

**Будкевич Роман Олегович, зав. лаб., к.б.н., доцент,
Федорцов Никита Михайлович, аспирант**
ФГАОУ «Северо-Кавказский федеральный университет»
(Россия, г.Ставрополь)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ В МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

Аннотация. Молочные продукты в процессе переработки могут быть подвержены окислительным процессам. В природе и в самом молоке содержится большое количество антиоксидантов, предотвращающих данную реакцию. Многообразие антиоксидантов и методов их исследования приводит к проблеме выбора определенной методики. Целью данной работы является обзор основных методов определения антиоксидантной активности в молочных продуктах и определение механизма их действия.

Ключевые слова: молоко, молочные продукты, антиоксиданты, методы определения антиоксидантной активности.

**Budkevitch Roman Olegovitch, laboratory chief, Ph.D., docent,
Fedortchov Nikita Michailovitch, postgraduate**
North-Caucasian Federal University
(Russia, Stavropol)

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF DAIRY PRODUCTS

Abstract. Dairy products during processing may be subjected to oxidative processes. The nature and milk itself contain a lot of antioxidants preventing the mentioned reaction. The diversity of antioxidants and the methods of their investigation create the problem of the definite method choice. The aim of the present work is the review of the basic methods for determination of antioxidant activity in dairy products and determination of the mechanism of their action.

Key words: milk, dairy products, antioxidants, methods of antioxidant activity determination.

Молоко является одним из ключевых продуктов питания в жизнедеятельности человека. Это полидисперсная многокомпонентная система, включающая в себя множество полезных составляющих. Молоко, как и другие пищевые продукты с течением времени подвергается окислению, в процессе которого образуются различные продукты реакции окисления и свободные радикалы. Наиболее ярким примером для молока может служить окисление липидов в его составе, которые выполняют важную роль в сохранении пищевой и биологической ценности продукта [1]. Справляться с этим процессом

помогают естественные антиоксиданты, находящиеся в молоке [2], а именно каротиноиды, токоферолы и сывороточные белки [3]. Иногда сывороточные белки подвергаются различным термическим, механическим и ферментативным воздействиям, что приводит к их определенной трансформации и отражается на их антиоксидантных свойствах. К примеру, известно, что при ферментативном гидролизе сывороточные белки способны проявлять высокую антиоксидантную активность (АОА) [4]. В случае термической обработки молока также наблюдается увеличение его АОА, что связывают с протеканием начальных этапов реакции Майяра между сывороточными белками и сахарами, представленными в молоке [5,6]. Но иногда их действия бывает недостаточно, и начинают проявляться окислительные процессы в молоке [7].

Для борьбы с различными эффектами свободно-радикальных реакций в молоке применяются различные антиоксиданты. Наиболее активные диетические антиоксиданты относятся к семейству фенольных и полифенольных соединений [8]. Для предотвращения процессов окисления могут использоваться данные антиокислители, что наиболее актуально для сухих молочных продуктов. Эти данные позволяют рассматривать использование АОА в оценке качества молока и молочных продуктов [1]. Используемые методы определения АОА имеют различные механизмы [9], и, соответственно, показывают различные результаты, так как молоко является сложной системой с большим количеством составляющих его веществ.

Целью данной работы является обзор основных методов определения АОА в молочных продуктах и определение механизма их действия, что может способствовать более глубокому пониманию различных используемых методов.

Существующие биохимические методы позволяют определять общее содержание антиоксидантов. Следует отметить, что они не являются универсальными. Одним из наиболее известных методов определения суммарного содержания антиоксидантов в пищевых продуктах является метод FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power) [10]. Механизм определения связан с восстановительным потенциалом антиоксидантов (Fe^{3+} до Fe^{2+}). Но в случае протекания такой реакции возникает ряд проблем. Например, у тиолсодержащих белков, входящих в состав молока, восстановительный потенциал значительно ниже потенциала реакции восстановления железа, а значит, они будут вступать в реакцию медленнее, и результаты окажутся занижены [11]. Эти факторы стоит учитывать при определении АОА с его помощью в молочных продуктах. Методом, обходящим ограничение на измерение тиолсодержащих белков, является модифицированный метод CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) [12]. Модификация

