

Н. В. Демина, А. А. Кочетов, Я. А. Шевченко,
И. Н. Сметанская, А. В. Канарский, З. А. Канарская

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ СТЕВИИ, ВЫРАЩЕННЫХ В СВЕТОКУЛЬТУРЕ

Ключевые слова: генотипы стевии, светокультура, экстракты, антиоксидантная активность.

Исследовано влияние генотипов стевии и температуры экстракции на антиоксидантную активность экстрактов из листьев стевии. Установлено эффективная температура экстракции из листьев стевии водно-метанольной смесью антиоксидантов 80 – 90 °С. Показана высокая антиоксидантная активность экстрактов из листьев стевии различных генотипов, выращенных при длинном дне в светокультуре.

Keywords: genotypes of *Stevia svetokultury*, extracts, antioxidant activity.

Investigated the influence of genotype and temperature stevia extract-ing on the antioxidant activity of extracts from the leaves of stevia. INSTALLATIONS effective temperature extraction from leaves of Stevia aqueous methanolic mixture of antioxidants 80 - 90 ° C. The high antioxidant activity of the extracts of stevia leaves of different genotypes grown under long-day conditions in light culture.

В условиях современного мира человеческий организм постоянно подвергается действию свободных радикалов, находящихся в потребляемой пище и окружающей его техногенной среде, что приводит к развитию окислительного стресса, провоцирующего развитие многих серьезных заболеваний, таких как онкологические заболевания, атеросклероз, диабет, преждевременное старение. Негативное влияние свободных радикалов можно существенно уменьшить при использовании в питании продуктов растительного происхождения, содержащих вещества с антиоксидантной активностью (полифенолы, витамины, каротиноиды, флавоноиды и др.), которые ингибируют или задерживают окисление других молекул.

В последнее время интерес к натуральным антиоксидантам существенно возрос. Значительное количество их присутствует в зеленом чае, кофе, гранате, винограде, цитрусовых, черноплодной рябине и других фруктах и ягодах [1, 2, 3]. К этой группе растений относят и стевию - двулистник сладкий (*Stevia rebaudiana Bertoni*).

Стевия - новая культура семейства сложноцветных, многолетний травянистый полукустарник из Парагвая, в листьях которой содержатся сладкие диетические дитерпеновые гликозиды (стевииозид, ребаудиозиды А и В и др.), близкие по вкусовым качествам к сахарозе и превосходящие ее по сладости в 300 и более раз [4, 5]. Естественную способность этого растения накапливать большие количества сладких диетических сахарозаменителей делает его интересным для пищевой биотехнологии, особенно для приготовления различных напитков и диетических продуктов [6, 7, 8]. Сегодня стевия широко культивируется в Южной Америке и странах Юго-Восточной Азии. В ряде стран - Японии, Китае, Вьетнаме, Таиланде до 50 % сахара, используемого в пищевой промышленности, заменяется на подсластители из стевии.

Для России замена сахара на подсластители из стевии весьма актуальна, так как значительная часть населения болеет сахарным диабетом (более 2 миллионов человек) или имеет нарушения обмена

веществ, связанные с чрезмерным употреблением углеводов. Культивирование стевии в России возможно лишь при сохранении маточных растений в зимнее время в закрытом грунте при последующем массовом размножении и выращивании полученной рассады в открытом грунте. Такая технология круглогодичного выращивания стевии с использованием регулируемых условий разработана и апробирована для Северо-Западного региона России [9]. Она может быть адаптирована для массового культивирования стевии на территории России, что обеспечит сырьем отечественную пищевую промышленность.

Листья стевии можно использовать непосредственно или извлекать из них сладкие вещества [10]. Экстракты стевии обладают комплексом лечебных свойств и являются безопасными для человека при длительном употреблении [11, 12]. Выявлено гипогликемическое, гипотензивное и иммуномодулирующее действие экстрактов из листьев стевии. Кроме того, эти экстракты могут оказывать противопаразитарное и противомикробное действие, положительно влияют на органы пищеварения и сердечно-сосудистую систему [13, 14, 15]. Многие полезные свойства экстрактов стевии связаны с наличием в них антиоксидантных соединений [16, 17]. Результаты, представленные в работе [18], показывают, что стевия имеет значительный потенциал для использования в качестве натурального антиоксиданта. В стевии обнаружена хлоргеновая кислота, обладающая гипогликемическим действием и высокой антиоксидантной активностью [19]. Установлено, что антиоксидантная активность экстрактов стевии увеличивается при смешивании с кофе и соком лайма. В этой связи полная очистка экстрактов из листьев стевии для получения чистых гликозидов как сахарозаменителей, т.е. подсластителей, не является целесообразной [20, 21, 22].

