



Рисунок 3 - Влияние ГК и АБК на перекисное окисление липидов в алейроновом слое зерна пшеницы в зависимости от времени инкубации

Известно, что в нормальных условиях жизнедеятельности клетки постоянно присутствует определенный уровень перекисного окисления липидов, индуцированный образованием активных форм кислорода [6]. Перекисное окисление липидов в клетке поддерживается на постоянном уровне благодаря многоуровневой антиоксидантной системе защиты. Таким образом, сбалансированность между обеими частями этой системы – перекисным окислением с одной стороны и антиоксидантной активностью с другой является необходимым условием для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки.

Учитывая необходимость сохранения прооксидантно-антиоксидантного равновесия в стационарном режиме, можно предположить, что его смещение является одним из первых неспецифических (опосредованных) звеньев в развитии программируемой гибели клеток.

Литература

- 1 Sandstrom PA, Pardi D., Tebbey PW., Dudek RW., Terrian DM and Butke TM. Lipid Hydroperoxide - induced apoptosis: lack of inhibition by Bcl-2 over-expression // *FEBS Lett.* - 1995. - Vol.365. -P. 66-70.
- 2 Бисенбаев А.К., Тауров М.М., Берсимбаев Р.И.. Участие синтеза белка и стимулирующего действия гибберелловой кислоты на секрецию амилазы из изолированного алейронового слоя зерна пшеницы // *Биохимия.* – 1992. – Т. 57, вып.12. - С. 1834-1840.
- 3 Michel H., Cornelius L., and Bernhard G. Chloroplast Membrane Photostability in chlP Transgenic Tobacco Plants Deficient in Tocopherols. *Plant Physiol.* Vol. 132, 2003
- 4 Melan MA, Dong X, Endara ME, Davis KR, Ausubel FM, Peterman TK (1993) An Arabidopsis thaliana lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* Vol101: P 441–450
- 5 Bethke P. C., Schuurink R and Jones R. L., Hormonal signaling in cereal aleurone // *J. Exp. Bot.* – 1997. - Vol. 48. - P. 13337-13356.
- 6 Bosnes M., Wedeman F. and Olsen O.A. Endosperm differentiation in barley wild-type and sex mutations//*plant J.* - 1992.- Vol.2. - P.661-674.

Тұжырым

Бидай дәнінің өніп-өсуі барысында липоксигеназаның төрт типі анықталды. Липоксигеназаның бұл типтері каталитикалық рН оптимумына және бидай дәнінің өсуі барысындағы белсенділіктері бойынша сипатталады. Нейтральді және сілтілік рН мәнінде ГҚ әсерінен липоксигеназа ферментінің белсенділігі жоғарлайтындығы байқалған. Бұл фитогормонның әсері малон диальдегидінің жинақталуын күшейтетінін көрсетті. Бұл модельді жүйеде АБК керісінше липоксигеназа активтілігін жән малон диальдегидінің жинақталуын төмендететіндігі анықталды. Бидай алейрон клеткаларында оттегі радикалдар генерациясында липоксигеназа ферментінің және липидтердің асқын тотығуының маңызды рөл атқаратындығы туралы болжам жасалынды.

Summary

It has been shown the presence of four types of lipoxygenases during the germination of wheat seeds. Those enzyme types have been characterized according to their catalytic pH optimum, and the activation pattern during germination. It has been shown, that in aleurone cells the activity of lipoxygenases with neutral and basic pH is enhanced under the action of GA. This action of this phytohormone has been accompanied by malone dialdehyde accumulation. The action of ABA in this model system has been conversely directed towards lipoxygenase activity suppression. The important role of lipoxygenases and lipide peroxidation in generation of oxygen radicals in wheat seed aleurone cells has been suggested.

С помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле определено, что в состав липидов молока C. bactrianus, C. dromedarius и их гибридов входят фосфолипиды, стеролы, свободные жирные кислоты и триацилглицеролы. В процессе брожения верблюжьего молока и его превращения в шубат появляются дополнительные фракции, находящиеся около стеролов и фосфолипидов.

Род *Camelus* включает три вида верблюдов, из которых в Казахстане разводят два: *Camelus bactrianus* и *Camelus dromedarius*. Порой эти виды животных содержатся на одних и тех же фермах, что позволяет сравнить состав молока в одинаковых условиях содержания. Были проведены работы по исследованию физико-химического состава молока верблюдиц разных пород в зависимости от внешних факторов, из которых ясно, что внешние факторы значительно влияют на данные показатели [1-3]. Содержание лактоферрина и иммуноглобулинов верблюжьего молока и шубата в зависимости от сезона года, вида животных и мест разведения данных животных не полностью объясняют лечебных свойствах верблюжьего молока [4].

