

4-бөлім
**АДАМ ЖӘНЕ ЖАНУАРЛАР
БИОХИМИЯСЫ**

Раздел 4
**БИОХИМИЯ
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

Section 4
**HUMAN AND ANIMAL
BIOCHEMISTRY**

¹Дюсембаев К.А.,
¹Кулатаева М.С.,
²Шалахметова Г.А.,
¹Аликулов З.

¹Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана
²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

Новый быстрый метод определения молибден ксантинооксидазы молока животных

Dusembaev K.A.,
Kulataeva M.S.,
Shalakhmetova G.A.,
Alikulov Z.

¹L.N. Gumilev Euroasian National University, Kazakhstan, Astana
²Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

New fast method of molybdenum determination in xanthine oxidase of animal milk

Дүйсембаев К.А.,
Кулатаева М.С.,
Шалахметова Г.А.,
Әліқұлов З.

¹Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Астана қ.
²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Жануарлардың сүтіндегі ксантиноксидазаның молибденін анықтаудың жаңа жылдам әдісі

Изучение нитратредуктазной (NaP) и нитритредуктазной (NiP) активностей молибденсодержащего фермента, ксантинооксидазы (КО) показало, что в козьем, верблюьем и кобыльем молоке КО находится в безмолибденовой и неактивной форме. Нами предложен метод активирования КО молока экзогенным молибденом и тиолами при термообработке молока при 85оС в течение 10 минут. Во время термообработки молока использовались различные антиоксиданты для защиты SH-групп кофактора. Для определения количества нитрита используются сульфаниламид и N-(1-нафтил)-этилендиамин. Нами было обнаружено, что в присутствии фосфата, антиоксидантов, дитиотрейтола, аскорбата и дитионита экзогенный молибдат окрашивался сульфаниламидом в синий цвет (максимум поглощения 695 нм). При использовании цистеина или глутатиона в качестве антиоксидантов молибдат не окрашивался сульфаниламидом, т.е. они не мешали определению нитрита. Используя дитиотрейтол, фосфат и сульфаниламид, установлено включение экзогенного молибдата в молекулу КО мицелл жировых глобул сливки.

Ключевые слова: нитратредуктаза, нитритредуктаза, ксантинооксидаза, молоко, молибден, дитиотрейтол, сульфаниламид.

Study on nitrate reductase (NaR) and nitrite reductase (NiR) activities of molybdenum containing enzyme xanthine oxidase (XO) showed that in milk of goat, camel and mare XO exists in molybdenum free form and is inactive. XO is activated by heat treatment of milk at 85°C in 10 min in the presence of exogenous molybdate (Mo) and thiols. Mo atoms bind to sulfhydryle (SH) groups of molybdenum cofactor in the active center of XO. However, denaturation of XO by heat treatment leads to the oxidation of these SH-groups by oxygen. Therefore, in order to defense of these groups of the cofactor during heat treatment of milk different antioxidants were used. One assay was used to determine NaR as well as NiR activities of milk XO: (1) nitrite formation from nitrate by NaR, and (2) nitrite utilization by NiR. For quantitative determination of nitrite sulfanilamide and N-(1-naphthyl)-ethylenediamine were used. We found that in the presence of phosphate, antioxidants dithiothreitol, ascorbate and dithionite Mo forms blue color (absorption maximum at 695 nm) by sulfanilamide. When cysteine or glutathione were used as an antioxidants molybdenum was not colored by sulfanilamide, i.e. they did not interfering nitrite determination. Using dithiothreitol, phosphate and sulfanilamide it was shown the incorporation of exogenous molybdenum in XO molecule which located in fat globule micelles of milk cream.

Key words: nitrate reductase, nitrite reductase, xanthine oxidase, milk, molybdenum, dithiothreitol, sulfanilamide.

Молибденді фермент ксантиноксидазаның (КО) нитратредуктазальқ (NaP) және нитритредуктазальқ (NiP) активтіктерін зерттеулер ешкінің, түйенің және биенің сүтінің құрамындағы КО молибденсіз, сондықтан ол активтігі жоқ күйінде болатынын көрсетті. Біз сырттан берілген молибдат және тиолдарды қосып, 85оС температурада 10 минут қыздыру арқылы сүттің КО-сын активтендіру әдісін ұсындық. Сүтті температурамен өңдеу кезінде кофактордың SH-топтарын қорғау үшін әртүрлі антиоксиданттар қолданылды. Нитраттың мөлшерін анықтау үшін сульфаниламид және N-(1-нафтил)-этилендиаминді пайдаланады. Біз фосфат, дитиотрейтол, аскорбат және дитионит секілді антиоксидантты қосқанда сульфаниламид молибдатты көк түске (сіңіру максимумы 695 нм) бояйтынын байқадық. Цистеин немесе глутатионды антиоксидант ретінде пайдаланғанда молибден сульфаниламидпен боялмады, яғни олар нитритті анықтауға кесір келтірмейді. Дитиотрейтолды, фосфатты және сульфаниламидті пайдалану арқылы сырттан берілген молибдаттың қаймақтағы май глобулаларының мицеллаларының құрамындағы КО-ның молекуласына кіретіні анықталды.

