

Sledovanie oxidácie kyseliny l-askorbovej v prítomnosti peroxidáz pri nízkych teplotách

Š. ŠULC, B. KRKOŠKOVÁ, J. PALLOVÁ

Kyselina l-askorbová je dôležitá zložka výživy človeka aj ako redukčné činidlo v potravinárskej technológii.

Kyselina l-askorbová vstupuje v mnohých fázach látkovej premeny do redoxpotenciálu nášho organizmu, podieľa sa na prevode elektrónov a pri hydroxylácii (1). Je súčasťou lipázy, ktorú môže i nahradiť (2).

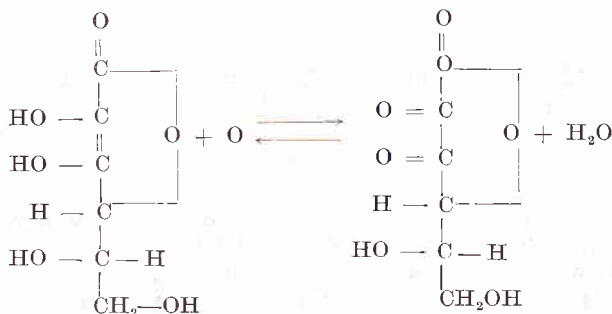
Ludský organizmus nie je v stave syntetizovať túto dôležitú látku na udržanie životných funkcií a preto ju musí prijať v potrave. Najdôležitejším zdrojom kyseliny l-askorbovej sú okrem citrusových plodov šípky, čierne ríbezle, paprika, karfiol, zelený hrášok, špenát a zemiaky.

Pri výrobe a skladovaní potravín dochádza často ku zmene ich chuti a farby, čo je spôsobené oxidáciou, či už chemickou alebo enzymatickou. Uvedeným zmenám možno niekedy úspešne zabrániť, keď využijeme redukčnú schopnosť kyseliny l-askorbovej tým, že pri technologickom procese ju pridáme do potraviny, alebo sa snažíme v potravine ju uchovať.

Kyselina l-askorbová je gama-laktón kyseliny 2-keto-l-gulonovej. Patrí k najsilnejším redukčným činidlám v živom organizme, pričom sa ľahko oxiduje celým radom enzýmov napr. askorbázou, katalázou a peroxidázami. Okrem enzymatickej oxidácie sa môže táto silná organická kyselina oxidovať rôznymi organickými a anorganickými látkami.

Prvým reverzibilným oxidačným stupňom kyseliny l-askorbovej je kyselina l-dehydroaskorbová, ktorá je ešte biologicky účinná. V ďalšom priebehu oxidácie sa táto mení na 2,3-diketo-l-gulonovú kyselinu. Posledný stupeň oxidácie vedie k oxidatívnemu štiepeniu 6 uhlíkového reťazca za vzniku kyseliny šťavelovej a kyseliny l-treónovej (3).

Oxidáciu kyseliny l-askorbovej na dehydroaskorbovú môžeme znázorniť nasledovne: (4)



Z biologického materiálu môže byť potrebný kyslík uvoľnený rôznymi enzymatickými systémami napr. peroxidázami.

Tento typ oxidácie kyseliny *l*-askorbovej bol sledovaný v jednoduchom a zložitom systéme so zameraním na zistenie zmien jednotlivých látok, ktoré sú zložkou potravy. Tak Smith a Dunkley (5) študovali vzťah medzi peroxidáciou lipidickej zložky mlieka a oxidáciou kyseliny *l*-askorbovej. Balla (6) skúmal podmienky rozpadu kyseliny *l*-askorbovej účinkom oxidačných enzýmov u niektorých výrobkov z ovocia a zeleniny. Maier a Tapel (7) študovali reakčné rýchlosti oxidácie kyseliny *l*-askorbovej v prítomnosti peroxidáz v závislosti od nízkych teplôt pri sledovaní poklesu kvality mrazených potravín. V našich štúdiách (8) sme sledovali úchovu kyseliny *l*-askorbovej v rôznych cukorných koncentráciách pri použití rôznych cukrov v závislosti od teploty.