Цель настоящей работы - изучение антиоксидантной активности водно - метанольных экстрактов из листьев различных генотипов стевии, выращенных в светокультуре.

Материалы и методы

В опытах использовали 10 образцов стевии, выращенных из семян различного происхождения. Они отличались генотипически, что проявлялось в различиях по морфологическим признакам (табл. 1) и реакции на длину дня. Растения каждого генотипа выращивали в светокультуре под лампами ДНАТ - 400 при облученности 40 - 60 Вт/м² ФАР при фотопериодах 12, 14, 16 часов в сутки (повторность 5 - 6 растений для каждого варианта опыта). Для анализа брали среднюю пробу сухих листьев с 5 - 6 растений в трехкратной повторности.

Таблица 1 - Характеристика образцов стевии, выращенных в открытом грунте

№ образца	Происхождение образца (выращен из семян фирмы)	Морфологические особенности образца
1	«Richters», Канада	Куст невысокий, с 2 - 5 побегами. Лист средней величины ромбовидный, край листа пильчатый.
2	«Richters», Канада	Куст высокий, с 2 - 7 побегами. Лист крупный, ромбовидный, край листа пильчатый.
3	«Грин Бэлт», Россия	Куст средней высоты, с 2 - 4 побегами, хорошо облиственный. Лист мелкий, ланцетный, зубцы края листа острые.
4	«Richters», Канада	Растение невысокое, хорошо кустящееся (3 - 4 побега). Лист мелкий, ланцетный и ромбический, зубцы края листа острые.
5	«Richters», Канада	Куст высокий, среднекустистый. Лист крупный, ромбовидный, зубцы края листа острые.
6	«Richters», Канада	Растение высокое с 2 - 6 побегами. Лист средний ромбовидный, край листа пильчатый.
7	«Richters», Канада	Куст средней высоты с 1 - 3 побегами. Лист средней величины, ромбовидный с пильчатым краем.
8	«Richters», Канада	Растение невысокое, хорошо кустится (3 - 6 побегов). Лист крупный, ромбовидный, зубцы листа острые
9	«Richters», Канада	Куст средней высоты с 1 - 3 побегами. Лист средний, ромбовидный, зубцы листа округлые
10	«Richters», Канада	Куст средней высоты с 1 - 3 побегами. Лист крупный, ромбовидный, зубцы листа заостренные

Получение экстракта из листьев стевии

Предварительно измельченные до порошкообразного состояния листья стевии взвешивали и засыпали в пробирки объемом 2 мл. Затем в эти пробирки вносили 1,5 мл 70 % метанола и помещали их в водяной термостат - экстрактор Stualt SBH 130D. Экстракцию проводили в течение 5 минут при температурах 60, 70, 80, 90 и 100 °С. Для разделение экстракта и шрота стевии смесь центрифугировали в течение 10 мин. при 10000 об/мин. Фугат сливали, к осадку добавляли 700 мкл 70 % метанола и экстракцию повторяли в течение 5 минут при тех же температурах. Повторное разделение экстракта и шрота стевии проводили также центрифугированием в течение 10 мин., при 10000 об/мин. Затем фугат после двух экстракций смешивали в пробирке объемом 2 мл.

Определение антиоксидантной активности экстракта листьев стевии

Приготовление реакционной смеси - DPPH (2,2 - дифенил - 1 - пикрилгидразила)

К 50 мкл экстракта добавляли 2 мл реакционной смеси состоящей из DPPH (2,2 - Diphenyl - 1 - picrylhydrazyl) и метанола, путем смешивания 6 мл маточного раствора с 100 мл метанола до получения значения абсорбции $0,7 \pm 0,02$ при 515 нм с помощью спектрофотометрии. Затем смесь перемешивали, выдерживали в течение 30 минут и проводили измерения оптической плотности, при длине волны 515 нм. Антиоксидантную активность (АА) образцов определяли по формуле:

$$AA = \frac{E_{\text{контр.}} - E_{\text{обр.}}}{E_{\text{контр.}}} * 100,$$

где АА - антиоксидантная активность образцов (%); $E_{\text{контр.}}$ - оптическая плотность контроля - реакционной смеси DPPH (2,2 - Diphenyl - 1-picrylhydrazyl) и метанола; $E_{\text{обр.}}$ - оптическая плотность экстрактов образцов с добавкой реакционной смеси.

