

ENZIMATIC ANTIOXIDANTS IN RAW COW MILK

Dimitar Nakov

Faculty of Agricultural Sciences and Food, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Republic of North Macedonia, nakovd@fzh.ukim.edu.mk

Metodija Trajchev

Faculty of Agricultural Sciences and Food, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Republic of North Macedonia, metot@fzh.ukim.edu.mk

Valentina Velkoska Nakova

Clinical Hospital – Stip, Republic of North Macedonia, University "Goce Delcev", Faculty of Medical Science in Stip, Republic of North Macedonia, valentina.velkovska@ugd.edu.mk

Jasmina Stojiljkovic

Academy of Technical and Educational Professional Studies in Nis, Department of Food Technology – section Vranje, Republic of Serbia, jasmina.stojiljkovic@visokaskola.edu.rs

Abstract: Dairy cows' experience a drastic change in metabolism after parturition that can lead to oxidative stress. Lipid auto-oxidation in milk is affected by a complex interplay of prooxidants and antioxidants. Several of these compounds are also important nutrients in the human diet and may have other physiological effects. Among the others, antioxidative enzymes superoxid dismutase (SOD) and glutathion peroxidase (GPx) have important role in milk antioxidative capacity. The two years prospective study was carried out to assess the changes occurring in the milk activity of antioxidant enzymes SOD and GPx in two physiological periods: period from beginning of lactation until 21st day in lactation and period from 22nd to 42nd day in lactation. Totally, there were followed 211 cows allocated in groups regarding the season of calving. Determination of the enzyme activity was assayed on milk serum by using spectrofotometric methods. The average activity of SOD in period from beginning of lactation until 21st day in lactation was 91.67 ± 7.927 mU/mg proteins, than decreasing to 90.89 ± 8.526 mU/mg proteins in the second physiological period from 22nd to 42nd day in lactation. The average activity of GPx in period from beginning of lactation until 21st day in lactation was 231.90 ± 12.133 mU/mg proteins, than increasing in the period from 22nd to 42nd day in lactation (236.16 ± 13.175 mU/mg proteins). Physiological stages in early lactation when milk samples were taken didn't have statistical significant influence on SOD and GPx activity in milk. The activity of SOD and GPx in milk statistically significant ($p < 0.001$) differed between season years of calving. The highest statistical significant difference in the activity of SOD in milk was found in the summer and fall seasons in second year of survey compared with other seasons. Regarding the GPx activity in milk there was statistical significant differences between all seasons of years. The test day milk yield had statistical significant influence on GPx activity in milk but this factor didn't have statistical significant influence on SOD activity. There was statistically significant positive correlation between the activity of GPx and SOD in the milk samples. The SOD/GPx ratio in milk has important role in the balance of reactive oxidative metabolites in milk.

Keywords: antioxidant enzymes, dairy cows, milk

АНТИОКСИДАТИВНИ ЕНЗИМИ ВО СУРОВОТО КРАВЈО МЛЕКО

Димитар Наков

Факултет за земјоделски науки и храна, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Република Северна Македонија, nakovd@fzh.ukim.edu.mk

Методија Трајчев

Факултет за земјоделски науки и храна, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Република Северна Македонија, metot@fzh.ukim.edu.mk

Валентина Велкоска Накова

Клиничка болница – Штип, Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, Република Северна Македонија, valentina.velkovska@ugd.edu.mk

Јасмина Стојиљковиќ

Академија за техничко-воспитни стручни студии во Ниш, Оддел за технологија на храна – Врање, Република Србија, jasmina.stojiljkovic@visokaskola.edu.rs