Түйін сөздер: нитратредуктаза, нитритредуктаза, ксантинооксидаза, сүт, молибден, дитиотрейтол, сульфаниламид.

**НОВЫЙ БЫСТРЫЙ
МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МОЛИБДЕН
КСАНТИНОКСИДАЗЫ
МОЛОКА ЖИВОТНЫХ****Введение**

Молибден – один из основных микроэлементов в питании животных, человека и растений. Молибден входит в состав молибдоферментов, которые могут играть важную роль в окислительном стрессе. Как известно, окислительный стресс может вызывать различные болезни у человека и животных [1]. Исследования в области медицины показывают, что молибдоферменты могут играть антиканцерогенную роль. Например, рак пищевода, особенно широко распространенный в Южной Африке, в регионе Транскей и в Лин Ксиан (LinXian) – регион в провинции Хонан (Honan) на севере Китая, который был известен, как область с наиболее высоким процентом заболеваемости раком пищевода и желудка среди местного населения [2]. Проведенные исследования почвы этих регионов показали низкое содержание в ней молибдена. А внесение в почву молибденовых удобрений значительно уменьшило процент заболеваемости населения. Сделано заключение о том, что недостаток молибдена в почве приводит к снижению или к потере активности молибденсодержащих ферментов растений, животных и человека. В результате этого в организме человека и животных повышается уровень нитритов и канцерогенных нитрозаминов, которые не окисляются молибдоферментами до их безвредных производных. Выявлено, что включение в рацион крыс молибдена ингибирует развитие рака пищевода и желудка даже после введения сложного эфира N-нитрозосаркозинэтила. Добавление молибдена в питьевую воду крыс ингибирует грудной канцерогенез, вызванный N-нитрозо-N-метилуреатом [3]. По данным американских ученых, почвы в штатах Колорадо и Огайо богаты молибденом и там обнаружена самая низкая встречаемость рака пищевода [2]. Таким образом, содержание молибдена в пищевых продуктах животного и растительного происхождения существенно зависит от его содержания в почве и воде. Молибден включен Объединенной Комиссией ФАО/ВОЗ в ряд обязательных элементов при гигиеническом контроле пищевых продуктов. Суточная потребность человека в молибдене составляет 1-2 мг. В то же время в ГОСТах и международных

стандартах отсутствуют методики определения молибдена в пищевых продуктах.

У животных и человека содержатся три молибденсодержащих фермента: альдегидоксидаза, ксантинооксидаза и сульфитооксидаза. Альдегидоксидаза и ксантинооксидаза играют важную роль в метаболизме гетероциклических ксенобиотиков, тем самым обезвреживают их и защищают организм от опасных азотсодержащих гетероциклов, поэтому их высокое содержание обнаружено в печени животных [1]. Ксантинооксидаза катализирует превращение пурина гипоксантина в ксантин, а затем в мочевую кислоту. Как известно, пуриновые основания являются составными компонентами нуклеиновых кислот, т.е. РНК и ДНК. Альдегидоксидаза принимает участие в реакциях биотрансформации ксенобиотиков – природных и чужеродных для организма человека и животных веществ, порожденных в той или иной степени хозяйственной деятельностью человека и не входящих естественным образом в биотический круговорот. Именно со способностью альдегидоксидазы катализировать окисление в организме канцерогенных ксенобиотиков связывают предполагаемую антираковую активность молибдена [2,3]. Сульфитооксидаза, находясь в митохондриях, участвует в метаболизме серосодержащих аминокислот – цистеина и метионина – и катализирует окисление сульфита в сульфат.

В растениях также хорошо изучены три молибденсодержащих фермента: нитратредуктаза, ксантиндегидрогеназа и альдегидоксидаза. Ассимиляция нитратов является фундаментальным процессом в царстве растений и поэтому фермент нитратредуктаза, восстанавливающий нитрат, рассматривается как лимитирующий-фактор роста, развития, образования белка и конечной урожайности растений. В катаболизме пуринов растений ксантиндегидрогеназа окисляет ксантин через мочевую кислоту до уреидов (аллантиналлантиноновая кислота). Уреиды являются легкоусвояемой запасной и транспортной формой азота для тканей растений. Установлено, что альдегидоксидаза катализирует превращения индолуксусного и абсцизового альдегидов в соответствующие фитогормоны – индолоуксусную и абсцизовую кислоты [3].