заклучалась в следующем – замена аммоний-ацетатного буфера с рН 7 (при концентрации 1 М) на 8 М мочевиный буфер, доведенный до рН 7, путем нейтрализации 6 М HCl. Такой буфер помогает частично растворить и денатурировать белки, чтобы тиолы, находящиеся внутри структуры белка были доступны для реакции. Механизм – восстановление двухвалентной меди до одновалентной с помощью восстановителей в пробе. Авторы метода также отмечают необходимость дальнейшего исследования механизма реакции. Еще одним методом определения общего содержания антиоксидантов является метод ABTS (по названию основного реагента – 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфо кислота)) [13]. Преимуществом этого метода является возможность его использования как в водных, так и в жировых фазах, что и позволяет его использовать для молочных продуктов. Механизм реакции следующий – перед добавлением в реакционную смесь, содержащую антиоксиданты, проводится получение стабильного катион-радикала ABTS при помощи его окисления персульфатом калия. Таким образом, мы получаем синезеленый хромофор, который обесцвечивается в ходе реакции присоединения антиоксидантов [14]. Исходя из описанного механизма, становится понятно, что измерение данным методом будет не самым точным, ведь могут протекать конкурирующие реакции, что может привести как к заниженным, так и завышенным результатам. Очень похожим на метод ABTS является метод DPPH (по названию основного реагента (2,2-дифенил-1-пикрилгидразина)) [15]. Его механизм похож на механизм действия ABTS – происходит инициация радикала DPPH с последующим поглощением антиоксидантами, что ведет к обесцвечиванию раствора. Но у данного метода присутствуют и серьезные недостатки – DPPH радикал является долгоживущим, вследствие чего некоторые вещества могут реагировать с ним медленно, или же и вовсе быть инертными, то есть в конечном итоге есть шанс получить значительно заниженные результаты. Помимо этого, кинетика реакции между DPPH и антиоксидантом носит нелинейный характер [16], что также может неблагоприятно отразиться на результатах измерения.

Новым направлением является хемилюминесцентный анализ сложных реакций с участием радикалов. Принципиальное отличие метода от всех остальных состоит в том, что с помощью него регистрируется не концентрация вещества, а скорость образования радикалов в системе. Для его использования требуется определенное оборудование и реагенты, а именно хемилюминометр и активаторы хемилюминесценции. В зависимости от активатора будут различаться и определяемые радикалы, например, при участии люминола производится измерение гидроксильного и супероксидного радикалов, а при участии C-525 в реакцию вступают пероксильные радикалы липидов [17]. Показано использование хемилюминесцентного анализа для оценки

интенсивности свободно-радикальных процессов при выборе технологических методов обработки молока и для получения безопасных молочных продуктов, позволяющих сохранить биологическую ценность молока [18].

Наиболее распространенный в России метод определения АОА в пищевых продуктах и молоке – амперометрическое определение антиоксидантной активности при помощи жидкостного хроматографа «ЦветЯуза-01-АА» [19,20]. Отличительной особенностью данного метода является высокая селективность определения именно антиоксидантов [21-23]. Исходя из этого, можно сказать, что метод является универсальным [24,25]. Для определения количества всех антиоксидантов в пробе измеряется величина тока, возникающая при их окислении на поверхности электрода, и уже полученный сигнал сопоставляется со стандартом, измеренным в тех же условиях [20]. Также данный метод обладает рядом преимуществ – регистрация в реальном времени, воспроизводимость анализа и возможность обнаружения малых концентраций антиоксидантов. Но можно выделить и небольшой недостаток – при работе с малыми концентрациями вещества снижается вероятность проявления эффекта синергизма [26]. Метод хорошо показал себя при изучении АОА молочных белков [4].

Еще одним универсальным методом может стать метод кулонометрического титрования электрогенерированным бромом на кулонометре «Эксперт-006» [27]. Особенность метода заключается в способности электрогенерированного брома вступать в радикальные и окислительно-восстановительные реакции электрофильного замещения и присоединения по кратным связям, что позволяет охватить практически все группы соединений с антиоксидантными свойствами [28]. При этом отмечается, что повышенное содержание жира в продуктах может быть причиной заниженных результатов. Авторы связывают это тем, что жиры – легко окисляемые компоненты, и чем больше жирность, тем больше антиоксидантов уходит на торможение процессов свободного радикального окисления жира [29].

Выводы. Таким образом, несмотря на обилие методов определения антиоксидантной активности в молоке и молочных продуктах, к изучению собственно молока могут быть применимы не все методы. Важным является выбор изучаемых компонентов молока. Биохимические методы являются менее затратными и не требуют специального оборудования, но ограничиваются химизмом процесса. В условиях комплексной оценки и необходимости сопоставления данных наиболее многообещающими являются: хемилюминесцентный анализ, амперометрический и кулонометрический методы.

