

Влияние аскорбиновой кислоты на пероксидазную активность мышечной ткани

А. Г. ШЛЕЙКИН, Я. В. МЕДВЕДЕВ, И. С. ШАТАЛОВ

shataloff.iv@hotmail.com

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет ИТМО

Институт холода и биотехнологий

191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

В работе представлены результаты исследования пероксидазной активности миоглобина мышечной ткани крупного рогатого скота, для определения которой использовали реакцию образования окрашенного катион-радикала 2,2-азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) (ABTS •+). Показана зависимость скорости реакции окисления ABTS от концентрации аскорбиновой кислоты.

Ключевые слова: мышечная ткань, миоглобин, пероксидазная активность, аскорбиновая кислота.

Effect of ascorbic acid on the peroxidase activity of muscle tissue

A. G. SHLEIKIN, Y. V. MEDVEDEV, I. S. SHATALOV

National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics

Institute of Refrigeration and Biotechnologies

191002, St. Petersburg, Lomonosov str., 9

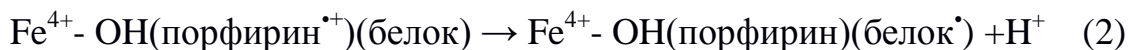
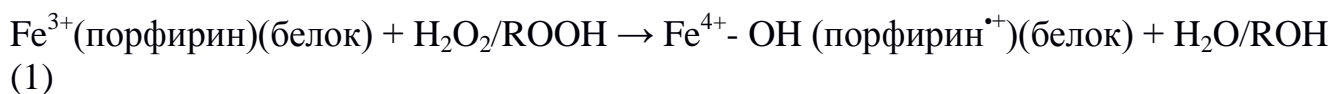
This paper presents the results of an investigation of peroxidase activity of myoglobin of muscle tissue of beef. The method based on the reaction of formation of colored radical cation of 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonate) (ABTS +) was used for this objective. The dependence of the ABTS oxidation rate on the concentration of ascorbic acid, and the effect of ascorbate concentration on the behavior of the reaction rate was demonstrated.

Key words: muscle tissue, myoglobin, peroxidase activity, ascorbic acid.

Введение

Метмиоглобин обладает «псевдопероксидазной» активностью и катализирует окисление различных субстратов в процессе взаимодействия с перекисью водорода. Оказалось, что MetMb восстанавливает H_2O_2 , превращаясь в перферрил катион-радикал ($Fe^{IV}=O R^+$) с радикальным центром в белковой части молекулы. Образовавшийся радикал восстанавливается обратно в MetMb, но уже с изменениями в белковой части молекулы. Было показано, что молекула Mb способна как минимум восемь раз принимать участие в реакциях этого цикла до тех пор, пока окислительная модификация структуры белка не приведет к утрате этой способности. Так как в ходе реакций окисления с участием перекиси водорода молекула MetMb повреждается, её классифицировали как псевдопероксидазу. На сегодняшний день известно, что MetMb, реагирует с H_2O_2 через образование катион-порфиринового радикала, который в последующем электрон-транспортном процессе образует перферрил-миоглобин ($Fe^{IV}=O R^{\bullet}$) – коротко живущий протеиновый радикал с железом в 4+ состоянии [5]. В результате электрон-транспортного процесса происходит его превращение в

долгоживущий феррил-миоглобин ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{OR}$). Оказалось, что именно феррил-миоглобин, будучи аналогом пероксидазы, является активным окислителем по отношению к аскорбату, глутатиону, цистеину, тирозину по схеме:



Результаты экспериментов с различными формами миоглобина, показывают, что низкая каталитическая активность пероксидазного цикла миоглобина в сравнении с циклом истинных пероксидаз объясняется различиями в пространственной ориентации гема молекулы миоглобина и нативных пероксидаз [3]. В мышечной ткани низкая каталитическая активность миоглобина компенсируется его высокой концентрацией.

Было проведено сравнение активности миоглобина в различных типах мышц, с различным метаболизмом. Полученные значения активности в условных единицах были отнесены к концентрации миоглобина в этих мышцах. Оказалось, что полученные данные статистически не различались [1].

