ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2532
https://elibrary.ru/KMRQHK

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Подбор параметров экстракции биоактивных веществ из лекарственных растений с применением молочной сыворотки

Н. С. Величкович*, А. А. Степанова, О. В. Козлова, В. А. Люц, Т. А. Ларичев

Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

Поступила в редакцию: 01.06.2024
Принята после рецензирования: 23.08.2024
Принята к публикации: 03.09.2024

**Н. С. Величкович: velichkovich@yandex.ru, http://orcid.org/0000-0002-9061-1256*
А. А. Степанова: https://orcid.org/0000-0001-7774-8859
О. В. Козлова: https://orcid.org/0000-0002-2960-0216
В. А. Люц: https://orcid.org/0009-0002-5706-7727
Т. А. Ларичев: https://orcid.org/0000-0003-0166-2527

© Н. С. Величкович, А. А. Степанова, О. В. Козлова, В. А. Люц, Т. А. Ларичев, 2024

Аннотация.
Молочная сыворотка обладает уникальным нутриентным составом и способна оказывать положительное влияние на организм человека. Однако по причине высокого содержания органических веществ, молочная сыворотка может наносить вред окружающей среде. Перспективным вариантом использования молочной сыворотки может стать её применение в качестве экстрагента для получения растительных экстрактов и извлечения из них биологически активных веществ для пищевой промышленности. На этом основании целью настоящей работы являлся подбор параметров извлечения биологически активных веществ (флавоноидов) из экстрактов растительного сырья с помощью нетрадиционного вида экстрагента, в качестве которого используется молочная сыворотка.
Объектами исследования выступали молочная сыворотка (в качестве экстрагента) и растительное сырье (в виде смесей лекарственных трав). Конечные продукты (экстракты) проверяли на содержание флавоноидных соединений методом тонкослойной хроматографии. Антиоксидантную активность оценивали с применением спектрофотометрического метода. Для повышения эффективности экстракции подбирали параметры экстрагирования (температуру, продолжительность экстракции, соотношение сырья к экстрагенту, состав растительных смесей).
Продолжительность экстрагирования выступала в качестве изменяемого параметра и составляла от 1 до 5 часов при температуре экстракции 90 ± 1 °С. Предложенные образцы, содержащие от 7,5 до 12,5 г смесей трав в 450 мл молочной сыворотке при времени экстрагирования 3 ч обладали максимальной антиоксидантной активностью. Содержание флавоноидов в растительных экстрактах было сопоставимым и не зависело от продолжительности экстракции.
Продолжительность экстракции имеет определяющее значение в интенсификации процесса получения флавоноидов из растительного сырья, поэтому выбор должен осуществляться по наименьшему значению продолжительности при сопоставимых значениях флавоноидов и максимальном уровне антиоксидантной активности.

Ключевые слова. Молочная сыворотка, экстракция, растительное сырье, флавоноиды, антиоксидантная активность, тонкослойная хроматография

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-16-00113.

Для цитирования: Подбор параметров экстракции биоактивных веществ из лекарственных растений с применением молочной сыворотки / Н. С. Величкович [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 3. С. 633–644. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2532

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2532
https://elibrary.ru/KMRQHK

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Extraction of Bioactive Substances from Medicinal Plants with Whey: Selecting Optimal Parameters

Natalia S. Velichkovich*, Ann A. Stepanova, Oksana V. Kozlova, Veronika A. Lutz, Timothy A. Larichev

Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

Received: 01.06.2024
Revised: 23.08.2024
Accepted: 03.09.2024

Natalia S. Velichkovich: velichkovich@yandex.ru, http://orcid.org/0000-0002-9061-1256
Ann A. Stepanova: https://orcid.org/0000-0001-7774-8859
Oksana V. Kozlova: https://orcid.org/0000-0002-2960-0216
Veronika A. Lutz: https://orcid.org/0009-0002-5706-7727
Timothy A. Larichev: https://orcid.org/0000-0003-0166-2527

© N.S. Velichkovich, A.A. Stepanova, O.V. Kozlova, V.A. Lutz, T.A. Larichev, 2024

Abstract.
Due to its natural chemical composition, whey can have both a positive effect on the human body and cause significant harm to the environment. It is rich in organic substances, which creates an additional organic burden on nature. However, whey has good prospects for the food industry as an extractant for the production of plant extracts and biologically active substances. The present research objective was to select optimal parameters for obtaining flavonoids from plant extracts using an unconventional type of extractant, i.e., whey.
The study featured whey as an extractant and mixes of medicinal herbs. The resulting extracts were tested for the content of flavonoid compounds by thin-layer chromatography. The antioxidant activity was assessed using the spectrophotometric method. The extraction variables included temperature, extraction time, material-to-extractant ratio, and composition of herbal mixes. The extraction time ranged from 1 to 5 h at 90 ± 1°C. The maximal antioxidant activity belonged to the samples containing 7.5–12.5 g herbal mix and 450 ml whey. The optimal extraction time was 3 h. The content of flavonoids in the plant extracts was comparable and did not depend on the extraction time.
Extraction time proved to be the key parameter to intensify the process of flavonoid extraction from plant raw materials. Therefore, the choice was made according to the shortest time with comparable values of flavonoids and the maximal level of antioxidant activity.

Keywords. Whey, extraction, vegetable raw materials, flavonoids, antioxidant activity, thin-layer chromatography

Funding. This research was supported by the Russian Science Foundation, grant no. 23-16-00113.

For citation: Velichkovich NS, Stepanova AA, Kozlova OV, Lutz VA, Larichev TA. Extraction of Bioactive Substances from Medicinal Plants with Whey: Selecting Optimal Parameters. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(3):633–644. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2532

Введение

Промышленная переработка молока классическими способами приводит к получению такого побочного продукта, как молочная сыворотка, которая в 7–8 раз превышает выработку основного продукта. Нерациональный слив её приводит к значительным экологическим проблемам из-за высокого содержания в ней органических веществ. Лактоза, жир и белки составляют основную часть органической нагрузки. В отсутствие устойчивых методов переработки, сыворотка считается серьезным загрязнителем окружающей среды в молочной промышленности. Поскольку большая ее часть выбрасывается в сточные воды, это вызывает серьезную угрозу для экономики предприятия и окружающей среды. При организации комплексной переработки и рационального использования ресурсов молочной сыворотки появляется возможность повысить показатели по экономической эффективности производства, расширения ассортимента производства биологически полноценных пищевых продуктов, а также продуктов функциональной направленности [1].

В зависимости от первичной переработки молока выделяют нативную, кислую, сладкую и соленую сыворотку.

Нативная молочная сыворотка, полученная в результате молочнокислого брожения, содержит около 50 %

составляющих молока, таких как лактоза (~70 %, в зависимости от кислотности сыворотки), белок (~14 %), минералы и липиды. Основные различия заключаются в содержании кальция, фосфатов и молочной кислоты [2].

Кислая молочная сыворотка получается в основном в результате биологического свертывания молока при производстве творога, и частично при производстве разных видов йогуртов, в том числе греческого йогурта и плавленого сыра. Например, при производстве греческого йогурта третья часть молока перерабатывается в кислую сыворотку, которая имеет меньшее содержание белка, лактозы и более низкую активную кислотность, но более высокое содержание кальция, фосфора и молочной кислоты по сравнению со сладкой [3].