Резиме: Во периодот на рана лактација во организмот на млечните крави настануваат важни метаболички промени кои може да доведат до појава на оксидативен стрес. Автооксидацијата на мастите во млекото е детерминирана од комплексната интеракција на прооксидантите и оксидантите присутни во млекото. Некои од овие состојки се важни хранителни материји во исхраната на луѓето, а имаат и физиолошка активност. Меѓу останатите, антиоксидативните ензими супероксид дисмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GPX) имаат важна улога во антиоксидативниот капацитет на млекото. Направени се двегодишни проспективни истражувања за утврдување на промените во активноста на антиоксидативните ензими SOD и GPX во два физиолошки периоди на раната лактација: периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација и периодот од 22. до 42. ден во лактација. Вкупно беа следени 211 млечни крави по сезони во годините на телење. Одредувањето на активноста на антиоксидативните ензими беше направена во млечниот серум со користење на спектрофотометриски методи. Просечната активност на SOD во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација изнесуваше $91,67 \pm 7,927$ mU/mg протеини, а потоа се забележуваше тренд на опаѓање на активноста во периодот од 22. до 42. ден во лактација и изнесуваше $90,89 \pm 8,526$ mU/mg протеини. Просечната активност на GPX во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација изнесуваше $231,90 \pm 12,133$ mU/mg протеини, а потоа се забележуваше тренд на зголемена активност во периодот од 22. до 42. ден во лактација и изнесуваше $236,16 \pm 13,175$ mU/mg протеини. Периодот во лактација кога се земани примероците од млеко не покажа статистички значајно влијание врз активноста на SOD и GPX. Активноста на SOD и GPX статистички високо значајно варираше меѓу сезоните во годините на телење кога се направени истражувањата ($p < 0,001$). Највисока статистички значајна разлика во активноста на SOD во млекото беше утврдена во сезоните лето и есен во втората година на телење на кравите споредено со останатите сезони на телење. Активноста на GPX во млекото статистички значајно се разликуваше меѓу сите сезони во годините на телење на кравите. Млечноста на кравите во деновите кога се вршеше млеко-контрола имаше статистички значајно влијание врз активноста на GPX но немаше статистички значајно влијание врз активноста на SOD. Постоеше статистички значајна позитивна корелација меѓу активноста на SOD и GPX во пробите млеко. Соодносот на SOD/GPX активност во млекото има важна улога во регулирање на рамнотежа меѓу продукцијата на реактивните кислородни радикали и нивната инактивација во млекото.

Клучни зборови: антиоксидативни ензими, млечни крави, млеко

1. ВОВЕД

Во периодот три недели пред телење и периодот три недели по телењето, млечните крави се изложени на големи физиолошки промени и метаболички стрес кои се под контрола на ендокринолошкиот систем. Интензивните метаболички процеси имаат зголемени потреби за кислород што предизвикува нарушена редокс-хомеостаза. Ова придонесува за зголемено создавање на реактивни оксидативни метаболити (РОМ) и појава на оксидативен стрес. Оксидативниот стрес се дефинира како нарушена рамнотежа меѓу продукцијата на реактивните кислородни радикали и антиоксидативниот капацитет на клеточно или индивидуално ниво (Valko et al, 2007). Присуството на слободните оксидативни радикали во организмот во високи концентрации има штетно, односно токсично дејство. Интеракцијата на прооксидантите и антиоксидантите во живите организми го детерминира биолошкиот редокс-статус кој се нарушува при состојбите на оксидативен стрес. Антиоксидантите се дефинираат како супстанции кои го превенираат или санираат оксидативното оштетување на молекулите и овозможуваат одржување на хомеостазата на организмот (Chauhan et al, 2014). Како индикатори за одредување на антиоксидативниот капацитет на крвната плазма, крвниот серум и млекото најчесто се користат: способноста на плазмата за редуцирање на железото, нивото на α -токоферолот, β -каротенот, витаминот Ц, витаминот Е и селенскиот статус во крвната плазма, активноста на ензимите на оксидативен стрес, како глутатион пероксидазата, супероксид дисмутазата, каталазата и параоксоназата.

