

Г.В. Гуринович, Р.Н. Абдрахманов

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕМОВОГО И НЕГЕМОВОГО ЖЕЛЕЗА НА АНТИОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА

В статье приведены результаты исследования антиокислительной активности дигидрокверцетина в зависимости от концентрации прооксидантов, в качестве которых исследовано железо в гемовой и негемовой формах. Экспериментально определена эффективная концентрация дигидрокверцетина, обеспечивающая ингибирование процесса окисления жира. Установлена большая каталитическая активность негемовой формы железа в процессе окисления жира. Представлены данные об эффективности ингибирования окисления модельной системы дигидрокверцетином при совместном присутствии в ней гемопротеинов и негемового железа.

Гемовое железо, негемовое железо, антиокислитель, куриный топленый жир, дигидрокверцетин, индукционный период.

Введение

Степень и скорость окисления липидов мяса в значительной мере зависят от таких факторов, как жирнокислотный и липидный состав сырья, концентрация проокислителей, антиокислителей. Жирнокислотный состав липидов мяса птицы механической обвалки (МПМО) отличается повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот, фосфолипидов, которые наиболее лабильны в отношении окислительного прогоркания, что является следствием снижения органолептических показателей мяса в процессе хранения. Известно, что первичными субстратами окисления липидов мышечной ткани являются фосфолипиды, ассоциированные с мембранами [1]. Это обусловлено как наличием в ней ненасыщенных жирных кислот, так и непосредственной близостью фосфолипидов к кислородоактивирующим системам и цитоплазматическим прооксидантам, таким как гемовое и негемовое железо [2]. Высокому риску развития окисления способствуют технологические особенности производства мяса птицы механической обвалки, основным этапом которого является механическая сепарация, сопровождаемая непосредственным контактом гемовых пигментов красного костного мозга и липидных компонентов на фоне активного поглощения сырьем кислорода воздуха с адсорбцией последнего гемопротеинами.

Гемопротеины и неорганические соединения железа вовлекаются в катализ на разных стадиях перекисного окисления липидов, а механизмы каталитического влияния свободного иона железа в ферро- и ферри-формах, связанного железа и гемовых пигментов на перекисное окисление многоплановы, поэтому остаются предметом научных исследований.

Эффект ускорения окисления липидов гемовыми пигментами является общепризнанным фактом, поэтому они рассматриваются как основные проокислители в мясе и мясных продуктах.

Одними из наиболее активных инициаторов окисления липидов являются пигменты, содержащие трехвалентное железо – метмиоглобин, а также пигмент термически обработанного мяса гемохромоген. Установлено, что в модельной системе линолеат – гем максимальную каталитическую активность метмиоглобин проявляет в молярных соотношениях 1:250 [3].

Концентрация гемма, равная 2–4 от максимального каталитического количества, не оказывает прооксидантного эффекта.

В то же время J. Kanner и S. Harel показали, что собственному метмиоглобину не оказывает влияния на перекисное окисление липидов мембран, но предварительно активированный перекисью водорода может проявлять высокую активность, обусловленную образованием промежуточных активных соединений [4].

По результатам собственных исследований R. Kaschnitz и Y. Hafezi [5] утверждают, что в липидном окислении могут принимать участие обе формы железа ферро (Fe^{2+})- и ферри (Fe^{3+})-гемоглобина. Согласно их гипотезе, оксигемоглобин (Fe^{2+}) может перейти в метгемоглобин посредством случайного автоокисления, в процессе которого образуются высокоактивные анионы супероксидного радикала. Образовавшийся метгемоглобин проявляет каталитическую активность в отношении пероксидов с образованием высоко реакционно-способных видов гидроперекисных свободных радикалов. В дальнейшем пигмент переходит в феррильную форму (Fe^{4+}) гемоглобина, которая также принимает участие в окислении полиненасыщенных липидов, отрывая водородные атомы.