Сладкая молочная сыворотка получается вследствие обработки молока сычужными ферментами для производства различных видов сыров, в большинстве случаев по определенным технологиям, которые строго защищены патентами. Сладкая молочная сыворотка, кроме сывороточных белков, содержит гликомакропептиды, образующиеся в результате ферментативного гидролиза *κ*-казеина.

Соленая молочная сыворотка получается при производстве сыров Cheddar, Colby и других твердых сыров. Содержание соли в соленой молочной сыворотке варьирует от 4,1 до 10 %, pH соленой молочной сыворотки – около 5,2. Состав соленой молочной сыворотки: соль – 8,71 %, липиды – 1,69 % и вода – 82,2 %. В соленой сыворотке содержится около 1 % белка, но его содержание в этом виде молочной сыворотки мало изучено [4]. Из-за высокого содержания соли, переработка соленой молочной сыворотки требует высоких затрат. Количество соленой молочной сыворотки, получаемой ежедневно, составляет от 2 до 5 % от общих её объемов [5, 6].

Согласно стратегии развития пищевой и перерабатывающей промышленности РФ и статистическим данным, на переработку отправляется около 44 % от производимой молочной сыворотки. В связи с этим, приоритет развития отдается предприятиям полного цикла переработки. Традиционные и инновационные способы переработки молочной сыворотки направлены на разработку специализированных продуктов (сывороточные порошки, сывороточные белки, функциональные продукты питания и напитки), пищевых пленок и покрытий, молочной кислоты и других биологически активных веществ, биопластика, биотоплива и прочее [1].

Большие объемы сыворотки могут быть переработаны в биоэтанол, а для малых количеств наиболее экономично производить ферментированные или не ферментированные напитки на основе сыворотки. Варианты переработки молочной сыворотки разнообразны. Развитие новых технологий привело к изучению альтернативных способов переработки сыворотки в ценные продукты с добавленной стоимостью.

Сывороточные порошки. Производство сухой сыворотки является одним из самых популярных способов использования сыворотки и обычно включает в себя несколько процессов [1]:

– осветление сыворотки;
– отделение сливок и пастеризация;
– концентрирование сухих веществ выпариванием (40–60 %);
– кристаллизация лактозы;
– распылительная сушка сыворотки.

Обладая уникальным нутриентным составом, сухая сыворотка применяется в самых разных спектрах пищевой промышленности. Наиболее широкое применение – в качестве добавки при производстве детских смесей, мясных продуктов, супов, соусов, топпингов, сливок, ореховой глазури, прессованных орехов, сырных соусов, картофельных чипсов, хлебобулочных изделий, пиццы, печенья, макарон, а также при производстве суфле и тортов. Сухую сыворотку можно использовать в качестве адсорбента и носителя жиров и масел. Продукты питания, приготовленные с добавлением сухой сыворотки, имеют улучшенные сенсорные и физические свойства (пенообразование и кислотоустойчивость) [7, 8].

Функциональные продукты и напитки. Большой интерес среди потребителей вызывают инновационные технологии переработки сыворотки, в результате которого выступают функциональные продукты питания и напитки. Богатый многокомпонентный состав сыворотки применяют в качестве функциональных ингредиентов в диетических, спортивных и медицинских продуктах. На сегодняшний день производители рассматривают способы изготовления напитков на основе нативной кисло-сладкой сыворотки или из порошкообразной, депротеинизированной и разжиженной сыворотки. Существует ряд трудностей, связанных с производством таких напитков – это подверженность микробной порче и чувствительность сывороточных белков к термообработке при температуре выше 60 °C. Большинство сывороточных белков выпадает в осадок после обычной термической обработки сыворотки (при 72 °C в течение 15–20 с). Поэтому многие исследования направлены на внедрение нетермических методов в производстве напитков – мембранное разделение, высокоинтенсивный ультразвук или использование сверхкритического диоксида углерода [9, 10].

Биогаз. Использование «зеленых технологий» в рамках получения экологически чистого топлива из возобновляемых источников усиливают позиции РФ на мировом рынке. Водород – это так называемая «чистая» энергия, которая не способствует возникновению парниковых газов и не вызывает кислотных дождей. Отходы или побочные продукты молочной промышленности, богатые лактозой, имеют огромный потенциал для производства биоводорода. Ферментативные бактерии, анаэробные бактерии и цианобактерии – три наиболее распространенных типа микроорганизмов, вырабатывающих водород и использующих лактозу в качестве источника углерода. Из-за высокой

органической и низкой буферной способности анаэробное сбраживание сыворотки приводит к быстрому выделению кислоты и низкому образованию биогаза. Поэтому для повышения продуктивности сыворотку следует смешивать с другими типами отходов или навозом [11, 12].

Лактоза. Лактоза является основным компонентом, входящим в состав сухих веществ сыворотки (70–72 % общего количества сухих веществ). С точки зрения здорового питания лактоза имеет множество преимуществ, поскольку действует как пищевая клетчатка, обладает пребиотическими свойствами. Она используется в качестве источника питательных веществ и субстрата кишечными бактериями для выработки молочной кислоты и жирных кислот с коротким углеродным циклом, тем самым создавая слабокислую реакцию в кишечнике и предотвращая рост и размножение вредных бактерий. Данный углевод оказывает меньшее влияние на уровень сахара в крови из-за низкого гликемического индекса (в два раза меньше, чем у глюкозы). Лактозу можно получить несколькими методами. Путем выделения из депротеинизированной сыворотки (например, пермеата сыворотки, полученного ультрафильтрацией): концентрирование сыворотки выпариванием, кристаллизация лактозы из концентрированной сыворотки и отделение полученных кристаллов центрифугой или декантером. В настоящее время разработаны прогрессивные технологии по выделению лактозы из сыворотки и ее дальнейшей переработки в продукты промышленного значения: органические кислоты (молочная и лимонная), кефироподобные ферментированные сывороточные напитки, белки одноклеточных организмов, пробиотические закваски, этанол, биогаз, биопластик и этиллактат [13].

Молочная кислота. Молочная кислота и ее производные уже давно применяются в пищевой, фармацевтической, текстильной, кожевенной и химической промышленности, прежде всего в качестве консервантов и подкислителей [14, 15]. Получение молочной кислоты в последнее время увеличивается за счет использования в производстве экологически чистых биоразлагаемых полимеров с целью заменить значительное применение пластиков на основе нефти. Молочную кислоту можно производить из лактозы путем ферментации с использованием следующих групп микроорганизмов: *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* и *Candida*, а также нитчатых грибов *Rhizopus oryzae* [16]. Перед производством молочной кислоты сыворотку необходимо предварительно обработать мембранными методами, чтобы снизить содержание белка и повысить концентрацию лактозы и минеральных солей. Для повышения эффективности процесса ферментации к сыворотке необходимо добавлять дополнительные источники азота и других питательных веществ, таких как дрожжевой экстракт, пептон или кукурузный настой. Для получения конечного продукта – чистой молочной кислоты, не содержащей примесей, – требуется последующая обработка, которая включает несколько процессов мембранного разделения (например, микро- и нанофильтрация, электродиализ с монополярными и биполярными мембранами или концентрирование) [17, 18].