Оксидативната стабилност на млекото претставува рамнотежа меѓу прооксидативните и антиоксидативните фактори. Досега се откриени голем број нискомолекуларни супстанции со антиоксидативно дејство, како што се: аскорбатите, глутатионот, уратите, α -токоферолот (Cichosz, Czczot, Ambroziak & Bielecka, 2017). Доколку во млекото се исцрпи присуството на овие нискомолекуларни антиоксиданси, тогаш оксидацијата на мастите се забрзува и тешко се контролира. Покрај нив, во млекото, како дел од ензимскиот антиоксидативен систем на организмот се присутни и антиоксидативни ензими (каталаза, супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза). Тие активно учествуваат во редуцијата на оксидативните радикали (Lindmark-Mansson & Akesson, 2000). Сепак, нивната важност и релативното учество во оксидативната стабилност на млекото сè уште не е до крај разјаснета. Главна цел на направеното истражување беше да се одреди ензимскиот антиоксидативен статус во млекото на млечните крави во периодот на рана лактација и

да се утврди влијанието на некои генетски и парагенетски фактори врз активноста на антиоксидативните ензими, супероксид дисмутаза и глутатион пероксидаза, во млекото.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Истражувањата направени во овој труд се двегодишни проспективни. Во тој период спроведено е континуирано следење на млечноста на кравите вклучени во истражувањето. При тоа, направени се повторливи мерења за утврдување на промените во активноста на антиоксидативните ензими SOD и GPX во два физиолошки периоди на раната лактација: периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација и периодот од 22. до 42. ден во лактација. Вкупно беа следени 211 млечни крави по сезони во годините на телење. Групите крави беа формирани по сезони на телење, зависно од очекуваниот датум на телење, во текот на две календарски години (година 1 и 2), и тоа: сезона 1 - пролет (март, април и мај), сезона 2 - лето (јуни, јули и август), сезона 3 - есен (септември, октомври и ноември) и сезона 4 - зима (декември, јануари и февруари). Освен тоа, во текот на обсервираниот период, кај секоја опитна крава беше мерена дневната млечност во тест денот (ТДМ) при првата (1), втората (2) и третата (3) контрола на млеко.

Активноста на ензимите супероксид дисмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GPx) беше одредувана во млечниот серум. Млечниот серум беше добиван од пробите млеко кои се земаа посебно од секоја опитна крава во групата, во чисти пластични и соодветно обележани епрувети на 21. и 42. ден во лактација. Пробите млеко од четвртинките на млечни жлезди беа земен како една, збирна проба. Земените проби се центрифугираа на 4°C на 5000 вртежи во минута, за време од 20 минути. По завршеното центрифугирање, на површината се издвојуваше липиден слој, а под него остануваше течна фракција која всушност беше обезмаслено млеко. Во епруветата со обезмасленото млеко со титрирање се додаваше 1M HCl до pH = 4,6, односно до изоелектричната точка на казеинот кога настанува негова преципитација. По ова, пробата повторно беше центрифугирана на 4°C на 5000 вртежи во минута, за време од 20 минути. По центрифугирањето, на дното од пластичната епрувета се формираше преципитат на казеинот, а над него остануваше супернатантот, односно млечниот серум. Млечниот серум, потоа беше префрлуван во друга чиста пластична епрувета. За да се врати pH-вредноста на добиениот млечен серум на неутралната вредност (pH=7,6), во епруветата со млечниот серум со титрирање се додаваше 1M NaOH. Вака добиениот млечен серум се издвојуваше во епендорфи кои се чуваа на температура од -80°C, сè до вршењето на анализите, но не подолго од 2 месеци. Активноста на супероксид дисмутаза (SOD) во млечниот серум беше одредувана со помош на индиректниот кинетички метод базиран врз истражувањата на Gao, Yuan, Zhao & Gao (1998), модифициран за изведување во микротитарска плоча (Trajchev, Nakov & Gjorgoski, 2016). Овој метод ја користи автооксидацијата на пиригалолот во алкална средина под дејство на супероксидните радикали, овозможувајќи спектрофотометриска визуелизација на активноста на SOD. Активноста на глутатион пероксидазата (GPx) во млечниот серум беше одредувана со помош на индиректниот кинетички метод базиран врз истражувањата на Chen, Lindmark-Mansson & Akesson (2000), модифицирана за изведување во микротитарска плоча (Trajchev, Nakov & Gjorgoski, 2016). Накратко, GPx ја катализира редуцијата на слободниот водороден пероксид (H₂O₂) во вода (H₂O), додека органските пероксиди (R-O-O-H) ги редуцира до соодветен стабилен алкохол (R-OH) употребувајќи го глутатионот (GSH) како извор на редуциран еквивалент. Со цел одредување на специфичната активност на ензимите глутатион пероксидаза и супероксид дисмутаза изразена како mU/mg протеини, беа одредени вкупните протеини во пробите млечен серум. Вкупните протеини беа одредени со помош на колориметриски метод базирана врз принципот на Биуретната реакција (Josephson & Gyllensard, 1957).