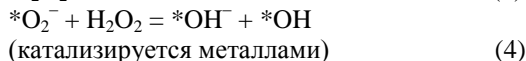
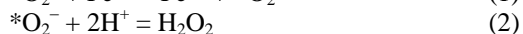
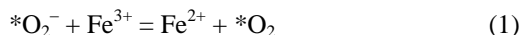
Влияние на процесс окисления оказывает и гемоглобин, который находится внутри красных кровяных телец. Последние легко разрушаются при механической обработке сырья, такой как разрезание, прессование, а также при других технологических операциях, в том числе замораживании. Потеря структурной целостности кровяных телец приводит к высвобождению оксигемоглобина и адсорбированного кислорода из него, что обусловлено низким рН мышцы в присутствии АТФ и других реагирующих веществ. Высокореактивные димеры и мономеры гемоглобина связываются с липидами из-за сильной гидрофобной природы последних [6]. В процессе окисления гема железо может в конечном счете высвободиться из него.

Однако гемовые соединения могут проявлять амбивалентные свойства, т.е. выступать как проокислители и антиокислители. Антиокислительные свойства гемопротеинов объясняют конкурированием их с другими молекулами за окислительные радикалы.

Помимо гемовых пигментов, в окислении липидов принимают участие также ферментативные и неферментативные системы, содержащие негемовое железо. Установлена способность саркоплазматического ретикулума мяса птицы к ферментативному инициированию липидного окисления в присутствии железа и NADH как источника электронов. Ферментативная система способна инициировать окисление липидов посредством атаки сульфгидрильных групп белков во внутренней мембране. Эти продукты окисления белков, в свою очередь, инициируют окисление липидов и в конечном счете приводят к образованию гидропероксидов.

Установлено, что трансферрин – белок, хранящий железо в прочно связанном состоянии в ферриформе, не принимает участия в генерировании радикала $\cdot\text{OH}$ при физиологических концентрациях. При этом обнаружено, что частично насыщенный трансферрин защищает клетки от разрушения, связывая железо, которое может катализировать образование $\cdot\text{OH}$ из супероксида ($\text{O}_2^{\cdot-}$) и перекиси водорода. Трансферрин, однако, может высвобождать железо при низких значениях pH (ниже pH 5,6) и таким образом ускорять перекисное окисление липидов в этих условиях. Вклад в развитие окисления вносит белок ферритин, из которого при определенных условиях могут высвобождаться ионы железа [7].

Согласно реакции Хабера-Вайса (4) [8] супероксид радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) восстанавливает железо из ферриформы в ферро-форму (1) и ферро-железо разрушает перекись водорода, образуя по реакции (3) радикалы $\cdot\text{OH}$, которые катализируют окисление липидов.



Однако D. Miller и др. [9] отрицают традиционную реакцию Фентона (3) [8] и считают, что катализатором окисления липидов является комплекс Fe(II):Fe(III).

Представленные данные доказывают, что состояние пигментов, наличие и концентрация неорганического железа и окисление липидов взаимосвязаны.

Мясо птицы механической обвалки характеризуется как сырье с высоким содержанием прооксидантов (гемовое и негемовое железо) и практически полным отсутствием природных антиоксидантов, что свидетельствует о целесообразности применения последних в технологии его получения, а также для стабилизации липидной фракции от окислительного прогоркания, сохранения пищевой ценности и, как следствие, увеличения срока годности сырья при хранении.

Использование антиоксидантов и уровень их введения регламентируются СанПиН 2.3.2.1293-2003. Существуют два основных вида антиоксидантов: природные и синтетические. К природным относятся, например, флавоноиды, среди которых следует отметить дигидрохверцетин (ДКВ). Дигидрохверцетин – это антиоксидант прямого действия, который

принимает непосредственное участие в процессе инактивации свободных радикалов посредством восстановления последних до молекулярного состояния, что приводит к обрыву цепи автоокисления. Установлено, что антиоксидантная активность (АОА) ДКВ выше, чем жирорастворимых витаминов (А, Е), аскорбиновой кислоты [10]. Доказано, что ДКВ может выступать в качестве хелатирующего агента, т.е. связывать ионы металлов с переменной валентностью, а также реагировать с активными формами кислорода [11].

Если говорить об использовании дигидрохверцетина в мясной промышленности, то его рассматривают как антиоксидант прежде всего для мясных продуктов, в состав которых предлагается вводить его в сухом виде при перемешивании измельченного сырья; аэрозольной обработкой; в виде спиртового раствора. Однако широкие возможности имеет использование ДКВ для обработки собственно сырья.