Таким образом, вышеприведенные сведения показывают важную роль молибдена в метаболизме живых организмов. Поэтому, контроль уровня молибдена является важным компонентом оценки качества пищевых продуктов расти-

тельного и животного происхождения, а также почвы и воды окружающей среды.

Высокие концентрации молибдена определяют методами атомно-абсорбционной спектроскопии, вольтамперометрии, спектрофотометрии часто в сочетании с экстракцией. Для определения содержания молибдена в молоке домашних животных, некоторые авторы для устранения матричных влияний и снижения предела обнаружения молибдена в молоке использовали процедуру предварительного концентрирования и отделения матрицы с использованием ионообменника Амберлита, 5% раствора гидроксида натрия в качестве элюента [4]. А для улучшения метрологических характеристик определения молибдена в обезжиренном молоке предлагают добавку европия и сложную предварительную процедуру обработки графитовой печи раствором ниобия [5]. Несмотря на это, существующие методики не удовлетворяют аналитиков из-за длительности определения, наличия дополнительных стадий отделения компонентов матрицы, применения токсичных газов, недостаточного предела обнаружения и плохой воспроизводимости. Предложены новые палладий-комплексные химические модификаторы (комплексы Pd(II) с хромазуолом S и ксиленоловым оранжевым) для определения молибдена в молоке после его сухой минерализации использовали электротермическую атомно-абсорбционную спектроскопию, позволяющую снизить предел обнаружения Mo в 12 раз [6].

Количество методов определения низких содержаний молибдена в природных и биологических объектах невелико, а имеющиеся являются либо достаточно продолжительны по времени и требуют высококвалифицированного персонала, либо особых реактивов и условий работы (кинетические, радиохимические методы). Практически нет методов определения молибдена в полевых условиях (тест-методы), простых и не требующих специального оборудования, подходящих для нужд экологов, биологов, медиков и поэтому методы определения молибдена в окружающей среде и биологических материалах постоянно совершенствуются. В связи с этим возникла необходимость создания быстрого и несложного метода определения молибдена в биологических объектах.

Материалы и методы исследований

В экспериментах использованы молибдат натрия ($M = 241.95$), сульфаниламид ($M = 172.21$),

N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорид ($M = 259,18$) фирмы AppliChem (Германия), цистеин ($M = 157,6$), дитиотритол ($M=154,2$) фирмы Sigma (Германия).

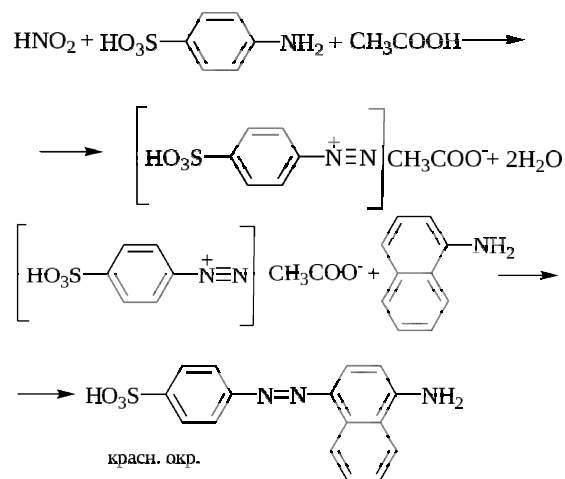
Для определения ферментативных активностей и содержания молибдена в наших экспериментах было использовано козье парное молоко, также использованы сливки и обрат, полученных сепарацией на сепараторе «Сибирь» (производство Россия).

Подготовка молока для определения различных ферментативных активностей. Перед обработкой в коровье и козье молоко добавляли 10 мкМ ЭДТА для связывания тяжелых металлов. Для кипячения в козье парное молоко вливали в узкие конические пробирки в объеме 2 мл. Затем для дальнейшего определения ферментативной активности, пробирки прогревали в водяной бане при температуре 85°C и держали в течение от 2-х до 10 минут, и быстро охлаждали в холодной воде.

Нитратредуктазную активность ксантиноксидазы парного молока, определяли по образованию нитритов в реакционной среде в результате каталитической реакции фермента. **Нитритредуктазную** активность – по исчезновению нитритов в реакционной среде. В качестве донора электронов использовали 25 мкМ НАДН (в конечной концентрации) или 1,0 мкМ метилвиологен (бензилвиологен), восстановленный дитионитом. Поскольку НАДН и метилвиологен дают сравнимые результаты, определения этих активностей проводили с использованием последнего донора электронов (значительно дешевле реагент по сравнению с НАДН)[7].