Zistené výsledky boli nám podkladom pre ďalšie skúmanie, ktorým sme chceli poznať ako závisia oxidačné pochody od teploty v prítomnosti enzýmov peroxidáz, ktoré sú jedným z najodolnejších enzýmov voči teplu. Nakoľko ovocie a zelenina predstavuje zložitý systém, volili sme štúdium urobiť v jednoduchom systéme.

Usporiadanie pokusov

Modelové systémy sme si pripravili rozpustením 150 mg kyseliny *l*-askorbovej v redestilovanej vode a redestilovanom metylalkohole v pomere 1:1. Potom sme pridali peroxid vodíka v takom množstve, aby jeho výsledná koncentrácia bola v roztoku 1 M, 0,1 M, 0,01 M, 0,001 M, 0,0001 M, 0,00001 M. Ďalej sme pridali extrakt z chrenu o známej aktivite peroxidáz, a to opäť v takom množstve, aby ich výsledná aktivita v roztoku bola 100, 200, 400, a 800 (10). Po dokonalom a rýchlom rozmiešaní, sme doplnili obsah banky vodno-alkoholickým roztokom (1:1).

Aby sa v systémoch čo najrýchlejšie ustálila požadovaná teplota, predchladili sme vopred zmes redestilovaného metylalkoholu a redestilovanej vody na potrebnú teplotu. Roztoky sme skladovali v PVC tubách pri teplotách -12°C , -18°C a -35°C .

Aktivitu peroxidáz sme volili na základe ich zistenia v ovocí a zelenine počas 3 ročného sledovania.

Odber vzoriek sme robili v pravidelných intervaloch počas 30 dní.

Metodika

Aktivita peroxidáz sa stanovila podľa Morrisa (9) a Šulca (10). Kyselina *l*-askorbová stanovená chromatograficky (11).

Výsledky pokusov

Pri hodnotení vplyvu teploty na priebeh oxidácie kyseliny *l*-askorbovej je možné koncentrácie peroxidu vodíka rozdeliť na dve časti.

V prvej časti sú koncentrácie peroxidu vodíka 1 M, 0,1 M a 0,01 M. V tejto oblasti koncentrácií je zvlášť výrazný účinok teplôt. Napr. čas potrebný na

úplné zoxidovanie prítomnej kyseliny *l*-askorbovej bol v 1 deň pri -12°C , 3 dni pri -18°C a 18 dní pri -35°C , keď bola v roztoku koncentrácia peroxidu vodíka 1 M a aktivita peroxidáz 100. Pri aktivite peroxidáz 200, koncentrácii peroxidu vodíka 1 M sa zoxidovala kyselina *l*-askorbová za 3 dni pri -12°C , 18 dní pri -18°C , kým pri -35°C ešte v roztoku ostalo 10 % kyseliny *l*-askorbovej i po 30 dňoch skladovania. Pri aktivite 400 čas potrebný na oxidáciu kyseliny *l*-askorbovej bol ešte dlhší ako pri aktivite peroxidáz 200. Najpomalšie prebiehala oxidácia kyseliny *l*-askorbovej pri aktivite peroxidáz 800, kde došlo k jej úplnej oxidácii počas 30 dní pri -12°C , kým pri -18°C v roztoku ostalo ešte 24 %, pri -35°C až 44 % kyseliny *l*-askorbovej.

Keď je koncentrácia peroxidu vodíka v systéme 0,1 M, je potrebný dlhší čas na oxidáciu kyseliny *l*-askorbovej pri skúmaných teplotách a sledovaných aktivitách peroxidáz ako pri koncentrácii peroxidu vodíka 1 M. Pri koncentrácii peroxidu vodíka 0,01 M oxidácia kyseliny *l*-askorbovej bola pomalšia, ako pri 1 M roztoku peroxidu vodíka, avšak rýchlejšia ako pri 0,1 M peroxidu vodíka. I keď sme sa snažili zistiť príčiny zrýchlenej oxidácie kyseliny *l*-askorbovej pri koncentrácii 0,01 M peroxidu vodíka ako pri 0,1 M peroxidu vodíka, nepodarilo sa nám to, i keď sme pokusy niekoľkokrát opakovali.

