

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577.3:612.111.11:57.04

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ГЕМОГЛОБИНА В РАСТВОРЕ ПОСЛЕ НАГРЕВА**П.В. Волошин, А.И. Черевко, Е.Д. Розанова, В.А. Коваленко, В.В. Евлаш***Харьковский государственный университет технологии и организации питания г. Харьков, ул. Клочковская, 333.*

Поступила в редакцию 18 марта 2003 г.

В статье приведены результаты исследования изменения содержания форм гемоглобина после нагрева до различных температур. Изучено влияние введения в раствор аскорбата, лизина и сахарозы на степень окисления гемового железа. Концентрация форм гемоглобина измерялась спектрофотометрически. Показано значительное снижение образования метгемоглобина при нагреве с введением в раствор сахарозы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гемоглобин, двухвалентное железо, нагрев, спектрофотометрия, аскорбат, лизин, сахароза

Использование в качестве пищевой добавки богатой железом крови крупного рогатого скота, основой которой является гемоглобин [1], привело к необходимости решения ряда задач, связанных с поиском путей стабилизации этого белка при нагреве.

Нагрев крови, являющийся необходимым этапом при изготовлении пищевых добавок, приводит к денатурации гемоглобина и образованию метгемоглобина, содержащего железо в 3-х валентном состоянии. Известно, что пищевая ценность продуктов, содержащих 3-х валентное железо, значительно ниже, чем у продуктов, в состав которых входит 2-х валентное гемовое железо [2].

Одним из путей стабилизации гемоглобина по отношению к нагреву является насыщение гемоглобина окисью углерода, приводящее к образованию карбоксигемоглобина, температура денатурации которого значительно выше, чем окси- или дезоксигемоглобина и составляет $\sim 80^{\circ}\text{C}$ [3]. Однако в реальных условиях при повышении температуры ускоряется и превращение карбоксигемоглобина в другие формы. Поэтому поиск веществ, способствующих стабилизации форм гемоглобина, содержащих 2-х валентное железо: в первую очередь карбоксигемоглобина представляет не только теоретический, но и практический интерес. Возможны различные пути стабилизации форм гемоглобина, содержащих двухвалентное железо: введение веществ, способствующих переходу гемового железа в двухвалентное состояние [4], антиденатурантов, стабилизирующих белки при нагреве, типичными представителями которых являются сахара [5] или веществ, которые способны связывать отрицательно заряженные супероксидные радикалы, ускоряющие образование метгемоглобина [7]. В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение влияния нагрева на содержание различных форм гемоглобина в растворах, содержащих аскорбат, лизин или сахарозу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гемоглобин выделяли из эритроцитов крови крупного рогатого скота. Для этого эритроциты трижды отмывали 0,9% раствором хлорида натрия, затем гомогенизировали в дистиллированной воде. Тени осаждали центрифугированием 10 мин. при 15000g. Гемоглобин очищали методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-75. Для получения карбоксигемоглобина раствор насыщали окисью углерода в течение 30 мин. В качестве веществ для стабилизации гемоглобина использовали 3 мМ раствор аскорбиновой кислоты с NaOH в эквивалентном соотношении для поддержания нейтрального pH, кроме того, были исследованы 3 мМ растворы лизина, а также 0,15 и 0,3М растворы сахарозы.

Концентрации указанных веществ были выбраны, исходя из возможности использования их в пищевых добавках. Концентрация гемоглобина в растворе была в пределах 8-10 мкМ. Растворы гемоглобина нагревали до различных температур (30, 40, 50, 60, 70, 75, 80 $^{\circ}\text{C}$), выдерживали 10 мин, затем охлаждали до комнатной температуры (22 $^{\circ}\text{C}$), при которой записывали спектры поглощения в видимой области для определения содержания форм гемоглобина и в УФ-области для характеристики состояния белковой глобулы. Мутность раствора характеризовали по уровню поглощения при 700 нм для оценки агрегации белка. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре «Pye Unicam SP 8000» (Англия). Содержание различных форм гемоглобина: оксигемоглобина (HbO₂), дезоксигемоглобина (Hb), карбоксигемоглобина (HbCO) и метгемоглобина (MetHb) определяли спектрофотометрически [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты расчета содержания различных форм гемоглобина после нагрева в физиологическом растворе приведены в табл. 1. Нагрев приводит к постепенному уменьшению содержания окси- и карбоксигемоглобина и образованию метгемоглобина (табл. 1.) Эти превращения идут по известной схеме [7].