Определения концентрации нитритов с использованием N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлоридом и сульфамиламидом. Концентрацию нитритов определяли с добавлением 0,5 мл раствора сульфаниламида и 0,5 мл N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорида в 500 мл реакционной смеси. В реакционную смесь входит: 300 мкл 0.2 М раствор натрий-фосфатного буфера (pH 6.5), 100 мкл парного молока, 50 мкл дитиотритол и 50 мкл сульфаниламида. Эти реагенты готовили следующим образом: 6 грамм сульфаниламида растворялся в 1 литре 20% HCl и 1,23 грамм N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорида в 1 литре дистиллированной воды. 48 мг дитионита (гидросульфита натрия, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) растворяли в 6 мл 95 мМ бикарбоната натрия. При pH 2-2,5, азотистая кислота образует с сульфамиламидом диазониевое соединение. Последнее вступает в реакцию

сочетания с N-(1-нафтил) – этилендиаминдигидрохлоридом, с образованием азокрасителя красного цвета [7]:



Полученный окрашенный раствор фотометрировали при длине волны 548 нм спектрофотометра (Specol-2000, Germany). Для измерения концентрации нитритов строили калибровочную кривую – возрастающие концентрации нитритов измеряли при длине волны 548 нм. В качестве стандарта использовали водный раствор Na_2NO_2 .

Ксантиноксидазную активность определяли по образованию мочевой кислоты из гипоксантина при pH 8.5. Концентрация мочевой кислоты определяли по ее поглощению при 295 нм с использованием спектрофотометра [8].

Определение содержания молибдена атомно-абсорбционным методом. Содержание молибдена определяли на атомно-абсорбционном спектрометре AAS-IN (Karl Zeiss, Germany). Из сметаны, выделенной из молока, молибден экстрагировали методом влажной минерализации. Влажную минерализацию проводили по следующей процедуре: сметану смешивали с концентрированной HNO_3 и эту смесь нагревали в керамической чашке под потоком воздуха. Выпаривали смесь, нагреванием, до уменьшения объема (от 50 мл концентрировали до 5 мл) Затем концентрированный экстракт снова смешивали с концентрированной кислотой, центрифугировали и в супернатанте определяли молибден [9]. Этот трудоемкий ААС-метод использован для сравнения с нашим методом.

Новый метод определения молибдена. Реакционная смесь для определения MoP и MoI активностей КО козьего молока в отсутствие

молока при добавлении сульфаниламида и N-(1-нафтил)-этилендиамина окрашивалась в синий цвет. Реакционная смесь содержала 200 мкл 0,1М натрий фосфатного буфера ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1:9) pH 6.0, 10 мкл 10 мкМ ЭДТА, 100 мкл парного молока, 100 мкл 0.1 М KNO_3 (или 0.4 мМ KNO_2), 10 мкл 0.1 М Na_2MoO_4 , 10 мкл 0.1 М аскорбиновой кислоты (аскорбат), 100 мкл 0.1 М метил-виологена (или бензилвиологен) и 50 мкл дитионита. После инкубации в течение 15 минут при 37°C добавляли 0.5 мл сульфаниламида и 0.5 мл N-(1-нафтил)-этилендиамина, нитрит окрашивался в красный цвет в течение 2-4 минут. Нами было обнаружено, что в отсутствии молока развивался темно-синий цвет в течение минуты. Максимум поглощения синего цвета при видимой области спектра спектрофотометра был 695 нм. Для измерения концентрации молибдена строили калибровочную кривую: возрастающие концентрации водного раствора молибдата натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) окрашивали сульфаниламидом в присутствии фосфата и дитиотреитола и измеряли при длине волны 695 нм спектрофотометра.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении активации ксантинооксидазы молока животных (коровы, козы, верблюда и кобылы) экзогенным молибденом, нами было обнаружено, что в присутствии восстановителей, таких как аскорбиновая кислота и дитионит, молибден окрашивается в смеси сульфаниламида и N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорида [8]. Обычно смесь этих реагентов используется для обнаружения нитритов. По количеству нитритов определяют активность нитратредуктазы растений и микроорганизмов. Общеизвестно, что молибденсодержащий фермент – нитратредуктаза (NaP) при нитратном питании растений и микроорганизмов восстанавливает нитрат (NO_3^-) до нитрита (NO_2^-). Нитрит далее восстанавливается нитритредуктазой (NiP) до гидросиламина (далее гидросиламин ферментативно превращается в аммоний, который включается в состав вновь синтезируемых аминокислот). У животных до сих пор не идентифицирована НР. Однако ранее нами впервые было обнаружено, что гомогенный молибденсодержащий фермент – ксантинооксидаза (КО), выделенный из парного коровьего молока, обладает высокими NaP и NiP активностями [8]. Природным донором электронов для таких активностей был НАДН, искусственным донором

– метилвиологен (или бензилвиологен), восстановленный дитионитом.