Rozdielnu úchovu kyseliny *l*-askorbovej môžeme vysvetliť tým, že jej straty sú závislé od koncentrácie peroxidu vodíka a od teploty. Čím je koncentrácia peroxidu vodíka vyššia, tým je aj aktivita peroxidáz vyššia, čo umožňuje uvoľnenie väčšieho množstva kyslíka z peroxidu vodíka, ktorý potom oxiduje kyseliny *l*-askorbové na kyselinu *l*-dehydroaskorbovú. Pri pôsobení teploty sa ukázalo, že čím je ona nižšia, tým viac bráni vstupu kyslíka a kyseliny *l*-askorbovej do aktivačného stavu, čo zabraňuje oxidácii kyseliny *l*-askorbovej.

V druhej časti pri koncentrácii peroxidu vodíka (0,001 M, 0,0001 M a 0,00001 M) oxidácia kyseliny *l*-askorbovej bola úplne odlišná od predchádzajúcich pokusov.

Pokusy ukázali, že k výraznejšej oxidácii kyseliny *l*-askorbovej dochádza počas 3 až 6 dní, načo v ďalšom období jej pokles je malý. Napr. pri aktivite peroxidáz 100, koncentrácii peroxidu vodíka 0,001 M po 30 dňoch sa v roztoku uchovalo 69,7 % kyseliny *l*-askorbovej pri -12°C . Obdobná úchova kyseliny *l*-askorbovej bola pri teplotách -18°C a -35°C .

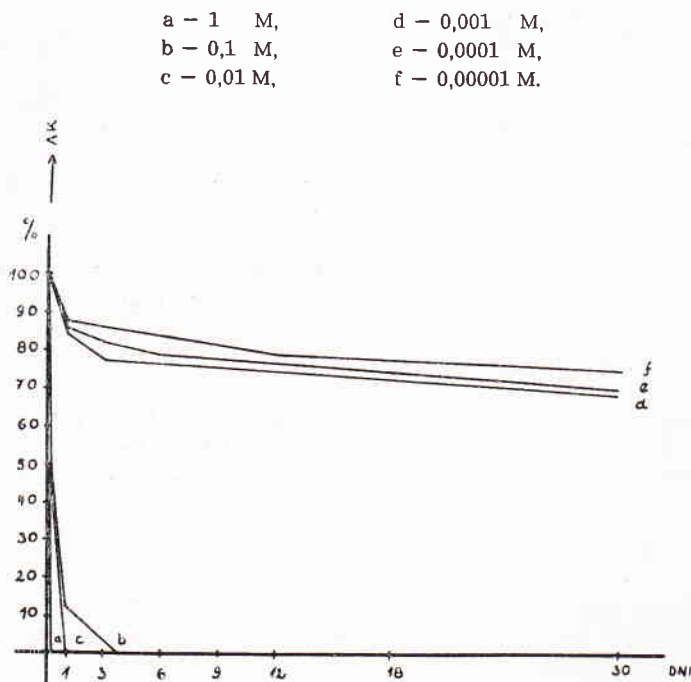
Vysokú stratu kyseliny *l*-askorbovej na začiatku pokusu môžeme vysvetliť tým, že na jej oxidácii sa nepodieľal len peroxidický kyslík, ale tiež kyslík, ktorý sme pridali s chrenovým výťažkom peroxidáz a s redestilovanou vodou.

S ú h r n

Sledovali sme vplyv teplôt (-12°C , -18°C a -35°C) koncentrácie peroxidu vodíka (1 M, 0,1 M, 0,01 M, 0,001 M, 0,0001 M a 0,00001 M) a aktivity peroxidáz (100, 200, 400, 800) na oxidáciu kyseliny *l*-askorbovej počas 30 dní.

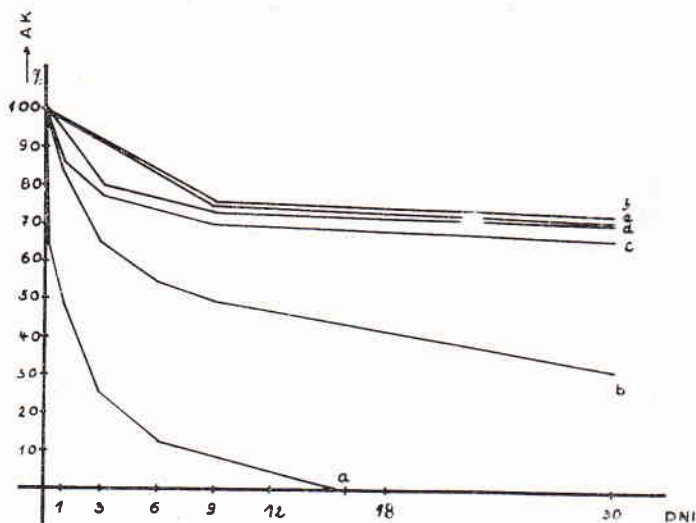
Zistili sme, že vo výraznej miere zabraňuje oxidácii kyseliny *l*-askorbovej teplota pri koncentráciách peroxidu vodíka 1 M, 0,1 M a 0,01 M. Najvyššia úchova kyseliny *l*-askorbovej bola pri -35°C , kým jej najnižšia úchova bola pri -12°C .