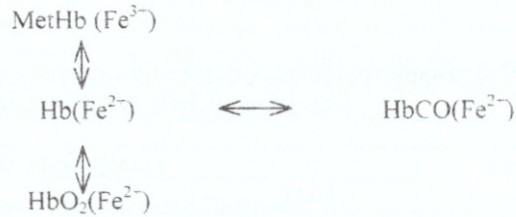


Табл.1.

Содержание различных форм гемоглобина в физиологическом растворе. pH 6.0

Температура, °C	Содержание форм гемоглобина, %			
	HbO ₂	Hb	HbCO	MetHb
30	42+2	8+1	41+3	9+1
40	44+3	10+1	38+3	8+1
50	42+2	13+2	33+3	12+2
60	43+2	15+2	31+4	11+2
70	35+2	15+2	30+4	24+3
75	32+2	13+2	28+3	27+2
80	6+1	14+2	20+2	60+3

После нагрева до 60°C (рис. 1а) заметно увеличивается мутность раствора, обусловленная агрегацией белка. Изменение мутности растворов гемоглобина при нагреве, обусловленное агрегацией белка, показано на рис. 1.

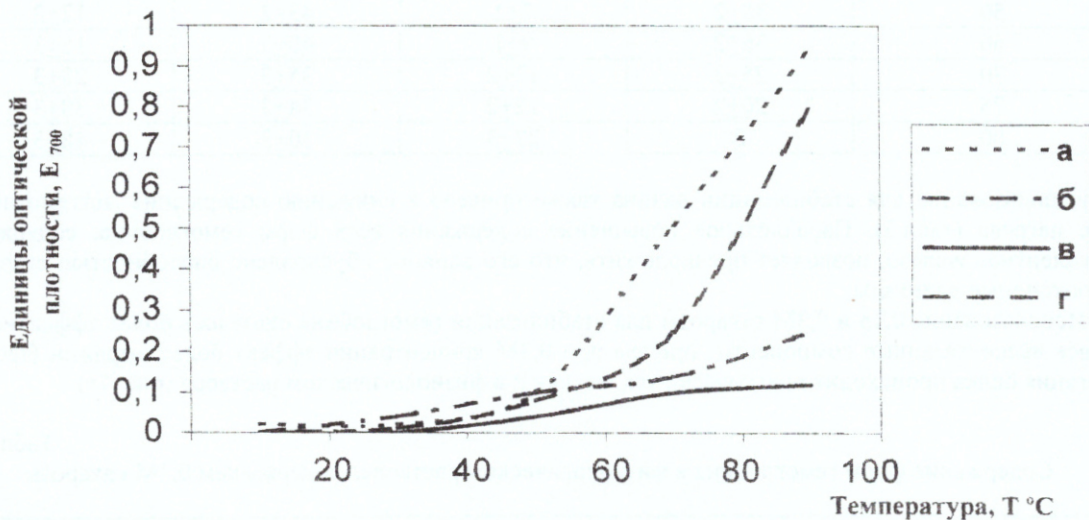


Рис. 1. Зависимость мутности растворов гемоглобина от температуры
 А) физиологический раствор
 Б) физиологический раствор + 3мМ аскорбата натрия
 В) физиологический раствор + 3мМ аскорбиновой кислоты
 Г) физиологический раствор + 0.3М сахарозы

Изменение содержания различных форм гемоглобина в растворе ...

Нагрев растворов гемоглобина, содержащих аскорбат натрия не способствует снижению содержания метгемоглобина, увеличение его концентрации начинается после 40°C. В то же время, концентрация карбоксигемоглобина остается неизменной до 75°C (табл.2).

При более высокой температуре начинается агрегация, которая менее выражена, чем в предыдущем случае (рис. 1б), что свидетельствует о стабилизации молекул карбоксигемоглобина в присутствии аскорбата натрия.

Таблица 2.

