание жира в молоке коз-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека третьего и четвертого года лактации было достоверно ($P < 0,01$) меньше, а концентрация лактозы достоверно ($P < 0,01$; $0,001$) выше по сравнению с нетрансгенными животными того же периода получения сырья.

3. Установлено, что молоко нетрансгенных коз четвертой лактации отличалось более высокой кислотностью (на 18 %) по сравнению с животными третьей лактации (16,2 против 13,3 °Т) в группе животных-продуцентов разница составила 16 % (14,9 против 12,5 °Т соответственно). При этом показатель кислотности молока в группе трансгенов был ниже по сравнению с нетрансгенными козами на 6 и 8 % для животных третьего и четвертого года лактации соответственно.

Литературы

1. Kues, W. The contribution of farm animals to human health / W. Kues, H. Niemann // Trends in biotechnology. – 2004. – Vol. 22. – P. 286-294.

2. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts / A. Schnieke [et al.] // Science. – 19970. – Vol. 278. – P. 2130-2140.

3. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow / D. Salamone [et al.] // J. Biotechnol. – 2006. – Vol. 124(2). – P. 469-472.

4. The Large-Scale Production of Recombinant Human Serum Albumin in the Milk of Transgenic Cattle: Strategy / S. Moghaddassi [et al.] // Bio Medicine. – 2014. – Vol. 2. – P. 6-19.

5. Effect of genetic background on glycosylation heterogeneity in human antithrombin produced in the mammary gland of transgenic goats / Q. Zhou [et al.] // J. Biotechnol. – 2005. – Vol. 117. – P. 57-72.

6. Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Purification and characterization of the recombinant enzyme / J. Denman [et al.] // Biotechnology. – 2005. – Vol. 9. – P. 839-843.

7. Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats / K. Ebert [et al.] // Biotechnology. – 1994. – Vol. 12. – P. 699-702.

8. Purification and characterization of a recombinant version of human AFP transgenic goats / M. Parker [et al.] // Biotechnology. – 2004. – Vol. 9. – P. 177-183.

9. Production of recombinant antibodies in the milk of transgenic animals / M. Young [et al.] // Res. Immunol. – 1998. – Vol. 149. – P. 609-610.
10. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies / D. Pollock [et al.] // Res. Immunol. – 1999. – Vol. 231. – P. 147-157.
11. Production of recombinant spider silk (BioSteel®) in the milk of transgenic animals / C. Karatzas [et al.] // Transgenic Res. – 1999. – Vol. 8. – P. 476-477.
12. Health and reproductive profiles of malaria antigen-producing transgenic goats derived by somatic cell nuclear transfer / E. Behboodi [et al.] // Cloning and Stem Cells. – 2005. – Vol. 7. – P. 107-118.
13. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat / J. Ko [et al.] // Transgenic Res. – 2000. – Vol. 9. – P. 215-222.
14. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning / Y.J. Huang [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 13603-13608.
15. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats / J. Zhang [et al.] // Protein Expr Purif – 2008. – Vol. 57(2). – P. 127-135.
16. Production of human lactoferrin in animal milk / I. L. Goldman, S. G. Georgieva, Y. G. Gurskiy, A. N. Deykin, A. N. Popov, T. G. Ermolkevich, A. I. Budzevich, A. D. Cheronousov, E. R. Sadchikova // Biochem Cell Biol. – 2012. – Vol. 90(3). – P. 513-519.
17. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows / H. C. Patrick van Berkel [et al.] // Nature Publishing– 2002. – Vol. 20. – P. 484-487.
18. Large-scale production of recombinant human lactoferrin from high-expression, marker-free transgenic cloned cows / Ming Wang [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – doi:10.1038/s41598-017-11462-z.
19. Recombinant human lactoferrin from transgenic goats: isolation and physicochemical properties / I. Semak [et al.] // The Xth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and applications, 08–12 May, 2011. – Mazatlan, Mexico. P-VI-6. – P. 74.
20. Recombinant human lactoferrin expressed in transgenic goats / A. Budzevich [et al.] // The Xth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and applications, 08–12 May, 2011. – Mazatlan, Mexico. O-VI-2. – P. 66.
21. Характеристика физико-химических показателей молока коз-производителей лактоферрина человека / Е. В. Петрушко [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр. – Жодино, 2016. – Т. 51, ч. 2 : Технология кормов и кормления, продуктивность. Технология производства, зоогиена, содержание. - С. 208-216.

Поступила: 8.04.2019 г.