Pri koncentracii peroxidu vodíka (0,001 M, 0,0001 M, 0,00001 M) kyselina *l*-askorbová oxidovala pomerne rýchlejšie počas 3–6 dní, kým v ďalšom období pokusu jej oxidácia bola minimálna. V tomto pokuse teploty mali malý vplyv na úchovu kyseliny *l*-askorbovej.



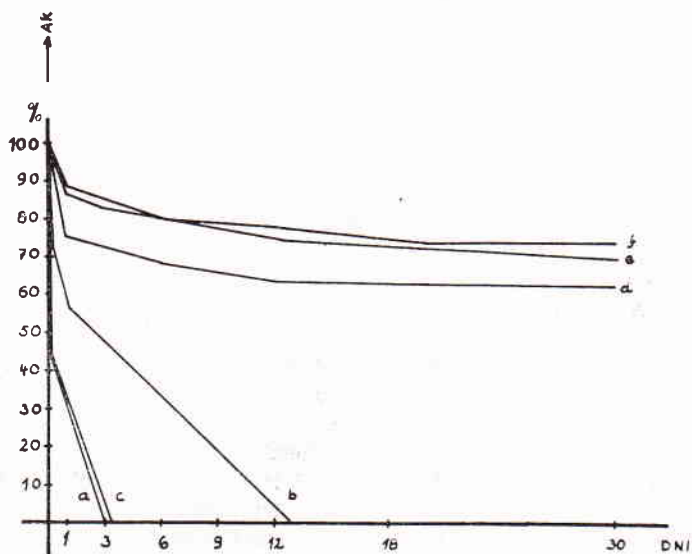
Graf 1. Oxidácia kys. *l*-askorbovej v prítomnosti peroxidáz pri aktivite 100 teploty -12°C .

a - 1 M,	d - 0,001 M,
b - 0,1 M,	e - 0,0001 M,
c - 0,01 M,	f - 0,00001 M.



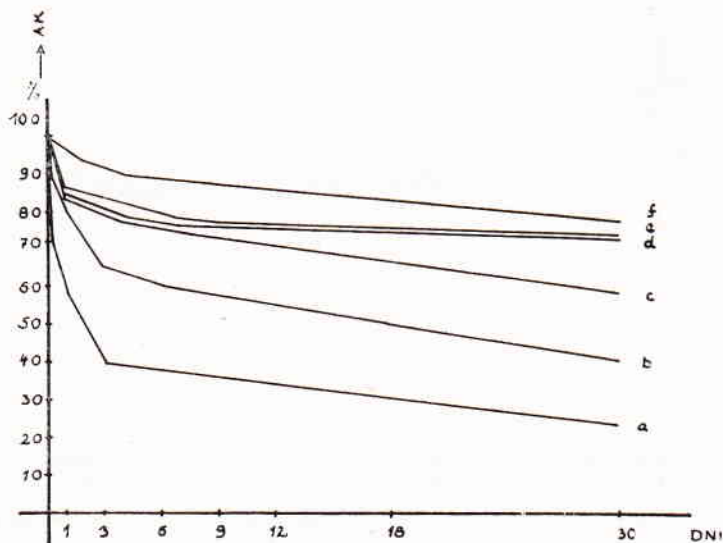
Graf 2. Oxidácia kys. *l*-askorbovej v prítomnosti peroxidáz pri aktivite 100 teploty -35°C .

a - 1 M,	d - 0,001 M,
b - 0,1 M,	e - 0,0001 M,
c - 0,01 M,	f - 0,00001 M.



