

УДК 54.066

UDC 54.066

02.00.00 Химические науки

Chemical sciences

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ-Антиоксидантов, содержащихся в корне хрена, выращенного в Астраханской области в летне-осенний период

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE DETERMINATION OF ENZYME-ANTIOXIDANTS CONTAINED IN HORSE RADISH GROWN IN THE ASTRAKHAN REGION IN THE SUMMER AND AUTUMN

Капизова Альфия Мансуровна
к.х.н., доцент

Kapizova Alfiya Mantsurovna
Cand.Chem.Sci, docent

Садомцева Ольга Сергеевна
к.х.н., доцент

Sadomtseva Olga Sergeevna
Cand.Chem.Sci, docent

Шакирова Виктория Викторовна
к.х.н., доцент
*Астраханский государственный университет,
г. Астрахань*

Shakirova Victoria Viktorovna
Cand.Chem.Sci, docent
Astrakhan State University, Astrakhan

Реснянская Анна Станиславовна
к.х.н., доцент
Астраханский государственный архитектурно-строительный университет, г. Астрахань

Resnyanskaya Anna Stanislavovna
Cand.Chem.Sci, docent
*Astrakhan State Architecture Construction University,
Astrakhan*

Статья посвящена изучению ферментов-антиоксидантов, содержащихся в корне хрена. В статье представлен подробный анализ источников информации, направленный на выяснение содержания ферментов-антиоксидантов, содержащихся в корне хрена, выращенного в Астраханской области в осенне-летний период. В ходе анализа литературы было выяснено, что содержание ферментов-антиоксидантов в корне хрена непостоянно и зависит от климатических условий, времени посадки и времени сбора урожая. Нами было изучено содержание антиоксидантов с использованием метода А. Н. Баха и А. И. Опарина в корне хрена, выращенного в Астраханской области в летне-осенний период. В 2 г корневища хрена содержится количество ферментов - антиоксидантов, способное за 30 мин разложить $(1,547 \cdot 100) / (20 \cdot 1) = 77,35$ мг пероксида водорода, а за 1 мин – 2,56 мг. Так как 1 мкмоль пероксида водорода составляет 0,034 мг, то в 2 г хрена содержится 76 Е ферментов - антиоксидантов (или 38 Е в 1 г хрена). Результаты данной работы станут основой для создания и изучения нового энтеросорбента с антиоксидантными функциями. Энтеросорбент получают адсорбцией на крахмале антиоксидантов, таких как пероксидаза, каталаза и аскорбиновая кислота, из водных вытяжек растительного материала

The article is devoted to the study of enzymes-antioxidants contained in horseradish root. The article provides a detailed analysis of the sources of information, aimed at clarifying the content of enzymes-antioxidants contained in horseradish root, grown in the Astrakhan region in the autumn and summer. During the analysis of the literature, it was found that the content of enzyme-antioxidants in the root of the horseradish is not constant and depends on climatic conditions, planting time and harvest time. The content of antioxidants in the root of horseradish grown in the Astrakhan region in the summer-autumn period was studied using by the method of A.N. Bach and A.I. Oparin. 2 g of horseradish roots contains the number of enzymes - antioxidants able to expand for 30 min $(1,547 \cdot 100) / (20 \cdot 1) = 77.35$ mg of hydrogen peroxide in 1 min - 2.56 mg. 1 μmol As hydrogen peroxide is 0.034 mg, in 2 g horseradish contains 76 E enzyme - antioxidants (or E 38 1 g horseradish). The results of this work will form the basis for the creation and study of new enterosorbent with antioxidant functions. Enterosorbent prepared by adsorption on starch antioxidants such as peroxidase, catalase, and ascorbic acid, from aqueous extracts of plant material

Ключевые слова: ФЕРМЕНТЫ-АНТИОКСИДАНТЫ, КОРЕНЬ ХРЕНА, ПЕРОКСИДАЗА, КАТАЛАЗА, ПЕРОКСИД ВОДОРОДА, АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА

Keywords: ENZYME-ANTIOXIDANTS, HORSE-RADISH ROOT, PEROXIDASE, CATALASE, HYDROGEN PEROXIDE, ASCORBIC ACID

Известно, что спасителями наших клеток являются антиоксиданты — группа биологически активных соединений, содержащихся в пище и нейтрализующих в организме свободные радикалы — нестабильные атомы и соединения, которые образуются в ходе нормального обмена веществ и присутствуют в окружающей среде, но, накапливаясь сверх меры, становятся опасными. Также антиоксиданты замедляют процесс старения, снижают риск возникновения у человека рака, сердечнососудистых заболеваний, мышечной дистрофии и др. Однако курение, стрессы, экология только способствуют уменьшению антиоксидантов.

Метаболизм кислорода в аэробных клетках сопровождается постоянным образованием токсичных реакционноспособных свободно – радикальных продуктов. В результате эволюции, у аэробов возникли защитные механизмы, к которым относятся специализированные ферментные и неферментные антиоксидантные системы. Главную роль в защите от кислородных интермедиантов играют ферменты, способные обезвреживать супероксидные радикалы и перекисные соединения в клетках, например: супероксиддисмутаза (СОД) (разрушает супероксидные анион-радикалы до перекиси водорода), каталаза (восстанавливает перекись водорода до кислорода и воды) и пероксидаза (также восстанавливающая перекись водорода до воды, но с участием органических восстановителей) [1].

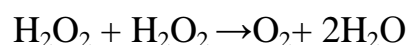
Угроза для клеток со стороны активных радикалов устраняется действием ряда ферментов, эффективно [2,3,4] обезвреживающих эти соединения. Первую линию защиты от свободных радикалов составляют антиоксидантные ферменты супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза. Супероксиддисмутаза (металлоферменты) катализируют реакцию:



Они находятся во всех клетках, потребляющих кислород. Скорость реакции чрезвычайно высока и лимитируется только скоростью диффузии O_2^- . Каталитический цикл этих ферментов включает восстановление и

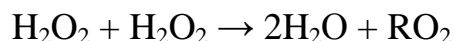
окисление иона металла на активном центре фермента. В организме имеется три формы СОД, содержащие медь, цинк (одна находится в цитозоле, другая экстрацеллюлярная — в эндотелии) и магний (находится в матриксе митохондрий) [4]. Супероксиддисмутаза осуществляет инактивацию радикалов кислорода, которые могут возникнуть в ходе биологических реакций переноса электронов или при воздействии металлов с переменной валентностью, ионизирующего, ультрафиолетового излучения, ультразвука, гипербарической оксигенации, различных заболеваниях.

Почти во всех животных клетках и органах определяется каталазная активность. Особенно богаты каталазой клетки печени, почек, эритроциты. Она предотвращает накопление в клетке перекиси водорода, образуемой при аэробном окислении восстановленных флавопротеидов и из O_2^- .



Каталаза может разложить 44 000 молекул H_2O_2 в секунду (относится к числу ферментов с наиболее высоким числом оборотов). Для расщепления большого количества перекиси водорода требуется малое количество фермента. Как и в случае супероксиддисмутазы, скорость реакции определяется диффузией и не требует энергии для активации. Каталаза преимущественно находится в пероксисомах [4], внеклеточно каталаза находится в незначительных концентрациях. Наибольшая активность каталазы в организме характерна для печени. К алиментарным факторам, понижающим каталазную активность, относят недостаточность витаминов группы В, фолиевой кислоты, биотина, пантотеновой кислоты, рибофлавина, витамина А. Снижение активности каталазы наблюдается при избытке метионина, тирозина, цистина, меди, цинка. В эритроцитах при высокой скорости образования перекиси водорода (10^{10} - 10^9 моль H_2O_2 на 1 мг гемоглобина в 1 мин) преобладает активность глутатионпероксидазы, а при низкой скорости образования H_2O_2 (10^9 - 10^7) — защитное действие оказывает в основном каталаза.