В следующих экспериментах из реакционной смеси отдельные компоненты исключались, и выяснялось их участие в проявлении синего цвета. После смешивания компонентов реакционная смесь окрашивалась сразу при комнатной температуре без инкубации. Суммарные результаты этих экспериментов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Участие отдельных компонентов в окрашивании реакционной смеси в синий цвет (в реакционной смеси отсутствовало молоко)

№ вариантов	Компоненты реакционной смеси*	Поглощение при 695 нм
1	Все компоненты	0.650
2	Минус нитрат	0.655
3	Минус нитрит	0.653
4	Минус молибдат	0.0
5	Минус аскорбиновая кислота	0.0
6	Минус фосфатный буфер	0.0
7	Минус метил виологен	0.645
8	Минус бензилвиологен	0.645
9	Минус дитионит	0.428
10	Минус сульфаниламид	0.0
11	Минус N-(1-нафтил)-этилендиамин	0.642
12	Минус ЭДТА	0.637
13	Все компоненты, но вместо молибдена вольфрам	0.0

Примечание: * вместо компонента, исключенного из смеси, добавляли дистиллированную воду

Результаты этих экспериментов убедительно показали, что в окрашивании реакционной смеси участвуют четыре компонента: молибдат натрия, аскорбиновая кислота, фосфатный буфер и сульфаниламид. При использовании вольфрамата вместо молибдата не происходило окрашивание реакционной смеси (вариант 13). Если для окрашивания нитритов было совершенно необходимо одновременное присутствие сульфаниламида и N-(1-нафтил)-этилендиамина, то для окрашивания молибдена второй реактив не был обязательным. Отсутствие в реакционной смеси дитионита несколько снижало окрашивание смеси. Поскольку дитионит является сильным химическим восстановителем (антиоксидантом), было сделано предположение, что для окраши-

вания необходимо также присутствие антиоксидантов. Отсутствие ЭДТА также значительно снижало образования синей окраски. Поэтому, в следующих экспериментах проверяли эффект различных антиоксидантов и ЭДТА в окрашивании реакционной смеси. Суммарные результаты этих экспериментов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Эффекты различных восстановителей на окрашивание реакционной смеси, состоящей из молибдата, фосфата и сульфаниламида

№ варианта	Антиоксидант (восстановитель)	Поглощение при 695 нм
1	Аскорбиновая кислота	0.656
2	Дитионит	0.324
3	Дитиотрейтол	0.843
4	Глутатион	0.063
5	Цистеин	0.032
6	Унитиол	0.122
7	Меркаптоэтанол	0.072
8	Вольфрамат + фосфат + сульфаниламид + отдельные антиоксиданты	0.0

Результаты, представленные в таблице 2 показывают, что в окрашивании реакционной смеси, состоящей из молибдата, фосфата и сульфаниламида, самым эффективным антиоксидантом является дитиотрейтол (и в этом случае при замене молибдата на вольфрамат никакой вид антиоксиданта не вызывал окрашивание (вариант 15). Слабее были аскорбиновая кислота и дитионит. Следует особо отметить, что дитиотрейтол ингибировал нитратредуктазную и нитритредуктазную активности ксантиноксидазы молока животных. Как было сказано выше, эти активности проявляются только после термообработки молока в присутствии экзогенного молибдата и цистеина. По-видимому, дитиотрейтол связывается с молибденом и не позволяет молибдену включаться в активный центр ксантиноксидазы.

В результате дальнейших экспериментов нами была установлена оптимальная концентрация дитиотрейтола, фосфатного буфера и сульфаниламида для определения содержания молибдена в реакционной среде. Оптимальная конечная концентрация дитиотрейтола для реакционной среды была 6 мМ, натрий-фосфатного буфера – 30 мМ и сульфаниламида – 3.5 мМ. Чувствительность этого метода определения со-

ставляла 4.1 мкг молибдена в мл реакционной смеси.

