

АКТИВНІСТЬ ТА ІЗОФОРМИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ МОЛОКА КОРІВ

І. П. Опанасенко¹, Д. Д. Остапів¹, Н. В. Кузьміна¹, О. І. Чайковська², О. П. Панич²

¹Інститут біології тварин НААН

²Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок

Вивчали активність та спектр ізоформ супероксиддисмутази (СОД) молока корів. Встановлено, що для молока корів характерна активність СОД 10,7–13,1 МО/мл, яку забезпечують дві ізоформи ензиму — цитоплазматична і позаклітинна. Активність ензиму молока залежить від періоду лактації та технологічних умов зберігання. Пастеризація молока знижує активність СОД ($p < 0,05–0,001$), що проявляється втратою каталітично активних протеїнів ензиму, а заморожування-розморожування зумовлює втрату позаклітинної і знижує інтенсивність проявлення цитозольної ізоформ.

Супероксиддисмутаза (СОД) — ензим, який каталізує перетворення супероксиданіону в кисень і переокис водню [3]. Вказаний фермент характеризується тканинною специфічністю та існує в ізоформах: цитозольній (Cu, Zn-вмісна), мітохондріальній (Mn-вмісна) та високомолекулярній позаклітинній [9, 11, 12]. У молоці ссавців виявлено активність вказаного ензиму. Доведено, що активність СОД забезпечується, в тому числі, й позаклітинною ізоформою [10]. Активність ензиму у свіжому молоці — величина не стабільна і залежить від індивідуальних особливостей корів [5], а у материнському молоці жінок визначається тривалістю вагітності, що своєю чергою впливає на розвиток немовлят [8]. У недоношених дітей споживання молока з високою активністю ензимів антиоксидантного захисту (за додавання каталази, СОД і глутатіонпероксидази) відновлює антиоксидантний захист організму і підвищує стійкість до окиснювального стресу [4]. Однак, у процесах кип'ятіння, приготування продуктів дитячого харчування втрачається антиоксидантна активність молока, що знижує його біологічну й поживну цінність [6, 7].

Враховуючи те, що основним продуктом для вигодовування приплоду тварин є молозиво і в наступному — молоко чи його продукти, а для дітей і людей — це цінний харчовий продукт, вважали за доцільне вивчити активність і вміст ізоформ СОД у свіжому молоці корів та при його зберіганні (заморожуванні) і після пастеризації.

Мета досліджень — вивчити активність та вміст ізоформ СОД у свіжому, збереженому (замороженому) і пастеризованому молоці корів.

Матеріали і методи. Для досліджень відбирали молозиво ($n = 6$; до 10 діб після отелення) і молоко: свіже — після доїння корів ($n = 7$; 2–3 міс. лактації) продуктивністю 6–8 тис. л за попередню лактацію та пастеризоване ($n = 6$; з торгівельної мережі). У свіжому молоці, оціненому за якістю (вмістом протеїну, лактози, молочного жиру), вивчали активність СОД [2] та ізоформи ензиму електрофорезом у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Проби для електрофорезу готували: до 0,1 мл зразка молока свіжого розбавленого 1:1, 1:10, 1:20 та 1:50 Трис-гліциновим буфером додавали 0,05 мл 40 % сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,04 мл проби (концентрація білка 50–100 мкг). Виявляли ізоформи СОД модифікованим методом Beauchamp і Fridovich [1, 3]. Крім того, для встановлення впливу зберігання і пастеризації на ізоформи ензиму досліджували зразки молока: замороженого при мінус 18 °С впродовж 24 год. і пастеризованого. Пастеризоване молоко для проведення електрофоретичного виявлення ізоформ СОД розбавляли Трис-

гліциновим буфером 1:5. Як маркер, для ідентифікації ізоформ СОД, використали еритроцити крові корів (розведення 1:50), які містять цитозольні ізоформи ензиму.

Результати й обговорення. Молоко проявляє активність СОД — 10,7–13,1 МО/мл (табл. 1). При цьому активність ензиму молозива $12,4 \pm 0,23$ МО/мл (lim 12,1–13,7 МО/мл) і молока $11,5 \pm 0,31$ МО/мл (lim 10,7 - 13,1 МО/мл). Отже, активність СОД в молозиві на 7,3 % ($p < 0,05$) вища, порівняно з молоком. У пастеризованому молоці активність ензиму найнижча ($10,7 \pm 0,09$ МО/мл). Різниця між величинами значень СОД пастеризованого і свіжого молока складає 7,0 % ($p < 0,05$) і молозива — 13,8 % ($p < 0,001$). Отже, активність СОД молока залежить від періоду лактації та технологічних умов його зберігання (пастеризації).

