

# АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ГИДРОЛИЗАТОВ СЫВОРОТКИ МОЛОКА И МОЛОЗИВА С ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

## ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WHEY AND COLOSTRUM HYDROLYZATES COMPLEXES WITH CYCLODEXTRIN

**Е. И. Тарун<sup>1</sup>, Е. А. Стаселович<sup>1</sup>, П. Ю. Красовская<sup>1</sup>, Т. Н. Головач<sup>2</sup>, Р. В. Романович<sup>2</sup>**  
**E. I. Tarun<sup>1</sup>, E. A. Staselovich<sup>1</sup>, P. Y. Krasovskaya<sup>1</sup>, T. M. Halavach<sup>2</sup>, R. V. Romanovich<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет МГЭИ им. А.Д.Сахарова, БГУ,  
г. Минск, Республика Беларусь  
ktarun@tut.by

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

<sup>1</sup>International Sakharov Environmental Institute of BSU, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Проведено сравнительное изучение антиоксидантной активности концентрата сывороточного белка молока, нативного молозива, их ультрафильтрованных гидролизатов, а также комплексов ультрафильтратов гидролизатов с циклодекстрином. Получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации всех образцов, из которых графически определены показатели  $IC_{50}$ , которые находились в пределах 6,83–77,53 мкг/мл. Комплексы ультрафильтратов гидролизатов с циклодекстрином восстанавливали флуоресценцию флуоресцеина до 84–96 % при концентрации образцов 0,68–0,75 мг/мл.

The comparative study of the antioxidant activity of whey protein concentrate, native colostrum, their ultrafiltered hydrolysates, as well as complexes of ultrafiltered hydrolysates with cyclodextrin was carried out. The dependences of the fluorescence intensity of fluorescein on the logarithm of the concentration of all samples were obtained, from which the  $IC_{50}$  values were graphically determined, which were in the range of 6,83–77,53  $\mu$ g/ml. Complexes of ultrafiltrate hydrolysates with cyclodextrin restored fluorescein fluorescence to 84–96 % at a sample concentration of 0,68–0,75 mg/ml.

**Ключевые слова:** антиоксидантная активность, нативное молозиво, гидролизованное молозиво, гидролизат молока, циклодекстрин, флуоресцеин.

**Keywords:** antioxidant activity, native colostrum, hydrolyzed colostrum, whey hydrolyzate, cyclodextrin, fluorescein.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-125-128>

Коровье молоко, сыр и кисломолочные продукты являются доступными источниками биологически активных пептидов (БАП), для которых показаны гипотензивный, иммуномодулирующий, антиоксидантный, антимикробный, антимуtagenный и др. эффекты [1]. БАП образуются в результате воздействия на белки молока пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта, при технологической обработке очищенными протеазами, а также ферментации молочнокислыми бактериями [2]. После ферментативного гидролиза основных белков-аллергенов молока ( $\beta$ -лактоглобулин, казеин) образуются гипоаллергенные пептиды, что связано с расщеплением участков антигенных детерминант в соответствующих белках [3]. Использование различных протеолитических ферментов и пробиотических микроорганизмов обеспечивает получение гидролизovaných и ферментированных белков молока со специфическим белково-пептидным профилем и характерными биологически активными свойствами [4]. Циклодекстрины (ЦД) представляют собой полимер-гомологический ряд, общая формула –  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Общим для всех ЦД является наличие циклодекстринового макроцикла. Его структурная единица – это  $\alpha$ -D-глюкоза в пиранозной форме, в состав которой входит 3 гидроксильных группы, две из которых находятся внутри кольца и одна – снаружи.  $\beta$ -циклодекстрин содержит 7 остатков глюкозы. Соответственно 7 гидроксильных групп, находящихся на поверхности этого циклического соединения могут служить ловушками свободных радикалов. Использование ЦД в медицине направлено на повышение качества лекарственных препаратов. В таких комплексах наблюдается повышение стабилизации лекарственных средств, улучшение их физико-химических свойств, изменении агрегатного состояния многое другое. ЦД применяются в этом случае или для образования комплексов, или в качестве вспомогательных веществ.