Graf 3. Oxidácia kys. *l*-askorbovej v prítomnosti peroxidáz pri aktivite 100 teploty -18°C .

a - 1 M,	d - 0,001 M,
b - 0,1 M,	e - 0,0001 M,
c - 0,01 M,	f - 0,00001 M.



Graf 4. Oxidácia kys. l-askorbovej v prítomnosti peroxidáz pri aktivite 800 teploty -18°C .

Literatúra

1. Bex H., Die industrielle Obst und Gemüsverwertung 2, 1965.
2. Kocková A., Úvod do biochémie pre potravinárov, 1958.
3. Fragner J., Vitamíny, 1961.
4. Neilands J. B., Stumpf P. K., Úvod do enzymologie, ČSAV Praha 1961.
5. Smith G. J., Dunkley W. L., Journal of Food Science, 4, 1962.
6. Balla F., Élelmészeti ipar, 10, 1960.
7. Maier V. P., Tappel A. L., Analytical chemistry, 26, 1954.
8. Šulc Š., Hurajová J., Bulletin výsk. ústavu mraziarenského I., 4, 1962.
9. Morris H. J., Agricultural and Food chemistry, 1958.
10. Šulc Š., Vplyv technológie a sort na mrazený špenát. Mrázirny, n. p., Praha. Výskumný ústav mraziarenský, Bratislava, 1961. Záv. zpráva.
11. Háis, Macek, Procházka, Papírová chromatografie, 1959.

Учет окисления *л*-аскорбиновой кислоты, в присутствии пероксидазов, при низких температурах

Резюме

Проводились наблюдения за влиянием температур, (-12°C , -18°C и -35°C) концентрации перекиси водорода, (1 М, 0,1 М, 0,01 М, 0,001 М, 0,0001 М и 0,00001 М) и активности пероксидаза, (100, 200, 400 и 800) на окисление *л*-аскорбиновой кислоты, в течение 30 дней.

Было установлено, что в назчительной степени препятствует окислению *л*-аскорбиновой кислоты — температура при концентрациях перекиси водорода 1 М, 0,1 М и 0,01 М. Более всего сохранилось *л*-аскорбиновой кислоты при -35°C , тогда как наименее ее сохранилось при -12°C .

При концентрации перекиси водорода, (0,001 М, 0,0001 М и 0,00001 М) окислялась *л*-аскорбиновая кислота, сравнительно быстрее в течение 3—6 дней, чем в течение дальнейшего продолжения опыта, когда ее окисление было минимальное. Во время опыта температура оказывала небольшое влияние на сохранение *л*-аскорбиновой кислоты.

Investigation de l'acide *l*-ascorbique en présence de peroxydase à des basses températures

Résumé

On a suivi l'influence de la température (-12°C , -18°C , et -35°C) de la concentration de peroxyde d'hydrogène (1 М, 0,1 М, 0,01 М, 0,001 М, 0,0001 et 0,00001 М) et l'activité de la peroxydase (100, 200, 400, 800) sur l'oxydation de l'acide *l*-absorbique pendant un délai de 30 jours.

On a constaté que surtout la température empêche l'oxydation de l'acide *l*-absorbique auprès de la concentration de peroxyde d'hydrogène 1 М, 0,1 М et 0,01 М. Le plus grand degré de conservation l'acide *l*-ascorbique a été auprès de -35°C , et le plus bas degré de conservation a été auprès de 12°C .

Pendant la concentration de peroxyde d'hydrogène (0,001 М, 0,0001 М, 00001 М) l'acide *l*-ascorbique a oxydé relativement plus vite pendant 3—6 jours, cependant plus tard l'oxydation a été minimale. Dans cette expérience la température a eu une très petite influence à la conservation de l'acide *l*-ascorbique.