Полимолочная кислота. Представляет собой биоразлагаемый биополиэфир, полученный путем конденсации мономеров молочной кислоты, и один из наиболее перспективных экологически чистых (зеленых) пластиков. Благодаря своей низкой токсичности полимолочная кислота имеет статус GRAS (обычно считается безопасным пластиком) и может использоваться в упаковке пищевых продуктов. Он биоразлагаем, поэтому его можно компостировать в земляных траншеях вместе с другими биоразлагаемыми материалами. При неправильной утилизации разлагаться будет долгие годы, как бензиновый пластик. Некоторые виды полимолочной кислоты могут продуцироваться штаммами дикого типа *Sporolactobacillus laevollacticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Sporolactobacillus ilulins* и *Lactobacillus bulgaricus*. Полимолочная кислота является хорошей заменой полимерам на основе углеводородов, но из-за высокой стоимости ферментации производство поли (d-молочной кислоты) не является конкурентоспособным. При использовании агропромышленных отходов, таких как сыворотка и сывороточный пермеат, становится возможным экономичное альтернативное производство поли (d-молочной кислоты) [15, 16].

Биопластик. Использование сырной сыворотки в качестве субстрата для производства биопластиков в последнее время набирает популярность, поскольку лактоза, присутствующая в пермеате сыворотки, может быть легко преобразована в полигидроксиалканоаты и полимолочную кислоту. Произведенные таким образом биопластики могут в дальнейшем использоваться в упаковке, распыляемых материалах, материалах для устройств, электронных продуктах, сельскохозяйственной продукции, продуктах автоматизации, химических средах и растворителях. В качестве микроорганизмов, перерабатывающих сыворотку в биополимеры, могут выступать *Lactobacillus*, *Haloferax mediterranei*, смешанный фотосинтетический консорциум бактерий и водорослей, смешанная микробная культура (в основном роды *Tauera* и *Lampropedia*) [19, 20].

Полигидроксиалканоаты. Представляют собой биополиэфиры, синтезируемые аэробными бактериями и накапливающиеся в виде внутриклеточных гранул в качестве запаса углерода и энергии, в условиях, ограничивающих рост микроорганизмов. За последние два десятилетия проведено заметное количество исследований по получению полигидроксиалканоаты из сывороточного пермеата с использованием чистых культур микроорганизмов дикого типа или рекомбинантных. Существует три возможных пути: прямое преобразование лактозы в полигидроксиалканоаты,

гидролитическое (химическое или ферментативное) преобразование глюкозы и галактозы в полигидроксиалканоаты и ферментация лактозы в молочную кислоту с последующим преобразованием молочной кислоты в полигидроксиалканоаты [21].

Биоэтанол. Зарекомендовал себя как потенциальное альтернативное и экологически чистое топливо будущего (зеленое топливо). Поскольку биоэтанол не производит никаких токсичных выбросов при сгорании, он эффективен в снижении загрязнения воздуха и замедлении глобального потепления. Сыворотка, как агропромышленный отход, является подходящим субстратом для производства биоэтанола с целью снижения органической нагрузки на окружающую среду. Большего выхода биоэтанола можно достичь путем концентрирования сыворотки ультрафильтрацией или обратным осмосом для повышения концентрации в ней лактозы. Штаммы дрожжей *Kluyveromyces marxianus* обладают способностью метаболизировать лактозу и могут использоваться для производства биоэтанола. Биоэтанол, полученный из сыворотки, может быть применен в пищевой, химической, фармацевтической и косметической промышленности, а также в качестве альтернативного топлива [22–24].

Белки одноклеточных организмов. Получают из культивируемой биомассы различных представителей: водорослей, актиномицетов, бактерий, дрожжей, плесеней, выращенных в крупномасштабных культуральных системах, для использования в качестве источника белка в продуктах питания человека или корма для животных. Цельная сыворотка или сывороточный пермеат являются субстратами для производства белков одноклеточных организмов. Используются микроорганизмы, которые напрямую способны расщеплять лактозу, или неспособные ее потреблять с предварительным гидролизом лактозы ферментативными или химическими способами. Виды *Kluyveromyces* наиболее широко изучали на предмет получения белков из сыворотки, а именно штаммы *K. marxianus* и *K. ragilis* [25].

Сывороточные белки. Представляют собой смесь глобулярных белков с относительно равномерным распределением неполярных, полярных и заряженных аминокислот, которые можно выделить из сыворотки. Сывороточный белок считается одним из наиболее ценных с питательной точки зрения компонентов сыворотки. Инженерно-технические методы разделения, очистки и сушки белков (мембранное разделение и хроматография, электродиализ, распылительная и сублимационная сушка) позволяют расширить применение сывороточных белков [26]. Помимо продуктов питания и напитков, сывороточные белки имеют и другие многочисленные применения в пищевой промышленности, поскольку им можно легко придать различные свойства (макро-, микро- и наноструктуры), подходящие для переноса биологически активных соединений [27]. Возможно использование сывороточных белков в качестве поверхностно-активных компонентов, модификаторов текстуры, пенообразователей и гелеобразователей, загустителей и эмульгаторов [28, 29].

Съедобные пленки и покрытия. Съедобные или биоразлагаемые пленки являются экологически чистой альтернативой традиционным пластикам и позволяют контролировать загрязнение окружающей среды [30]. Прежде всего их можно употреблять вместе с продуктом без предварительного удаления. Пленки сывороточного белка, изолирующие доступ кислорода, характеризуются как биоразлагаемые альтернативные материалы, заменяющие обычно используемые нейлоновые или полиэфирные пленки [31, 32]. Данные покрытия обладают улучшенными механическими и барьерными свойствами по сравнению с пленками на основе полисахаридов и могут обеспечивать стерильность поверхности. Такие пленки быстро биоразлагаются. Для разработки новых экологически эффективных упаковочных материалов с улучшенной устойчивостью к переносу влаги и повышенной гибкостью сывороточные белки необходимо смешивать с подходящими пластификаторами, такими как сорбит или глицерин [33, 34].

Гидрогели. Это полимерные трехмерные сети, которые могут ассимилировать большие объемы воды или биологических жидкостей благодаря наличию гидрофильных групп. Помимо формирования биопленок, сывороточные белки могут образовывать гидрогели. Для разработки новых пищевых продуктов важно понимать взаимодействие между сывороточными белками и биополимерами, такими как пектин, *к*-каррагинан, ксантан и камедь семян базилика. Носителями биоактивных веществ гидрогелей являются частицы размером 10^{-9}–10^{-3}, то во время потребления обеспечивается контролируемое высвобождение включенных веществ, что позволяет улучшить питательные и функциональные свойства продуктов питания [35].

Использование молочной сыворотки как экстрагента. Молочная сыворотка по своим биохимическим свойствам не уступает другим экстрагентам, которые часто используются для экстракции растительного сырья.

В патенте РФ № 2491947, в качестве растительного сырья использовалась ромашка обыкновенная (*Matricaria recutita* L.), предварительно смоченная деионизированной водой. Процесс экстракции проходил в прямоточном перколяторе с помощью водно-жировой смеси – натурального коровьего молока с массовой долей жира 6 % при 70 °С, продолжительность экстракции составила 6 ч. Экстракцию осуществляли при соотношении растительного сырья к экстрагенту 1:10. Анализ полученного экстракта проводили на жидкостном хроматографе. Содержание активных веществ составило 0,21 %. В экстракте широко представлена терпеноидная фракция (34,8 %), в составе которой циклические сесквитерпены *b*- и *α*-фарензены (10,03 %); *b*-кубенен, гермакрен, лепидозен (0,7 %); неофитодиен, тетрагидроионон, мюристин, *b*-сесквифелландрен

(0,22 %); метоксикумарин (1,6 %); нафталиндиол и спатуленол (1,74 %) и дициклоэфир (18,58 %). Самым высоким, по сравнению с известными остальными экстрактами (спиртовые, водные, масляные), было содержание бисаболола (13,9 %) и хамазулена (0,3 %), причем последний был обнаружен еще только в водно-спиртовом экстракте в количестве 0,29 % [36].