Целью создания комплексов гидролизата белков молока и молозива с  $\beta$ -циклодекстрином являлось устранение горького вкуса гидролизата. Вместе с тем, актуальным представляется изучение влияния комплексообразования на функциональные свойства пептидов, в частности, на антиоксидантную активность гидролизovaných белков молока и молозива.

Метод определения антиоксидантной активности (АОА) по отношению к активированным формам кислорода (АФК) основан на измерении интенсивности флуоресценции окисляемого соединения и ее уменьшении под воздействием АФК. В настоящей работе для детектирования свободных радикалов использован флуоресцеин,

обладающий высоким коэффициентом экстинкции и близким к 1 квантовым выходом флуоресценции. Генерирование свободных радикалов осуществляли, используя систему Фентона, в которой образуются гидроксильные радикалы при взаимодействии комплекса железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ) с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) и пероксида водорода [5]. При взаимодействии флуоресцеина со свободными радикалами происходит тушение его флуоресценции, восстановить которую можно при добавлении в систему веществ, проявляющих антиоксидантные свойства. В качестве таких веществ были взяты 6 образцов: концентрат сывороточного белка молока, нативное молозиво, их ультрафильтрованные гидролизаты, а также комплексы ультрафильтратов гидролизатов с циклодекстрином. В таблице 1 указано содержание сухого вещества и белка в образцах.

Таблица 1 – Перечень образцов молока и молозива.

№	Название образца	Краткое название образца	Содержание белка, мг/мл	Содержание сухого вещества, мг/мл
1	Концентрат сывороточного белка молока	КСБ	35,1	50,8
2	Нативное молозиво	М	31,5	48,5
3	Ультрафильтрат гидролизата сывороточного белка молока	ГСБ–УФ	13,7	23,4
4	Ультрафильтрат гидролизата молозива	ГМ–УФ	9,7	22,7
5	Комплекс ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока с циклодекстрином	ГСБ–ЦД	13,7	75,2
6	Комплекс ультрафильтрата гидролизата молозива с циклодекстрином	ГМ–ЦД	9,7	68,0

В работе использовали концентрат сывороточного белка молока и сухое молозиво (образцы предоставлены ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Россия). Ультрафильтрат гидролизата сывороточного белка молока и молозива получен в НИЛ прикладных проблем биологии (БГУ) с применением протеолитического фермента алкалазы.

*Получение ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока и гидролизата молозива:*

Готовили 10 % растворы гидролизатов в дистиллированной воде, центрифугировали для осаждения нерастворимых частиц при 6000 g и температуре 4° С в течение 30 мин. Полученные супернатанты фракционировали с применением фильтров Spin-X UF Concentrator 20 (Corning, Англия) с разделяющей способностью 10 кДа. Ультрафильтраты гидролизованного и ферментированного молозива представлены фракцией с молекулярной массой (mr), меньшей или равной 10 кДа. Содержание общего азота в экспериментальных образцах определяли по СТБ ISO 8968–1–2008, массовую долю (м.д.) сухого вещества – по ГОСТ 3626–76 (п. 3).

*Приготовление комплексов ультрафильтратов гидролизатов с циклодекстринами:*

Ультрафильтраты гидролизатов брали в пропорции с циклодекстрином 5%:3%. К 0,1 г сухой смеси добавляли 2 мл дистиллированной воды. Для получения однородной суспензии помещали стакан с комплексом гидролизатов с циклодекстринами на водяную баню при температуре 50°С и перемешивали. Получали раствор комплексов гидролизатов с циклодекстринами с концентрацией 50 мг/мл.

Измерения флуоресценции проводили на флуориметре RF-5301 PC («Shimadzu», Япония). Регистрировали интенсивность флуоресценции на длине волны 514 нм. Длина волны возбуждения – 490 нм.