В печени, почках, нейтрофильных лейкоцитах обнаруживается пероксидазная активность.



Миелопероксидаза в нейтрофилах окисляет ионы галогенов до свободного галогена, являющегося эффективным бактерицидным агентом. В эритроцитах, печени, хрусталике глаза имеется глутатионпероксидаза, которая содержит селен и специфично окисляет восстановленный глутатион. Как каталаза, так и пероксидаза могут утилизировать как субстраты органические гидроперекиси (например, гидроперекись этила, надуксусную кислоту). Полагают, что в животных тканях каталаза действует, как пероксидаза.

В настоящее время культуры растительных клеток являются объектом биотехнологии для получения целевых продуктов, поэтому целесообразность изучения ферментов-антиоксидантов становится очевидным. Кроме того, в последние годы ферменты антиоксидантной системы представляют большой интерес для практической медицины.

Корень и препараты из хрена обладают противовоспалительными, мочегонными, раздражающими, витаминными, отхаркивающими, сокогонными, фитонцидными, противогинготными, болеутоляющими, противомикробными и противогрибковыми свойствами. Имеются также сведения о противоопухолевом действии указанных препаратов. И все это благодаря содержанию различных ферментов-антиоксидантов.

В связи с этим изучению ферментов-антиоксидантов, содержащихся в корне хрена, посвящено достаточное количество работ.

В корне хрена присутствует гликозид синигрин ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{CNS}_2\text{O}_9$), который под действием ферментного комплекса мизорина распадается на аллиловое горчичное масло, глюкозу и кислую серно-калиевую соль; а также белковое антибиотическое вещество лизоцим, углеводы (глюкоза, галактоза, арабиноза, ксилоза, сахароза, пентозаны, галактуроновая кислота, поли-

сахаридами), азотистые и зольные вещества; жиры; сапонины; флавоноиды. Своеобразный вкус и запах хрена обусловлены наличием эфирных масел, в состав которых входят аллилгорчичное масло.

Содержащийся в хрене лизоцим, фермент класса гидролаз, разрушает стенки бактериальных клеток, в результате чего происходит их растворение. Лизоцим подавляет рост грамположительных и грамотрицательных бактерий, оказывает противовоспалительное действие и стимулирует неспецифическую резистентность организма [5].

Другим важнейшим составляющим хрена является фермент пероксидаза, принадлежащий к классу оксидоредуктаз, катализирующий окисление органических и неорганических соединений в присутствии перекиси водорода, которая действует как акцептор водорода, превращаясь в воду в ходе данной химической реакции. Пероксидаза, воздействуя на оболочку имеющихся в организме клеток вируса, разрушает ее, что приводит к гибели указанных клеток. Результатом является эффективное повышение неспецифической резистентности. Культивируемые в настоящее время в России сорта хрена содержат до 15 г пероксидазы на 1000 кг исходного сырья, что обеспечивает высокую эффективность содержащей его препарат биологически активной пищевой добавки.

Химический состав частей растения представлен в табл. 1.

Таблица 1.

**Химический состав частей растения.
Содержание основных веществ на 100 г продукта, %.**

Основные вещества в мякоти		Витамины		Минеральные вещества	
Вода	77	Аскорбиновая кислота	55-200	Натрий	140
Белок	2,5	β-каротин	Следы	Калий	579-700
Сырой белок	2,7-4,5	Тиамин (В ₁)	0,08	Кальций	119
Усвояемые углеводы – общие	16,3-18	Рибофлавин (В ₂)	0,10	Магний	36
Сахароза	30	Пиридоксин (В ₆)	0,7	Железо	2,03
Много крахмала		Фолиевая кислота (В ₉)	37мкг	Фосфор	70-130
Азотистые вещества	2,73	Ниацин (РР)	0,40	Сера	212
Жиры	0,4			Хлор	18,8
Клетчатка	2,8-3			Медь	0,14
Зольные элементы	1,4-1,5				
Сухое вещество	17-32,8				
Смесь эфирных и горчичных масел	0,34				

Не смотря на большой спектр ферментов, содержащихся в корне хрена, наибольший интерес вызывает пероксидаза.