В патенте РФ № 2792775 описан способ получения БАД на основе молочной сыворотки и растительного экстракта. В качестве растительного сырья выступают каллусная культура тимьяна обыкновенного и корневая культура женьшеня настоящего. Экстракцию тимьяна осуществляли при 70 °С и концентрации этилового спирта 70 %. Экстракцию женьшеня проводили при 50 °С и концентрации этилового спирта 30 %. В обоих случаях был взят гидромодуль 1:86 с продолжительностью экстракции 4 ч. Далее экстракт фильтровали, выпаривали экстрагент и сушили на распылительной сушилке. Сухой экстракт смешивали с сухой молочной сывороткой, таким образом, обеспечивая продукт антиоксидантным комплексом БАВ [37].

Каледина М. В. и др. в качестве объектов исследования рассматривали экстракты зеленого чая, чабреца и плодов шиповника. Экстрагентом служила подсырная несоленая и творожная сыворотки. Для проведения эксперимента были применены следующие параметры процесса экстрагирования: температура 40–60 °С, количество сырья от 1 до 10 % от массы экстрагента. Предварительно высушенное, измельченное растительное сырье смешивали с подсырной или творожной сывороткой и экстрагировали в интервале 40–60 °С, продолжительность процесса составила 0,5 ч. По результатам исследования были сделаны выводы: водорастворимые витамины более устойчивы в кислой среде, экстракция витамина С и рутина в творожную сыворотку выше, чем в подсырной, содержание витамина С в экстракте, полученном из смеси шиповник-зеленый чай, больше, чем из смеси зеленый чай-чабрец [38].

В работе автора Д. М. Халанской и др. представлены результаты процесса экстракции биологически активных веществ (БАВ) алоэ, боярышника и солодки с применением нетрадиционных экстрагентов (молочная сыворотка, пермеат обезжиренного молока). Выбраны следующие параметры экстрагирования: температура 40–60 °С, продолжительность экстрагирования – 30 мин., соотношение сырья и экстрагента в трех разных соотношениях: 1:2, 1:4, 1:6. Результаты исследования свидетельствуют о том, что наибольшее выделение БАВ наблюдается при соотношении компонентов 1:2 [39].

С. Иванова и др. затрагивают проблему создания функциональных напитков, содержащих экстракты отечественного растительного сырья и молочную сыворотку. Технологический процесс производства напитка включал в себя следующие стадии: подготовка сырья к переработке, приготовление экстрактов каротиноидов и БАВ родиолы розовой и левзеи сафлоровидной, внесение функциональных ингредиентов в молочную сыворотку согласно рецептуре и физиологическим потребностям организма человека, охлаждение, фасовка, хранение. Выбор молочной сыворотки в качестве одного из компонентов напитка обусловлен наличием в составе ценных аминокислот, витаминов, в том числе достаточно редких форм витаминов В7 и В4, минеральных элементов [40].

Работа А. Лодыгина и др. отражает результаты применения молочной сыворотки в качестве экстрагента для извлечения БАВ из растительного сырья: плоды расторопши, листья мяты перечной, листья шалфея, трава эхинацеи пурпурной. Параметры процесса экстракции БАВ: температура – 55–60 °С, продолжительность – 2 ч; скорость вращения термошейкера – 70 об/мин. Оптимальное соотношение сыворотки к растительному сырью: расторопши и мяты – 1:8; шалфея и эхинацеи пурпурной – 1:10. Шалфей и эхинацея пурпурная рекомендованы для дальнейшего изучения с учетом более высоких выходов суммы сухих веществ в их экстрактах по сравнению с экстрактами расторопши пятнистой и мяты перечной. Предварительно высушенное и измельченное растительное сырье смешивали с экстрагентами согласно параметрам. Выдерживали в термошейкере при заданных условиях процесса и по окончании экстракции фильтровали. Согласно результатам исследования, антиоксидантная активность сывороточных экстрактов выше по сравнению с водными экстрактами БАВ исследуемого растительного сырья. Наибольшие значения выхода фенольных соединений достигаются при соотношении сырья и экстрагента 1:8. Концентрация суммы фенольных соединений в экстрактах шалфея значительно больше, чем в эхинацее пурпурной. Существенной разницы в количестве общих фенольных соединений в водных и сывороточных экстрактах нет [41].

Таким образом, после проведения литературного обзора, пришли к выводу, что применение сыворотки в качестве экстрагента не распространено, данный факт позволяет дополнительно изучать и исследовать нетрадиционные виды экстрагентов, используя их для получения БАВ из растительного сырья.

Целью настоящей работы является получение БАВ из растительного сырья с помощью нетрадиционного вида экстрагента, в качестве которого используется молочная сыворотка.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали лекарственные растения Сибирского региона: сирень обыкновенную (*Syringa vulgaris* L.), клевер луговой (*Trifolium pratense* L.), медуницу лекарственную (*Pulmonaria officinalis* L.), борщевик сибирский (*Heracleum sibiricum* L.), таволгу вязолистную (*Filipendula ulmaria* L.), тысячелистник обыкновенный (*Achilleae millefolii* L.), лопух паутинистый (*Arctium tomentosum* Mill.), тимьян обыкновенный (*Thymus vulgaris* L.),

люцерну посевную (*Medicago sativa* L.), копеечник забытый (*Hedysarum neglectum* Ledeb.); молочную сыворотку подсырную.

Перед процессом экстрагирования подготавливали молочную сыворотку к экстракции. Подсырную молочную сыворотку нагревали до 45 °С и центрифугировали для отделения жира, затем подвергали нагреву до 95 °С для коагуляции оставшегося сывороточного белка и дополнительной пастеризации. Продолжительность выдерживания молочной сыворотки при вышеуказанной температуре составила 15 мин. Затем нагретую сыворотку центрифугировали с целью разделения на фракции – жидкую (экстракт) и густую (белок). Далее получившийся раствор пропускали через ватно-марлевый фильтр для дополнительной очистки [41, 42]. Отбирали контрольную пробу молочной сыворотки.

Следующий этап включал получение экстрактов на основе сухого растительного сырья. Растительные объекты измельчали до состояния порошка. Были составлены смеси растительного сырья на основе собственных фитохимических исследований:

– смесь 1: сирень обыкновенная, клевер луговой, медуница лекарственная, борщевик сибирский, таволга вязолистная;
– смесь 2: сирень обыкновенная, медуница лекарственная, тысячелистник обыкновенный, лопух паутинистый, борщевик сибирский, тимьян обыкновенный;
– смесь 3: сирень обыкновенная, люцерна посевная, тысячелистник обыкновенный, копеечник забытый;
– смесь 4: копеечник забытый, женьшень настоящий, медуница лекарственная.

