

ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ОЛІГОМЕРІВ ВУГЛЕВОДІВ

Данилова О. І., канд. хім. наук, ст. наук. співр., Решта С. П., канд. техн. наук, доцент,
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

*Отримані β -глюкани із рослинної сировини та із клітинних стінок дріжджів *S. cerevisiae* в результаті часткової ферментативної деструкції і визначена їх біологічна активність, зокрема, антиоксидантні та пребіотичні властивості. Запропоновано використовувати ці показники для з'ясування біологічної активності сполук різної хімічної природи. Доведено, що β -глюкани клітинних стінок дріжджів мають вищу біологічну активність, ніж препарат, отриманий із вівса. Відмічено, що значний інтерес представляє визначення біологічної активності різних препаратів для оцінки перспективи їх використання як антиоксидантів у складі кормових і харчових добавок.*

*β -glucans are obtained from plant raw material and from cell walls of *S. cerevisiae* yeast as a result of partial enzymatic degradation, and their biological activity is determined, in particular, antioxidant and prebiotic properties. The use of these indicators to determine the biological activity of compounds of different chemical nature is proposed. It has been proved that β -glucans of yeast cell walls have a higher biological activity than the preparation obtained from oats. It is noted that the determination of the biological activity of various preparations to assess the prospects for their use as antioxidants in the composition of feed and food additives is of considerable interest.*

Ключові слова: антиоксидантні та пребіотичні властивості, β -глюкани, дріжджі, олігосахариди

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок з важливими науковими та практичними завданнями. Визначення високо- і низькомолекулярних біологічно активних речовин (БАР) представляє як практичний, так і теоретичний інтерес для вивчення їх властивостей у зв'язку з широким застосуванням високоефективних біологічно активних сполук в різних областях життєдіяльності (в сільському господарстві, у складі харчових продуктів, медичних препаратів і добавок). У зв'язку з вимогами підвищення якості життя і збільшення асортименту біологічно активних добавок (БАД) з'явилася потреба у швидкому визначенні біологічної активності, оскільки зростання ступеня використання різноманітних БАР вимагає визначення можливості їх використання та оцінки якості, із наступним визначенням їх впливу на організм людини і тварин [1-4]. Дуже часто спосіб визначення біологічної активності речовин включає приготування контрольного і робочого біологічних препаратів клітинної субстанції тваринного організму, додавання випробовуваної речовини в робочий біологічний препарат, інкубацію контрольного і робочого біологічних препаратів, визначення в них показників метаболізму, в якості одного з яких використовують вміст у біологічному препараті малонового альдегіду, порівняння показників метаболізму в контрольному і робочому біологічних препаратах і судження про міру біологічної активності випробовуваної речовини за величиною показників метаболізму. Іноді використовують різні моделі патологій тварин для визначення напрямку використання БАД. Але ці методи є дуже дорогими, раціональніше на початку з'ясовувати біологічну активність окремих сполук та БАД в цілому *in vitro*.

В наш час основними методами у біоаналізі є хроматографія, капілярний електрофорез в їх гібридних варіантах з мас-селективним детектором і люмінесцентний аналіз. У останньому випадку використовується власна люмінесценція сполук, люмінесценція їх хелатів з однорідними або різними лігандами, флуороімунні методи, не втрачає свого значення і фотометричний аналіз. В той же час реальною необхідністю є забезпечення дослідження попередніх властивостей БАД, вивчення їх біодоступності і біоеквівалентності. Вирішують такі і подібні завдання нині переважно за допомогою радіоімунологічних методів і високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), які трудомісткі, тривалі і вимагають застосування складної і дорогої апаратури. Останніми роками при визначенні біологічно активних речовин (БАР) все частіше використовують простий і високочутливий флуориметричний метод, заснований на вимірі сенсibilізованої флуоресценції хелатів лантанодів. До теперішнього часу накопичена велика база даних про кольорові реакції, що використовуються в експрес-контролі і ідентифікації БАР в розчинах, в харчовій і фармацевтичній продукції, в культуральних і біологічних рідинах. Такі БАР як флавоноїди, каротиноїди, хлорофіли та інші мають власне інтенсивне забарвлення, яке залежить від їх складу і вмісту у зразку. В той же час, застосування такого параметру, як колір розчинів, в якості кількісного аналітичного сигналу розроблено для використання, головним чином, при визначенні таких сполук як деякі азот-

вмісні БАР (амінокислоти, пептиди, нітрити) та окремих вуглеводів після проведення кольорових реакцій [3-6].

