

## Антиоксидантна активност на екстракт от копринени буби Daizo

**В. Михайлова<sup>1</sup>, Я. Евтимова<sup>1</sup>, Л. Атанасова<sup>1</sup>,  
Н. Христова-Авакумова<sup>1</sup>, М. Панайотов<sup>2</sup>, В. Хаджимитова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Катедра медицинска физика и биофизика, Медицински факултет,  
Медицински университет -- София

<sup>2</sup>Аграрен факултет, Тракийски Университет, Стара Загора

**Abstract.** The main product from silkworm (*Bombyx mori*) which has medical applications is sericin protein. It is about 25% from the weight of the cocoon and is a waste product in the silk industry. It is a water-soluble, highly hydrophilic material with many hydroxyl, carboxyl and amino acid groups. Sericin has been used for cosmetics, medical, polymer materials due to its UV resistant, antioxidative, antibacterial, wound healing, moisture-absorbing properties. Typically it is obtained by aqueous extraction and other water soluble components are extracted along with it. For the medical applications it is interesting to know the antioxidant properties of sericite and extracts obtained from cocoons. We studied antioxidant properties of the extract of 10 yellow-green Daizo cocoons originating from Japan by ABTS and DPPH test. Antioxidant activity was measured in two stages - after ultrasonic extraction and after incubation at 60°C. The extracts exhibits a radical-scavenging properties with both tests. Incubation at 60°C increases twice the yield of substances with antioxidant properties. The measurement of pure sericin in the same conditions showed that the antioxidant activity of the obtained extracts is not only due to sericite but the extracted together with it other components, also having antioxidant properties.

### 1 Увод

Копринената буба (*Bombyx mori*) е насекомо, което се отглежда от хората с цел производство на коприна. В хода на развитието си копринената пеперуда преминава през 4 стадия: яйце (бубено семе), ларва, какавида и пеперуда (имаго). В третия стадий ларвата изгражда пашкул, който е съставен от около 70% фиброин, 25% серицин и 5% несерицинови компоненти. Две нишки фиброин изграждат копринената нишка, която е добре проучена и намира приложение при изработката тъкани. Серицинът е водоразтворим лепило-

подобен белтък, изграден от 17 аминокиселини, който слепва фиброиновите нишки [1]. В продължение на стотици години се е смятал за отпаден продукт при изработването на коприна. Установено е обаче, че той притежава важни биологични свойства -- антиоксидантна [2,3] и антитирозинова активност [3], противосъсирващо [4] и антибактериално [5] действие. Серицинът има антитуморно действие без да индуцира отговор на имунната система [6, 7]. Може да се използва като безсерумна среда за съхранение чрез замразяване на животински култури [8]. Серицинът потиска *in vitro* окислението на липидите [3], действа заздравително на рани [9] и се използва в козметичната дерматология за подмладяващи процедури. Може да се използва и за хирургичните шевове. Има възможност серицин да се употребява и при изработването на контактни лещи. Този белтък намира приложение в хранителната промишленост, както и за изработване на хранителни добавки [3]. Възможността му да се превръща в гел, задържането на влага и адхезията към кожата способстват широко му приложение в медицината, фармацията и козметиката. Поради възможните многобройни приложения е важно да се знае каква е антиоксидантната активност на екстракта, който съдържа този протеин, тъй като в процеса на извличане на серицина от пашкулите се екстрахират и други вещества. Екстрактите от различни породи копринени буби имат различен антиоксидантен потенциал.

## 2 Методи

*Извличане на екстракт.* Изследвани са екстракти, получени от 10 жълто-зелени пашкула от копринени буби, *Bombyx Mori*, порода *Daizo* с произход Япония. Пашкулите са изследвани един по един. Всеки е нарязан на малки парченца и е добавена дестилирана вода до концентрация 30 mg сухо вещество на ml. Подложени са последователно на ултразвукова екстракция два пъти по 15 min и след това на инкубация за 1 h при температура 60°C. Тествани са и двата метода на екстракция, като са взети проби за изследване на тотална антиоксидантна активност (ТАОА) след всеки от тях.

Измерена е и АОА на разтвор на чист серицин, произведен от Seiren Co., Ltd., разтворен в дестилирана вода до концентрация 10 mg/ml и озвучен два пъти по 15 min.

*Методи за определяне на ТАОА на базата стабилни радикали.* Използвани са два метода, базирани на взаимодействие на изследваните вещества със стабилни радикали – *ABTS тест* [10] и *DPPH тест* [11]. Двата метода са взаимно допълващи се поради различния механизъм на взаимодействие на радикалите с множество антиоксиданти.