За анализа на специфичната активност на SOD и GPx во млечниот серум на кравите беше користен Мултиваријантниот Општ линеарен модел. Беа оценети и средните вредности за факторите вклучени во моделот, преку тестирање на нивните разлики (Post Hoc анализа) со користење на тестот Бонферони (Bonferroni). Меѓусебната зависност на специфичната активност на SOD и GPx во млечниот серум на кравите беше проверена преку Пирсоновиот коефициент на корелација.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Просечната вредност за млечноста на крави во текот на истражувањето, зависно од сезоната на телење е прикажана во Табела 1.

Табела 1. Млечност на кравите зависно од сезоната на телење (kg)

Сезона_година	n	ТДМ_1	ТДМ_2	ТДМ_3
		$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
1_1	24	29,79±1,704	28,82±1,266	28,50±1,018
2_1	26	29,83±0,804	28,92±0,899	27,22±0,935
3_1	18	24,07±1,100	24,90±1,151	23,48±0,756
4_1	22	31,24±0,689	30,07±0,645	28,06±0,726
1	90	28,77±0,645	28,17±0,541	26,67±0,464
1_2	35	31,99±1,050	29,48±1,028	26,60±1,150
2_2	20	21,01±1,503	25,02±1,528	23,39±2,071
3_2	39	24,39±1,106	27,39±1,118	28,46±1,001
4_2	27	35,47±1,806	32,95±1,592	33,52±1,392
2	121	28,78±0,847	29,14±0,693	28,84±0,719
Вкупно	211	28,76±0,572	28,79±0,472	28,15±0,485

Kolb & Seehawer (2000) истакнуваат дека потребата во кислород на кравите со висока продукција на млеко е за двапати поголема во однос на помалку млечните крави со што имаат поголем ризик да влезат во фаза на високо ниво на оксидативен стрес. Воспалителните процеси во млечната жлезда и намалената антиоксидативна заштита на жлезденото ткиво доведуваат до оштетување на лактоцитите и трајно нарушување на нивната функција (Ibrahim, El-seedy & Goma, 2016). Ова на крај резултира со намалување на продукцијата на млеко. Млекото со зголемен број соматски клетки е поподложно на процесите на липолиза и пероксидација. Витаминот Ц и селенот вклучени во исхраната на кравите ја штитат млечната жлезда од акутни инфекции при кои доаѓа до бурен полиморфонуклеарен одговор (Ata & Zaki, 2014).

Резултатите за специфичната активност на ензимот SOD и GPx во млекото на испитуваната популација млечни крави, зависно од сезоната на телење и периодот во лактација кога се земани пробите млеко, се прикажани во Табела 2. Согласно добиените резултати, со почетокот на лактацијата беше евидентирана зголемена активност на антиоксидативните ензими. Ова најверојатно се должи на забрзаната продукција на РОМ, како резултат на оксидативните и воспалителните процеси во млечната жлезда.