Для всех образцов получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации молока и молозива. В таблице 2 представлены основные показатели антиоксидантной активности:  $A_{\max}$  – интенсивность флуоресценции, соответствующая максимальному ингибированию свободных радикалов,  $C_{\max}$  – концентрация молозива, при которой достигается  $A_{\max}$  и  $IC_{50}$  – концентрация образца, при которой достигается 50% ингибирования свободных радикалов.

Таблица 2 – Показатели антиоксидантной активности образцов молока и молозива

№	Название образца	$A_{\max}$ , %	$C_{\max}$ , мг/мл	$IC_{50}$ , мкг/мл сухого вещества	$IC_{50}$ , мкг/мл белка
1	КСБ	67	0,508	112,2	77,53
2	М	75	0,485	102,33	66,46
3	ГСБ–УФ	76	0,234	25,12	14,7
4	ГМ–УФ	82	0,227	21,38	9,14
5	ГСБ–ЦД	84	0,752	39,81	7,25
6	ГМ–ЦД	96	0,68	47,86	6,83
7	ЦД	75	0,5	114,82	

На рисунке 1 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации (С) концентрата сывороточного белка (КСБ) (1), ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока (ГСБ–УФ) (2), комплекса ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока с циклодекстрином (ГСБ–ЦД) (3) и циклодекстрина (ЦД) (4).

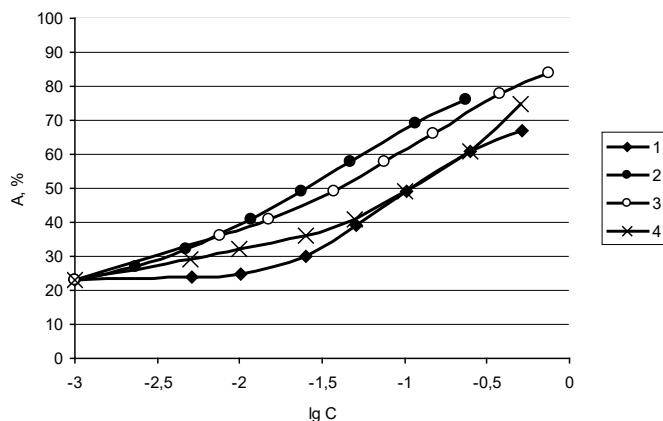


Рис.1 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) концентрата сывороточного белка (КСБ) (1), ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока (ГСБ–УФ) (2), комплекса ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока с циклодекстрином (ГСБ–ЦД) (3) и циклодекстрина (ЦД) (4)

Минимальная антиоксидантная активность получена для образца концентрата сывороточного белка (КСБ). Флуоресценция флуоресцеина восстанавливается до 67 % при концентрации 0,508 мг/мл. Также максимальные значения имеют и показатели  $IC_{50}$  по сухому веществу (112,2 мкг/мл) и белку (77,53 мкг/мл).

Гидролиз белков молока и их последующая ультрафильтрация приводит к уменьшению высокомолекулярной фракции белка, способствуя повышению антиоксидантной активности. Образец ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока (ГСБ–УФ) восстанавливает флуоресценцию флуоресцеина до 76 % при концентрации 0,234 мг/мл, что на 9 % выше, чем для образца КСБ. Показатели  $IC_{50}$  по сухому веществу (25,12 мкг/мл) и по белку (14,7 мкг/мл) уменьшаются в 4,5/5,3 раза соответственно по сравнению с аналогичными показателями КСБ.

Образец комплекса ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока с циклодекстрином (ГСБ–ЦД) восстанавливает флуоресценцию флуоресцеина до 84 % при концентрации 0,752 мг/мл. Как видно из рисунка 8, этот образец снижает радикальную активность более эффективно, чем образец КСБ, но менее эффективен по сравнению с образцом ГСБ–УФ. Показатель  $IC_{50}$  по сухому веществу (39,81 мкг/мл) в 2,8 раза ниже аналогичного показателя для образца КСБ и в 1,6 раза выше показателя для образца ГСБ–УФ. Однако, показатель  $IC_{50}$  по белку (7,25 мкг/мл) уменьшается в 10,7 и 2 раза по сравнению с аналогичными показателями для образцов КСБ и ГСБ–УФ соответственно.