Экспериментальным путем подобрали параметры экстракции – температуру нагрева, продолжительность экстракции, а также соотношение сырья к экстрагенту. В качестве изменяемого параметра для определения наибольшего выхода флавоноидов выступала продолжительность экстракции, которая составляла 1; 2; 3; 4; 5 ч, 7,5–12,5 г растительного сырья вносили в 450 мл молочной сыворотки. Температура нагрева во время процесса экстракции – 90 ± 1 °С. Навески переносили в круглодонные колбы на 500 мл и добавляли молочную сыворотку. Экстрагирование проводили на водяной бане с помощью установки обратного холодильника в соответствии с рисунком 1.

a b

Рисунок 1. Экстрагирование растительного сырья молочной сывороткой: a – процесс экстракции на водяной бане с помощью установки обратного холодильника; b – конструкция установки – обратный холодильник

Figure 1. Extracting plant material with whey: a – extraction process: water bath with a reflux condenser; b – reflux condenser design

По завершению процесса экстрагирования экстракты фильтровали через стерильный ватно-марлевый фильтр, затем дополнительно прогоняли через обеззоленный фильтр. Экстракты хранили в темном месте при температуре от +2 до +6 °С в конических колбах объемом 500 мл с резиновыми пробками для проведения дальнейших исследований.

Определение антиоксидантной активности. Исследование проводили по методу TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) с использованием раствора $ABTS^{\bullet+}$. Метод основан на измерении изменения степени окраски долгоживущего катион-радикала голубого цвета при воздействии антиоксиданта. Водный раствор $ABTS^{\bullet+}$ готовили, смешивая 7 мМ раствора $ABTS^{\bullet+}$ с 2,45 мМ персульфатом аммония в соотношении 1:1 соответственно. Полученную смесь настаивали 16 ч при комнатной температуре 20 ± 1 °С. В контрольную кварцевую кювету наливали дистиллированную воду, обнуляли значения прибора. Затем во вторую кювету добавляли рабочий раствор ABTS•+ и разбавляли водой до тех пор, пока оптическая плотность раствора не станет равной 0,7–0,8 при длине волны 734 нм.

В пробирки вносили 3 мл раствора $ABTS^{\bullet+}$ и добавляли 0,4 мл растительного экстракта. После 8 мин. инкубации при 20 ± 1 °С переносили во вторую кварцевую кювету и измеряли оптическую плотность растворов.

Антиоксидантную активность выражали как степень восстановления радикала $ABTS^{\bullet+}$ по формуле 1:

$$X = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \qquad (1)$$

где X – степень восстановления радикала $ABTS^{\bullet+}$, %; A_0 – оптическая плотность контрольной пробирки; A_1 – оптическая плотность образцов.

Результаты расчетов представили в виде среднего арифметического значения ± стандартного отклонения, которые занесены в таблицу 1. Эксперименты проводили с трехкратной повторностью. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в MS Excel.

Определение содержания флавоноидов в экстрактах на основе растительного сырья методом тонкослойной хроматографии. Для проведения анализа подготовили пластины для тонкослойной хроматографии, обозначали карандашом линию «старта», отступив

от нижнего края пластины 1 см. Затем примерно на одинаковом расстоянии друг от друга наметили карандашом три точки: 1 – место нанесения дозатором образца растительного экстракта, 2 – рутин, 3 – кверцетин [43, 44].

После нанесения необходимых реактивов, помещали пластины для тонкослойной хроматографии в большой химический стакан (объемом 1 л). Пластины размещали в вертикальном положении так, чтобы не допустить соприкосновения краями соседних пластин. В химический стакан наливали свежеприготовленный элюент (подвижная фаза) на высоту 1 см от дна – раствор н-бутанола с ледяной уксусной кислотой с добавлением дистиллированной воды (в соотношении 4:1:5). Линию «финиша» проводили карандашом после окончания процесса элюирования на расстоянии 5–10 мм от верхнего края пластины.

После проведения процесса элюирования необходимо было проявить результаты хроматографического разделения. Для этого обрабатывали пластину проявителем, в качестве которого использовали пары 5 %-ного раствора $FeCl_3$. После проведения анализа тонкослойной хроматографией проявляли пятна в ультрафиолетовом свете.

Определение величины относительной скорости перемещения флавоноидов осуществляли по формуле:

$$R = \frac{x}{L} \quad (2)$$

где R – величина относительной скорости перемещения веществ; x – расстояние, пройденное веществом, см; L – расстояние, пройденное элюентом, см.

Результаты и их обсуждение

В подготовленной молочной сыворотке определили титруемую кислотность – 47,2 ± 0,16 °Т. Антиоксидантная активность сыворотки обусловлена присутствием высоко- и низкомолекулярных антиоксидантов (белкового компонента, витаминов и минеральных веществ) и активной кислотности (pH 6–7) механизмы действия на растительную клетку предполагают высвобождение из неё биоактивных веществ [45].

Результаты спектрофотометрического определения антиоксидантной активности полученных экстрактов сведены в таблицу 1.

Исходя из данных таблицы 1, можно утверждать, что во всех образцах отмечался высокий уровень восстановления катион-радикала. Предложенные образцы экстрактов превосходят значение антиоксидантной активности по сравнению с контрольным образцом – молочной сывороткой. Более выраженной антиоксидантной активностью обладают смеси из трав под номерами 4 и 3, среднее значение которых 86,6 и 84,9 % соответственно. Однако максимальный результат определения антиоксидантной активности характерен для образцов с продолжительностью экстракции 3 ч в смесях из трав под номерами 2, 3, 4, значение которых

Таблица 1. Результаты определения общей антиоксидантной активности экстрактов на основе растительного сырья и молочной сыворотки

Table 1. Total antioxidant activity of extracts based on plant raw materials and whey

Наименование образца	Продолжительность экстракции, τ, ч	Среднее значение оптической плотности A_1 (при A_0 = 0,761)	Степень восстановления катион-радикала, %
Молочная сыворотка подсырная	Контроль	0,339 ± 0,003	55,40 ± 0,32
Смесь 1: сирень обыкновенная, клевер луговой, медуница лекарственная, борщевик сибирский, таволга вязолистная	1	0,275 ± 0,001	63,90 ± 0,13
	2	0,250 ± 0,003	67,20 ± 0,40
	3	0,128 ± 0,001	83,20 ± 0,14
	4	0,119 ± 0,001	84,20 ± 0,13
	5	0,131 ± 0,002	82,80 ± 0,27
Смесь 2: сирень обыкновенная, медуница лекарственная, тысячелистник обыкновенный, лопух, борщевик сибирский, тимьян обыкновенный	1	0,139 ± 0,003	81,70 ± 0,39
	2	0,227 ± 0,002	70,20 ± 0,27
	3	0,074 ± 0,001	90,30 ± 0,14
	4	0,114 ± 0,003	85,00 ± 0,40
	5	0,080 ± 0,001	88,40 ± 0,92
Смесь 3: сирень обыкновенная, люцерна посевная, тысячелистник обыкновенный, копеечник забытый	1	0,119 ± 0,002	84,40 ± 0,26
	2	0,117 ± 0,001	84,60 ± 0,13
	3	0,098 ± 0,001	87,10 ± 0,13
	4	0,120 ± 0,002	84,20 ± 0,26
	5	0,119 ± 0,001	84,40 ± 0,13
Смесь 4: копеечник забытый, женьшень настоящий, медуница лекарственная	1	0,121 ± 0,002	84,10 ± 0,25
	2	0,110 ± 0,001	85,50± 0,13
	3	0,072 ± 0,001	90,54 ± 0,14
	4	0,090 ± 0,001	88,17 ± 0,13
	5	0,118 ± 0,002	84,49 ± 0,26

90,3, 87,1, 90,5 % соответственно. В смеси 1 наивысший результат был достигнут при 4 ч экстрагирования и составил 84,4 %.