Табела 2. Специфична активност на SOD и GPx во млекото (mU/mg протеини)

Сезона_година	Период во лактација	n	SOD	GPx
1_1	21.	24	58,35±8,426	97,04±9,304
	42.		44,21±7,270	108,94±16,178
2_1	21.	26	54,92±8,095	533,65±27,101
	42.		28,07±4,946	642,53±33,020
3_1	21.	18	28,76±4,324	284,49±40,295
	42.		35,06±5,224	206,42±20,254
4_1	21.	22	23,71±3,638	383,08±23,046
	42.		19,30±2,379	320,59±24,355
1	21.	90	42,98±3,786	330,58±21,630
	42.		31,63±2,821	334,32±25,578
1_2	21.	35	65,08±14,683	154,34±13,127
	42.		61,36±15,871	171,39±19,105
2_2	21.	20	222,40±53,622	262,76±29,574
	42.		133,56±36,018	182,88±17,228
3_2	21.	39	156,22±18,115	119,13±5,310
	42.		195,85±28,309	144,13±11,499
4_2	21.	27	98,39±11,364	143,54±23,376
	42.		144,91±20,453	165,27±15,639
2	21.	121	127,89±12,579	158,50±9,268
	42.		134,96±13,397	163,14±8,043
Вкупно	21.	211	91,67±7,927	231,90±12,133
	42.		90,89±8,526	236,16±13,175

За првпат, присуството на SOD во млекото од крави било изнесено од Hicks, Korycka-Dahl & Richardson (1975), кои истакнале дека ензимот игра важна улога во оксидативната стабилност на млекото. Holbrook & Hicks (1978) го потенцирале значењето на антиоксидативните ензими за стабилноста на млекото. Некои автори ја потенцираат позитивната поврзаност помеѓу NAG-азата (N-acetyl-β-D-glucosaminidasa) и GPx во млекото, како ензими кои учествуваат во воспалителните процеси, со напомена дека улогата на GPx не е до крај дефинирана (Fox & Kelly, 2006). Berry & Meaney (2006) истакнуваат дека улогата на GPx е во заштитата на жлезденото ткиво на млечната жлезда, но и на новородените животни од деструктивното дејство на POM и намалувањето на интензитетот на оксидативниот стрес. Понатаму, промените во физиолошкиот сооднос на ензимите SOD и GPx има значаен ефект на клеточната резистентност спрема оксидативното оштетување и уништување. Според Andrei et al (2010), активноста на SOD во млекото на здрави крави изнесувала 1,044±0,17 U/ml, додека во млекото на крави заболени од мастит изнесувала 1,066±0,15 U/ml. Andrei et al (2011) забележале повисока активност на GPx во млекото од крави со нарушена секреција на млечната жлезда во споредба со здравите крави. Според Yang et al (2011), активноста на GPx во нормалното млеко изнесувала 32,8±1,41 U/ml. Во истражувањето на Hamed, El Feki & Ahmed (2008), пресметаната активност на GPx во млекото изнесувала 33,02 U/g протеини, при што била утврдена позитивна корелација меѓу активноста на ензимот и вкупниот број на соматски клетки во млекото, особено со неутрофилите. Истите автори заклучиле дека слободните радикали формирани во млекото со зголемен број на соматски клетки, всушност се водороден пероксид, за чија неутрализација е потребен GPx. Затоа, концентрацијата и активноста на GPx во млекото го детерминира степенот на заштита на млечната жлезда од оксидативен стрес. Притоа, не била утврдена корелација меѓу активноста на ензимот GPx и SOD во млекото. Во табела 3 се прикажани резултатите од статистичкиот модел за влијанието на фиксните фактори на активноста на SOD и GPx во млекото.