Vplyv teploty na oxidáciu kyseliny *l*-askorbovej v % v prítomnosti peroxidáz

Teplota -12 °C

Tabuľka 1

Koncentrácia H_2O_2 Mol/liter	Aktivita peroxidáz	Hodiny			Dni						
		Hneď	2	4	1	3	6	9	12	18	30
1	$19,10^{-2}$ (100)	100	42,4	38,0	0						
0,1		100	55,8	52,0	13,3	4,0	0				
0,01		100	65,0	50,0	0	ϕ					
0,001		100	90,0	85,0	84,5	78,0	77,0	75,0	76,6	74,2	69,7
0,0001		100	91,0	86,6	85,6	82,4	79,2	78,0	77,2	76,6	71,6
0,00001		100	93,0	91,6	87,5	85,8	84,1	82,0	79,0	76,3	76,6
1	$38,10^{-2}$ (200)	100	49,5	45,1	7,8	0					
0,1		100	76,6	62,5	30,0	25,0					
0,01		100	89,0	87,5	41,6	22,5	15,0	4,1	0		
0,001		100	95,8	91,6	89,1	85,4	83,3	81,6	79,0	76,6	73,3
0,0001		100	97,0	94,1	94,1	90,8	88,0	86,5	84,3	81,2	73,3
0,00001		100	98,0	96,0	95,8	94,1	91,3	88,0	85,7	79,0	76,6

Teplota -12°C

Koncentrácia H_2O_2 Mol/liter	Aktivita peroxidáz	Hodiny			Dni						
		Hneď	2	4	1	3	6	9	12	18	30
1	$75,10^{-2}$ (400)	100	56,0	55,2	36,6	20,0	10,5	4,2	0		
0,1		100	84,0	89,0	71,6	53,3	38,0	27,2	19,0		
0,01		100	91,6	90,0	80,0	71,6	54,1	50,0	44,2	39,2	31,6
0,001		100	96,0	92,0	80,0	76,6	78,0	76,6	75,0	76,0	74,0
0,0001		100	96,0	94,8	87,5	83,8	78,2	77,8	77,0	75,0	75,0
0,00001		100	97,6	96,0	90,0	84,7	80,0	81,6	75,0	76,6	76,6
1	$150,10^{-2}$ (800)	100	82,5	64,2	60,8	40,0	26,6	20,0	15,0	4,2	0
0,1		100	97,4	94,0	78,3	67,0	43,3	37,2	33,0	19,2	0
0,01		100	98,0	93,0	93,0	78,3	70,0	66,6	56,6	55,8	52,5
0,001		100	93,0	95,0	93,0	80,9	78,3	77,4	78,0	77,5	75,8
0,0001		100	97,0	95,4	94,0	85,8	81,0	79,5	78,0	79,0	77,3
0,00001		100	98,0	96,0	92,6	88,3	83,3	82,1	81,0	79,2	78,0

Vplyv teploty na oxidáciu kyseliny *l*-askorbovej v % v prítomnosti peroxidáz

Tabuľka 3

Teplota -18°C

Koncentrácia H_2O_2 Mol/liter	Aktivita peroxidáz	Hodiny			Dni						
		Hneď	2	4	1	3	6	9	12	18	30
1	$19,10^{-2}$ (100)	100	47,2	43,4	34,7	0	0	0	0	0	0
0,1		100	76,6	70,3	56,6	50,0	35,0	21,5	19,5	0	0
0,01		100	58,0	44,0	28,0	0	0	0	0	0	0
0,001		100	90,7	89,0	85,2	73,2	68,0	65,9	63,9	62,8	62,8
0,0001		100	95,0	92,0	87,0	83,0	78,0	76,0	75,0	72,0	70,0
0,00001		100	97,5	92,8	88,5	81,4	79,4	78,0	78,0	74,2	74,2
1	$38,10^{-2}$ (200)	100	55,5	53,0	45,4	25,2	15,6	8,0	6,0	0	0
0,1		100	80,0	73,9	65,0	62,6	59,0	47,0	43,0	28,7	0
0,01		100	75,0	73,0	58,0	54,0	40,0	36,0	11,0	0	0
0,001		100	93,5	86,0	73,0	72,0	69,0	69,0	68,0	67,0	65,0
0,0001		100	98,0	96,0	91,0	79,0	76,0	75,0	74,0	70,0	70,0
0,00001		100	100,0	100,0	98,5	94,0	78,0	76,1	78,0	73,0	73,0