Анализ литературных данных указывает на широкий спектр исследований, связанных с изучением антиоксидантной активности ДКВ и факторов, влияющих на нее. Однако в доступной литературе отсутствуют данные о влиянии гемового и негемового железа на антиоксидантную активность ДКВ, что очень важно для мясных систем и продуктов.

Целью исследования являлось изучение АОА дигидрохверцетина в зависимости от вида проактиваторов окисления – гемового и негемового железа.

Материалы и методы

Исследования выполнены на модельной системе, в качестве основы которой использован куриный топленый жир (КТЖ). Окисление жира проводили ускоренным методом по ГОСТ Р 53160-2008. Для его воспроизведения в лаборатории кафедры «Технология мяса и мясных продуктов» КемТИПП была собрана установка, представленная на рис. 1. Метод основан на измерении электропроводности системы в условиях инициированного процесса окисления при одновременном воздействии высокой температуры и кислорода воздуха.

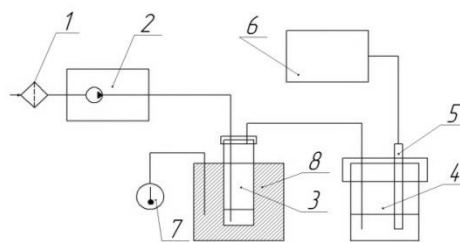


Рис. 1. Схема установки для ускоренного окисления: 1 – фильтр; 2 – насос с регулятором скорости потока; 3 – аэрационный сосуд; 4 – измерительная ячейка; 5 – электрод; 6 – измерительное записывающее устройство; 7 – контактный термометр; 8 – нагревательный блок

Процесс окисления включает две фазы: первая – индукционный период, который характеризуется накоплением пероксидов; вторая – фаза интенсивного поглощения кислорода, распад первичных продуктов окисления под воздействием высокой температуры с образованием свободных радикалов и низкомолеку-

лярных жирных кислот. Образующиеся кислоты абсорбируются дистиллированной водой, находящейся в измерительной ячейке, что приводит к изменению электропроводности раствора, которая и является выходным параметром. При измерении электропроводности кондуктометром «АНИОН 4120» (Россия) регистрируется кривая проводимости, на основании которой определяется индукционный период.

При постановке метода экспериментально установлены следующие параметры процесса окисления: температура 110 °С, скорость воздушного потока 20 л/ч, масса исследуемой пробы 6 г.

В исследовании использован дигидрокверцетин под торговым названием «Лавитол» степени чистоты 94 %, форма выпуска – порошок бледно-желтого цвета по ТУ 9325-001-70692152-2007 (ЗАО «Аметис», г. Благовещенск, Амурская область, РФ).

Дигидрокверцетин, принимая во внимание его хорошую растворимость в спирте, вносили в модельную систему в виде спиртового раствора в количестве от 0,01 до 0,04 %.

В качестве источника гемового железа (ГЖ) использован гемоглобин быка по ТУ 9358-007-10837785-2003 (ООО «Белком», г. Москва, РФ) с содержанием гемоглобина 96 %. Уровень введения препарата в модельную систему рассчитывали таким образом, чтобы обеспечить концентрацию пигмента, соответствующую количеству гемового пигмента в МПМО, это количество составляет (25,42±0,77) мг/кг.

Источником негемового железа (НГЖ) являлся сульфат железа двухвалентного в виде раствора. Негемовое железо вносили в исследуемую систему в виде раствора в количестве 0,0011 %, что соответствовало содержанию негемового железа в мясе птицы механической обвалки, равного (10,66±0,16) мг/кг.

Контрольной модельной системой являлся куриный топленый жир без добавок. Использование куриного топленого жира в качестве основы модельной системы обусловлено сходством его жирнокислотного состава и липидной фракции МПМО.

Результаты и их обсуждение

Предварительными исследованиями установлены значения показателей окислительной и гидролитической порчи, которые составили: пероксидное число жира 0,024 % йода или 0,299 м-экв O₂/кг; анизидиновое число, характеризующее наличие альдегидов, кетонов и иных вторичных продуктов окислительного прогоркания, – 0,22 ед/г, что ниже нормативного значения, равного 3 ед/г; общее число окисления 0,818 ед/г; кислотное число 0,125 мг КОН.

По всем показателям жир, составляющий основу модельной системы, классифицируется как свежий.