Табела 3. Регресионен статистички модел за влијанието на сезоната на телење на кравите, периодот во лактација и млечноста врз активноста на SOD и GPx во млекото

Fixed variable	df	SOD ^a	GPx ^b
Модел ^{a,b}	10	40.948***	185.432***
Сезона година	7	16.206***	79.816***
Период во лактација	1	0.116 ^{NS}	1.711 ^{NS}
ТДМ	1	0.440 ^{NS}	4.647*
Грешка	288		
Вкупно	298		
^a R ² = 0.587; ^b R ² = 0.866			

***статистички значајно на ниво p<0,001; *статистички значајно на ниво p<0,05; ^{NS}несигнификантно

Единствено, сезоната на телење во годините кога се направени истражувањата покажа статистички значајно влијание на активноста на SOD и GPx во млекото, на ниво p<0,001. При тоа, забележителна беше големата статистички значајна разлика (p<0,05) во специфичната активност на ензимот SOD во млекото меѓу сезоните лето и есен во втората година на истражување и останатите сезони во текот на истражувањето. Активноста на GPx во млекото статистички значајно се разликуваше меѓу сите сезони во годините на телење на кравите. Млечноста на кравите во тест денот при месечните контроли на млеко покажаа статистички значајно влијание на активноста на SOD и GPx на ниво p<0,05. Останатите испитувани фактори не покажаа статистичка значајно влијание на активноста на SOD и GPx во млекото на испитуваните крави. Во однос на активноста на двата ензима, постоеше мала но статистички значајна позитивна корелација (p<0,01) меѓу активноста на GPx во млечниот серум и SOD во млечниот серум на кравите (r=0,172).

Според Bernabucci, Ronchi, Lacetera & Nardone (2002) кравите отелени во лето имаат повисок степен на липидна пероксидација и зголемена активност на SOD и GPx во еритроцитите во споредба со кравите отелени во сезоната пролет. Albera & Kankofer, (2010) докажале дека постојат динамички промени во антиоксидативниот профил на крвта, колостралното млеко и млекото, што претставува соодветен одговор на организмот да ја воспостави нарушената редокс рамнотежа на почетокот од лактацијата. Abuelo, Perez-Santos, Hernandez & Castillo (2014) истакнуваат дека колостралното млеко поседува висок антиоксидативен капацитет што ја штити млечната жлезда и новороденото животно од манифестирање на оксидативен стрес, со што придонесува за пониска смртност и подобар раст на младите.

4. ЗАКЛУЧОК

Оксидативниот стрес во млечната жлезда се должи на формирањето на водороден пероксид како резултат од активноста на имунолошките клетки. Затоа, зголемениот број на соматски клетки во млекото не индицира зголемена активност на SOD, како прва антиоксидативна бариера, и нема потреба од негова интервенција. Всушност, супероксидните радикали (O_2^-) во млекото немаат потреба од дисмутација, туку тие играат важна улога на сигнални молекули во воспалителната реакција. Затоа, најодговорен антиоксидативен ензим во млекото, одговорен за редуцирање на водородниот пероксид и неутрализација на оксидативниот стрес претставува GPx. Антиоксидативниот систем SOD/GPx е присутен во кравјото млеко и може да се активира во случаите на акутен оксидативен стрес, кога во млечната жлезда ќе се акумулира голема концентрација на оксидативни радикали, особено во преодниот период кај кравите, од стелност кон лактација.