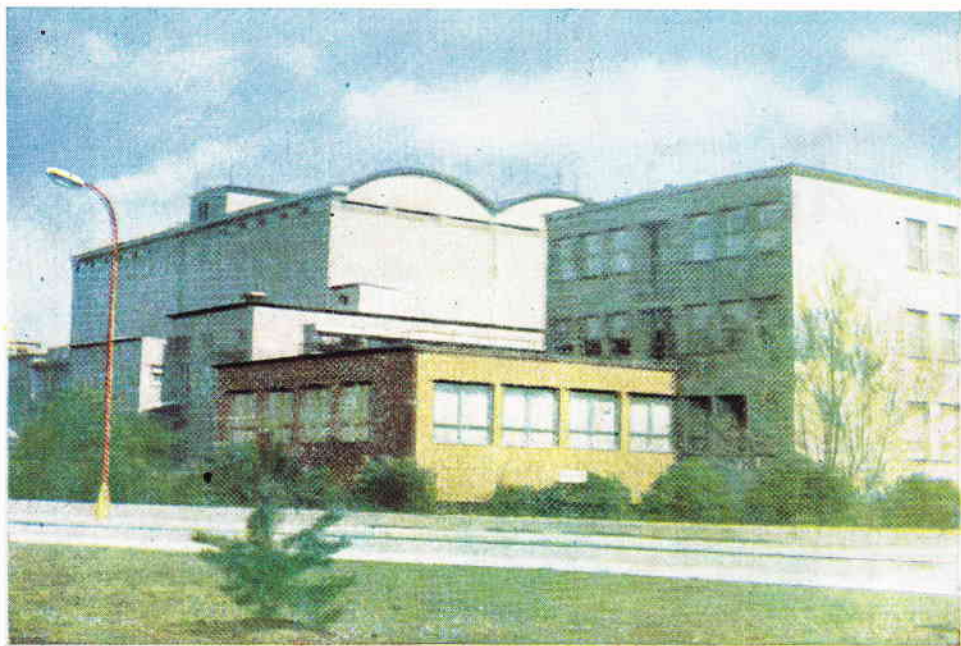
Koncentrácia H_2O_2 Mol/liter	Aktivita peroxidáz	Hodiny			Dni						
		Hneď	2	4	1	3	6	9	12	18	30
1	$75,10^{-2}$ (400)	100	70,5	65,0	51,0	34,7	27,3	24,0	18,0	12,5	0
0,1		100	—	83,6	64,0	49,5	47,4	45,8	42,9	37,0	26,6
0,01		100	75,0	74,0	68,0	65,0	61,0	59,0	56,0	52,0	42,0
0,001		100	98,0	92,0	86,0	70,0	70,5	69,0	68,0	67,0	66,0
0,0001		100	97,0	96,0	90,0	82,0	75,5	71,0	76,0	70,0	71,0
0,00001		100	100	100,0	98,0	97,0	94,0	87,0	82,0	77,0	76,0
1	$150,10^{-2}$ (800)	100	80,0	72,0	58,0	39,8	38,0	36,0	34,5	30,8	24,1
0,1		100	98,6	90,0	80,0	64,5	60,0	58,7	56,3	50,8	40,0
0,01		100	92,0	85,3	83,2	77,4	76,0	73,5	66,6	65,7	58,8
0,001		100	98,1	88,2	81,3	78,4	76,4	76,4	74,5	74,5	73,5
0,0001		100	98,9	98,4	95,1	78,9	78,0	77,0	75,5	75,1	74,0
0,00001		100	99,8	99,6	96,0	90,0	88,5	88,0	85,0	82,0	78,0