Таблиця 1

Активність СОД молока корів, МО/мл

Молоко корів:	n	M ± m	CV
свіже (2 - 3 міс. лактації)	7	$11,5 \pm 0,31^*$	7,0
молозиво	6	$12,4 \pm 0,23^{***}$	4,6
пастеризоване	6	$10,7 \pm 0,09$	2,1

Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно до мінімальної величини значення — * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

У свіжому молоці виявлені дві ізоформи СОД (рис. 1).

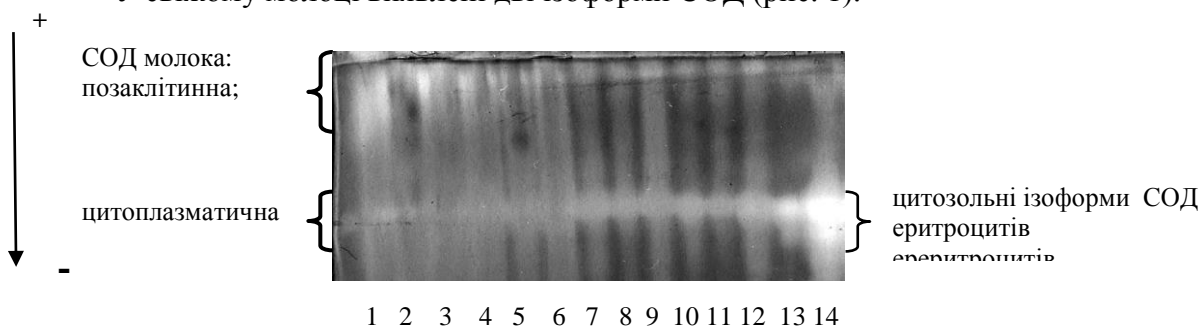


Рис 1. Ізоформи СОД молока; розбавлення молока: 1:1 — 1-3 треки; 1:10 - 4-6 треки; 1:20 —7-9 треки; 1:50 — 10—12 треки; 13,14 треки — цитозольні ізоформи ензиму еритроцитів.

Одна з них знаходиться в зоні електрофоретичної рухливості цитозольних ізоформ еритроцитів крові корів, а інша – розміщена у верхній частині ПААГ – високомолекулярна позаклітинна СОД. При візуальному оцінюванні фореграм встановлено, що інтенсивність проявлення ізоформ СОД залежить від ступеня розбавлення молока. За розбавлення молока 1:1 та 1:10 виявляються дві ізоформи, а за вищого (1:20 і 1:50) – інтенсивність проявлення позаклітинної СОД значно зменшується і майже зникає. Отже, при підготовці до електрофорезу з виявлення ізоформ СОД молока доцільно розбавляти його 1:10.

Дослідженням впливу пастеризації на інтенсивність проявлення ізоформ СОД виявлено, що у свіжому молоці корів проявляються ізоформи СОД, а у пастеризованому ізоформа, що відповідає рухливості цитозольним ізоформам СОД еритроцитів виявляється зі слабкою інтенсивністю, а позаклітинна не проявляється (рис. 2).