Список литературы

1. Шидловская В.П., Юрова Е.А. Антиоксиданты молока и их роль в оценке его качества. *Молочная промышленность*, 2010. № 2. С. 24-27.
2. Горбатова К.К., Гунькова П.И. Химия и физика молока и молочных продуктов. СПб.: ГИОРД, 2012. 336 с.
3. Elias R.J., Kellerby S.S., Decker E.A. Antioxidant activity of proteins and peptides // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008. V. 48, Iss. 5. P. 430-441.
4. Будкевич Р.О. и др. Антиоксидантная активность гидролизатов сывороточных белков молока, полученных с применением фермента пепсина. *Вестник АПК Ставрополя*, 2015. № 3 (19). С. 18-21.
5. Shukla P., Vajwa U. Effect of heat treatment on antioxidant activity in sucrose-milk protein model systems // *International Journal of Computational Engineering Research*. 2013. V.3, Iss. 12. P. 20-24.
6. Евдокимов И.А. и др. Современные проблемы науки в пищевых и перерабатывающих отраслях АПК. Том. Часть I Специфические свойства белков молока и их изменение при технологической обработке. Ставрополь, 2013. 83 с.
7. Будкевич Р.О., Федорцов Н.М., Еремина А.И. Влияние температурной обработки на образование продуктов окислительной трансформации белков молока // «Биоразнообразие, биоресурсы, вопросы биотехнологии и здоровье населения северо-кавказского региона», материалы VI (63-й) ежегодной научно-практической конференции «Университетская наука-региону» Северо-Кавказского федерального университета, 2018. С. 89-92.
8. Soto M.L., Falqué E., Domínguez H. Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics // *Cosmetics*. 2015. V.2, Iss. 3. P. 259-276.
9. Moharram H.A., Youssef M.M. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review // *Alexandria J. Food Sci. Technol.* 2014. V. 11, Iss. 1. P. 31-41.
10. Kuhnen S., Moacyr J., Mayer J. et al. Phenolic content and ferric reducing-antioxidant power of cow's milk produced in different pasture-based production systems in southern Brazil // *J. Sci. Food Agric. John Wiley and Sons Ltd.* 2014. V.94, Iss. 15. P. 3110-3117.
11. Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. V. 8, Iss. 48. P. 3396-3402.
12. Çekiç S.D., Başkan K.S., Tütem E. et al. Modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay for measuring the antioxidant capacities of thiol-containing proteins in admixture with polyphenols // *Talanta, Elsevier*. 2009. V.79, Iss. 2. P. 344-351.
13. Yilmaz-Ersan L., Ozcan T., Akpınar-Bayazit A. et al. Comparison of antioxidant capacity of cow and ewe milk kefir // *J. Dairy Sci., Elsevier Inc.* 2018. V. 101, Iss. 5. P. 3788-3798.

14. Moon J.K., Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. V. 57, Iss. 5. P. 1655-1666.
15. Khan I.T., Nadeem M., Imran M. et al. Antioxidant capacity and fatty acids characterization of heat treated cow and buffalo milk // *Lipids Health Dis, BioMed Central Ltd*. 2017. V. 16, Iss. 1. P. 163-173.
16. Huang D., Boxin O., Prior R. et al. The chemistry behind antioxidant capacity assays // *J. Agric. Food Chem*. 2005. V. 53, Iss. 6. P. 1841-1856.
17. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов // *Биофизика клетки*. 2011. № 56 (6). С. 1081-1090.
18. Высокогорский В.Е., Игнатъева Г.В. Хемилюминесцентный анализ пастеризованного молока // *Пищевая промышленность*. 2012. № 10. С. 34-35.
19. Бутова С.В., Шахова М.Н., Кондаурова М.Н. Антиоксидантные свойства амарантовой муки // *Технологии и товароведение сельскохозяйственной продукции*. 2017. № 8 (1). С. 77-82.
20. Рудниченко Е.С., Коренман Я.И. Определение антиоксидантной активности молочно-растительного экстракта методом жидкостной хроматографии // *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. 2012. № 2 (52). с. 138-140.
21. Ермолаева Г.А. Влияние сырья на качество напитков // *Пиво и напитки*. 2005. № 1.
22. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза. М.: Медпрактика, 2003.
23. Нечаев А.П., Траубенберг С.Е., Кочеткова А.А. *Пищевая химия*. СПб.: ГИОРД, 2003.
24. Kaur S., Kapoor H.C. Antioxidants in fruits and vegetables – The Millennium's health // *Intern.Journal of Food Sci. and Techn*. 2001. V. 36. P. 703-725.
25. La Vecchia C. Altieri A., Tavani A. Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies // *Eur. J. Nutr*. 2001. V. 40, Iss. 6. P. 261-267.
26. Яшин А.Я. и др. Методы определения антиоксидантной активности пищевых продуктов и БАДов // *Мир измерений*. 2012. № 1. С. 30-35.
27. Ю.В. Балакирева и др. Гальваностатическая кулонометрия для оценки антиоксидантной активности молока и молочных продуктов. Научно-методическое пособие. М. РАЕН, 2009. 60 с.
28. Щербакова Ю.В. Влияние тепловой обработки на компоненты антиоксидантной системы молока и его интегральную антиоксидантную активность: автореф. дис. ... кандидата биохим. наук. Москва. 2011. – 21 с.
29. Щербакова Ю.В. Использование кулонометрического титрования для сравнительной оценки качества молока различных производителей // *Вестник технологического университета*. 2016. № 19 (8). С. 158-160.