На первом этапе исследований изучено влияние концентрации ДКВ на скорость окисления жира. Полученные кинетические кривые окисления жира приведены на рис. 2.

Согласно полученным данным продолжительность индукционного периода контрольной модельной системы составляет 60 мин.

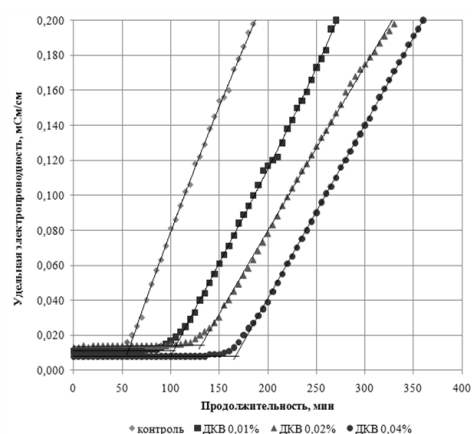


Рис. 2. Кинетические кривые окисления жира в зависимости от концентрации ДКВ

При добавлении в нее ДКВ в количестве 0,01; 0,02 и 0,04 % продолжительность индукционного периода увеличилась в 1,75; 2,17 и 2,83 раза и составила 105, 130 и 170 мин соответственно, что свидетельствует об эффективном ингибировании процесса накопления первичных продуктов окисления (пероксидов).

Принимая во внимание полученные данные, концентрацией ДКВ, достаточной для эффективного ингибирования процесса окисления липидов с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, в том числе полиненасыщенных, следует рассматривать 0,04 % к массе жира.

На втором этапе исследовали каталитическую активность различных форм железа – гемовой и негемовой в условиях каталитического действия повышенной температуры при активном насыщении системы кислородом воздуха. Воздействие этих факторов наряду с интенсификацией процесса, продиктованной методикой работы, позволяет учесть такой фактор, как переход гемового железа в негемовое, возникающий при тепловой обработке мясных продуктов. Экспериментальные данные, характеризующие развитие процесса окисления в присутствии разных форм железа, а также при их совместном действии, представлены на рис. 3.

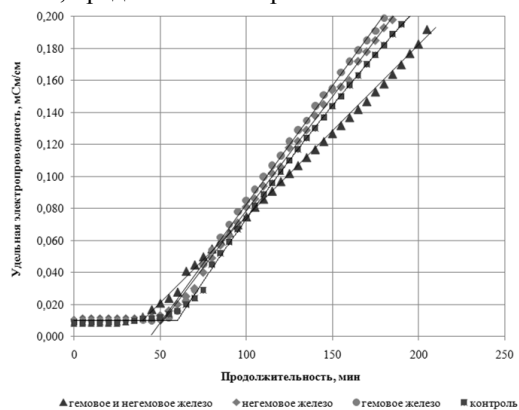


Рис. 3. Влияние состава прооксидантов на кинетические кривые окисления жира

Установлено, что добавление в контрольную модельную систему гемового железа приводит к уско-

рению процесса образования перекисей (см. рис. 3), о чем свидетельствует сокращение продолжительности индукционного периода до 52 мин. К сопоставимому увеличению индукционного периода приводит введение в систему негемового железа (НГЖ) в концентрации, соответствующей его содержанию в МПМО. В этом случае продолжительность индукционного периода сокращается до 50 мин. Вместе с тем можно говорить о тенденции к большему ускорению процесса окисления в присутствии негемового железа. Следует предположить, что в присутствии раствора сульфата железа (II) как источника Fe^{2+} ионов гидроперекиси превращаются в высокоактивные гидроксильные радикалы посредством химической реакции Фентона. Эти гидроксильные радикалы способны инициировать каскадное перекисное окисление липидов в результате отрыва атомов водорода от полиненасыщенных жирнокислотных цепей, создавая углеродные центры в жирнокислотных радикалах, способные к взаимодействию с кислородом, формируя перекисные радикалы. Последние, в свою очередь, распространяют реакции окисления цепей липидов [12].

Наиболее значительное инициирование процесса окисления вызывает совместное введение в модельную систему гемового и негемового железа, в результате чего продолжительность индукционного периода сокращается до 41 мин. Это обусловлено проявлением каталитического синергизма обеих форм железа в отношении абсорбции кислорода воздуха жирнокислотными радикалами с образованием гидропероксидов и их дальнейшим распадом до альдегидов, кетонов и карбоновых кислот.