Активация безмолибденовых форм КО экзогенным молибденом. Так, нами было установлено, что большая часть молекул КО в коровьем, козьем, верблюжьем и кобыльем молоке, не содержит молибден и фермент неактивен. Прогревание молока животных при 80°C в течение 5 минут в присутствии молибдата, натрия и цистеина (или глутатиона) с последующим охлаждением до комнатной температуры привело к резкому повышению собственной активности КО и ее ассоциированных НаР и НиР активностей. При использовании вольфраматанатрия вместо молибдата исходная активность КО и ее НаР и НиР молока полностью исчезла. Общеизвестно, что для идентификации любого молибденсодержащего фермента в среду роста при выращивании организма вместо молибдата добавляют вольфрамат. В таких условиях вольфрам, как химический аналог молибдена, включается в молекулу фермента. Однако вольфрамовый фермент становится неактивным, так как атомы вольфрама неспособны переносить электроны от донора к акцептору при каталитическом акте молибдофермента. Использование специфического ингибитора КО – аллопуринола после термообработки молока в присутствии молибдата и цистеина привело к полной инактивации фермента. Все эти результаты показывают, что большая популяция молекул КО находится в безмолибденовой форме, экзогенный молибден включается в активный центр КО и все каталитические реакции происходят в молибденовом участке фермента. [8].

Такие же данные получены другими авторами. Так, сравнение содержания молибдена и уровня активности КО человека и коровы позволяет оценить активности фермента на основе 100%-го содержания молибдена. КО, очищенная из человеческого молока содержала 0.08 атома Мо, вместо теоретического 2 атома. Гомогенная КО человека содержала в 25 раз меньше Мо и ферментативной активности, соответственно [10]. Очищенная КО козьего и овечьего молока содержала 0.09 и 0.18 атома молибдена [11]. Таким образом, в молоке человека и коровы также существуют безмолибденовые формы КО.

Для определения ксантиноксидазной, нитрат- и нитритредуктазной активностей и содержания молибдена проводили следующую процедуру: парное козье молоко разделили на 3 варианта, в 1-ом варианте 2 л молока (для облегчения сепарирования) добавляли 10 мл 0.5 М

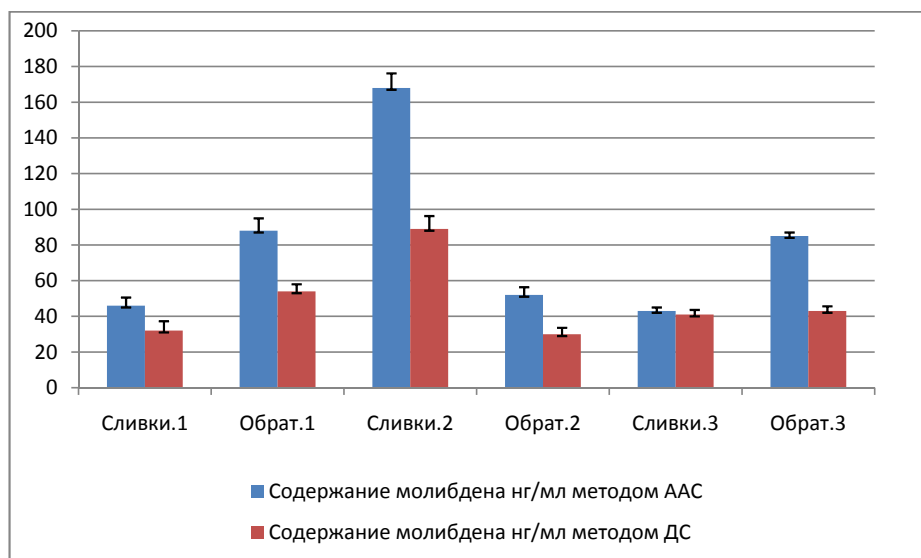
раствор молибдата натрия (2.5 мМ в конечной концентрации в молоке); во 2-ом варианте в такой же объем молока добавлялись молибдат и 10 мл 1.0 мМ цистеина (5.0 мкМ в конечной концентрации) и 3-й контрольный вариант – без добавлений. Варианты разделили на две части по 1-му литру. Первую часть была оставлена без

обработки (контрольные варианты), а вторую часть прогревали при 80°C в течение 5 минут и затем охлаждали до 35°C. Во всех вариантах были определены НаР и НиР активность с использованием восстановленного метилвиологена (или бензилвиологена). Из всех вариантов были выделены сливки.