Ми пропонуємо для визначення біологічної активності різних комплексних препаратів і сполук, у тому числі, олігомерів вуглеводів, використовувати показники, які можливо визначити *in vitro*. При цьому визначення антиоксидантних та пребіотичних властивостей дозволить достатньо чітко визначити наявність або відсутність біологічної активності та з'ясувати, який саме ефект активуючий або інгібуючий має досліджуваний зразок.

Матеріали та методи. Антиоксидантну активність (АА) важко виміряти по відношенню до вільних радикалів безпосередньо *in vivo*, тому дія антиоксидантів оцінюється мірою їх окислення *in vitro*. Зазвичай, спосіб визначення біологічної активності речовини включає приготування препарату тест-об'єкта живого організму, внесення в клітинну суспензію контрольної і випробовуваної речовини, інкубацію, отримання контрольного і випробовуваного розчину. Далі визначають оптичну щільність контрольного і випробовуваного розчинів, а міру біологічної активності випробовуваного розчину виражають у вигляді індексу стимуляції, яка при показниках вище 100 % вказує на наявність стимулюючої активності випробовуваної речовини, а нижче — інгібують.

Використання суспензій клітин живих організмів дозволяє точно визначити антиоксидантні властивості але сам процес є достатньо складним, вимагає наявності живих клітин, навичок роботи із ними тощо, тому простіше визначити антиоксидантні властивості іншими методами, зокрема, із використанням фізико-хімічних методів. Дуже часто АА визначають електрохімічними методами (кулонометрія, амперметрія, потенціометрія) [3-5], але їх доцільно використовувати при наявності речовин фенольної природи. Результати дослідження кулонометричними методами часто представляються з використанням кількості кверцетину на одиницю зразка (мг кверцетину/г або см^3 досліджуваного зразка). В той же час, відомо, що антиоксидантні властивості мають вуглеводні та їх похідні [6]. Для таких сполук більш прийнятним є порівняння АА із аскорбіновою кислотою або фотометричні методи, наприклад, із використанням відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду ($\text{NAD}\cdot\text{H}_2$) [7]. Нами проведені дослідження препаратів β -глюканів вівса та виділених із клітинних стінок дріжджів *S.cerevisae* [8] для визначення їх біологічної активності (β -глюкан І). Для отримання препаратів із дріжджів, в яких збільшена кількість β -глюканів додатково обробляли препарат, отримання якого описано в [9] препаратом маннази, який вносили у кількість 0,1 % при рН 5,5, яке створювали за допомогою фосфатного буфера і витримували 3 години, потім здійснювали центрифугування, відділяли препарат β -глюкану, промивали тричі водою та висувували. Отриманий препарат містив 72 % β -глюкану (β -глюкан ІІ). Вихід від початкової ваги дріжджової біомаси склав майже 10 %.