С целью изучения влияния гемового и негемового железа на антиокислительную активность ДКВ исследованы системы, состав которых приведен в табл. 1. Дигидрокверцетин вводили в модельные системы в количестве 0,02 и 0,04 %. Эффективность антиокислительного действия различных концентраций ДКВ в исследуемых модельных системах устанавливали по изменению продолжительности индукционного периода процесса относительно контроля (без ДКВ). Экспериментальные данные представлены на рис. 4.

Показатели, характеризующие эффективность действия ДКВ в исследуемых системах в зависимости от концентрации, приведены в табл. 1.

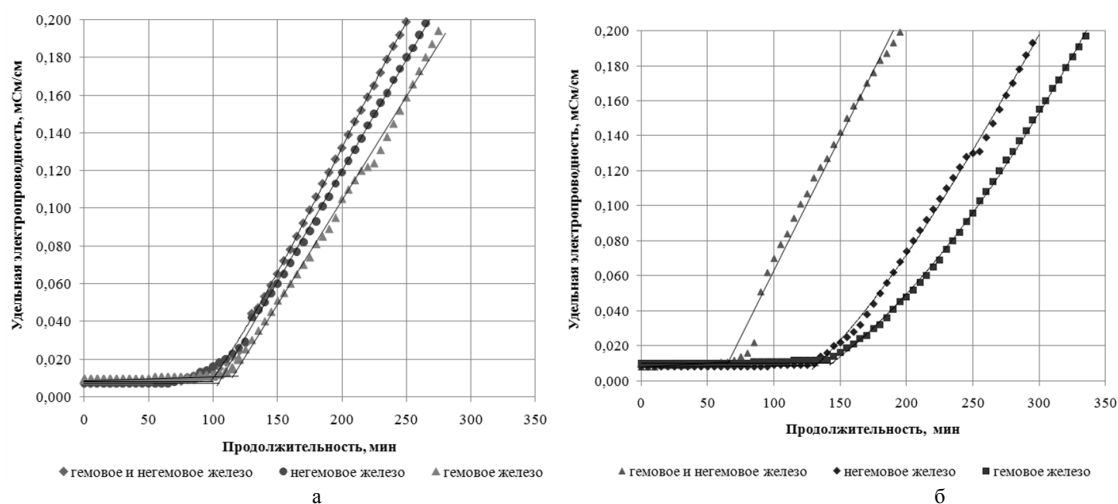


Рис. 4. Кинетические кривые окисления модельных систем, содержащих гемовое и негемовое железо: а – 0,02 % ДКВ; б – 0,04 % ДКВ

Таблица 1

Показатели эффективности действия ДКВ в зависимости от состава модельных систем

№ модельной системы	Состав модельной системы				Индукционный период, мин	Эффективность относительно контроля
	КТЖ	НГЖ	ГЖ	ДКВ, %		
1	+	–	–	–	60	1,00
2	+	–	–	0,02	130	2,17
3	+	–	–	0,04	170	2,83
4	+	+	+	–	41	1,00
5	+	+	–	–	50	1,00
6	+	–	+	–	52	1,00
7	+	+	+	0,02	99	2,42
8	+	+	–	0,02	104	2,03
9	+	–	+	0,02	116	2,23
10	+	+	+	0,04	66	1,61
11	+	+	–	0,04	133	2,66
12	+	–	+	0,04	144	2,77

Установлено, что в присутствии ДКВ развитие процесса окисления, инициируемого ГЖ, существенно замедляется. При концентрации ДКВ 0,02 и 0,04 % продолжительность индукционного периода возрастает в 2,23 и 2,77 раза соответственно. Вместе с тем эти концентрации ДКВ не обеспечивают замедления процесса до уровней, характерных для систем с аналогичными концентрациями ДКВ без прооксидантов, по отношению к которым продолжительность индукционного периода сокращается на 11 и 16 % соответственно.

Как следует из представленных данных, ДКВ проявляет антиокислительную активность в процессе окисления, инициируемого негемовым железом, но эффективность его действия при этом несколько ниже. Увеличение продолжительности периода индукции при добавлении 0,02 % ДКВ в систему с НГЖ составило 2,03 раза, при добавлении 0,04 % – 2,66 раза. Относительно системы с ДКВ без прооксидантов

продолжительность индукционного периода сокращается до 80 и 78 % соответственно.