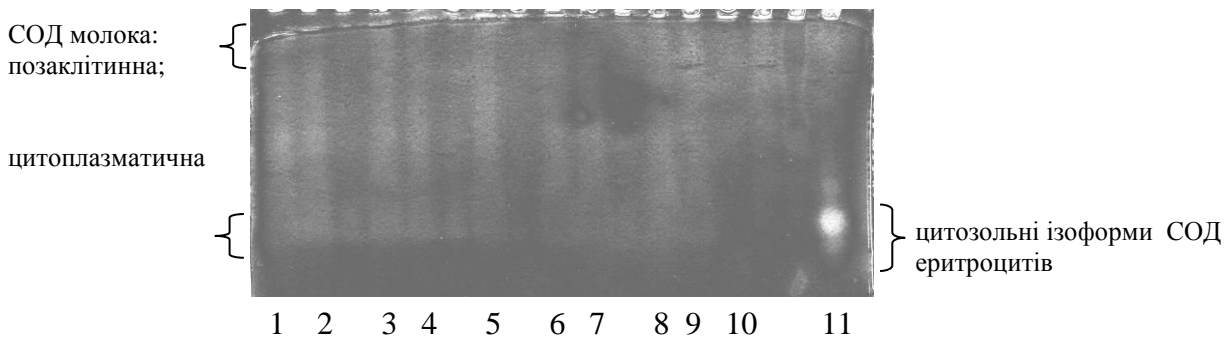


Рис. 2. Ізоформи СОД свіжого і пастеризованого молока корів: 1–4 — свіже; 5–10 — пастеризоване; 11 — цитозольні ізоформи СОД еритроцитів

Подібний результат отримано при вивченні ізоформ СОД у молоці, після заморожування: у ПААГ проявляється чітко тільки маркер СОД (цитозольні ізоформи еритроцитів крові корів) і з дуже слабкою інтенсивністю цитозольна ізоформа, а позаклітинна відсутня (рис. 3).

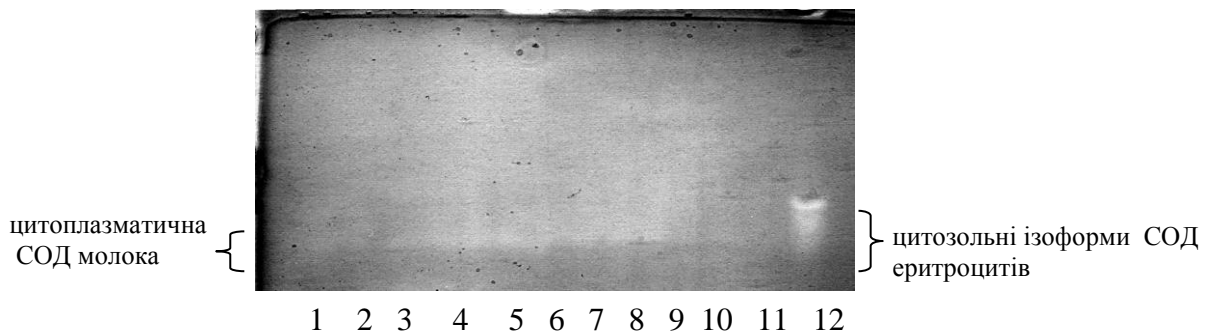


Рис. 3. Ізоформи СОД розмороженого, після зберігання при мінус 18 °С молока корів: 1–11 — розморожене молоко; 12 — цитозольні ізоформи СОД еритроцитів

Отримані результати узгоджуються з дослідженнями впливу умов зберігання материнського молока на антиоксидантну активність [6].

Отже, пастеризація та заморожування призводить до зниження антиоксидантних властивостей і біологічних якостей молока корів, що своєю чергою не забезпечує організм приплоду і споживачів молочної продукції природними факторами антиоксидантного захисту.

В И С Н О В К И

1. Для молока корів характерна активність СОД — 10,7–13,1 МО/мл.
2. Активність СОД молока залежить від періоду лактації та технологічних умов його зберігання (пастеризації). Найвища активність ензиму в молозиві ($12,4 \pm 0,23$ МО/мл), нижча на 7,3 % — в свіжому та найменша ($10,7 \pm 0,09$ МО/мл) — в пастеризованому молоці.
3. У молоці корів виявлено дві ізоформи СОД — цитоплазматична і позаклітинна. Для виявлення ізоформ СОД оптимальним розведенням молока є 1:10.
4. Пастеризація молока призводить до зниження активності СОД ($p < 0,05-0,001$), що візуально проявляється на фореграмі втратами каталітично активних протеїнів ензиму.
5. Процес заморожування-розморожування молока знижує вміст протеїнів цитозольної ізоформи, а позаклітинна — відсутня.

Перспективи подальших досліджень. Буде вивчатися можливість коригування активності СОД в молоці корів.