Содержание различных форм гемоглобина в физиологическом растворе, содержащем 3мМ аскорбата натрия, pH 7.0

Температура, °C	Содержание форм гемоглобина, %			
	HbO ₂	Hb	HbCO	MetHb
30	46±4	8±1	43±3	9±1
40	35±3	5±1	44±4	17±2
50	34±3	7±2	43±4	16±2
60	20±3	4±1	45±4	31±3
70	16±3	5±1	45±4	34±3
75	10±2	0	44±4	46±4
80	3±1	5±1	28±3	64±5

В присутствии 3мМ аскорбиновой кислоты (pH~3,0) наблюдается полное окисление железа в гемоглобине при всех изученных температурах, в то же время следует отметить отсутствие агрегации белка (рис. 1в).

Таблица 3.

Содержание форм гемоглобина в физиологическом растворе, содержащем 3мМ лизин

Температура, °C	Содержание форм гемоглобина, %			
	HbO ₂	Hb	HbCO	MetHb
30	41±3	8±1	42±3	9±1
40	40±3	9±1	43±2	8±1
50	38±2	7±1	43±2	12±2
60	36±2	9±1	40±3	15±3
70	25±3	12±2	35±3	28±3
75	20±2	12±2	34±3	38±3
80	0	22±3	30±3	48±3

Использование для стабилизации лизина также привело к снижению содержания метгемоглобина после нагрева (табл.3). Параллельное повышение содержания всех форм гемоглобина, содержащих двухвалентное железо, позволяет предположить, что его влияние обусловлено способностью связывать супероксидные радикалы.

Использование 0,15 и 0,3М сахарозы для стабилизации гемоглобина оказалось более эффективным, чем все вышеуказанные компоненты, причем при 0,3М концентрации эффект более выражен (табл. 4). Агрегация белка происходит практически так же, как и в физиологическом растворе (рис. 1г).

Таблица 4.

Содержание форм гемоглобина в физиологическом растворе, содержащем 0,3М сахарозы

Температура, °C	Содержание форм гемоглобина, %			
	HbO ₂	Hb	HbCO	MetHb
30	42±1	8±1	40±3	10±2
40	41±2	10±1	39±3	10±2
50	42±2	8±2	40±3	10±2
60	41±2	8±2	40±2	11±2
70	38±2	8±2	41±2	13±2
75	30±2	9±2	41±2	20±3
80	13±4	8±2	40±2	39±3

Стабилизирующее действие сахарозы наиболее вероятно связано с изменением свойств растворителя, снижением его диэлектрической проницаемости, приводящим к стабилизации белковой глобулы в растворе при нагреве и уменьшением вероятности окисления железа при взаимодействии с кислородом [8].

Таким образом, полученные результаты показали, что использованные нами вещества в разной степени позволяют стабилизировать формы гемоглобина, содержащие двухвалентное железо, при нагреве. Наиболее эффективным стабилизатором является сахароза. Поэтому дальнейший поиск веществ, позволяющих снизить содержание метгемоглобина при тепловой обработке, в первую очередь должен проводиться среди веществ, снижающих диэлектрическую проницаемость растворов. Можно также предположить, что хорошие результаты могут быть получены при одновременном использовании стабилизаторов различных типов. Подтверждение справедливости этого предположения может быть получено в дальнейших исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горбатов В.М., Мамонов Н.Д. Обработка и использование крови на пищевые цели. ЦНИИГЭН мясопром. М., 1985. - 20 с. (сер. «Мясная промышленность», обзор, информ.).
2. Черняев С.И., Люблинский С.Л., Люблинская И.Н., Марков Н.В. «Гемобин» – натуральная биологически активная пищевая добавка нового поколения. Пищевая промышленность, 2000, N8. с. 50-52.
3. Лапшина Е.А., Заводник И.Б., Игнатенко В.А., Степура И.И. Термостабильность и функциональные свойства гемоглобина человека в присутствии алифатических спиртов. Мол. Биол., 1992, 26, N2. с 315-320.
4. Ernst R., Jaffe M.D. Methemoglobin Pathology in the function of red blood cells: eritrocite pathology. N.Y., 1981. p. 133-151.
5. Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура. Л. «Наука», 1975. 329 с.
6. Zwart A., Buursuia A., van Kampen E.J., Desburg B., van der Ploeg P.H.W., Zilistra W.G., A multi-wavelength Spectrophotometric Method for the simultaneous determination of five Haemoglobin derivatives. J. Clin Chem. Clin. Biochem., 1981, 19, 457-463.
7. Overvie of blood, Ed.C.Bishop, N.Y., USA, 1978. 431 p.
8. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. Основы биохимии. Т.3. Москва. Мир. 1981.726 с.