### Антиоксидантна активност на екстракт от копринени буби *Daizo*

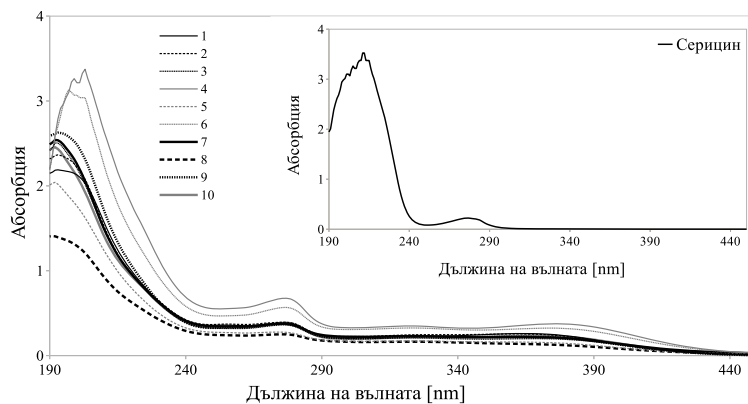
И при двата към 2 ml от изходния разтвор на съответния радикал се добавят получените екстракти в различни концентрации. В резултат на взаимодействието на веществата с АОА с радикала се наблюдава обезцветяване на разтвора, пропорционално на количеството реагирал радикал. Пробите се инкубират на тъмно в продължение на 1 h при стайна температура, след което се измерва абсорбцията им при определена дължина на вълната. За разтвора на  $ABTS^{+\bullet}$  радикал тя е 734 nm, а за  $DPPH^{\bullet}$  радикал 517 nm. Измерени са по три проби от всяка концентрация и е пресметната средната стойност и стандартното отклонение.

За оценка на ТАОА е използвана величината  $C_{50}$ , което е концентрацията на сухо веществото, екстрактът от което намалява абсорбцията, съответно и количеството радикали, наполовина спрямо изходните. За изчисляването на тази стойност е използвано, че зависимостта на абсорбцията от концентрацията е линейна. По-ниски стойности на  $C_{50}$  означават по-висока ТАОА на изследваната проба.

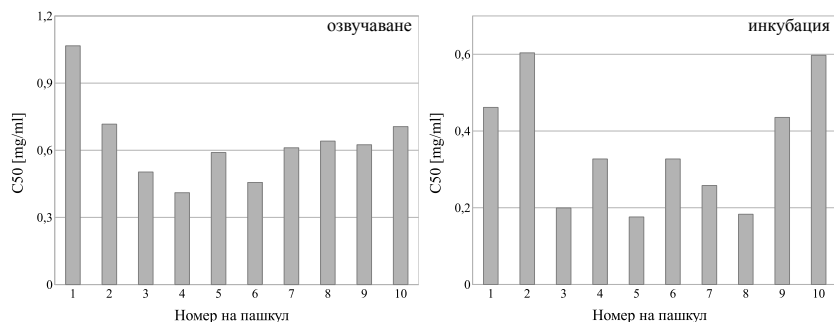
Абсорбционните спектри на получените екстракти на разтворения серицин са измерени със UV-Vis спектрофотометър в диапазона 190 - 1100 nm. В спектрите не се наблюдава поглъщане при дължините на вълната при които се измерва абсорбцията на свободните радикали  $ABTS^{+\bullet}$  и  $DPPH^{\bullet}$ .

### 3 Резултати

Абсорбционните спектри на екстрактите, получени след озвучаване на пашкулите и спектърът на чист серицин са показани на Фиг. 1. Измерените спектри след инкубация имат същото поведе-



Фиг. 1: Абсорбционни спектри на получените екстракти след озвучаване сравнени със спектърът на чист серицин.

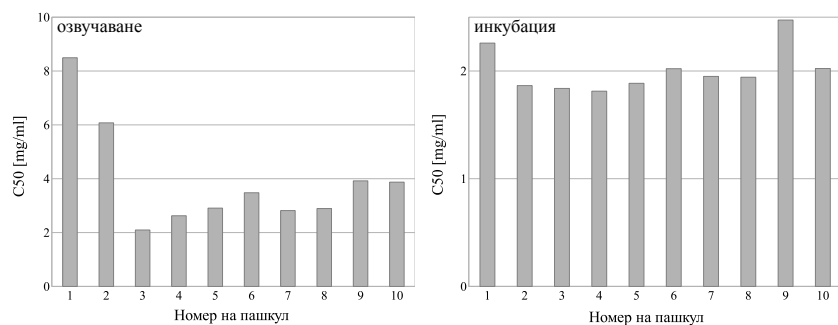


Фиг. 2: Стойности на  $C_{50}$  в система с ABTS радикал за екстракти, получени след озвучаване (ляво) и след инкубация (дясно).