Смесь 4, имея наименьшее количество растительных компонентов, показала максимальное значение антиоксидантной активности, что может говорить о наиболее высокой совместимости всех растительных объектов между собой и экстрагентом.

На основании полученных хроматограмм определяли величины относительной скорости перемещения флавоноидов (R*f*) по формуле 2. Результаты определения флавоноидов (кверцетина и рутина) методом тонкослойной хроматографии в экстрактах на основе растительного сырья представлены в таблице 2.

Согласно результатам отмечено наличие кверцетина и рутина в исследуемых экстрактах. Используя данные из таблицы 2, рассчитали величины относительной скорости перемещения флавоноидов, изображенные на рисунке 2.

Ориентируясь на результаты исследования, у растительных объектов выявили максимальное наличие рутина в смеси 1 в условиях 5-часового процесса экстра-

Таблица 2. Результаты определения флавоноидов (кверцетина и рутина) в экстрактах на основе растительного сырья методом тонкослойной хромотографией

Table 2. Flavonoids (quercetin and rutin) in plant extracts, thin-layer chromatography

Наименование образца	Время экстракции, *τ*, ч	Высота экстракта (1), ×1, см	Высота экстракта (1), ×2, см	Высота рутина (3), ×3, см	Высота кверцетина (4), ×4, см	Высота от «линии старта» до «фронта элюента», *L*, см
Смесь 1: сирень обыкновенная, клевер луговой, медуница лекарственная, борщевик сибирский, таволга вязолистная	1	5,80	7,50	5,60	7,40	7,50
	2	5,00	6,80	4,90	6,40	6,90
	3	5,10	6,60	5,20	6,60	6,70
	4	4,90	6,40	5,00	6,80	6,90
	5	5,50	6,70	5,50	6,60	6,90
Смесь 2: сирень обыкновенная, медуница лекарственная, тысячелистник обыкновенный, лопух, борщевик сибирский, тимьян обыкновенный	1	5,00	5,80	4,70	5,90	6,10
	2	5,20	7,00	5,20	6,80	7,10
	3	5,00	6,80	5,10	7,00	7,10
	4	4,10	6,00	4,20	6,10	6,20
	5	4,80	5,80	4,50	5,90	6,15
Смесь 3: сирень обыкновенная, люцерна посевная, тысячелистник обыкновенный, копеечник забытый	1	4,70	6,40	4,80	6,50	6,80
	2	4,60	5,90	4,30	5,90	6,15
	3	5,45	6,90	5,50	6,60	6,90
	4	5,10	6,50	5,10	6,30	7,30
	5	5,40	6,80	5,40	6,70	6,90
Смесь 4: копеечник забытый, женьшень настоящий, медуница лекарственная	1	4,80	6,40	5,10	6,90	7,30
	2	4,95	6,40	4,95	6,35	6,50
	3	5,00	6,50	5,00	6,40	7,30
	4	5,40	6,40	5,30	6,60	6,70
	5	5,00	6,40	5,00	6,30	6,80

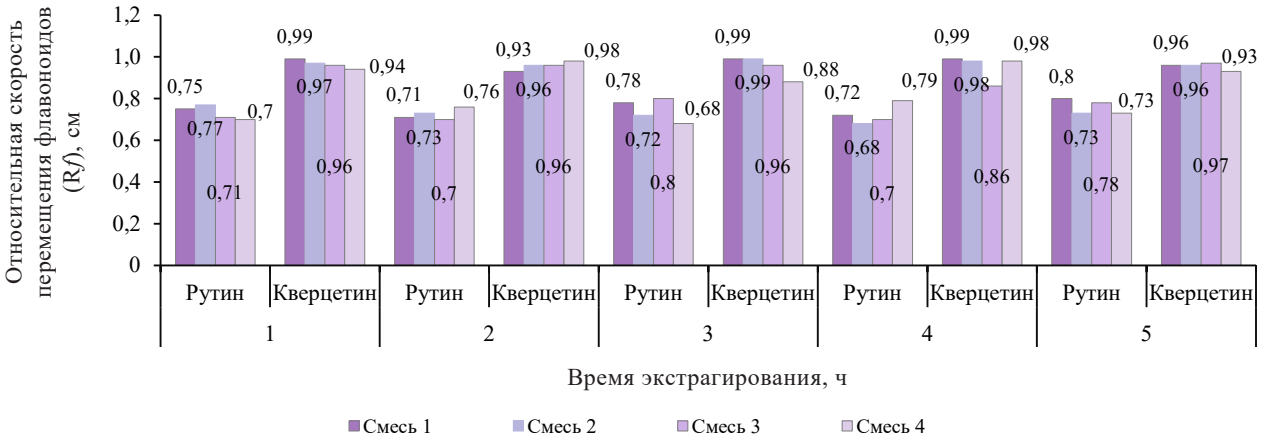

Рисунок 2. Результаты определения величины относительной скорости перемещения флавоноидов

Figure 2. Relative flow rate of flavonoids

гирования, значение которого составило 0,80 ± 0,05 см; в смеси 2 (τ = 1 ч) – 0,77 ± 0,05 см; в смеси 3 (τ = 3 ч) – 0,80 ± 0,05 см; в смеси 4 (τ = 4 ч) – 0,79 ± 0,05 см. Максимальное наличие кверцетина в смеси 1 в условиях 1-, 3- и 4-часового процесса экстрагирования, составило 0,99 ± 0,05 см; в смеси 2 (τ = 3 ч) – 0,99 ± 0,05 см; в смеси 3 (τ = 5 ч) – 0,97 ± 0,05 см; в смеси 4 (τ = 2 и 4 ч) – 0,98 ± 0,05 см.

Предложенный экстрагент позволяет получить образцы экстрактов из растительного сырья с высоким содержанием флавоноидов. Продолжительность экстракции имеет определяющее значение в интенсификации процесса получения флавоноидов из растительного сырья, поэтому выбор осуществляется по наименьшему значению продолжительности при сопоставимых значениях флавоноидов и максимального уровня антиоксидантной активности.

Выводы

В связи с высокой загрязняющей способностью молочной сыворотки повторное ее использование и переработка становится серьезной научной задачей, направленной на сокращение молочных отходов и достижение целей устойчивого развития [44, 46].

В данной работе сыворотка рассматривается, как возможный нетрадиционный вид экстрагента, с помощью которого получают экстракты из растительного сырья с высоким содержанием флавоноидов и высокой антиоксидантной активностью. Такой вариант позволяет решить проблему загрязнения окружающей среды вторичными отходами производства, повысить экономическую эффективность производства за счет получения новых ценных продуктов, в том числе получение экстрактов, которые в перспективе можно использовать в пищевой промышленности для создания функциональных продуктов питания.