В данной работе исследованы изменения липидного состава жира верблюжьего молока и шубата в зависимости от вида животного и сезон года с целью выяснения их роли в проявлении биологической активности верблюжьего молока и шубата.

Материалы и методы

Данная работа была выполнена в рамках проекта ECONET 2004-2006 гг. Объектом исследования биохимического и физико-химического состава молока здоровых животных служили пробы верблюжьего молока и шубата из хозяйств Южно-Казахстанской области.

Для исследования липидного состава молока взяты пробы верблюжьего молока *C.bactrianus* n=11, *C.dromedaries* n=10, гибриды n=3, сборного молока n=3 и шубата n=4. Забор проб верблюжьего молока и шубата был проведен на хозяйствах Южно-Казахстанской области n=11, были взяты пробы из Алматинской n=10, Атырауской n=6 и Кызыл-Ординской n=4 областей. Пробы брали в течение года: зимой n=8, весной n=7, летом n=8, осенью n=8.

Пробы молока и шубата после отбора, замораживались и хранились при 20°C во время перевозки до выполнения анализов.

Выделение липидов молока. 50-60 мл молока нагревали до 40°C, гомогенизировали 10 минут с помощью ультразвука и 10 минут на автоматической мешалке [5, 6]. Из полученного гомогенного молока выделяли липиды с помощью экстрагирования. Для экстрагирования к 10 мл молока добавляли 1 мл 30% аммиака и 10 мл 80% этанола. Смесь переносили в делительную воронку, добавляли 20 мл гексана и 20 мл петролейного эфира, перемешивали, органическую фазу сливали, водную фазу 3 раза повторно экстрагировали гексаном. Выделенные липиды хранились в гексане при 4°C. Аналогично проводили экстракцию молочного жира из шубата.

Раствор выделенного молочного жира в гексане, примерная концентрация от 10 до 15 мг/мл, перед проведением анализов отфильтровывали через специальный гидрофобный фильтр (hydrophobic 0,45µm, Millipore). Пробы наносили на силикагелевую пластинку (№ref: 1.056260001 Legallais) с помощью автоматического прибора «GAMAG LINOMAT 5» в заранее запрограммированном режиме. Общий объем наносимого образца исследования составил 20 мкл. Основная схема нанесения на силикагелевые пластины была следующей: расстояние от стартовой позиции 15 мм, расстояние нанесения – 11,2 мм, расстояние между пробами – 10 мм, объем исследуемых образцов – 20 объем мкл.

Качественный анализ липидов тонкослойной хроматографией. Хроматографию проводили в системе гексан - этиловый эфир - ледяная уксусная кислота (70:30:1). Систему из трех растворителей готовили непосредственно перед анализом. Для проявления липидов хроматограмму опрыскивали 5% раствором медного купороса в концентрированной серной кислоте, обжигали в муфельной печи в течение 15 минут.

Для идентификации липидов молока на пластинке использованы следующие растворы эталонов: триолеиновая кислота (частотой ≥97%), из Biochemika 92860 Fluka, олеиновая кислота (C₁₈H₃₄O₂), MW 282,47, ХЧ), растительное масло из Ensayo fruta hibrido, фосфотидилхолин из Sigma grade чистота - 99%, холестерол из Sigma grade, чистота - 99%.

Результаты и их обсуждение

Зоны отбора проб верблюжьего молока и шубата. Пробы молока взяты от отдельных верблюдиц каждой фермы. «Сборное» молоко – молоко, полученное после дойки всего стада и его сбора в общую емкость. Индивидуальные пробы молока были получены от *C.bactrianus*, *C.dromedarius* и их гибридов.

Исследование качественного состава липидов верблюжьего молока и шубата. Из 53 образцов верблюжьего молока были отобраны 8 типичных образцов, которые были обозначены как М1, М2, М3, М4, М5, М6, М7 и М8. Было рассмотрено влияние низкой температуры на изменение липидного состава образцов молока верблюдиц. Для этого из 8 образцов верблюжьего молока Южно-Казахстанской области взято 4 свежих, не замороженных образца (М1, М6, М7, М8), и 4 замороженных (М2, М3, М4, М5) образца. Из 12 проб шубата для качественного анализа липидов взято 5 образцов.