Про антиоксидантну активність досліджуваних зразків судили по їх здатності інгібувати аутоокислення адреналіну *in vitro* і тим самим запобігати утворенню активних форм кисню [10]. Антиоксидантну активність досліджуваних зразків визначали по їх здатності інгібувати аутоокислення адреналіну *in vitro* і тим самим запобігати утворенню активних форм кисню [10]. Для цього до 4 см^3 0,2 М натрій-карбонатного буфера, рН = 10,65 (який встановлювали додаванням до 0,2 М розчину Na_2CO_3 сухого реактиву NaHCO_3), додавали 0,2 см^3 0,1 % (5,46 мМ) аптечного розчину адреналіну гідрохлорида, ретельно і швидко перемішували, на спектрофотометрі СФ-46 визначали оптичну щільність через 30 с впродовж 10 хв при довжині хвилі 347 нм в кюветі завтовшки 10 мм на спектрофотометрі (D_1). Далі до 4 см^3 буферу (рН=10,65) додавали 0,06 см^3 досліджуваного препарату (суспензію із масовою часткою препарату 1 %) і 0,2 см^3 0,1 % адреналіну гідрохлориду, перемішували і вимірювали оптичну щільність, як описано вище (D_2). Для нівелювання впливу власного забарвлення суспензій препаратів, які поглинають певну довжину хвилі у видимій частині спектру, в якості контрольної проби використали буферований розчин препарату без адреналіну. Антиоксидантну активність (АА, %) досліджуваних препаратів виражали у відсотках інгібування аутоокислення адреналіну і обчислювали за формулою:

$$AA = \frac{(D_1 - D_2) \cdot 100}{D_1} \quad (1)$$

Крім того, антиоксидантні властивості визначали за окисленням кверцетину [11]. До складу реакційної суміші входили: 0,5 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,8, 2,4 мл дистильованої води або розчину речовини, що вивчається, 0,058 мл тетраметилетилендіаміна (ТМЕД), 0,08 ммоль етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА). Реакцію починали внесенням в середовище інкубації 0,1 мл 0,462 мМ розчину кверцетину. Проби інкубували на водяній бані впродовж трьох хвилин при температурі 37 °С, потім реєстрували зміну оптичної щільності при довжині хвилі 406 нм. АА визначали у мг кверцетина /г препарату.

Третім методом, використаним для визначення АА був метод із застосуванням $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$. Спочатку аналізували контрольний зразок, а потім дослідний. У випадку контрольного зразка в суху пробірку відбирали 3 см^3 розчину фероціаніду калію ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), 5 см^3 буферного розчину з рН 7, 1 см^3 дистильованої води і 1 см^3 відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду ($\text{NAD}\cdot\text{H}_2$). Зміну оптичної щільності

контрольного зразка внаслідок прямого окиснення $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$ фероціанідом калію знаходили при $\lambda=325$ нм. Визначення властивостей дослідного зразка здійснювали аналогічно, але додавали у реакційну суміш $0,1\text{ см}^3$ досліджуваного препарату та $0,9\text{ см}^3$ води. Знімали оптичну щільність на фотоколориметрі. Знаходили зміну оптичної щільності і розраховували біологічну активність у відсотках від контрольної проби [12].

Дуже перспективною є оцінка активності біологічно БАД шляхом введення досліджуваної речовини різної концентрації в поживне середовище для росту бактерій і підрахунок колоній, що вирости або кількості мікроорганізмів у рідкому середовищі накопичення. Оскільки необхідно було визначити пребіотичні властивості олігомерів вуглеводів, як тест-об'єкт живого організму використали представників пробіотичної мікрофлори. Необхідно зазначити, що біфідобактерії (*Bifidobacterium*) достатньо вимогливі до середовища, не дуже добре ідентифікуються та провести їх облік важко, тому в якості тест-культур використали *Lactobacillus acidophilus*.

Мікроорганізми брали у кількості 1 см^3 з концентрацією 10^9 мікробних клітин на см^3 , в препарат тест-об'єкта живої культури додавали контрольну речовину (фізіологічний розчин), в інші досліджувані проби — олігомери вуглеводів у розвиненому вигляді у кількості $0,1$, $0,5$ і $1,0\text{ мг/см}^3$, інкубували впродовж 24 годин, визначали кількість мікроорганізмів в контрольному (з фізіологічним розчином) і дослідному зразках, а ступінь біологічної активності виражали у вигляді індексу стимуляції, який розраховували за формулою:

$$I = X_{\text{екс}} / X_{\text{к}} \cdot 100, \quad (2)$$

де I — індекс стимуляції;

$X_{\text{екс}}$ — середня кількість мікроорганізмів в досліджуваному розчині;

$X_{\text{к}}$ — середня кількість мікроорганізмів у контрольному розчині.