Таблица 3 – Ксантинооксидазная, нитрат- и нитритредуктазная активности в сливках и обратах, полученных сепарацией прогретого при 80 °С парного козьего молока после различной обработки

Варианты	Компоненты после сепарации	Ферментные активности		
		*КО	**НаР	***НиР
1	Сливки	0.0	0.0	0.0
	Обрат	0.0	0.0	0.0
2	Сливки	25.6	48.6	78.6
	Обрат	0.9	0.0	0.0
3	Сливки	0.0	0.0	0.0
	Обрат	0.0	0.0	0.0

Примечание: *ммоль образованного мочевой кислоты/мл молока; **ммоль образованного NO₂-/мл молока; ***ммоль утилизированного NO₃-/мл молока



По абсцисс – содержание молибдена в нанogramмах (нг) в миллилитре. ААС – молибден был определен методом атомно-абсорбционной спектрометрии, ДС – молибден был определен с использованием дитиотрейтола и сульфаниламида.

Рисунок 1 – Содержание молибдена в сливках и обратах, полученных сепарацией парного козьего молока после различной обработки

Известно, что в некоторых случаях сливки выделяют из прогретого при 80-90°C молока. Из каждого варианта получили около 20% сливок из общей массы молока. В полученных

сливках и обратах (обезжиренное молоко) определялась вышеуказанная активность, а также содержание молибдена в сливках с использованием дитиотрейтола и сульфаниламида, впервые

предложенного нами метода и метода атомно-абсорбционной спектрометрии[9]. Полученные результаты представлены в таблице 3 (результаты контрольных вариантов не были включены в таблицу, так как без термообработки в молоке не обнаруживаются собственная активность и ассоциированные активности ксантиноксидазы) и содержание молибдена- на рисунке 1.

Результаты, представленные на рисунке 1 показывают, что при термообработке (80°C) в присутствии молибдата и цистеина (или глутатиона) происходит включение атомов молибдена в молекулу КО, находящейся в составе мицелл жировых глобул козьего молока результате активируются все активности, связанные с молекулой КО. В отсутствие цистеина не происходит включение молибдена в молекулу фермента, т.е. не обнаруживаются активность, связанная с КО.

Предполагаемые механизмы активации КО молока. Одним из возможных путей освобождения КО из внутренней мембраны является разрушение мембран жировых глобул молока (МЖГМ). Общеизвестно, что КО относится к термостабильным ферментам – она не теряет свою активность при 75-80°C температуре в течение нескольких минут. Таким образом, прогревание молока при такой температуре приводит к разрушению МЖГМ и молекулы КО несколько «обнажаются». С другой стороны, при высокой температуре молекулы КО частично денатурируются и повышается доступ кислорода в активный центр фермента. В этом случае безмолибденовые формы молекул могут быстро необратимо инактивироваться в результате окисления активного центра двух сульфгидрильных (-SH) групп молибдокофактора. Во всех молибдоферментах атом молибдена связывается с этими SH-группами кофактора (рисунок 1).

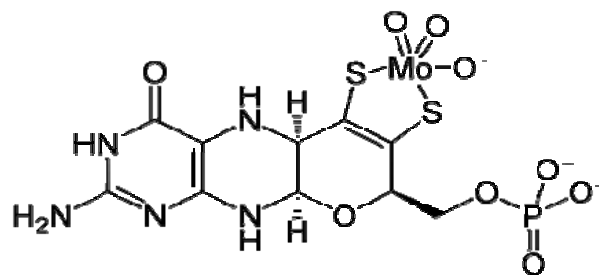


Рисунок 2 – Структура молибдокофактора и его связь с атомом молибдена в активном центре ксантиноксидазы

Поэтому, для их защиты от окисления необходимо присутствие антиоксиданта (восстановителя). К таким восстановителям относятся природные антиоксиданты – аскорбиновая кислота, цистеин и глутатион. Таким образом, при прогревании: (а) МЖГМ частично денатурируются, обнажая молекулы КО, (б) частично денатурируется молекулы фермента – при этом доступ экзогенного молибдена и антиоксидантов к молибдокофактору резко повышается. Антиоксиданты защищают SH-группы молибдокофактора от окисления, атом молибдена легко связывается с сульфгидрильными группами кофактора, и активность КО восстанавливается.

Таким образом, разработанный нами метод определения молибдена в биологических материалах представляет собой очень быстрый (несколько минут), дешевый (всего три недорогих реактива) и безвредной (сульфаниламиды известны как антибиотики) процедурой. По сравнению с некоторыми известными методами, чувствительность нашего метода может быть несколько ниже, однако концентрирование биологического материала перед определением молибдена не представляет особого труда.