Одним из основных факторов, лимитирующим процесс образования метмиоглобина в мясном сырье, является действие компонентов антиоксидантной системы (АОС). В живом организме АОС – это сложно организованная многокомпонентная система антиоксидантов живой клетки, которая регулирует степень подавляющего влияния СР окисления на большинство метаболических процессов. АОС состоит из двух подсистем – ферментативной (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазы, глутатион-S-трансфераза и др.) и неферментативной (токоферолы, убихинон, витамин С, серосодержащие соединения и др.). Антиоксидантная активность подобных соединений определяется их способностью выступать в роли восстановителей (доноров электронов) по отношению к какому-либо радикальному субстрату R^{\bullet} , переходя при этом в устойчивую, малоактивную радикальную форму A^{\bullet} .

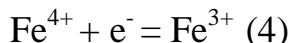
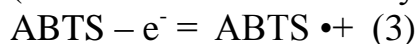
Как $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O R}^{\bullet}$ так и $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O R}$ инактивируются в ходе так называемых реакций автовосстановления за счет окислительной модификации белка, или в присутствии восстановителей, например, таких как аскорбиновая или хлорогеновая кислота, природа которых определяет скорость протекания реакций пероксидазного цикла [2, 6]

В основе этого явления лежит тот факт, что такие восстановители, как аскорбиновая кислота, глутатион, убихинон являются субстратами истинных пероксидаз и способны ингибировать реакции пероксидазного катализа [4].

Цель и задачи исследования

Целью данного исследования было изучить влияние концентрации аскорбиновой кислоты на пероксидазную активность миоглобина в мышечной ткани.

Для этого использовали метод определения активности миоглобина, основанный на реакции образования окрашенного катион-радикала 2,2-азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) (ABTS •+) по схеме:



Метмиоглобин (Fe^{3+}) под действием HOON окисляется и переходит сначала в перферрил-, а затем в феррил-миоглобин (Fe^{4+}), служащий акцептором электронов ABTS.

Материалы и методы исследований

В ходе эксперимента использовались: мышечная ткань бедренных мышц половозрелых коров (Ленинградская обл.), водорода перекись (4,5 мМ), ABTS (1,6 мМ), фосфатный буферный раствор ($\text{pH} = 6,7$; 0,5 М), кислота аскорбиновая (0,57 мМоль)

Навеску мяса гомогенизировали в дистиллированной воде, затем центрифугировали (3000 г, 10 мин). Полученный супернатант разводили дистиллированной водой (1:40) и использовали для дальнейших исследований.

Раствор ABTS готовили, растворив навеску вещества в фосфатном буфере ($\text{pH} = 6,7$).

Реакционная смесь состояла из трех компонентов: исследуемый препарат из мышечной ткани, ABTS, перекись водорода.

Оптическую плотность измеряли при длине волны 734 нм против смеси ABTS и исследуемого образца.

Определения проводили при 25 °С.

Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel 2003.

Результаты и их обсуждение

В предварительных исследованиях было найдено, что скорость окисления ABTS зависит от концентраций миоглобина, перекиси водорода и присутствия в среде восстановителей. Были определены оптимальные концентрации реагирующих компонентов. Далее в реакционную смесь вносились различные количества аскорбиновой кислоты с целью определения ее влияния на скорость реакции окисления ABTS. Полученные результаты представлены ниже (рис. 1).

Как видно из полученных данных, в данной модельной системе и во взятом промежутке времени наблюдается прямо пропорциональная зависимость образования ABTS •+ от времени реакции.