За зміною величини індексу стимуляції в усіх пробах робили висновок про біологічну активність досліджуваних олігомерів вуглеводів.

Обговорення отриманих результатів. Антиоксидантна активність обумовлена числом і розташуванням функціональних груп, здатних легко віддавати атом водню (зокрема, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}$), наявністю подвійних зв'язків, а також просторовою структурою молекул. Так, кверцетин, який має дві 3' і 4' гідроксильних групи в орто-положенні кільця В і одну в 3 положенні кільця 3 є ефективнішим антиоксидантом, ніж його глікозид рутин, активна 3-ОН група якого заміщена цукровим залишком (рутинозою) [1-3, 13-17]. Крім того, наявність глікозидного залишку призводить до зміни просторового розташування молекули, що також є причиною нижчої антиоксидантної здатності глікозидів в порівнянні з агліконами. Відмінність у відновній здатності цистеїну і трипептиду глутатіона, мабуть, також обумовлена просторовою структурою їх молекул. Саме цим можливо пояснити вищі антиоксидантні властивості фракцій вуглеводів з меншою молярною вагою, які були вилучені як із рослинної сировини (вівса), так і з клітинних стінок *S.cerevisae* (табл. 1). Крім того, відомо, що антиоксиданти впливають на різні етапи пероксидації: на утворення супероксидного радикалу — аскорбінова кислота, на гідроксильний радикал — убіхінон, вітамін Е [14, 16]. Якщо розглядати отримані препарати β -глюканів, можна зробити висновок, що вони більшою мірою впливають саме на утворення водневих зв'язків завдяки $-\text{OH}$ групам, а просторова орієнтація молекули впливає меншою мірою. Для оцінки рівня антиоксидантної активності різних хімічних сполук, фітопрепаратів, харчових і кормових добавок в них визначають вміст біологічно активних речовин поновлюючого характеру, порівнюючи ці показники з поновлюючою активністю кверцетину, який прийнятий у фахівців-біохіміків в якості стандарту при оцінці антиоксидантної активності [19].

Таблиця 1 – Антиоксидантна активність зразків

Препарат	АА, %	АА, мг кверцетину/г	АА, ум. од. акт.
Кверцетин	—	1,0	—
β -глюкан вівса	13,5	1,8	1098
β -глюкан дріжджів I	26,7	6,3	1184
β -глюкан дріжджів II	37,2	9,8	1650

Зміна оптичної густини контролю у методі 3 склала $0,02$ од. У досліджуваних зразків зміна оптичної густини розчинів була $0,021$ (β -глюкан вівса), $0,023$ (β -глюкан дріжджів I), $0,033$ (β -глюкан дріжджів II), тобто відрізнялася дуже мало, що пов'язано з тим, що основні складові препаратів після фракціонування представлені β -глюканами.

Порівняння антиоксидантних властивостей олігомерів вуглеводів, отриманих із рослинної сировини (β -глюканів вівса) та клітинних стінок дріжджів *S.cerevisae*, показало, що декстрини, отримані із зернової сировини мають менші показники АА, ніж препарат із клітинних стінок дріжджів *S.cerevisae*, що добре узгоджується із даними літератури [18, 20]. Оскільки ми вважаємо, що антиоксидантні властивості β -

глюканів пов'язані саме із просторовим розташуванням молекул та впливом на гідроксильний радикал, стає зрозумілим, що зразок, виділений із дріжджів має вищі показники АА, зокрема, препарат β -глюкану I в 3,5 рази, а β -глюкан дріжджів II, що має біль низьку молекулярну вагу (до 30 Да) — в 5,4 рази у порівнянні із β -глюканом рослинної сировини.



Рис. 1 — Визначення індексу стимуляції препаратів

про інгубуючу дію.