Калибровочный график строили по галловой кислоте. Фотометрический анализ образцов проводили с использованием фотометра Jenway 6200.

Результаты и обсуждение

Изученные в опытах генотипы стевии различались, как морфологически, так и по реакции на длину дня (рис. 1).

При 12 - часовом фотопериоде растения всех генотипов быстро переходили к цветению и накапливали небольшую надземную массу. При 14 - часовом фотопериоде часть растений раньше других переходила к цветению (образцы № 3, 4, 7), другие же не зацветали до конца опыта. При 16 - часовом фотопериоде наблюдали интенсивный вегетативный рост без перехода к цветению у всех изучаемых образцов, отмечая максимальное накопление надземной массы у растений генотипов № 1, 2, 3.

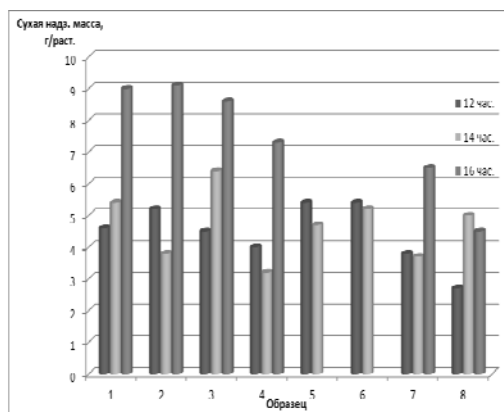


Рис. 1 - Продуктивность исследуемых образцов стевии при разной длине дня (характеристика образцов в табл. 1)

Таким образом, 14 - часовой фотопериод является дифференцирующим для различных генотипов по чувствительности к длине дня.

Различия между генотипами по морфологическим признакам часто сохранялись на всех фотопериодах. Стабильно высокий коэффициент кущения (3 - 4 стебля на растении) имели образцы (№ 3, 5, 7). Растения других генотипов характеризовались более крупным листом (№ 1, 2, 4, 8). При 12 - часовом фотопериоде средняя длина листа у этих растений этих вариантов составила 82 - 89 мм, а ширина – 41 - 44 мм, достигая показателей 95 - 99 и 44 - 51 мм при 16 - часовом фотопериоде соответственно.

Основной задачей данного исследования было изучение антиоксидантной активности вытяжек из листьев различных генотипов стевии. В ходе опытов проведена работа по определению оптимальных условий экстракции веществ с АА из сухих листьев стевии. Эти вещества экстрагировали водно - метанольной смесью при разных температурах от 60 до 100 °С.

Температура экстракции существенно повлияла на антиоксидантную активность вытяжек из листьев растений всех изучаемых образцов (рис. 2).

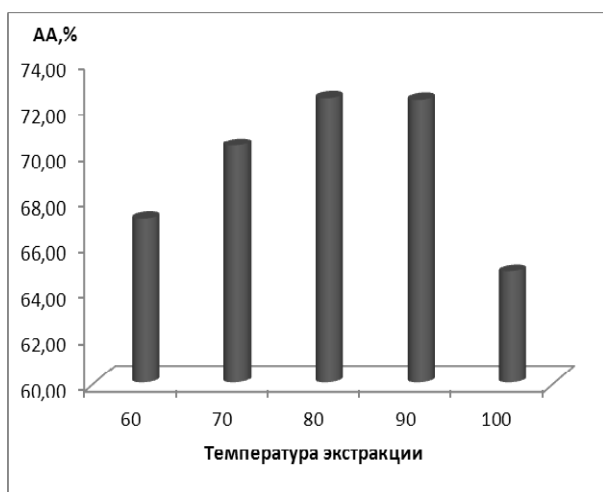


Рис. 2 - Средняя антиоксидантная активность водной вытяжки из листьев 10 образцов стевии при различной температуре экстракции

Наибольшую АА имели экстракты, полученные при 80 и 90°С, наименьшую - при 60 и 100°С. Такая тенденция наблюдалась у всех образцов стевии. Результаты исследований позволяют предположить, что при 60°С экстракция веществ с АА проходит не полностью, при 70 – 90°С постепенно возрастает. Уменьшение АА при 100°С может быть связано с разложением части экстрагированных веществ.

Результаты эксперимента позволяют сделать вывод, что наиболее эффективной температурой для экстракции веществ с АА у стевии является температура 80 – 90°С.

В опыте также обнаружены достоверные различия по АА между исследуемыми образцами (рис. 3).