Циклодекстрин (ЦД) восстанавливает флуоресценцию флуоресцеина до 75 % при концентрации 0,5 мг/мл, что на 8 % выше, чем для образца КСБ при аналогичной концентрации. Показатель  $IC_{50}$  по сухому веществу (114,82 мкг/мл) сравним с аналогичным показателем для образца КСБ и в 3 раза выше аналогичного показателя для образца ГСБ–ЦД. Таким образом, включение циклодекстрина в комплекс с ультрафильтратом гидролизованного сывороточного белка молока повышает его антиоксидантную активность.

На рисунке 2 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) молозива (М) (1), ультрафильтрата гидролизата молозива (ГМ–УФ) (2), комплекса ультрафильтрата гидролизата молозива с циклодекстрином (ГМ–ЦД) (3) и циклодекстрина (ЦД) (4).

Образец молозива (М) восстанавливает флуоресценцию флуоресцеина до 75 % при концентрации 0,485 мг/мл, что на 8 % выше, чем для образца КСБ. Показатели  $IC_{50}$  по сухому веществу (102,33 мкг/мл) и по белку (66,46 мкг/мл) несколько ниже, чем для образца КСБ, что свидетельствует о более высокой антиоксидантной активности молозива по сравнению с белками молока.

Гидролиз молозива и последующая ультрафильтрация также приводит к повышению антиоксидантной активности за счет уменьшения высокомолекулярной фракции белка. Образец ультрафильтрата гидролизата молозива (ГМ–УФ) восстанавливает флуоресценцию флуоресцеина до 82 %, что на 7 % выше, чем для образца молозива, при более низкой концентрации 0,227 мг/мл. Показатели  $IC_{50}$  по сухому веществу (21,38 мкг/мл) и по белку (9,14 мкг/мл) уменьшаются в 4,8/7,3 раза по сравнению с аналогичными показателями молозива. Кроме того, показатели  $IC_{50}$  несколько ниже по сравнению с аналогичными показателями образца ГСБ–УФ, а показатель  $A_{max}$  на 6 % выше.

Образец комплекса ультрафильтрата гидролизата молозива с циклодекстрином (ГМ–ЦД) восстанавливал флуоресценцию флуоресцеина на максимальную величину ( $A_{max} = 96\%$ ) при концентрации 0,68 мг/мл. Как видно из рисунка 9, этот образец снижает радикальную активность более эффективно, чем образец молозива, но менее эффективен по сравнению с образцом ГМ–УФ. Показатель  $IC_{50}$  по сухому веществу (47,86 мкг/мл) в 2 раза ниже аналогичного показателя для образца молозива и в 2,2 раза выше показателя для образца ГМ–УФ. Однако, показатель  $IC_{50}$  по белку (6,83 мкг/мл) уменьшается в 9,7 и 1,3 раза по сравнению с аналогичными показателями для образцов молозива и ГМ–УФ соответственно. Данный образец так же показывает более высокую антиоксидантную активность по сравнению с аналогичным образцом для белков молока (ГСБ–ЦД). Его показатель  $A_{max}$  на 12 % выше, а показатель  $IC_{50}$  по белку несколько ниже. Необходимо отметить увеличение АОА комплекса по отношению к циклодекстрину. Повышается показатель  $A_{max}$  (рис. 9) и показатель  $IC_{50}$  по сухому веществу уменьшается в 2,4 раза по сравнению с аналогичным показателем для образца циклодекстрина.