Пероксидаза – один из наиболее распространенных ферментов, содержащийся в растениях, микробах, тканях животных. Этот фермент катализирует окисление широкого спектра органических соединений пероксидом водорода с образованием токсичных пероксидов, удаляющихся из живых организмов. Пероксидаза представляет собой гликопротеид, состоящий из полипептидной цепи, формирующей двухдоменную глобулу, и гемовой простетической группы с атомом железа, располагающейся между доменами [6].

Введение пероксидазы хрена в пищевой рацион весьма полезно. Это обусловлено в частности (и особенно) наличием гема в структуре фермента. Хотя в литературе прямые сведения об использовании пероксидазы хрена как биологически-активной добавки встречаются редко, очевидно, что потребление пероксидаз растений человеком происходит достаточно активно.

Пероксидазы растений принадлежат к классу гем-содержащих оксидоредуктаз и используют пероксид водорода в качестве донора электронов. Пероксидаза хрена является одним из наиболее изученных ферментов этого класса [7].

В настоящее время существуют различные методы определения пероксидазы и ферментов-антиоксидантов: фотометрический, колориметрический, волнометрический, электрохимический, флуоресцентный, хемилюминесцентный и ряд более специфических.

Известно, что в водной вытяжке из корней хрена содержится значительное количество антиоксидантов, таких как пероксидаза, каталаза, витамин С, β -каротин, флавоноиды.

Содержание ферментов-антиоксидантов в корне хрена непостоянно и зависит от климатических условий, времени посадки и времени сбора урожая.

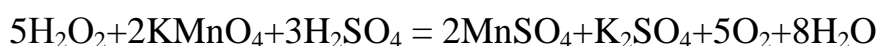
Нами было изучено содержание антиоксидантов с использованием метода А. Н. Баха и А. И. Опарина в корне хрена, выращенного в Астраханской области в летне-осенний период [8].

Содержание ферментов-антиоксидантов в корневище хрена непостоянно и зависит от климатических условий, времени посадки и времени сбора урожая.

Порядок выполнения работы. 2 г корневища хрена растирали с кварцевым песком в ступке, постепенно добавляя 2-3 см³ воды. Для уменьшения кислой реакции добавляли на кончике шпателя карбонат кальция до

прекращения выделения пузырьков углекислого газа. Растертую массу количественно переносили в мерную колбу и доводили объем раствора водой до 100 см³. Через 30 мин в коническую колбу емкостью 200 см³ вносили 25 см³ 0,1 н. раствора пероксида водорода и добавляли туда же 20 см³ вытяжки хрена, а еще через 30 мин действие фермента прекращали прибавлением 5 см³ 10%-ного раствора серной кислоты и титровали смесь 0,1 н. раствором перманганата калия (до образования устойчивого в течение примерно 1 мин розового окрашивания). Фиксировали количество миллилитров раствора перманганата калия, пошедшего на титрование оставшегося пероксида водорода. Одновременно ставили контроль с инактивированным нагреванием в кипящей водяной бане в течение 6 мин 20 см³ вытяжки хрена. К этому раствору после охлаждения добавляли 25 см³ 0,1 н. пероксида водорода. Смесь оставляли на 30 мин, после чего добавляли 5 см³ 10%-ного раствора серной кислоты и титровали смесь 0,1 н. раствором перманганата калия. Фиксировали количество миллилитров перманганата калия, пошедшего на титрование оставшегося количества пероксида водорода. По разности между опытным и контрольным титрованием находили количество перманганата, эквивалентное количеству разложенного ферментом пероксида водорода.

Расчет количества пероксида водорода, разложенного ферментом, вели в соответствии с уравнением реакции:



Согласно этому уравнению, 1 см³ 0,1 н. раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг пероксида водорода. Это хорошо иллюстрируется следующим примером. Из 2 г хрена приготовлена водная вытяжка объемом 100 см³. На титрование опытной пробы (20 см³ вытяжки хрена) затрачено 9,5 см³, контрольной – 18,6 см³ 0,1 н. раствора перманганата калия. Количество разложенного пероксида водорода в пробе эквивалентно $18,6 - 9,5 =$

9,1 см³ 0,1 н. раствора перманганата калия и, следовательно, равно 9,1 x 0,17=15,47 мг пероксида водорода.