Параметры экстракции заданы произвольно: смеси растительного сырья, температура экстракции – 90 ± 1 °С, соотношение сырья к экстрагенту – навески по 2,5 г каждого растения к 450 мл молочной сыворотки, а также изменяемый параметр процесса – продолжительность экстрагирования. Последний параметр позволил выявить зависимость уровня антиоксидантной активности от продолжительности экстракции. С постепенным увеличением времени экстрагирования возрастает антиоксидантная активность. Однако, показав максимальное значение при 3-часовом экстрагировании, показатель антиоксидантной активности постепенно снижался, что может свидетельствовать о разрушении или окислении флавоноидных соединений при высокой температуре 90 °С и продолжительной экстракции до 5 ч.

Рассматриваемая в работе смесь 4, имеющая в составе копеечник забытый, женьшень настоящий, медуницу лекарственную, при времени экстрагирования 3 ч, обладала самой высокой из исследуемых смесей антиоксидантной активностью 90,54 %, которую определяли спектрофотометрическим методом, и повысила степень восстановления катион-радикала молочной сыворотки более чем на 35 %.

По данным тонкослойной хроматографией, содержание рутина и кверцетина в растительных образцах было сопоставимо.

Таким образом, молочная сыворотка, используемая в качестве экстрагента имеет большой потенциал для отечественной науки как перспективное дешевое сырье для получения биоактивных веществ из растений Сибирского региона. Трехчасовые экстракты показали наибольшую степень восстановления катион-радикала. Провели качественные исследования на наличие флавоноидов в данных смесях. Выявили, что содержание рутина и кверцетина не зависит от времени экстрагирования. Данные соединения эффективно высвобождаются в натуральный органический экстрагент и стабильны в течение всего времени экстракции. На основании полученных результатов планируется изучить фитохимический состав смесей методами высокоэффективной жидкостной хроматографией, которые в перспективе будут применены для создания на их основе фитогенных кормовых добавок направленного действия.

Критерии авторства

Все авторы в равной степени несут ответственность за полученные результаты исследований и рукопись.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

All the authors contributed equally to the study and bear equal responsibility for information published in this article.

Conflict of interest

The authors declared no potential conflicts of interests regarding the research, authorship, and / or publication of this article.

References/Список литературы

1. Zandona E, Blažić M, Jambrak AR. Whey Utilisation: Sustainable Uses and Environmental Approach. Food Technology and Biotechnology. 2021;59(2):147–161. https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6968

2. Nishanthi M, Chandrapala J, Vasiljevic T. Compositional and structural properties of whey proteins of sweet, acid and salty whey concentrates and their respective spray dried powders. International Dairy Journal. 2017;74:49–56. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.01.002

3. Božanić R, Barukčić I, Lisak K, Jakopović, Tratnik L. Possibilities of Whey Utilisation. Austin Journal of Nutrition and Food Sciences. 2014;2(7):1036.

4. Kapoor R, Metzger LE. Evaluation of Salt Whey as an Ingredient in Processed Cheese. Journal of Dairy Science. 2004;87(5):1143–1150. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73262-2

5. El-Tanboly E-S, El-Hofi M, Youssef YB, El-Desoki W, Ismail A. Utilization of salt whey from Egyptian Ras (cephalotyre) cheese in microbial milk clotting enzymes production. Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria. 2013;12(2):9–20. https://doi.org/10.21608/jfds.2012.75391

6. Lappa IK, Papadaki A, Kachrimanidou V, Terpou A, Koulougliotis D, Eriotou E, *et al.* Cheese Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications. Foods. 2019;8(8):347. https://doi.org/10.3390/foods8080347

7. Blažić M, Zavadlav S, Kralj E, Šarić G. Production of whey protein as nutritional valuable foods. Croatian Journal of Food Science and Technology. 2018;10(2):255–260. https://doi.org/10.17508/CJFST.2018.10.2.09

8. Papademas P, Kotsaki P. Technological Utilization of Whey towards Sustainable Exploitation. Advances in Dairy Research. 2019;7(4):231. https://doi.org/10.35248/2329-888X.19.7.231

9. Amaral GV, Silva EK, Cavalcanti RN, Martins CPC, Andrade LGZS, Moraes J, *et al.* Whey-grape juice drink processed by supercritical carbon dioxide technology: Physicochemical characteristics, bioactive compounds and volatile profile. Food Chemistry. 2018;239:697–703. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.003

10. Jambrak AR, Vukuˇsi´c T, Donsi F, Paniwnyk L, Djekic I. Three Pillars of Novel Nonthermal Food Technologies: Food Safety, Quality, and Environment. Journal of Food Quality. 2018;2018:8619707. https://doi.org/10.1155/2018/8619707

11. Rivera I, Bakonyi P, Cuautle-Marín MA, Buitrón G. Evaluation of various cheese whey treatment scenarios in single-chamber microbial electrolysis cells for improved biohydrogen production. Chemosphere. 2017;174:253–259. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.128

12. Blanco VMC, Oliveira GHD, Zaiat M. Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. Renewable Energy. 2019;139:1310–1319. https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029

13. Simone E, Tyler AII, Kuah D, Bao X, Ries ME, Baker D. Optimal Design of Crystallization Processes for the Recovery of a Slow-Nucleating Sugar with a Complex Chemical Equilibrium in Aqueous Solution: The Case of Lactose. Organic Process Research and Development. 2019;23(2):220–233. https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00323

14. Pleissner D, Dietz D, van Duuren JBeJH, Wittmann C, Yang X, Lin ClSK, *et al.* Biotechnological Production of Organic Acids from Renewable Resources. In: Wagemann K, Tippkötter N, editors. Biorefineries. Cham: Springer; 2019. pp. 373–410. https://doi.org/10.1007/10_2016_73

15. Awasthi D, Wang L, Rhee MS, Wang Q, Chauliac D, Ingram LO, *et al.* Metabolic engineering of Bacillus subtilis for production of D-lactic acid. Biotechnology and Bioengineering. 2018;115(2):453–460. https://doi.org/10.1002/bit.26472

16. Liu P, Zheng Z, Xu Q, Qian Z, Liu J, Ouyang J. Valorization of dairy waste for enhanced D-lactic acid production at low cost. Process Biochemistry. 2018;71:18–22. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.014

17. Sahoo TK, Jayaraman G. Co-culture of *Lactobacillus delbrueckii* and engineered *Lactococcus lactis* enhances stoichiometric yield of d-lactic acid from whey permeate. Applied Microbiology and Biotechnology. 2019;103:5653–5662. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09819-7

18. Ziadi M, M'Hir S, Aydi A, Hamdi M. Bioreactor Scale-Up and Kinetic Modeling of Lactic Acid and Biomass Production by *Enterococcus faecalis* SLT13 during Batch Culture on Hydrolyzed Cheese Whey. Journal of Chemistry. 2020; 2020:1236784. https://doi.org/10.1155/2020/1236784

19. Carlozzi P, Giovannelli A, Traversi ML, *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) bioproduction in a two-step sequential process using wastewater. Journal of Water Process Engineering. 2021;39:101700. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101700

20. Raho S, Carofiglio VE, Montemurro M, *et al.* Production of the Polyhydroxyalkanoate PHBV from Ricotta Cheese Exhausted Whey by *Haloferax mediterranei* Fermentation. Foods. 2020;9(10):1459. https://doi.org/10.3390/foods9101459