ние. Във всички спектри се наблюдават два характерни пика около 210 nm и около 280 nm с еднакъв относителен интензитет, които се дължат на наличието на серицин. В спектрите на екстрактите не се наблюдава поглъщане при дължини на вълната над 450 nm, а в спектъра на серицина над 300 nm.

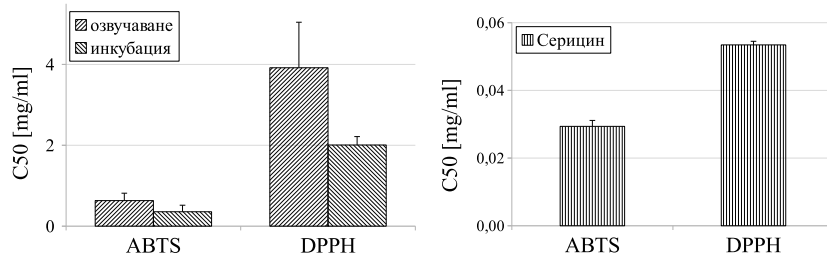
На Фиг. 2 са представени резултатите от изследването на ТАОА на екстрактите отделени след озвучаване и след инкубация спрямо ABTS<sup>•+</sup>, а на Фиг. 3 спрямо DPPH<sup>•</sup> радикала. Наблюдаваните разлики се дължат на индивидуални особености на отделните пашкули.

Сравнение между средните стойности за ТАОА (Фиг. 3) спрямо двата стабилни свободни радикала показват, че след инкубация се регистрира два пъти по-висока активност. Отношението между ТАОА получена по двата метода след озвучаване е  $C_{50}(ABTS)/C_{50}(DPPH) =$



Фиг. 3: Стойности на  $C_{50}$  в система с DPPH радикал за екстракти, получени след озвучаване (ляво) и след инкубация (дясно).

## Антиоксидантна активност на екстракт от копринени буби *Daizo*



Фиг. 4: Средни стойности на  $C_{50}$  в системи с ABTS и DPPH радикал за екстракти, получени след озвучаване и след инкубация (ляво), сравнени със стойности на  $C_{50}$  за чист серидин (дясно).

0.16(9), а след инкубация  $C_{50}(ABTS)/C_{50}(DPPH) = 0.18(9)$ . Това показва, че екстрактите проявяват около пет пъти по-ниска активност спрямо DPPH радикала, отколкото спрямо ABTS и че при двата метода на екстракция вида на разтворените вещества е един и същ.

Отношението между ТАОА получена по двата метода за чист серидин (Фиг. 4) е  $C_{50}(ABTS)/C_{50}(DPPH) = 0.55(4)$ , което е много различно от същото отношение за изследваните екстракти. Това, както и наблюдаваните допълнителни ивици в спектрите на екстрактите в интервала 300 – 440 nm показва, че за тях ТАОА се дължи и на извличането на други компоненти, притежаващи антиоксидантни свойства.

## 4 Заключение

Установено е, че полученият екстракт проявява радикал-улавящи свойства и по двата използвани метода. След инкубацията на 60°C се регистрира два пъти по-висока антиоксидантна активност. Измерването на стандарт серидин в същите условия показва, че антиоксидантната активност на получените екстракти се дължи не само на серидина, а и на извличането на други компоненти, притежаващи антиоксидантни свойства.

## Литература

- [1] Y.J. Wang, Y.Q. Zhang, (2011) *Adv. Mater Res.* **175-176**, 158.
- [2] R. Dash *et al.* (2008) *BMB Rep.* **41**, 236.
- [3] N. Kato *et al.* (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 145.
- [4] S Sarovart *et al.* (2003) *Rev. Adv Mater Sci* **5**, 193.
- [5] P Aramwit *et al.* (2010) *Biotechnol. Appl Biochem* **55**, 91.
- [6] M. Sasaki *et al.* (2000) *Oncol. Rep.* **7**, 1049.

*В. Михайлова и др.*

- [7] S. Zhaorigetu *et al.* (2001) *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **65**, 2181.
- [8] M. Sasaki *et al.* (2005) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **42**, 183.
- [9] Hunt TK. (1980) *World J Surg.* **4**, 271.
- [10] R. Re *et al.* (1999) *Free Rad. Biol, Med.* 1231.
- [11] P. Goupy *et al.* (2003) *J. Agric. Food Chem.* 615.