

ПРИМЕНЕНИЕ СОЛОДОВОГО ЭКСТРАКТА ДЛЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В МЕДОВОМ РАСТВОРЕ

USE OF MALT EXTRACT FOR HYDROGEN PEROXIDE NEUTRALIZATION IN HONEY SOLUTION

**D. Leontyev
K. Laurinavicius
A. Panasyuk**

Summary. It has been researched acacia honey for antibiotic action by method for sowing a pure culture of wine yeast on a specially prepared nutrient medium. Particular attention is paid to the formation of hydrogen peroxide in honey wort, the method of its identification and neutralization. The presence of peroxide in honey solution was confirmed by its neutralization with the enzyme catalase. As an inactivator of peroxide, malt extract has been proposed, which has high enzymatic activity. The time required for the formation of the maximum peroxide concentration in the honey solution and its neutralization using the raw materials given in the experiment is noted

Keywords: bee honey, hydrogen peroxide, yeast wine, catalase, malt extract.

Леонтьев Дмитрий Архипович

Московский государственный университет технологий и управления им. К. Г. Разумовского (Первый казачий университет)
leontiev.d@mail.ru

Лауринавичюс Константин Сергеевич

К.б.н., Пушинский научный центр Российской академии наук
laurinaoke@mail.ru

Панасюк Александр Львович

Д.т.н., профессор, Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности
alpanasyuk@mail.ru

Аннотация. Исследовали мед пчелиный акациевый на предмет антибиотического действия методом высевания чистой культуры винных дрожжей на специально подготовленную питательную среду. Особое внимание уделено образованию в медовом сусле пероксида водорода, методу его идентификации и нейтрализации. Подтверждено наличие перекиси в медовом растворе путем ее нейтрализации ферментом каталазой. В качестве инaktivатора перекиси предложен экстракт солода, обладающий высокой ферментативной активностью. Отмечено время, необходимое для образования максимальной концентрации перекиси в медовом растворе и ее нейтрализации с применением сырья, приведенного в эксперименте

Ключевые слова: мед пчелиный, пероксид водорода, дрожжи винные, каталаза, экстракт солода.

Введение

Пчелиный мед все больше привлекает внимание исследователей как продукт, традиционно применяемый в медицине, но с недостаточно изученным механизмом действия. В литературе приводятся данные по угнетающему действию меда на развитие микроорганизмов, патогенных для человека или вредных в плане хранения пищевых продуктов: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococci*, *Streptococcus pyogenes*, *Salomonella tyghi*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumonia*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* и др. [1, 9, 12, 15].

Одним из главных антисептиков в меде считают пероксид водорода, образующегося как побочный продукт окисления глюкозы ферментом глюкооксидазой при достаточном разведении меда водой [13, 14]. Помимо перекиси, в меде присутствуют другие бактериоста-

тики — метилглиоксаль, специфический белок меда — дефенсин-1, и ряд веществ, способных к образованию свободных радикалов, которые также обладают противомикробным действием [2–7].

Одним из направлений, имеющим перспективы, является применение меда как основного сырья в бродильной промышленности. Но антибиотические свойства меда представляют проблему для усвоения сахаров меда дрожжевыми грибами [8]. Возможность нейтрализации перекиси водорода в медовом сусле если не полностью, то частично ослабит антисептическое действие меда на винные дрожжи [5]. С этой целью в данном исследовании использовали экстракт солода, который применяют в алкогольной промышленности. Солод представляет собой проросшее зерно, как правило, злаковых культур, при приготовлении которого должны быть соблюдены определенные технологические стадии (замачивания и дезинфекции, сушки, отделения ростков, выдержки и др.). Отличительная особенность состава солода заключена в его ферментах, способных быстро

переходить в активную форму. Комплекс ферментов солода участвует в реакциях расщепления и синтеза основных биологических полимеров, которые используются в качестве источника энергии или строительного материала для формирования тела зародыша растения [11].

Цель исследования

Изучение влияния добавки экстракта солода на содержание пероксида водорода в медовом сусле.

Задачи исследования:

- ◆ установить факт бактериостатических свойств исследуемого образца меда в водном растворе на примере дрожжевых грибов;
- ◆ идентифицировать динамику образования перекиси в исследуемом растворе меда;
- ◆ проанализировать характер влияния экстракта солода в медовом растворе на содержание в нем пероксида водорода.

Объекты и методы исследования. К объектам исследования относятся мед пчелиный акациевый, дрожжи винные, ячменный солод, солод тритикале и солод мака пищевого.

В данном исследовании метод определения антибактериального действия медового раствора на микроорганизмы заключается в высевании разводки чистой культуры дрожжей на питательную среду в чашках Петри, в определенной области которой имеется углубление, содержащее предполагаемый антисептик — медовый раствор 25%-ной концентрации.

Также в исследовании воспользовались методом определения перекиси в водном растворе. Метод основан на изменении окраски индикатора ксиленового оранжевого при окислении иона двухвалентного железа до трехвалентного [10]. Для проведения анализа необходимо приготовить рабочую смесь, состоящую из раствора индикатора и подкисленного серной кислотой раствора соли Мора $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$. Соответственно, окисление железа происходит при наличии в испытуемом образце пероксида водорода. Изменение окраски индикатора в растворе фиксировали с помощью спектрофотометра, для пересчета показаний оптической плотности исследуемого образца в содержание перекиси был построен градуировочный график с использованием стандартного 3%-ного раствора пероксида водорода.

Для нейтрализации перекиси применяли раствор каталазы и экстракт солода в соотношении 1:1 по отношению к исследуемому 25%-му раствору меда. Гидромодуль для приготовления экстракта 1:20, экстракцию

проводили в водном растворе при температуре 40–50 °С в течение одного часа, полученный экстракт фильтровали через хлопчатобумажную ткань.

Концентрация каталазы в растворе составляла 0,05 г/л.

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1–4 представлены образцы медового сусла в питательной среде, на которую равномерно нанесена разводка чистой культуры винных дрожжей. На рис. 1 в чашке Петри только один образец, представленный медовым раствором без каких-либо добавок. Участок среды, непосредственно прилегающий к исследуемому образцу, является зоной, свободной от роста микроорганизмов, и наглядно демонстрирует подавляющее действие меда на развитие дрожжевой культуры. На рис. 2–4 на одной питательной среде имеется сразу два образца, в первый, помимо меда, добавлены глутатион, каталаза и пептидаза соответственно, второй содержит только раствор меда и является контрольным образцом, для сравнения. Предполагается, что глутатион будет ингибировать действие метилглиоксаля, каталаза — перекиси водорода, а пептидаза нейтрализует белок дефенсин-1.

Характер роста культуры микроорганизмов на рис. 2–4 разный, положительный результат наблюдается на рис. 2 и рис. 3. Образец с пептидазой не оказал влияние на антисептические свойства данного вида цветочного меда, так как на нем имеется область, свободная от роста дрожжей. Образец с глутатионом интересен тем, что вокруг зоны с образцом меда рост дрожжевой культуры интенсивнее, чем в остальной части питательной среды. Скопление дрожжей непосредственно у образца, возможно, указывает на то, что микроорганизмы используют глутатион как дополнительный источник питания. Также сразу после скопления культуры наблюдается зона, свободная от роста, так как скопление дрожжей в одном месте, по всей видимости, вызвало обеднение среды за счет диффузии питательных веществ в места наибольшего скопления посевной культуры. В образце с каталазой рост культуры вблизи выемки с медовым раствором имеется, но он менее интенсивный, чем в остальной части среды, что, по всей видимости, в данном случае указывает на частичную нейтрализацию антимикотического действия раствора меда.

График количественного определения содержания пероксида водорода в исследуемых образцах медового сусла через оптическую плотность среды приведен на рис. 5.

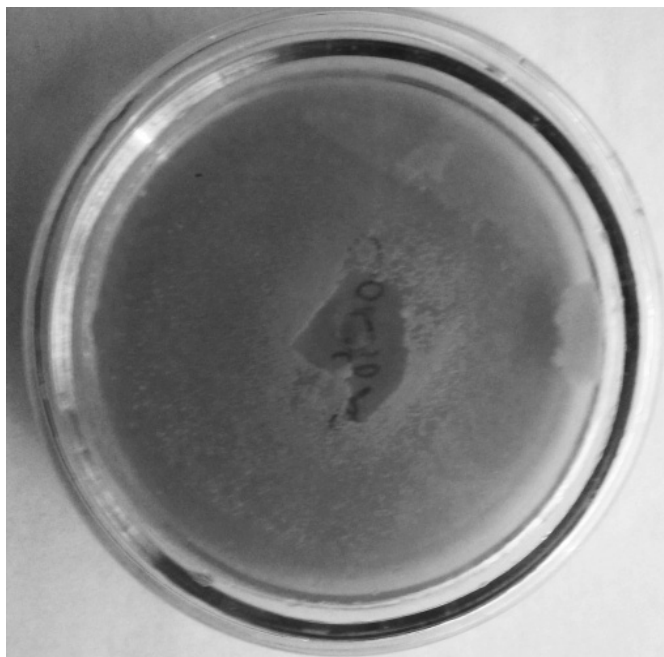


Рис. 1. Образец «контрольный»

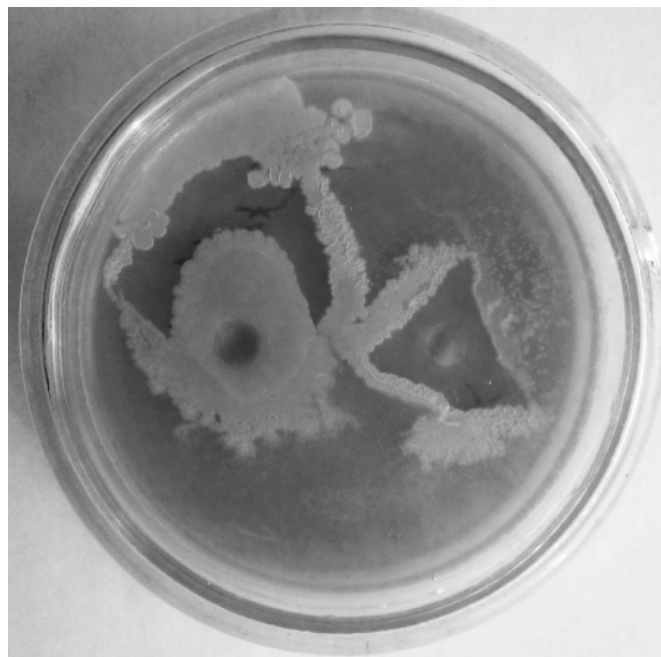


Рис. 2. Образец «глутатион-мед» — образец «контрольный»

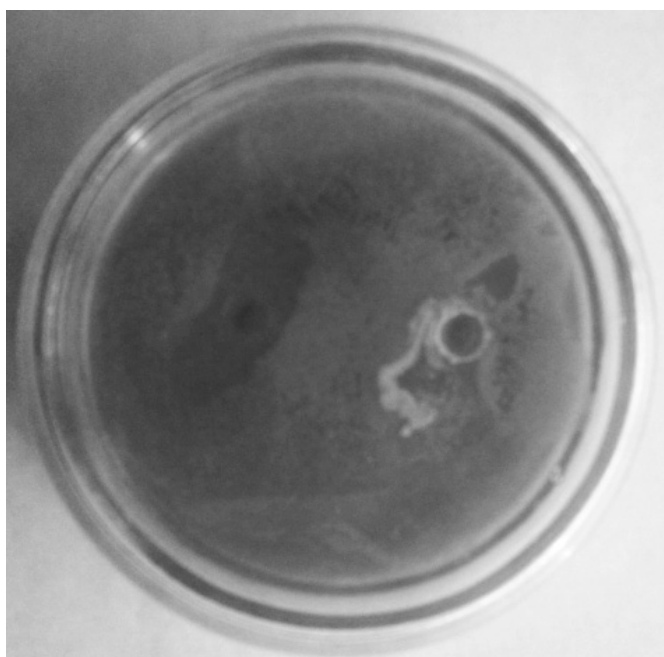


Рис. 3. Образец «каталаза-мед» — образец «контрольный»



Рис. 4. Образец «пептидаза-мед» — образец «контрольный»

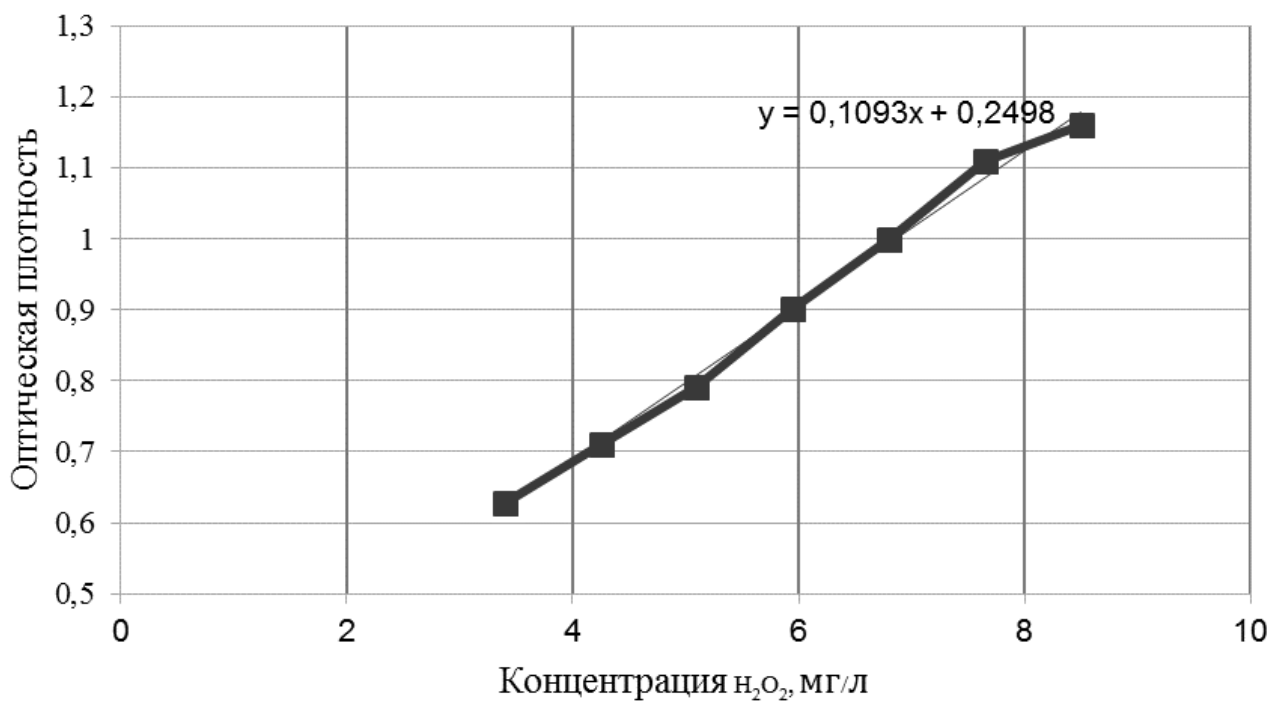


Рис. 5. График зависимости оптической плотности раствора от содержания перекиси водорода

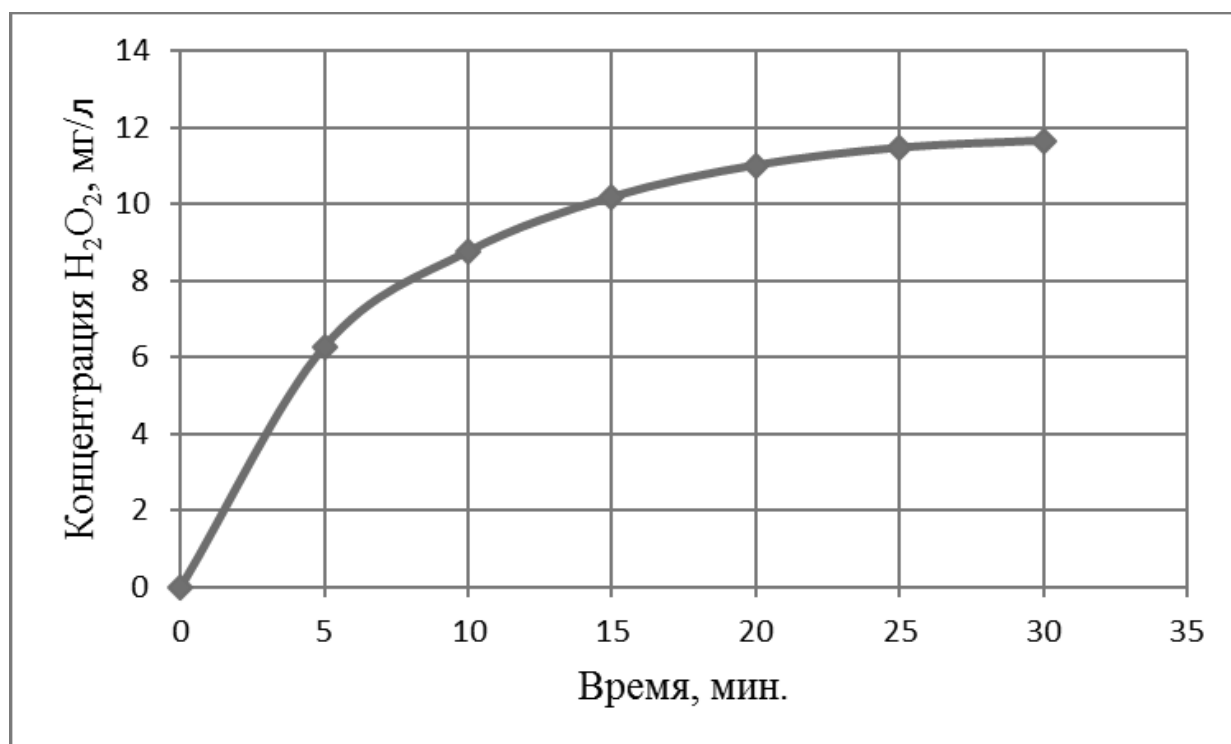


Рис. 6. Образование перекиси водорода в медовом сусле непосредственно сразу после растворения меда в воде

Таблица 1. Влияние раствора каталазы и солодовых экстрактов на содержание перекиси водорода в медовом сусле

Время, мин.	Каталаза	Маковый солод	Ячменный солод	Тритикале солод
0	11,65	11,65	11,65	11,65
5	8,44	6,88	7,34	7,80
10	5,50	3,67	4,13	5,50
15	3,39	1,17	2,11	3,94
20	1,83	0,10	0,64	2,75
25	0,55	0,00	0,10	1,65
30	0,10		0,00	0,55
35	0,00			0,00

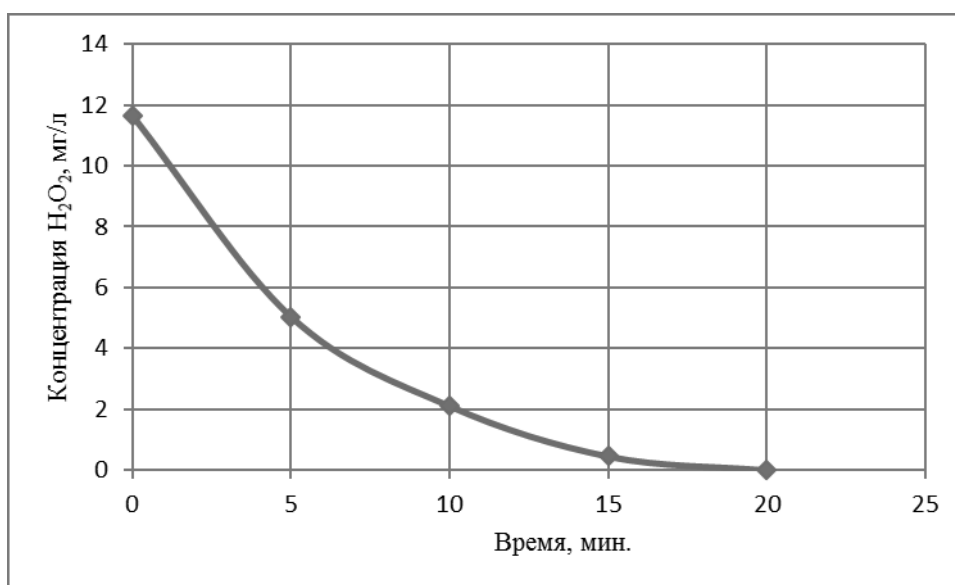


Рис. 7. Нейтрализация раствора перекиси водорода раствором каталазы

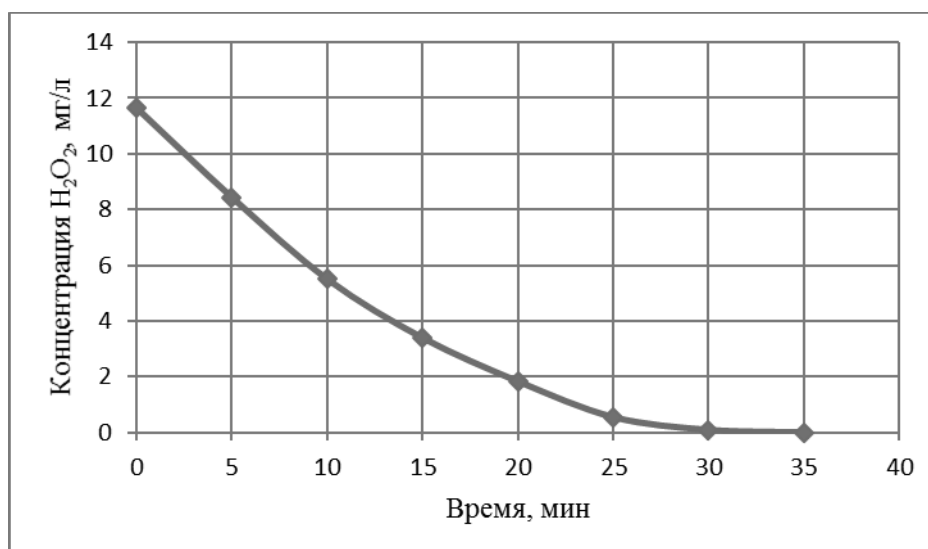


Рис. 8. Нейтрализация перекиси водорода в медовом сусле раствором каталазы

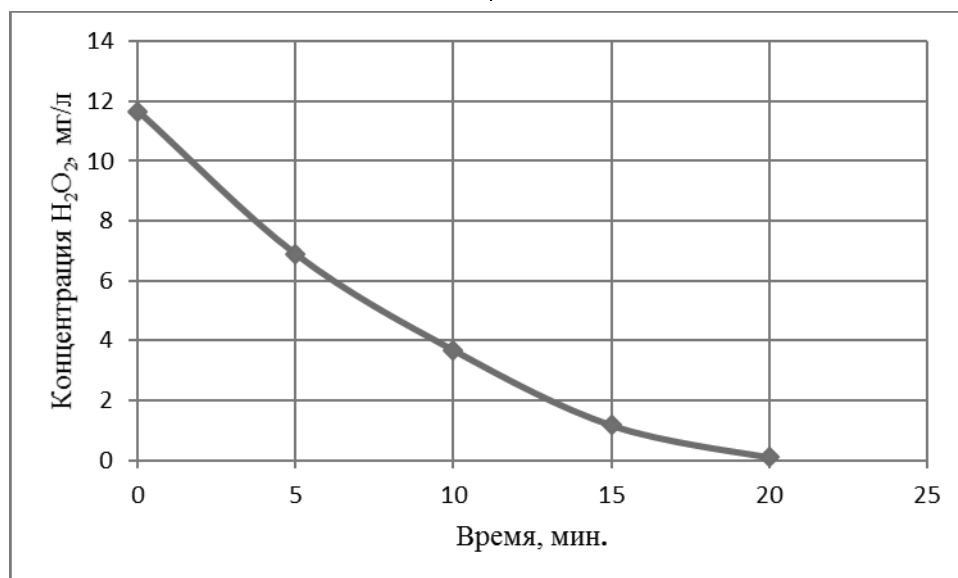


Рис. 9. Нейтрализация перекиси водорода в медовом сусле экстрактом макового солода

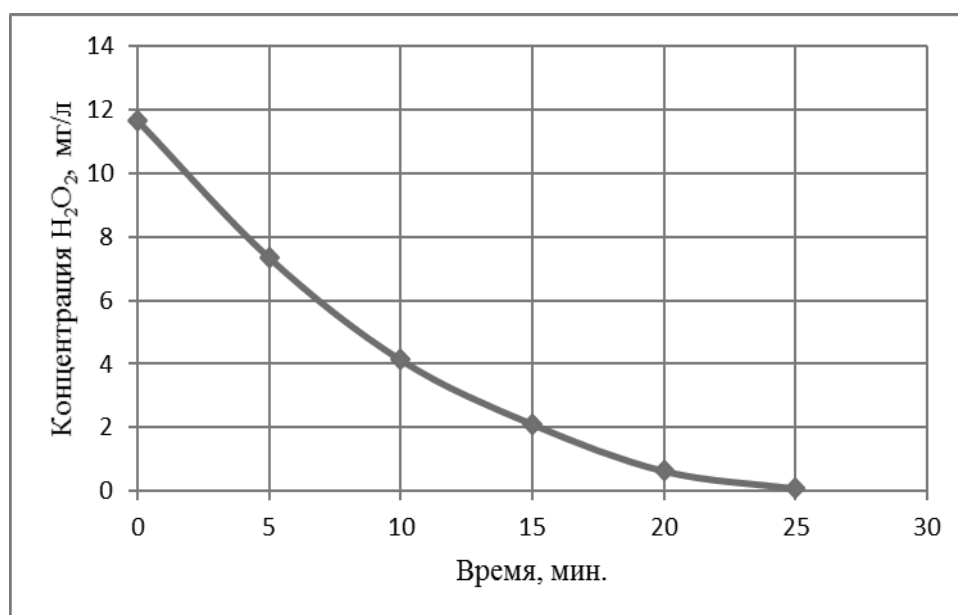


Рис. 10. Нейтрализация перекиси водорода в медовом сусле экстрактом ячменного солода

На рис. 6 изображено образование перекиси в растворе с момента растворения меда в воде.

По графику видно, что в момент растворения меда пероксида в растворе нет, что демонстрирует факт ее образования в результате ферментативной реакции окисления глюкозы. Данная реакция протекает с момента начала работы фермента, которая становится возможной в результате достаточного разбавления меда водой.

На рис. 7 показано направленное действие фермента каталазы на водный раствор перекиси водорода той концентрации, которая соответствует максимальной концентрации перекиси в исследуемом образце медового раствора (сусла).

В таблицу 1 внесены данные проведенных экспериментов по действию раствора каталазы, экстрактов макового, ячменного солодов, и солода тритикале на содержание перекиси в медовом сусле.

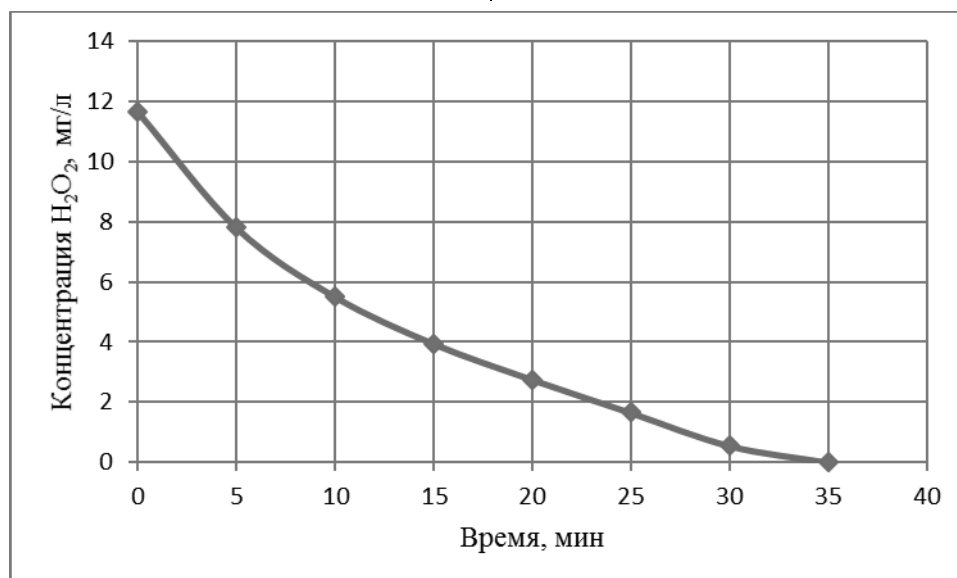


Рис. 11 Нейтрализация перекиси водорода в медовом сусле экстрактом солода тритикале

По данным таблицы видно, что экстракты солодов нейтрализуют перекись водорода в исследуемом сусле с концентрацией меда 25% в течение 25–30 мин. Данные таблицы представлены на рис. 8–11.

Выводы

Подтверждены антисептические свойства медового раствора, представлено образование пероксида водорода после растворения меда в воде. Данный факт позволяет выделить напитки на основе меда в особую категорию, для производства которой требуется меньшее применение вредных для человека консервирующих

веществ с целью очищения сусла от посторонней микрофлоры.

Данные эксперимента подтверждают возможность применения экстракта солода для нейтрализации перекиси в медовом растворе, что является положительным фактором для бродильной промышленности, использующей медовый раствор в качестве питательной среды для дрожжевых микроорганизмов.

Данное исследование способствует применению меда в пищевой промышленности, позволяет лучше понять его противомикробные свойства и является продолжением работ по изучению пчелиного меда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aggad H., Guemour D. Honey antibacterial activity // *Medicinal and aromatic plants*. 2014, vol. 3, p. 152–154.
2. Aurongzeb M., Azim M. K., Antimicrobial properties of natural honey: a review of literature // *Pakistan journal of biochemistry and molecular biology*. 2011, vol. 44, № 3, p. 118–124.
3. Bernatova S., Samek O., Pilat Z., Sery M., Jakl P. Following and mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using roman spectroscopy // *Molecules*. 2013, vol. 18, p. 13189–13199.
4. Bobrowski K. Free radicals in chemistry, biology and medicine: contribution of radiation chemistry // *Nukleonika*, 2005, vol. 50, p. 67–76.
5. Brandi G., Salvaggio L., Cattabeni F., Cantoni O. Cytocidal and filamentous response of *Esherichia coli* cells exposed to low concentrations of hydrogen peroxide and hydroxyl radical scavengers // *Environmental and molecular mutagenesis*. 1991, p. 22–27.
6. Gaunt L.F., Beggs C. B., Georghiou G. E., Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review // *Transactions on plasma science*. 2006, vol. 34, № 4, p. 1257–1269.
7. Hussain M. B. Role of honey in topical and systemic bacterial infections // *The journal of alternative and complementary medicine*. 2018, vol. 24, № 1, p. 15–24.
8. Iglesias A., Pascoal A., Choupina A. B., Carvalho C. A., Feas X., Estevinho L. M. Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production // *Molecules*. 2014, vol. 19, p. 12577–12590.
9. Kwakman P.H.S. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity // *Plos one*. 2011, vol. 6, № 3, p. 1–7.
10. Li D., Wang M., Cheng N., Xue X., Wu L., Cao W. A modified FOX-1 method for micro-determination of hydrogen peroxide in honey samples. — *Food chemistry*. — 2017, № 3, p. 145–170.

11. MacLeod L. Malting // Reference module in food sciences. 2004, vol. 1, p. 68–76.
12. Mundo M.A., Padilla-Zakour O.I., Worobo R. W. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys // Food microbiology. 2004, vol. 97, p. 1–6.
13. Nakamura K., Kanna T., Mokudai T., Iwasawa A., Niwano Y., Kohno M. Microbial resistance in relation to catalase activity to oxidative stress induced by photolysis of hydrogen peroxide // Microbiology and immunology. 2012, vol. 56, p. 48–55.
14. Nakamura K., Sasaki K., Niwano Y. In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide // Microbiology and immunology. 2013, vol. 8, p. 1–9.
15. Szweda P. Antimicrobial activity of honey // Honey analysis. 2017, p. 215–234.

© Леонтьев Дмитрий Архипович (leontiev.d@mail.ru),

Лауринавичюс Константин Сергеевич (laurinaoke@mail.ru), Панасюк Александр Львович (alpanasyuk@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



МГУТУ им. К.Г. Разумовского