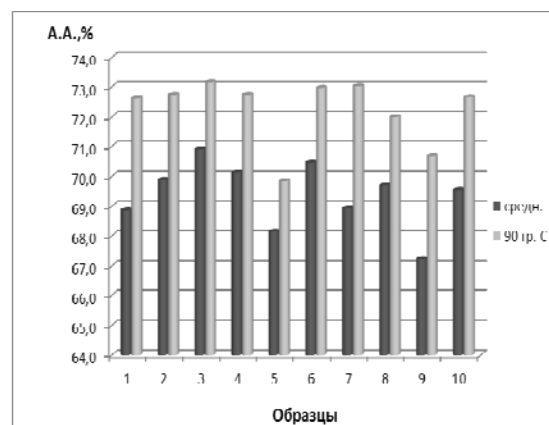


Рис. 3 - Антиоксидантная активность разных образцов стевии при разных температурах экстракции

На гистограмме приведены средняя АА по всем температурам экстракции и АА при наиболее эффективной температуре экстракции (90°С) для каждого образца стевии. Как видно из гистограммы, при 90°С величины АА экстрактов различных генотипов стевии сопоставимы. Это позволяет легко выделить образцы с низкой величиной АА вытяжки (генотипы № 5 и 9). Образцы стевии, экстракты которых имеют высокие значения АА, более четко определяются при сравнении средних показателей АА (генотипы растений № 3, 4, 6). Сопоставляя продуктивность различных образцов и их АА можно отметить, что для образца № 3 характерно как значительное накопление надземной массы при 16 - часовом фотопериоде, так и высокая АА. Перспективно дальнейшее использование этого генотипа в селекционной работе.

Для сравнения отметим, что растения стевии изученных генотипов, выращенные в светокультуре при длинном дне, по антиоксидантному потенциалу не уступают растениям, выращенным в Парагвае, Таиланде и Испании, антиоксидантная активность которых достигает 57 % [23]. Это позволяет надеяться на то, что растения стевии данных генотипов можно будет использовать не только как источник натуральных диетических сахарозаменителей, но и как источник веществ с высокой АА.

Выводы

1. Эффективной температурой экстракции антиоксидантов из листьев стевии водно-метанольной смесью является 80 – 90 °С.

2. Наблюдаются существенные различия по продуктивности и антиоксидантной активности у разных генотипов стевии, выращенных из семян различного происхождения. Выделены генотипы, накапливающие наибольшую надземную массу при длинном дне (16 - часовой фотопериод), среди которых один образец (3) имеет и высокую АА.

3. Показана высокая антиоксидантная активность экстрактов листьев стевии изученных генотипов, выращенных при длинном дне в светокультуре, сопоставимая с АА образцов стевии из Парагвая, Таиланда и Испании.