21. Koller M, Maršálek L, de Sousa Dias MM, Braunegg G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. New Biotechnology. 2017;37:24–38. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001

22. Sampaio FC, de Faria JT, da Silvac MF, de Souza Oliveira RP, Converti A. Cheese whey permeate fermentation by *Kluyveromyces lactis*: a combined approach to wastewater treatment and bioethanol production. Environmental Technology. 2019;41(24):3210–3218. https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1604813

23. Beniwal A, Saini P, De S, Vij S. Harnessing the nutritional potential of concentrated whey for enhanced galactose flux in fermentative yeast. LWT. 2021;141:110840. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110840

24. Tesfaw A, Oner ET, Assefa F. Evaluating crude whey for bioethanol production using non-Saccharomyces yeast, *Kluyveromyces marxianus.* Discover Applied Sciences. 2021;3:42. https://doi.org/10.1007/s42452-020-03996-1

25. Putri D, Ulhidayati A, Musthofa IA, Wardani AK. Single cell protein production of *Chlorella* sp. using food processing waste as a cultivation medium. International Conference on Green Agro-industry and Bioeconomy. 2018;131:012052. https://doi.org/10.1088/1755-1315/131/1/012052

26. Ryazantseva KA, Agarkova EYu, Fedotova OB. Continuous hydrolysis of milk proteins in membrane reactors of various configurations. Foods and Raw Materials. 2021;9(2):271–281. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-2-271-281

27. Abbas HM, Abd El-Gawad MAM, Kassem JM, Salama M. Application of fat replacers in dairy products: A review. Foods and Raw Materials. 2024;12(2):319–333. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-2-612

28. Khalifa I, Nie R, Ge Z, Li K, Li C. Understanding the shielding effects of whey protein on mulberry anthocyanins: Insights from multispectral and molecular modelling investigations. International Journal of Biological Macromolecules. 2018;119:116–124. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.117

29. Prosekov AYu. The role of interphase surface phenomena in the production of dispersed products with foam structure (revive). Storage And Processing of Farm Products. 2001;(8):24–27. (In Russ.). https://elibrary.ru/yrxyby

30. Braber NLV, Giorgio LD, Aminahuel CA, Vergara LID, *et al.* Antifungal whey protein films activated with low quantities of water soluble chitosan. Food Hydrocolloids. 2021;110:106156. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106156

31. Çakmak H, Özselek Y, Turan OY, Fıratlıgil E, Karbancioğlu-Güler F. Whey protein isolate edible films incorporated with essential oils: Antimicrobial activity and barrier properties. Polymer Degradation and Stability. 2020;179:109285. https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109285

32. Guimarães A, Ramos Ó, Cerqueira M, Venâncio A, Abrunhosa L. Active Whey Protein Edible Films and Coatings Incorporating *Lactobacillus buchneri* for *Penicillium nordicum* Control in Cheese. Food and Bioprocess Technology. 2020; 13:1074–1086. https://doi.org/10.1007/s11947-020-02465-2

33. Kalkan S, Erginkaya Z. Impact of whey protein isolate coatings containing different antimicrobial agents on sliced bologna-type sausage during refrigerated storage. Food Science and Technology. 2020;40:136–145. https://doi.org/10.1590/fst.05119

34. Muley AB, Singhal RS. Extension of postharvest shelf life of strawberries *(Fragaria ananassa)* using a coating of chitosan-whey protein isolate conjugate. Food Chemistry. 2020;329:127213. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127213

35. Sogut E, Balqis AMI, Hanani ZAN, Seydim AC. The properties of κ-carrageenan and whey protein isolate blended films containing pomegranate seed oil. Polymer Testing. 2019;77:105886. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.05.002

36. Sargin BV, Bobkov GV, Pavlov SA. Method for preparing extracts of herbal raw material by water-in-oil extraction in natural extractants. Russia patent RU 2491947C2. 2011.

37. Prosekov AYu, Dyshliuk LS, Milenteva IS, Asiakina LK, Fedorova AM, Loseva AI. Method for obtaining a biologically active additive based on whey and plant extract. Russia patent RU 2792775C1. 2022. [Способ получения биологически активной добавки на основе молочной сыворотки и растительного экстракта: пат. 2792775C1 Рос. Федерация. № 2022112230 / А. Ю. Просеков [и др.] заявл. 05.05.2022; опубл. 24.03.2023. 17 с. Бюл. № 9.].

38. Kaledina MV, Fedosova AN, Shramko MI, Salatkova NP, Martinova IA. Fermented milk drinks with herbal extracts on the basis of whey. Newsletter of North-Caucasus Federal University. 2013;(6):92–96. (In Russ.). https://elibrary.ru/RXANWJ

39. Khalanskaya DM, Lodygin AD, Kurchenko VP. Effect of technological factors on the extraction of biologically active substances from plant raw materials. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference on Molecular Genetics and Biotechnology in Obtaining and Using Synthetic and Natural Biologically Active Substances;2017; Stavropol. Stavropol: North-Caucasus Federal University; 2017. p. 290–293. (In Russ.). https://elibrary.ru/ZISHHT

40. Ivanova SA, Milentyeva IS, Asyakina LK, Lukin AA, Kriger OV, Petrov AN. Biologically Active Substances of Siberian Medical Plants in Functional Wgey-Based Drinks. Food Processing: Techniques and Technology. 2019;49(1):14–22. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2019-1-14-22; https://elibrary.ru/XQHWBO

41. Lodygin A, Khalanskaya D, Evdokimov I, Kurchenko V, Lodygina S, Kapustin M, *et al.* Application of whey for plant biologically active substances extraction. Journal of Hygienic Engineering and Design. 2024;46:73–79. https://keypublishing.org/jhed/wp-content/uploads/2024/03/03.-Full-paper-Alexey-Lodygin.pdf

42. Nesterenko PG. Production of condensed concentrates based on whey. Izvestiya Vuzov. Food Technology. 1992;(2): 5–10. (In Russ.). [Нестеренко П. Г. Производство сгущенных концентратов на основе молочной сыворотки // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 1992. № 2. С. 5–10.]. https://elibrary.ru/QCAAUV

43. Bryukhachev EN, Zaushintsena AV, Fotina NV, Skomorokhov AV. The development of production technology of functional drink based on milk whey. Bulletin of KSAU. 2020;(8):144–152. (In Russ.). https://doi.org/10.36718/1819-4036-2020-8-144-152; https://elibrary.ru/IMZYJF

44. Trineeva OV, Safonova II, Safonova EF, Slivkin AI. Definition of flavonoides and research of influence of storage conditions on their contents in hippophaes fruits a TLC method. Sorption and Chromatography Processes. 2012;12(5):806-813. (In Russ.). [Определение флавоноидов и исследование влияния условий хранения на их содержание в плодах облепихи методом ТСХ / О. В. Тринеева [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. 2012. Т. 12. № 5. С. 806–813.]. https://elibrary.ru/PIWVSZ

45. Danilchuk TN, Novosad YuG, Sidorova ES. Antioxidant activity of milk whey. Food Industry. 2022;(3):39–42. https://doi.org/10.52653/PPI.2022.3.3.010; https://elibrary.ru/OKQKY

46. Poništ J, Dubšíková V, Schwarz M, Samešová D. Methods of processing whey waste from dairies. A review. Environment Protection Engineering. 2021;47(4):67–84. http://doi.org/10.37190/epe210405