ACTIVITY AND ISOFORMS OF COW MILK SUPEROXIDE-DISMUTASE

I. P. Opanasenko¹, D. D. Ostapiv¹, N. V. Kuzmina¹, O. I. Chaikovska², O. P. Panich²

¹Institute of Animal Biology of NAAS

²State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives

S U M M A R Y

Activity and isoforms spectrum of cow milk superoxide-dismutase (SOD) were studied. It is set, that for cow milk the activity of superoxide-dismutase is 10,7 - 13,1 IU/ml, that maintain two isoforms: cytoplasmic and extracellular. Milk enzyme activity depends on period of lactation and technological storage conditions. Milk pasteurization lowers the activity of superoxide-dismutase ($p < 0,05 - 0,001$), that is manifested by loosing of catalytically active proteins of enzyme, and freezing-unfreezing causes denaturation of extracellular form and lowers intensity of cytoplasmic isoform manifestation.

АКТИВНОСТЬ И ИЗОФОРМЫ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ МОЛОКА КОРОВ

И. П. Опанасенко¹, Д. Д. Остапів¹, Н. В. Кузьмина¹, А. И. Чайковская², О. П. Паныч²

¹Институт биологии животных НААН

²Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок

А Н Н О Т А Ц И Я

Изучали активность и спектр изоформ супероксиддисмутазы (СОД) молока коров. Установлено, что для молока коров характерна активность СОД 10,7–13,1 МО/мл, которую обеспечивают две изоформы энзима — цитоплазматическая и внешнеклеточная. Активность энзима молока зависит от периода лактации и технологических условий хранения. Пастеризация молока снижает активность СОД ($p < 0,05–0,001$), что проявляется потерей каталитически активных протеинов энзима, а замораживание-оттаивание способствует потере внешнеклеточной и снижению интенсивности проявления цитозольной изоформ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Кузьмина Н. В.* Активність супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази в різних органах і крові корів [Text]/ Кузьміна Н. В., Остапів Д. Д. // Біологія тварин. — 2008. — № 12. — С. 423–429.
2. *Чевари С. Н.* Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / Чевари С. Н., Андян Т.А. Штрэнгер Я. И. //Лаб. дело. — 1991. — №10. — С.9 – 13.
3. *Beauchamp C.* Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [Text]/ Beauchamp C., Fridovich I. // Anal. Biochem. — 1971. — Vol. 44. — P. 276–287.
4. *Friel J. K.* Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula [Text]/ Friel J. K., Martin S. M., Langdon M., et al. // *Pediatr Res* — 2002. — Vol. 51.— P. 612–618.

5. *Granelli K.* The Variation of Superoxide Dismutase (SOD) and Xanthine Oxidase (XO) Activities in Milk Using an Improved Method to Quantitative SOD Activity [Text]/Granelli K., Bjorckb L., Appelqvista L-A. // J. Sci. Food. Agric. — 1995. — Vol. 67. — P. 85–91.
6. Hanna N. Effect of storage on breast milk antioxidant activity [Text]/ Hanna N., Anwar M., Ahmed K., Petrova A. et al. //Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed. — 2004. — Vol. 89, — P. 518–520.
7. *Hojo Y.* Selenium Concentration and Glutathione Peroxidase Activity in Cow's milk [Text]/ Hojo Y. //Biological Trace Element Research — 1982. — Vol. 4. — 233–239.
8. *L'Abbe M. R.* Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. [Text] /L'Abbe M. R., Friel J. K. // J. Pediatr Gastroenterol. Nutr. — 2000 — Vol. 31. — P. 270–274.
9. *Laran T.* Activation of Cu,Zn-superoxide dismutase from caenorhabditis elegans does not require the copper chaperone CCS [Text] / Laran T., Culotta J., Culotta V. // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280. — P. 41373–41379.
10. *Mqvist M. S.* Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of transgenic rabbits [Text]/ Mqvist M. S., Houdebine L-M., Andersson Jan-Olof, et al. // Transgenic Research — 1997. — Vol. 6. — P. 271–278.
11. *Rotilio G.* Interplay of Cu, Zn superoxide dismutase and nitric oxide synthase in neurodegenerative processes [Text] / Rotilio G., Aquilano K., Ciriolo M. // Life. — 2008. — Vol. 55. — P. 629–634.
12. *Weisiger R.* Superoxide Dismutase. Organelle specificity [Text] / Weisiger R., Fridovich I. // The J. Biol. Chem. — 1973. — Vol. 248, № 10. — P. 3582–3592.