Литература

- 1 Beedham C. Molybdenum hydroxylases // In: Costas Ioannidis. (ed.) Enzyme systems that metabolize drug and xenobiotics. – John Wiley & Sons Ltd, 2001. – P. 146-188
- 2 Blot W.J., Li J.Y., Taylor P.R. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence and disease-specific mortality in the general population// J Natl Cancer Inst. – 1993. – N 85. – P.1483-1942.
- 3 Brewer G.J., Dick R.D., Grover D.K. Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. // Clin Cancer Res. – 2000. – N6. – P.1-10.
- 4 Lopez-Garcia I., Vinas P., Romero-Romero R., Hernandez-Cordoba M. Liquid chromatography–electrothermal atomic absorption spectrometry for the separation and preconcentration of molybdenum in milk and infant formulas// AnalyticaChimicaAct. – 2007. – N597. – P.187-194.
- 5 Flavia Regina de Amorim, Milton Batista Franco, Clesia Cristina Nascentes, Jose Bento Borba da Silva .Direct Determination of Molybdenum in Milk and Infant Food Samples Using Slurry Sampling and Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry // Food Anal Methods. – 2011. – N 4. – P. 41-48.

- 6 Щепина Н.Д. Новые химические модификаторы при электротермическом атомно-абсорбционном определении молибдена в молоке // Вестник Донецкого национального университета. Природные науки. – 2012. – № 2. – С.152-156.
- 7 Аликулов З.А., Львов Н.Л., Кретович В.Л. Нитрат-и нитритредуктазная активность ксантинооксидазы молока // Биохимия. – 1980. – № 9. – С.1714-1719.
- 8 Аликулов З.А. Антагонизм между молибденом и вольфрамом в биологических системах.// Вестник ЕНУ им. Гумилева. – 2008. – № 67. – С. 57-63.
- 9 Пупышев А.А. Атомно-абсорбционный спектральный анализ. – М.: Техносфера, 2009. – 784 с.
- 10 Godber B.L., Schwarz G., Mendel R., Lowe D., Bray R., Eisenthal R., Harrison R. Molecular characterization of Human Xanthine Oxidase: The enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulphur centers// Biochemical Journal. – 2005. – N 17. – P. 1-29.
- 11 Atmani D., Benboubetra M., Harrison R. (). Goat's milk xanthine oxidoreductase is grossly deficient in molybdenum//J. Dairy Res. – 2004. – N71. – P.7-13.

References

- 1 Beedham C. (2001) Molybdenum hydroxylases. In: Costas Ioannidis (ed.) Enzyme systems that metabolize drug and xenobiotics. John Wiley & Sons Ltd., pp.146-188.
- 2 Blot WJ, Li JY, Taylor PR (1993) Nutrition intervention trials in Linxian China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence and disease-specific mortality in the general population. J Natl Cancer Inst, 85:1483-1942.
- 3 Brewer GJ, Dick RD, Grover DK(2000) Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. ClinCancerRes, 6:1-10.
- 4 Lopez-Garcia I, Vinas P, Romero-Romero R, Hernandez-Cordoba M (2007) Liquid chromatography–electrothermal atomic absorption spectrometry for the separation and preconcentration of molybdenum in milk and infant formulas. AnalyticaChimicaActa, 597:187-194.
- 5 Flavia Regina de Amorim, Milton Batista Franco, Clesia Cristina Nascentes, Jose Bento Borba da Silva (2011) Direct Determination of Molybdenum in Milk and Infant Food Samples Using Slurry Sampling and Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. Food Anal Methods, 4: 41-48.
- 6 Shepina ND (2012) New chemical modifiers in the electrothermal atomic absorption determination of molybdenum in milk. Bulletin of Donetsk National University Natural science [Novyiyechimicheskii modifikatory pri elektrottermicheskom atomno-absorbционном определении молибдена в молоке. Vestnik Doneckogo nacionalnogo universiteta. Prirodnyye nauki] 2:152-156 (In Russian)
- 7 Alikulov Z, Lvov N, Kretovich V. (1980) Nitrate and nitrite reductase activity of xanthine oxidase milk. Biochemistry [Nitratinitritreduktaznaya aktivnost ksanthinoksidazy moloka]. 45(9): 1714-1719 (In Russian)
- 8 Alikulov ZA (2008) Antagonism between molybdenum and tungsten in biological systems. Bulletin of ENU [Antagonizm mezhdu molibdenom i volframom v biologicheskikh sistemah] 6 67:57-63 . (In Russian)
- 9 Pupyshv AA. Atomic absorption spectral analysis –M : Technosphere-2009-784p. (In Russian)
- 10 Godber BL, Schwarz G, Mendel R, Lowe D, Bray R, Eisenthal R, Harrison R. (2005). Molecular characterization of Human Xanthine Oxidase: The enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulphur centers. Biochemical Journal Immediate Publication, 17: 1-29.
- 11 Atmani D, Benboubetra M, Harrison R. (2004). Goat's milk xanthine oxidoreductase is grossly deficient in molybdenum. J. Dairy Res, 71:7-13.