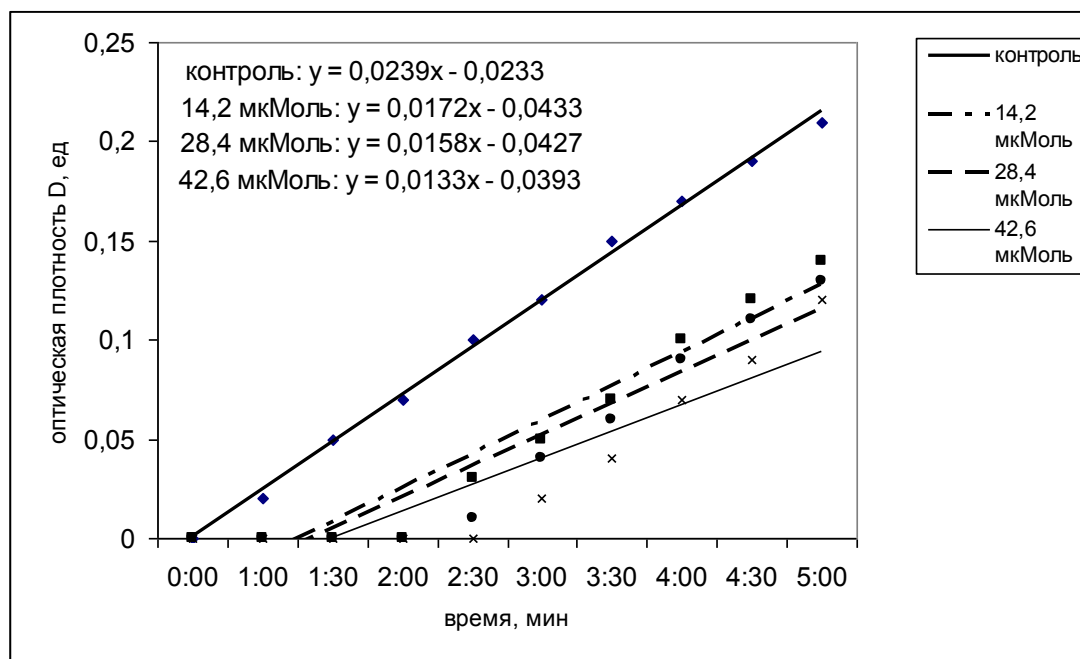


Рис.1 Скорость реакции образования ABTS •+.

Были получены уравнения протекания процессов образования ABTS •+ во всех четырех случаях, из которых далее были получены значения скоростей реакции (ед.опт.плотн/мин). Зависимость скорости реакции от концентрации аскорбата представлена на рис.2

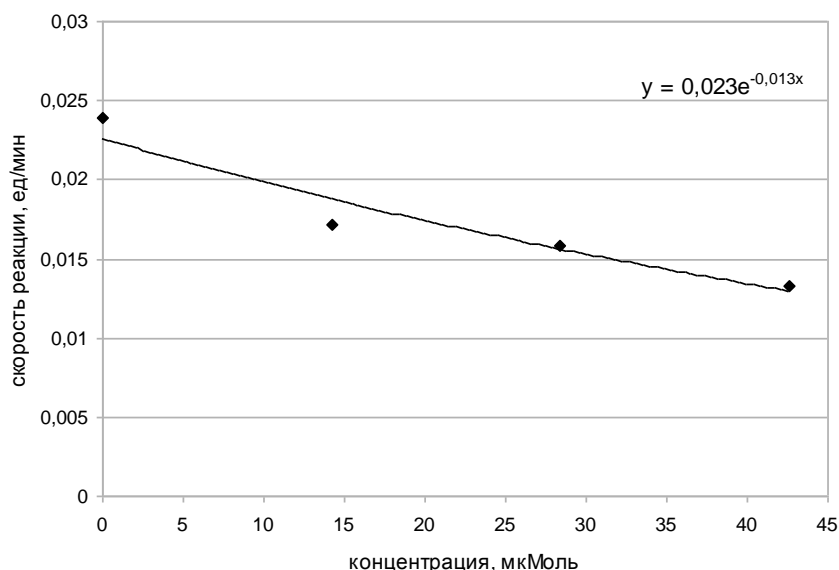


Рис. 2. Зависимость скорости реакции образования ABTS •+ от концентрации аскорбата

Данный график имеет экспоненциальный вид, также отчетливо видно, что концентрация аскорбиновой кислоты в пробе обратно пропорциональна скорости реакции образования радикала ABTS•+. Это объясняется тем, что аскорбиновая кислота, как и другие антиоксиданты, перехватывает свободные радикалы, образующиеся в реакционной среде, либо восстанавливает феррил- и перферрил-миоглобин. Таким образом, имеет место задержка окисления ABTS, зависящая от концентрации аскорбата. На рис. 3 представлена зависимость времени увеличения