Дигидрокверцетин сохраняет антиокислительную активность при совместном добавлении ГЖ и НГЖ, хотя следует говорить о значительном сокращении эффективности его действия. Относительное сокращение продолжительности индукционного периода в системах № 5 и № 6 относительно систем № 2 и № 3 составило 76 и 39 %.

Таким образом, выполненные исследования указывают, что антиокислительная активность ДКВ также проявляется в процессах окисления жира, инициируемого гемовым и негемовым железом как в отдельности, так и при их совместном действии. Большую активность ДКВ проявляет в системах с гемовым железом, наименьшую – при совместном присутствии обеих форм железа. При этом больший эффект оказывает концентрация ДКВ, равная 0,02 %, которая может быть рекомендована для введения в МПМО.

Список литературы

1. Undeland, I. Aqueous extracts from some muscles inhibit hemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids / I. Undeland, H.O. Hultin, M.P. Richards // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – № 51. – P. 3111–3119.
2. Nawar, W.W. Lipids. In *Food Chemistry*, 3rd ed.; Fennema, O.R., Ed; Marcel Dekker, Inc.: New York, NY. – 1996. – P. 225–319.
3. Kendrick, J. Acceleration and inhibition of lipid oxidation by heme compounds / J. Kendrick, B.M. Watts // *Lipid.* – 1969. – № 4. – P. 454.
4. Kanner, J. Initiation of lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin / J. Kanner, S. Harel // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1985. – № 237. – P. 314–321.
5. Kaschnitz, R.M. Lipid oxidation in biological membranes. Electron transfer proteins as initiators of lipid oxidation / R.M. Kaschnitz, Y. Hatefi // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1975. – № 171. – P. 292–304.
6. Griffith, W.P. Highly asymmetric interactions between globin chains during hemoglobin assembly revealed by electro-spray ionization mass spectrometry / W.P. Griffith, I.A. Kaltashov // *Biochemistry.* – 2003. – № 42. – P. 10032–10033.
7. Decker, E.A. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food / E.A. Decker, B. Welch // *J. Agric. Food Chem.* – 1990. – № 38. – P. 674–677.
8. Halliwell, B. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: an overview / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // *Methods Enzymol.* – 1990. – № 186. – P. 1–85.
9. Miller, D.M. Transition metals as catalysts of autoxidation reactions / D.M. Miller, G.R. Buettner, S.D. Aust // *Free Rad. Biol. Med.* – 1990. – № 8. – P. 95–108.
10. Руленко, И.А. Кондитерские изделия с добавками биологически активных веществ. Количественное определение дигидрокверцетина в кондитерских изделиях методом ВЭЖХ / И.А. Руленко, Ю.А. Колесник, Н.А. Тюкавкина // *Биотехнология и управление.* – 1993. – № 34. – С. 30–32.
11. Теселкин, Ю.О. Антиоксидантные свойства дигидрокверцетина / Ю.О. Теселкин, Б.А. Жамбалова, И.В. Бабенкова и др. // *Биофизика.* – 1996. – № 41. – С. 620–624.
12. Brand, M.D. Mitochondrial superoxide; production, biological effects, and activation of uncoupling proteins / M.D. Brand, C. Affouritt, T.C. Esteves, et al. // *Free Radical Biol. Med.* – 2004. – № 37. – P. 755–767.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

G.V. Gurinovich, R.N. Abdrakhmanov

THE INVESTIGATION OF HEME AND NON-HEME IRON EFFECT ON ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF DIHYDROQUERCETIN

The article presents the results of the investigation on the antioxidative activity of dihydroquercetin depending on the concentration and combination of prooxidants, such as iron in heme and non-heme forms. The effective concentration of dihydroquercetin which inhibits the oxidation process in fat is experimentally defined. The significant catalytic activity of non-heme iron influencing the oxidation process in fat is established. The data on effectiveness of inhibiting the oxidative process in simultaneous presence of dihydroquercetin, heme proteins, and non-heme iron are presented.

Heme iron, non-heme iron, antioxidant, chicken rendered fat, dihydroquercetin, inductive period.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