ЛИТЕРАТУРА

- Abuelo, A., Perez-Santos, M., Hernandez, J. and Castillo, C. (2014). Effect of colostrums redox balance on the oxidative status of calves during the first 3 months of live and the relationship with passive immune acquisition. *Veterinary Journal* 199: 295-299.
- Albera, E. and Kankofer, M. (2010). The Comparison of Antioxidative/Oxidative Profile in Colostrum, Milk and Blood of Early Post-Partum Cows During their First and Second Lactation *Reprod Dom Anim* 45, pg. 417-425.
- Andrei, S., Matei, S., Zinveliu, D., Pintea, A., Bunea, A., Ciupe, S., Groza, I. (2010). Correlations between antioxidant enzymes activity and lipids peroxidation level in blood and milk from cows with subclinical mastitis *veterinary medicine* 67(1), pg. 6-11.
- Andrei, S., Matei, S., Fit, N., Cernea, C., Ciupe, C., Bogdan, S. and Groza, I.S. (2011). Glutathione peroxidase activity and its relationship with somatic cell count, number of colony forming units and protein content in subclinical mastitis cows milk. *Rom. Biotech. Lett.* Vol. 16, 3: pg. 6209-6217.
- Ata, N. and Zaki, M.S. (2014). New Approaches in Control of Mastitis in Dairy Animals. *Life Science Journal*, 11: 275-277.
- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N. and Nardone, A. (2002). Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *J. Dairy Sci.* 85: pg. 2173-2179.
- Berry, D.P., and Meaney, W.J. (2006). Interdependence and distribution of subclinical mastitis and intramammary infection among udder quarters in dairy cattle *Prev. Vet. Med.* 75, pg. 81-91.
- Chauhan, S.C., Celi, P., Eric N.P., Brian, J.L., Fan Liu, F. and Dunshea, F.R. (2014). antioxidant dynamics in the live animal and implications for ruminant health and product (meat/milk) quality: role of vitamin E and selenium. *Animal Production Science*, 54, 1525–1536.
- Chen, J., Lindmark-Mansson, H. and Akesson, B. (2000). Optimisation of a coupled enzymatic assay of glutathione peroxidase activity in bovine milk and whey. *International Dairy Journal*, 10, pg. 347-351.
- Cichosz, G., Czczot, H., Ambroziak, A. and Bielecka, M.M. (2017). Natural antioxidants in milk and dairy products *International Journal of Dairy Technology*, 70: 165-178
- Fox, P. and Kelly, A. (2006). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects Part 1, *International Dairy Journal* 16: pg. 500-516.
- Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z., Gao, X. (1998). Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45, pg. 41-45.
- Hamed, H., El Feki, A. and Ahmed, G. (2008). Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant factors. *C. R. Biologies Physiology/Physiologie* 331: pg. 144–151.
- Hicks, C.L., Korycka-Dahl, M., Richardson, T. (1975). Superoxide dismutase in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 58: 796.
- Holbrook, J. and Hicks, C.L. (1978). Variation of superoxide dismutase in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 61: pg. 1072-1077.
- Ibrahim, H.M.M., El-seedy, Y.Y. and Gomaa, N.A. (2016) Cytokine Response and Oxidative Stress Status in Dairy Cows with Acute Clinical Mastitis. *J Dairy Vet Anim Res* 3(1): 00064.
- Josephson, B. and Gyllensward, C. (1957). The development of the protein fractions and of cholesterol concentration in the serum of normal infants and children. *Scand J Clin Lab Invest.* 1957;9(1): pg. 29-38.
- Kolb, E. and Seehawer, J. (2000). Effect of stress on cortisol secretion and vitamin metabolism in cattle. *Praktischer Tierarzt*, 81. pg. 1037-1046.
- Lindmark-Mansson, H. and Akesson, B. (2000). Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84, pg. 103-110.

- Trajchev, M., Nakov, D. and Gjorgoski, I. 2016. Optimization of enzymatic assay of superoxid dismutase and glutation peroxidase activity in milk whey. Symposium Proceedings of the 2nd International Symposium for Agriculture and food, 7-9 October, 2015, Ohrid, Republic of Macedonia, pg. 43-53.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: pg. 44-84.
- Yang, F.L., Li, X.S., He, B.X., Yang, X.L., Li, G.H., Liu, P., Huang, Q.H., Pan, X.M., and Li, L. (2011). Malondialdehyde level and some enzymatic activities in subclinical mastitis milk African Journal of Biotechnology Vol. 10(28), pg. 5534-5538.