

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 diterпеновые гликозиды (стевиозид, 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 Stuallt 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: , где АА - антиоксидантная активность образцов (%); Е контр. – оптическая плотность контроля - реакционной смеси DPPH (2,2 – Diphenyl - 1-picrylhydrazyl) и метанола; Е 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.