Vplyv teploty na oxidáciu kyseliny *l*-askorbovej v % v prítomnosti peroxidáz

Tabuľka 5

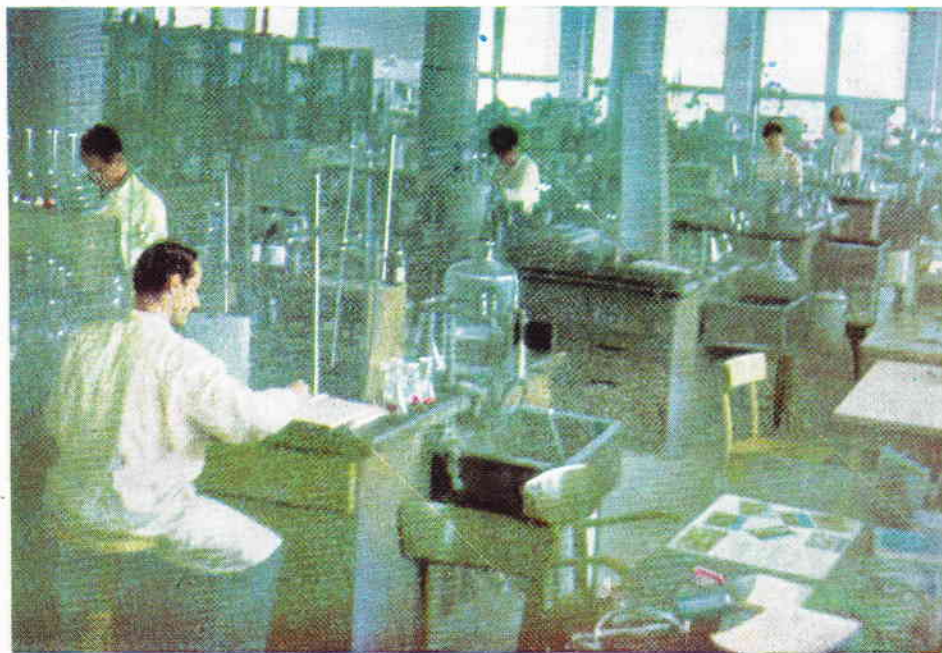
Teplota -35°C

Koncentrácia H_2O_2 Mol/liter	Aktivita peroxidáz	Hodiny			Dni						
		Hneď	2	4	1	3	6	9	12	18	30
1	$19,10^{-2}$ (100)	100	82,0	65,0	51,0	25,0	13,0	8,3	6,0	0	0
0,1		100	86,0	85,0	84,0	65,0	55,0	50,0	48,0	42,7	32,4
0,01		100	90,4	88,1	86,6	77,5	72,5	70,0	69,0	68,3	67,2
0,001		100	92,0	90,0	85,0	80,0	73,3	73,3	73,0	72,5	71,5
0,0001		100	95,0	94,0	90,0	83,3	76,6	75,0	75,0	72,5	72,5
0,00001		100	97,5	98,0	97,0	85,8	75,8	75,0	73,3	73,3	72,5
1	$38,10^{-2}$ (200)	100	85,0	81,0	68,0	62,0	40,0	29,0	28,0	21,8	10,0
0,1		100	86,2	81,0	80,0	78,0	72,0	61,0	58,0	54,4	48,8
0,01		100	96,3	95,7	76,6	43,3	30,0	15,8	3,3	0	0
0,001		100	98,0	97,0	86,6	82,4	79,2	71,0	64,2	60,8	54,7
0,0001		100	98,2	96,0	89,4	86,6	83,0	79,5	75,8	75,0	74,1
0,00001		100	98,9	96,6	94,2	90,0	89,7	86,6	85,0	79,2	78,3



Pohľad na veľké laboratórium výskumného ústavu zvonka

Foto: E. Jurčovičová



Veľké laboratórium výskumného ústavu zvnútra

Foto: E. Jurčovičová

Teplota -35 °C

Koncentrácia H_2O_2 Mol/liter	Aktivita peroxidáz	Hodiny			Dni						
		Hneď	2	4	1	3	6	9	12	18	30
1	$75,10^{-2}$ (400)	100	88,0	85,0	70,7	63,5	55,0	52,0	48,8	45,0	35,0
0,1		100	90,0	86,0	82,0	74,0	71,5	70,0	65,8	63,0	58,0
0,01		100	91,0	90,0	60,0	45,6	43,2	40,8	31,6	22,7	0
0,001		100	93,6	89,0	79,2	76,6	73,3	71,8	69,5	65,0	60,0
0,0001		100	96,0	92,0	80,1	79,2	77,5	78,0	76,3	73,2	67,5
0,00001		100	95,8	94,0	93,3	90,2	88,0	85,0	83,3	80,6	75,8
1	$150,10^{-2}$ (800)	100	92,0	86,0	73,0	66,0	58,7	58,0	55,8	53,4	44,0
0,1		100	93,0	88,0	82,0	81,0	76,5	75,0	71,6	68,5	62,5
0,01		100	95,0	90,0	74,0	68,3	68,0	65,0	62,5	59,0	50,0
0,001		100	97,2	93,0	87,3	80,8	80,8	77,8	77,0	75,0	70,0
0,0001		100	97,0	95,0	90,3	86,4	85,8	83,3	81,0	78,0	70,8
0,00001		100	98,0	98,0	97,0	93,3	90,0	87,3	84,2	81,3	73,3