В 2 г корневища хрена содержится количество ферментов - антиоксидантов, способное за 30 мин разложить $(1,547 \cdot 100) / (20 \cdot 1) = 77,35$ мг пероксида водорода, а за 1 мин – 2,56 мг. Так как 1мкмоль пероксида водорода составляет 0,034 мг, то в 2 г хрена содержится 76 Е ферментов - антиоксидантов (или 38 Е в 1 г хрена).

Результаты данной работы станут основой для создания и изучения нового энтеросорбента с антиоксидантными функциями.

Энтеросорбент получают адсорбцией на крахмале антиоксидантов, таких как пероксидаза, каталаза и аскорбиновая кислота, из водных вытяжек растительного материала.

Литература

- 1.Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи совр. Биологии, 1993. Т. 113. №4. С.442-455 .
2. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии: в 3 томах. Т.2. // М., Мир, 1981. С. 617.
3. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии: В 3-х томах. Т.3. Пер. с англ. // М., Мир, 1981. С. 726
4. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. Т.2. // М., Мир, 1985. С. 368.
5. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy // Lancet, 1984. P.1396-1398.
6. Шеремет С. А. Способ получения биологически активной добавки. Патент на изобретение № 2452242. Заявл. 2011106642/13, 22.02.2011. 10.06.2012 Бюл. № 16.
7. Преснова Г. В., Рубцова М. Ю., Егоров А. М. Электрохимические биосенсоры на основе пероксидазы хрена // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева), 2008, т. LII, № 2. С. 61.
- 8.Александрова Е. Ю., Орлова М. А., Нейман П. Л. Изучение пероксидазной активности в экстрактах из корневища и корней хрена и ее стабильности к различным воздействиям // Вест. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. № 5. С. 350.
9. Филлипович Ю.Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей химии // М.: Просвещение, 1975. С. 318.

References

1. Menshchikova E.B, Zenkov N.K Antioxidanty and inhibitory radicalnih okislitelnyh processov // Uspehi sovr. Biologii, 1993. T. 113. №4. S.442-455.
2. White, A., Hendler, F., Smith, E., R. Hill, Lehman I. Fundamentals of Biochemistry: 3, the max. V.2. // M., Mir, 1981. S. 617.

3. White, A., Hendler, F., Smith, E., R. Hill, Lehman I. Fundamentals of Biochemistry: In 3 volumes. V.3. Trans. from English. // M., Mir, 1981. S. 7264. .Lenindzher A. Fundamentals of Biochemistry: The 3-ton
4. .Lenindzher A. Fundamentals of Biochemistry: In 3 volumes. V.2. // M., Mir, 1985. S. 368.
5. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy // Lancet, 1984. P.1396-1398.
6. Sheremet S.A. Sposob poluchenuya biologicheski aktivnoi dobavki. Patent na izobretenie № 2452242. zayavl.. 2011106642/13, 22.02.2011. 10.06.2012 Bul. № 16.
7. Presnova G.V. Rubtsov M.U., Egorov A.M. Electrochimicheskie biosensory na osnove peroxidase chrena // Ros. Him. g., 2008, m. LII, № 2. S. 61.
8. Alexandrov E. U., Orlova M.A., Neiman P.L. Izuchenie peroxidaznoi aktivnosti v ekstraktax iz kornevitscha i kornei hrena i stabilnosti k razlchnim vozdeistviyam// Vest. Mosk. Univ. Ser. 2. Chemistry. 2006. T. 47. № 5. S. 350.
9. Fillipovich U. B, Egorova T.A., Sevastyanov G.A. Praktikum po obtschei himii // M.: Prosbetschenie, 1975. S. 318