Для предположительной идентификации фракций липидов верблюжьего молока и шубата использовали следующую формулу:

$$R_f = \frac{a}{b},$$

где а – расстояние от стартовой линии до фронта движения полярной фазы;

б – расстояние от стартовой линии до центра соответствующего пятна, образуемого исследуемой смесью.

В зависимости от подвижности составных компонентов липидов (верблюжьего молока и шубата на силикагелевой пластинке) были получены следующие фракции: фосфолипиды, стеролы, жирные кислоты и триацилглицеролы.

В результате анализов в некоторых образцах обнаружены дополнительные не идентифицированные фракции. Ниже эти фракции будут разделяться по величинам R_f (таблица 1).

Таблица 1 – R_f величины фракций липидов верблюжьего молока

Фракции	R_f											
	Молоко								Стандарты			
	М1	М2	М3	М4	М5	М6	М7	М8	ФЛ	СТ	СЖК	ТАГ
1	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	0,19	0,20	0,25	0,23	0,23	0,23	-	-	-	-	-
4	0,35	0,35	0,34	0,36	0,43	0,37	0,43	0,37	-	0,35	-	-
5	-	-	-	-	-	0,40	0,40	-	-	-	-	-
6	-	0,47	-	-	0,47	0,47	0,47	-	-	-	0,47	-
7	0,88	0,87	0,78	0,88	0,85	0,86	0,88	0,88	-	-	-	0,88

Примечание: ФЛ – фосфолипиды, СТ – стеролы, СЖК – свободные жирные кислоты, ТАГ – триацилглицеролы

В составе липидов не замороженного молока М1, М6, М7 и М8 в основном присутствуют фосфолипиды, стеролы и триацилглицеролы. Схожую картину липидного состава имеют образцы: М1 и М8; М6 и М7. В данных образцах свободные жирные кислоты были обнаружены в М6 и М7, а в М1 и М8 отсутствовали.

При исследовании замороженных образцов М2 и М5, выявлено, что липидный состав представлен фосфолипидами, стеролами, свободными жирными кислотами и триацилглицеролами. При использовании неполярных растворителей для миграции липидов фосфолипиды остаются на стартовой позиции неподвижными. В образцах молока М3 и М4 отсутствуют свободные жирные кислоты. Между фракциями стеролов и фосфолипидов во всех замороженных образцах наблюдаются не идентифицированные липиды (фракция №3).

Далее представлена аналогичная таблица по идентификации липидных фракций шубата (таблица 2). Как видно из таблицы 2, во всех образцах шубата содержатся: фосфолипиды, стеролы, свободные жирные кислоты и триацилглицеролы.

Таблица 2 - R_f величины фракций липидов шубата

Фракции	R_f									
	Шубат					Стандарты				
	Ш1	Ш2	Ш3	Ш4	Ш5	ФЛ	СТ	СЖК	ТАГ	
1	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	-	-	-	
2	0,10	0,10	-	0,08	0,10	-	-	-	-	
3	-	0,23	0,23	0,23	0,22	-	-	-	-	
4	0,35	0,35	0,36	0,37	0,35	-	0,35	-	-	
5	0,40	-	0,39	0,40	0,38	-	-	-	-	
6	0,48	0,46	0,47	0,47	0,48	-	-	0,47	-	
7	0,87	0,85	0,86	0,88	0,86	-	-	-	0,88	

Образец исследованного шубата Ш1 между фракциями стеролов и фосфолипидов присутствует не идентифицированная фракция. Данная фракция расположена значительно ближе к фосфолипидам и имеет значение $R_f = 0,10$. Аналогичная фракция обнаружена в образцах шубата Ш2, Ш4 и Ш5. Кроме того, в образцах шубата Ш2, Ш3, Ш4 и Ш5 замечена не идентифицированная фракция, расположенная над фракцией стеролов, которая имеет величину $R_f = 0,23$.

Образец шубата Ш2 отличается от других проб отсутствием не идентифицированной фракции ($R_f = 0,40$), которая мигрирует между стеролами и свободными жирными кислотами. Отметим, что эта фракция присутствует в образцах других шубатов. Значение R_f не идентифицированной фракции №5 для образцов Ш1, Ш4 равно 0,40; Ш3 – 0,39; Ш5 – 0,38.