оптической плотности реакционной смеси до 0,120 ед (что с учетом коэффициента экстинкции для АВТС•+ при 734 нм, равным $15000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, эквивалентно 8 мкМоль АВТС•+) от концентрации аскорбата. Наблюдается прямая пропорциональность между временем и концентрацией, причем наиболее сильное увеличение времени реакции наблюдается в первом случае, с концентрацией аскорбата 14,2 мкМоль. Дальнейшее увеличение концентрации аскорбата в системе также приводит к увеличению времени реакции, но не столь значительно. Это может объясняться тем, что аскорбат является медленно окисляемым субстратом.

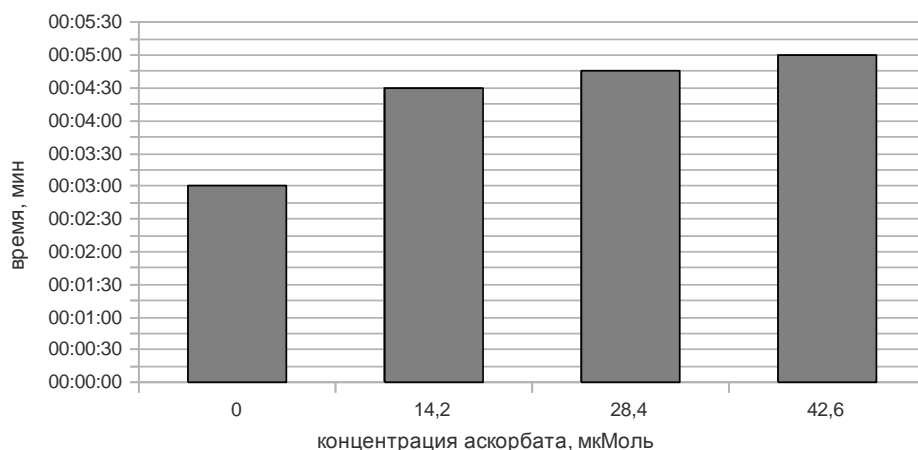


Рис. 3. Зависимость времени реакции образования АВТС•+ от концентрации аскорбата.

Заключение

В данной работе рассмотрено влияние аскорбиновой кислоты на скорость реакции окисления АВТС. Показана обратная пропорциональность между скоростью реакции и концентрацией аскорбата. Также установлено, что при увеличении концентрации аскорбата в системе скорость реакции снижается нелинейно. Показана прямая зависимость между концентрацией и временем задержки реакции окисления, что может объясняться антиоксидантным действием аскорбиновой кислоты.

Список литературы

1. Медведев Я.В., Шаталов И.С. Определение миоглобин-зависимой пероксидазной активности мышечной ткани//Биотехнология. Взгляд в будущее. Сборник трудов международной Интернет-конференции. Казань,17-19 Апреля 2012 г.- Казань: Изд-во "Казанский университет".-2012.- С. 147-149.
2. Carlsen C.U., Kroger-Ohlsen M.V., Bellio R., Skibsted L.H. Protein binding in deactivation of ferrylmyoglobin chlorogenate and ascorbate// J. Agric. Food Chem.- 2000,- V.48,- P.204–212.
3. Dunford H.B. Heme Peroxidases//John Wiley & Sons: New York.- 1999,- 77 pp.
4. Gebicki J.M. Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species//Redox Rep.- 1997,- V.3,- P.99-110.
5. Giulivi C., Cadenas E. Heme protein radicals: formation, fate, and biological consequences// Free Radic. Biol. Med.- 1998,- V.24(2),- P.269-279.
6. Mikkelsen A., Skibsted L.H. Acid-catalyzed reduction of ferrylmyoglobin: product distribution and kinetics of autoreduction and reduction by NADH// Z. Lebensm. Unters. Forsch. - 1995, - V.200,- P.171-177.