Литература

1. Шарафутдинова, Е.Н. Качество пищевых продуктов и антиоксидантная активность [Текст] / Е.Н. Шарафутдинова, А.В. Иванова, А.И. Матерн, Х.З. Брайнина // Аналитика и контроль. 2011. Т. 15. № 3. С. 281 – 286.
2. Яшин, Я.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и влияние их на здоровье и старение человека [Текст] / Я. И. Яшин, В. Ю. Рыжнев, А. Я. Яшин, Н. И. Черноусова // ТрансЛит. 2009. 212 с.
3. Velioglu, Y.S. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products [Text] / Y.S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, B.D. Oomah // J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 4113 - 4117.
4. Das, S. Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A [Text] / S. Das, A.K. Das, R.A. Murphy, I.C. Punwani, M.P. Nasution, A.D. Kinghorn // Caries Research, 1992, 26, 363 – 366.
5. Дзюба, О.О. Stevia rebaudiana (Bertoni) Hemsley - новый для России источник натурального сахарозаменителя [Текст] / О.О. Дзюба // Растительные ресурсы. 1998. Т. 34. Вып. 2. С. 86 – 95.
6. Kinghorn, A.D. In Alternative Sweeteners, 3rd ed., revised and expanded [Text] / A.D. Kinghorn, C. D. Wu, D. D. Soejarto // L. O'Brien Nabors (Ed.), pp. 167 – 184. Marcel Dekker, New York, 2001.
7. Brandle, J.E. Steviol glycoside biosynthesis phytochemistry [Text] / J.E. Brandle, P.G. Telmer // 2007, 68, pp. 1855 – 1863.
8. Лисицин, В.Н. Новые технологии производства диабетических и диетических продуктов на основе продукции переработки растения стевии [Текст] / В.Н. Лисицин, Е.Л. Воловик // Пища, вкус и аромат. № 4. 1999. С.8 - 9.
9. Кочетов, А.А. Перспективы выращивания стевии [*Stevia rebaudiana Bertoni* (L.)] в Нечерноземной зоне России [Текст] / А.А. Кочетов // Аграрная Россия. 2012. № 2. С. 2 – 4.
10. Midmore, D. J. A new rural industry stevia to replace imported chemical sweeteners [Text] / D.J. Midmore, A.H. Rank // RIRDC Pub No. W 02/22. 2002. p. 55.
11. Gardana, C. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora [Text] / C. Gardana, P. Simonetti, E. Canzi, R. Zanchi, P. Pietta // J Agric Food Chem. 2003. Oct. 22; 51(22): 6618 – 22.
12. Koyama, E. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans [Text] / E. Koyama, N. Sakai, Y. Otori, K. Kitazawa, O. Izawa, K. Kakegawa, A. Fujino, M. Ui // Food Chem Toxicol. 2003 Jun; 41(6): 875 - 83.
13. Geuns, J. M.C. Molecules of Interest Stevioside [Text] / J. M.C. Geuns // Phytochemistry 2003, 64, pp. 913 – 921.
14. Jeppesen, P.B. Stevioside acts directly on pancreatic cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel activity [Text] / P.B. Jeppesen, S. Gregersen, C.R. Poulsen, K. Hermansen // Metabolism. 2000. 49. pp. 208 – 214.
15. Chan, P. A double blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension [Text] / P. Chan, B. Tomlinson, Y. Chen, J. Liu, M. Hsieh, J. Cheng, // British Journal of Clinical Pharmacology. 2000. 50. pp. 215 – 220.
16. Tadhani, M.B. In vitro antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* leaves and callus [Text] / M.B. Tadhani, V.H. Patel // J Food Comp. Anal. 2007. 20 (3 – 4): 323 – 3213.
17. Ghanta, S. Oxidative DNA damage preventative activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener [Text] / S. Ghanta, A. Banerjee, A. Poddar, S. Chattopadhyay // J Agric Food Chem. 2007. 5 (26): 10962 – 10967.
18. Shruti Shukla, Archana Mehta, Vivek K. Bajpai and Savita Shukla In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association (2009) Volume: 47, Issue: 9, Pages: 2338 – 2343.
19. Зимин, М.В. Использование биоморфологической характеристики сортообразцов стевии в селекционной работе [Текст] / М.В. Зимин, Т.П. Жужалова // Селекция и семеноводство полевых культур: Юбилейный сборник трудов. Ч. 1. Воронеж: ФГОУ ВПО ВГАУ. 2007. С. 69 – 73.
20. Ramakrishnan Kaushik, Narayanan Pradeep, Vasudevan Vamshi, Muthukumaran Geetha, Antony Usha (2010) J Food Sci Technol (January–February 2010) 47(1):27 – 33) Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts.
21. Канарская, З.А., Демина Н.В. Тенденции в производстве сахарозаменителей [Текст] // Вестник Казанского технол. ун. Т.15. № 9. 2012. с. 145 – 154.
22. Хусаинов И.А., Канарский А.В., Канарская З.А. Влияние конформации олигосахаров на их пребиотические свойства [Текст] // Вестник Казанского технол. ун. Т. 16. № 6 (1). 2013. с. 131 – 137.
23. Buran Phansawan, Supak Pongbangpho (2007) Antioxidant Capacities of *Pueraria mirifica*, *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Curcuma longa* Linn., *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. and *Cassia alata* Linn. for the Development of Dietary Supplement Kasetart J. (Nat. Sci.) 41: 548 – 554.

© Н. В. Демина – асп. каф. пищевой инженерии малых предприятий КНИТУ, gaхona@rambler.ru; А. А. Кочетов - зав. лаб. экофизиологии растений, Агрофизический НИИ РАСХН, kochetov@yandex.ru; Я. А. Шевченко - University of Allipied Schiencies Weihenstephan Triesdorf, Agricultural Faculty, Triesdorf, yaroslav_shevchenko@yahoo.com; И. Н. Сметанская - University of Allipied Schiencies Weihenstephan Triesdorf, Agricultural Faculty, Triesdorf, iryna.smetanska@hswt.de; А. В. Канарский – проф. каф. пищевой биотехнологии alb46@mail.ru; З. А. Канарская – доц. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, zosya_kanarskaya@mail.ru.