Известно [7,8], что наличие свободных жирных кислот в шубате обуславливает его лечебный эффект, обусловленный легкой доступностью жирных кислот и других промежуточных продуктов гидролиза глицеролов и стеролов. Жирные кислоты связывают свободные радикалы в тканях, тем самым предотвращая опасное окисление мембранных липидов.

Триацилглицеролы молочного жира коровьего молока в основном состоят из смеси глицеролов. Они составляют 98-99% липидов молока, диацилглицеролы содержатся около 1%, моноацилглицеролы – 0,02% [9].

В результате тонкослойной хроматографии на силикагеле показано, что составы липидов свежего и замороженного молока сходны в содержании общих компонентов, таких как фосфолипиды, стеролы и триацилглицеролы; в то же время в образцах замороженного верблюжьего молока выявлено присутствие свободных жирных кислот. Анализируя не идентифицированные фракции, можно предположить, что фракция №2 соответствует моноацилглицеролам ($R_f = 0,10$), фракция №3 – 1,2- или 1,3-диацилглицеролам ($R_f = 0,19-0,25$), №5 – производным стеролам ($R_f = 0,38-0,40$). Однако такие предположения требуют дополнительных исследований и подтверждения другими методами исследования.

По данным таблицы 1 следует, что первая фракция во всех образцах верблюжьего молока и шубата по эталону соответствует фосфолипидам, находится на стартовой позиции хроматограммы, значения R_f соответствует 0,04 и 0,05.

В свежем молоке присутствуют липолитические ферменты, которые обладают определенной активностью в молоке. Липолитические ферменты гидролизуют липиды на промежуточные компоненты, которые играют важную биологическую и физиологическую роль в живом организме. Содержание и активность этих ферментов в сыром молоке в основном зависят от зоотехнических факторов, условий получения и транспортировки молока. Отметим, что природа этих ферментов как нативная, так и микробная.

При замораживании молока многие из этих липолитических ферментов дезактивируются. Однако, несмотря на замораживание, в образцах молока наблюдается частичный гидролиз липидов. Известно [8,9], что при этом создаются благоприятные условия для развития флуоресцирующих бактерий, которые продолжают гидролиз липидов молока.

Качественный состав липидов верблюжьего молока и шубата проводили методом тонкослойной хроматографии. Во многих литературных источниках имеется информация о коровьем, овечьем и козьем молоке [10,11,12,13].

Сравнительный анализ влияния температуры на состав липидов молока показал наличие не идентифицированных фракций, которые являются продуктами частичного гидролиза липидов. Таким образом, в образцах свежего молока выявлены подфракции гидролиза липидов молока, свидетельствующие об активности липолитических ферментов. В образцах замороженного молока отмечаются дополнительные продукты распада липидов, что обусловлено активностью бактерий при низкой температуре.

В результате проведения тонкослойной хроматографии на силикагеле определено, что в состав липидов молока *C. bactrianus*, *C. dromedarius* и их гибридов входят фосфолипиды, стеролы, свободные жирные кислоты и триацилглицеролы. В процессе брожения верблюжьего молока и его превращения в шубат появляются дополнительные фракции, находящиеся около стеролов и фосфолипидов.

Литература

1. Конуспаева Г.С., Нармуратова М.Х., Серикбаева А.Д., Иващенко А.Т., и др. Сравнительное изучение физико-химических параметров молока *Camelus bactrianus* и *Camelus dromedarius* Алматинской и Атырауской областей // Вестник Павлодарского университета. Биологические науки Казахстана, Научный журнал Павлодарского государственного педагогического института, - 2006. - №1-2, 95-104.
2. Нармуратова М.Х., Конуспаева Г.С., Мелдебекова А.А., Иващенко А.Т. Изучение физико-химического состава верблюжьего молока Южно-Казахстанской области // Вестник КазНУ, сер. биологическая, 2008 г., №1, 176-178.
3. B. Faye, G. Konuspayeva, S. Messad, G. Loiseau. Discriminant milk components of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*), dromedary (*Camelus dromedarius*) and hybrids // Journal of Dairy Science and Technology. 88 (2008), DOI: 10.1051/dst:2008008, 607-617.
4. G. Konuspayeva, B. Faye, G. Loiseau, D. Leveix. Lactoferrin and Immunoglobulin content in camel milk (*C. bactrianus*, *C. dromedarius* and hybrids) from Kazakhstan // Journal of Dairy Sciences. 2007, 90, 38-46.