З наведених на рисунку 1 даних видно, що найбільшу стимулюючу дію має β -глюкан дріжджів II, він на 66,3 % перевищує контроль та на 38,8 % вищий показника для β -глюкану вівса і на 26,5 % більше, ніж показник β -глюкану дріжджів I.

Таким чином, визначення антиоксидантної активності та пробіотичних властивостей дозволяє достатньо швидко визначити можливість застосування різних сполук, комплексів, речовин для подальшого використання як БАД або, взагалі, говорити про перспективність їх подальших досліджень.

Висновки. Таким чином, окреслені напрями отримання препаратів β -глюкану із рослинної та мікробіальної сировини, що мають антиоксидантні та пробіотичні властивості. Все це дозволить у наступному розробити технології біотехнологічної переробки різних видів сировини, що містить β -глюкани, із отриманням цінних препаратів. Досліджені β -глюкани, вилучені із рослинної сировини та із клітинних стінок дріжджів *S. cerevisiae* в результаті часткової ферментативної деструкції, мають високу біологічну активність, зокрема, антиоксидантні та пробіотичні властивості. Запропоновано використовувати ці показники для з'ясування біологічної активності сполук різної хімічної природи. Доведено, що β -глюкани клітинних стінок дріжджів мають вищу біологічну активність, ніж препарат, отриманий із вівса. Значний інтерес представляє визначення антиоксидантної активності препаратів β -глюканів із інших видів сировини для оцінки перспективи їх використання як антиоксидантів у складі кормових і харчових добавок, а також препаратів, здатних до зняття стресів як у сільськогосподарських тварин, так і у людей.

Література

1. Меньшикова, Е. Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты [Текст] / Е. Б. Меньшикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др. // М.: Фирма "Слово", 2006. — 554 с.
2. Селютіна, Г. А. Визначення антиоксидантної активності рослинної сировини [Текст] / Г. А. Селютіна, О. В. Виронова, Т. В. Щербакова // Наукові праці ОНАХТ. — 2014. — Т. 2., № 46. — С. 80–85.
3. Євлаш, В. В. Вдосконалення методики визначення антиоксидантної активності продуктів рослинного походження та її кількісна оцінка [Текст] / В. В. Євлаш, Н. О. Отрошко, В. О. Акмен // Зб. наук. Праць ДонДует. — 2013. — Вип. 30. — С. 58–63.
4. Федина, П. А. Определение антиоксидантов в продуктах растительного происхождения амперометрическим методом [Текст] / П. А. Федина, А. Я. Яшин, Н. И. Черноусова // Химия раст. сырья. — 2010. — № 2. — С. 91–97.
5. Roginsky, V. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food [Text] / V. Roginsky, E. A. Lissi // Food chemistry. — 2005. — Vol. 92 — P. 235–254.
6. Оленников, Д. Н. Антиоксидантная активность растительного средства «Фитоуросепт» [Текст] / Д. Н. Оленников, А. А. Торопова, Л. М. Танхаева и др. // Раст. ресурсы. — 2010. — № 4. — С. 143–150.
7. Reshta, S. P. Processing of wastes of grain-growing industry at help of hydrolase of *S. cerevisiae* [Text] / S. P. Reshta, O. I. Danylova // Materials of the V international research and practice conference. Westwood, Canada. — 2014. — P. 471–478.