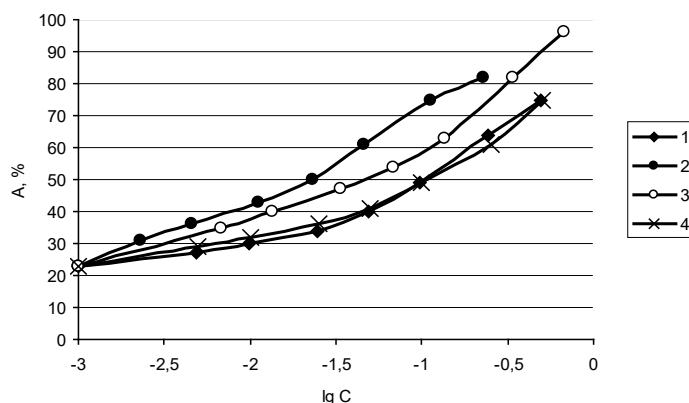


Рис. 2 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина ( $A$ ) от логарифма концентрации ( $C$ ) молозива ( $M$ ) (1), ультрафильтрата гидролизата молозива (ГМ–УФ) (2), комплекса ультрафильтрата гидролизата молозива с циклодекстрином (ГМ–ЦД) (3) и циклодекстрина (ЦД) (4)

Таким образом, показано повышение антиоксидантной активности благодаря гидролизу и последующей ультрафильтрации молока и молозива за счет обогащения низкомолекулярной фракцией. Показатели  $A_{\max}$  образцов ультрафильтратов гидролизованного молока и молозива возрастали на 7–9 %, а показатели  $IC_{50}$  уменьшались в 4,5–7,3 раза по сравнению с образцами КСБ и молозива. Образцы комплексов белков молока и молозива с циклодекстринами показывали повышение АОА по сравнению с исходными образцами КСБ и молозива, а также с циклодекстрином. Показатели  $A_{\max}$  образцов комплексов ГСБ–ЦД и ГМ–ЦД увеличивались на 17–21 % по сравнению с образцами КСБ и молозива и на 9–21 % по сравнению с циклодекстрином. Показатели  $IC_{50}$  по сухому веществу и по белку уменьшались в 2/10,7 раза. Сравнение комплексов белков молока и молозива с циклодекстринами с ультрафильтратами гидролизатов молока (ГСБ–УФ) и молозива (ГМ–УФ) показывает повышение показателя  $A_{\max}$  на 8–14 % при максимальных концентрациях и снижение показателей  $IC_{50}$  по белку в 1,3–2 раза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wada, Y. Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action / Y. Wada, B. Lönnerdal // J. Nutr. Biochem. 2014. V. 25, № 5. P. 503–514.
2. Mohanty, D. et al. Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food / D. Mohanty // Int. J. Food Prop. 2016. V. 19. P. 837–846.
3. Tsabouri, S. Cow's milk allergenicity / S. Tsabouri, K. Douros, K.N. Priftis // Endocr. Metab. Immune. 2014. V. 14, № 1. P. 16–26.
4. Madureira, A.R. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins / A.R. Madureira [et al.] // J. Dairy Sci. 2010. V. 93, № 2. P. 437–455.
5. Тарун Е.И. Антиоксидантная активность гексагидрохинолонов / Е.И. Тарун, А.В. Данькова, А.Н. Пырко // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – 2019. – № 2. – С. 77–83.

## АНАЛИЗ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ, СОБРАННЫХ В РОССИИ, БЕЛАРУСИИ И КИТАЕ

### ANALYSIS OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GROOVE MUSHROOMS COLLECTED IN RUSSIA, BELARUS AND CHINA

**Е. И. Тарун<sup>1</sup>, А. А. Туболева<sup>1</sup>, Я. В. Павловская<sup>1</sup>,  
В. С. Гомонова<sup>1</sup>, Х. Яньлинь<sup>1</sup>, В. П. Курченко<sup>2</sup>  
E. I. Tarun<sup>1</sup>, A. A. Tuboleva<sup>1</sup>, Y. V. Pavlovskaya<sup>1</sup>,  
V. S. Gomonova<sup>1</sup>, X. Yanlin<sup>1</sup>, V. P. Kurchenko<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь  
ktarun@tut.by

<sup>1</sup>Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus