

Биолог. журн. Армении, 3-4 (53), 2001

УДК 576.8:615.33:577.486:615.425

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЧАЙНОГО ГРИБА И ЕГО МИКРОФЛОРЫ

В.Б. ГОГИНЯН

*Республиканский Центр депонирования микробов ИАН и
Министерства образования и науки Армении, 378510, г. Абовян*

Чайный гриб - микрофлора - антиоксидантная активность

В последние годы значительно возрос интерес к изучению процессов окислительного стресса и его роли в жизнедеятельности человека, особенно, при сердечно-сосудистых заболеваниях, разнообразных инфекциях, развитии злокачественных новообразований, процессах преждевременного старения и других патологических явлениях [1, 2, 7, 8].

В настоящей работе изучены антиоксидантные свойства народного лечебного средства - чайного гриба (*Medusomyces gisevii*), а именно его микрофлоры и культуральной жидкости. Чайный гриб - сложная микробная ассоциация, находящаяся в естественном симбиозе дрожжей и уксуснокислых бактерий (УКБ). Как сопутствующая микрофлора в нем встречаются молочнокислые (МКБ), спорообразующие и другие бактерии. Культуральная жидкость чайного гриба применяется в основном для профилактики и терапии заболеваний желудочно-кишечного тракта, обладает антимикробным и иммуностимулирующим свойствами, содержит витамины, органические кислоты, дубильные вещества, белки, кофеин, алкалоиды, глюкозиды, ферменты и другие вещества [3].

Нами была изучена антиоксидантная активность двух штаммов *Medusomyces gisevii* - московского (М) и ереванского (Е) и 29 штаммов дрожжей и УКБ, выделенных из чайного гриба.

Материал и методика. В качестве антиоксидантов исследовались 7-, 14- и 21-суточные культуральные жидкости (КЖ) образцов чайного гриба, полученные в результате настаивания культур в слабом растворе чая, содержащем 5% сахарозы, а также выделенные из них микроорганизмы: дрожжи, выращенные на среде Гансена, уксуснокислые бактерии, выращенные на среде для УКБ, МКБ, выращенные на среде МРС [10], и бациллы, выращенные на рыбобептонной среде.

Об антиоксидантной активности (АОА) микрофлоры чайного гриба и его культуральной жидкости судили по скорости перекисного окисления липидов (ПОЛ). ПОЛ определяли по конечному продукту - малоновому диальдегиду (МДА), количество которого измеряли по интенсивности окраски триметилового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты (ТБК).

Определение скорости ПОЛ в гомогенате мозговой ткани крысы проводили в Fe - индуцируемой системе по модифицированному методу. Неферментативное стимулирование ПОЛ в Fe-аскорбат - и ферментативное в Fe-НАДФН - зависимых системах проводили по модифицированному методу [2, 5, 6, 9].

Мозг крысы (самец, массой 180-200 г) после декапитации гомогенизировали в 20 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) в соотношении 1г сырого мозга в 100 мл буфера. Суспензия или тканевый гомогенат содержал около 0,5-1,0 мг/мл белка, количество которого определяли по биуретовому методу [4].

Состав реакционной смеси Fe-зависимой системы:

контрольной пробы: 1 мл суспензии; 0,3 мл 0,1мМ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ (соль Мора); 0,7 мл фосфатного буфера (рН 7,4).

опытной пробы: 1 мл суспензии; 0,3 мл 0,1мМ соли Мора; 0,1 мл антиоксиданта; 0,6 мл фосфатного буфера (рН 7,4).

Состав реакционной смеси Fe-аскорбат стимулируемой системы:

контрольной пробы: 1 мл суспензии; 0,3 мл 0,8 мМ аскорбиновой кислоты; 0,3 мл 12×10^{-6} М соли Мора; 0,4 мл фосфатного буфера (рН 7,4).

опытной пробы: 1 мл суспензии; 0,3 мл 0,8 мМ аскорбиновой кислоты; 0,3 мл 12×10^{-6} М соли Мора; 0,1 мл антиоксиданта; 0,3 мл фосфатного буфера (рН 7,4).

Состав реакционной смеси Fe-НАДФН стимулируемой системы:

контрольной пробы: 1 мл суспензии; 0,3 мл 12×10^{-6} М соли Мора; 0,3 мл 1мМ НАДФН; 0,3 мл 2×10^{-4} мМ пиродифосфата Na; 0,1 мл фосфатного буфера (рН 7,4).

опытной пробы: 1 мл суспензии; 0,3 мл 12×10^{-6} М соли Мора; 0,3 мл 1мМ НАДФН; 0,3 мл 2×10^{-4} мМ пиродифосфата Na; 0,1 мл антиоксиданта.

Реакционные смеси инкубировали при 37° на водяной качалке в течение 30 мин. Затем реакцию останавливали, добавляя 2 мл смеси, содержащей 0,375% ТБК, 15% ТХУ в 250 мМ растворе HCl. Пробы кипятили 15 мин и охлаждали. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием. Интенсивность изменения окраски измеряли спектрофотометрическим методом при длине волны 535 нм. Количество МДА в нмолях определяли, используя коэффициент экстинкции $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и рассчитывали на 1 мг белка за 1 мин по формуле:

$$C = D \frac{100000}{1,56 \cdot A \cdot T}, \quad \text{где}$$

C - количество МДА, нмоль/мин/мг белка;

D - показатель оптической плотности;

A - количество белка в гомогенате, мг/мл;

T - время инкубации, мин.

Процент ингибирования ПОЛ определяли по формуле: % ингибир. = $(C_k - C_{ин}) \times 100 / C_k$, где C_k - количество МДА контрольной пробы, нмоль/мин/мг белка; $C_{ин}$ - количество МДА испытуемой пробы, нмоль/мин/мг белка.

Результаты и обсуждение. Полученные данные позволяют заключить, что КЖ испытанных образцов чайного гриба обладают выраженными антиоксидантными свойствами (табл. 1 и 2).

Эти свойства лучше всего проявляются в 7-суточных КЖ. Так, КЖ

московского образца в Fe-зависимой системе проявляет АОА, составляющую 56,6% ингибирования ПОЛ, а КЖ ереванского образца в НАДФН и аскорбат-стимулируемых системах соответственно 50,0 и 79,0%. В дальнейшем АОА падает, по-видимому, вследствие повышения кислотности КЖ.

Таблица 1. Антиоксидантное действие культуральной жидкости чайного гриба (московский штамм, инкубация 24°)

Испытуемые образцы КЖ чайного гриба	Fe-зависимая система		
	D	МДА, нмоль	% ингибирования
7-суточная	0,26	793,5	56,6
14-суточная	0,46	1403,0	23,3
21-суточная	0,48	1465,0	20,0
Контроль (гомогенат мозга) (Fe-зависимая система)	0,6	1831,0	0

Таблица 2. Антиоксидантное действие культуральной жидкости чайного гриба (ереванский штамм, инкубация 24°)

Испытуемые образцы КЖ чайного гриба	НАДФН-зависимая			Аскорбат-зависимая		
	D	МДА, нмоль	% ингибирования	D	МДА, нмоль	% ингибирования
7-суточная	0,13	62,15	50	0,105	50,2	79
14-суточная	0,26	124,37	0	0,29	138,72	42
21-суточная	0,34	162,6	-	0,33	157,8	34
Контроль (гомогенат мозга)	0,26	124,37	0	0,5	239,2	0
Раствор чая + 5% сахарозы (Fe-зависимая система)	0,29	826,2	-			
Контроль (гомогенат мозга) (Fe-зависимая система)	0,19	541,3	0			

На 14-е сутки АОА КЖ московского образца в Fe-зависимой системе % ингибирования ПОЛ составил 23,3, а ереванского образца в НАДФН и аскорбат-стимулируемых системах - 0 и 42,0 соответственно.

На 21-е сутки АОА КЖ московского образца % ингибирования ПОЛ составил в Fe-зависимой системе 20,0, ереванского - в НАДФН и аскорбат-стимулируемых системах - 0 и 34,0 соответственно.

При микробиологическом анализе изученных образцов чайного гриба было выделено 29 культур микробов, в том числе, из ереванского - 8 дрожжей и 6 УКБ, а из московского - 9 дрожжей и 6 УКБ.

Выделенная и изученная в чистых культурах на антиоксидантную активность микрофлора образцов чайного гриба такими явными свойствами не обладает. Исследования показали, что антиоксидантная активность культур достаточно низкая, если сравнивать ее с АОА соответствующих питательных сред, на которых они были выращены, что можно объяснить сравнительно медленным ростом культур.

Таким образом, оценка культуральных жидкостей образцов чайного гриба выявила их достаточно высокую антиоксидантную активность на 7-е сутки инкубации с ее падением в последующие дни. Выделенная микрофлора образцов чайного гриба не обладает свойствами ингибирования процесса перекисного окисления липидов. Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что АОА микрофлоры чайного гриба проявляется только в ассоциированном состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабижаев М.А., Лозовская Е.М., Макареева Е.Н., Люлькин Ю.А., Сапежинский И.И. Биохимия, 63, 5, 620-626, 1998.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., "Наука", 38-51, 1972.
3. Даниелян Л.Т. Чайный гриб - лечебное средство народной медицины, Ереван, "Айастан", 1993.
4. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика, М., "Мир", 1991.
5. Ernster L., Nordenbrand K. Mikromosomal lipid peroxidation. Methods in enzymology, 10, 574, 1967.
6. Fortney S.R., Linn W.S. Arch. Biochem. Biophys., 104, 241, 1964.
7. Gibson G.R., Rastall R.A., Roberfroid M.B. Prebiotics. In: Colonic Microbiota, Nutrition, and Health. Eds. G.R. Gibson, M.B. Roberfroid. Kluwer, Dordrecht, 101-124, 1999.
8. Halliwell B., Gutteridge I.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford, England, 1989.
9. Hochstein P., Ernster L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 338, 1963.
10. Man J.C. de, Rogosa M., Sharpe M.E. J. Appl. Bacteriol., 23, 130, 1960.

Поступила 03.IX.2001