8. Данилова, Е. И. Переработка отходов зерновой промышленности при помощи гидролаз *S. cerevisiae* [Текст] / Е. И. Данилова, С. П. Решта, М. Ж. Кизатова // Вестник Алматинского технологического университета – 2014. – № 3 (104) – С. 31–38.
9. Данилова, О. І. Отримання олігомерів із рослинної сировини з антиоксидантними властивостями [Текст] / О. І. Данилова, С. П. Решта // Наукові праці ОНАХТ. – 2014. – Т. 1, № 46. – С. 83–88.
10. Рябинина, Е. И. Новый подход в оценке антиоксидантной активности растительного сырья при исследовании процесса аутоокисления адреналина [Текст] / Е. И. Рябинина, Е. Е. Зотова, Е. Н. Ветрова и др. // Химия раст. сырья. – 2011. – № 3. – С. 117 – 121.
11. Костюк, В. А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина [Текст] / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // Вопросы мед. химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88 – 91.
12. Данилова, О. І. Використання комплексу гідролаз дріжджів *S. cerevisiae* для отримання олігомерів, що мають антиоксидантні властивості [Текст] / О. І. Данилова, С. П. Решта // Наукові праці ОНАХТ – 2013. – Т. 2, № 44. – С. 103 – 109.
13. Kuo, J.-M. Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plant material [Text] / J.-M. Kuo, D.-B. Yeh, B. Sun Pan // J. Agric. and Food Chem. – 1999. – Vol. 47, Issue 8. – P. 3206 – 3209.
14. Garcia-Alonso, M. Evaluation of the antioxidant properties of fruits [Text] / M. Garcia-Alonso, S. de Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, J. C. Rivas-Gonzalo // Food Chem. – 2004. – Vol. 84? Issue 1 – P. 13 – 18.
15. Poli, G. Oxidative stress and cell signalling [Text] / G. Poli, F. Leonarduzzi, E. Biasi // Curr. Med. Chem. – 2004. – Vol. 11. – P. 1163 – 1182.
16. Flora, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure [Text] / S. J. S. Flora // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2009. – Vol. 2, Issue 4. – P. 191 – 206.
17. Хасанов, В. В. Методы исследования антиоксидантов [Текст] / В. В. Хасанов, Г. Л. Рыжова, Е. В. Мальцева // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3. – С. 63 – 95.
18. Petravic-tominac, Vlatka Biological effects of yeast β -glucans [Text] / Vlatka Petravic-tominac, Vesna Zechner-krapan, Slobodan Grba, Siniša Srećec and all. // Agriculturae Conspectus Scientificus – 2010. – Vol. 75. – P. 149–158.
19. Томсон, А. Э. Антиоксидантная активность препаратов из торфа и растительного сырья [Текст] / А. Э. Томсон, Г. В. Наумова, С. Ф. Шурхай и др. // Природопользование. – 2011. – № 19. – С. 165 – 168.
20. Черно, Н. К. Получение и частичный гидролиз бета-глюкана клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [Электронный ресурс] / Н. К. Черно, А. В. Коваленко, К. И. Шапкина // Режим доступа: \www/ URL: [http:// www.sworld.com.ua/index.php/ru/conference/the-content-of-conferences/archives-of-individual-conferences/december-2012](http://www.sworld.com.ua/index.php/ru/conference/the-content-of-conferences/archives-of-individual-conferences/december-2012). – Название с экрана.

УДК [664.002.3 : 57.016] – 035.841

ПРЕПАРАТ ГУМІАРАБІКУ «FIBREGUM B» ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ ФІЗІОЛОГІЧНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ ХАРЧОВИЙ ІНГРЕДІЄНТ

Гураль Л. С., канд. техн. наук

Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

Досліджуваному комерційному препарату «Fibregum B» надано органолептичну оцінку та встановлено хімічний склад. В його складі домінує полісахаридна компонента (арабіногалактан) — 65,4 %, яка ковалентно зв'язана з мінорною складовою — білковими речовинами (3,4 %). Досліджуваний зразок є високомолекулярним біополімером (молекулярна маса перевищує 100 кДа). Водні розчини камеді характеризуються низькою в'язкістю та проявляють властивості антиоксиданту.

Polysaccharide component (arabinogalactan) — 65,4 % prevails as part of preparation gum-arabic «Fibregum B». Gum-arabic «Fibregum B» contains small amount of proteins — 3,4 %. Biopolymer molecular weight exceeds 100 kDa. 1,0...4,0 % aqueous solution of gum-arabic has low viscosity and exhibits antioxidant properties.

Ключові слова: гідроколоїди, біополімери, полісахариди, гуміарабік, фізіологічно-функціональний харчовий інгредієнт.