

**Сергей Витальевич Хижняк**

Красноярский государственный аграрный университет, профессор кафедры экологии и природопользования, доктор биологических наук, Россия, Красноярск

E-mail: skhizhnyak@yandex.ru

**Елена Яковлевна Мучкина**

Сибирский федеральный университет, профессор кафедры экологии и природопользования, доктор биологических наук, Россия, Красноярск

E-mail: emuchkina@mail.ru

**Галина Александровна Демиденко**

Красноярский государственный аграрный университет, профессор, заведующая кафедрой ландшафтной архитектуры и ботаники, доктор биологических наук, профессор, Россия, Красноярск

E-mail: demidenkoeskos@mail.ru

**ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХРЕНА ОБЫКНОВЕННОГО  
(*ARMORACIA RUSTICANA*) ПРИ КОНСЕРВИРОВАНИИ ПАПОРОТНИКА**

Цель исследования – оценить возможность использования хрена обыкновенного (*Armoracia rusticana*) как антимикробного средства для увеличения срока хранения папоротника, консервированного методом засола. В модельных экспериментах использовали ранее выделенные авторами культуры галофильных архей, вызывающие порчу соленого папоротника. Культуры выращивали аэробно на жидкой питательной среде при оптимальной температуре с добавлением измельченного корня или измельченных листьев хрена обыкновенного. Стартовый титр культур перед внесением хрена был равен  $2 \cdot 10^7$  клеток/мл, что в 10 раз превышает максимальную зафиксированную численность указанных галофильных архей в соленом папоротнике. Контролем служили культуры тех же архей без добавления хрена. Установлено, что и листья, и корень хрена обыкновенного снижают численность галофильных архей. В зависимости от органов хрена обыкновенного, используемых в качестве антимикробной добавки, и от вносимой дозы численность популяции архей снижается на 45–93 %. Антимикробный эффект носит временный характер. После первоначального падения численности популяция архей переходит к экспоненциальному росту за счет выживших клеток. Дополнительные эксперименты показали, что возобновление роста связано не с адаптацией архей к антимикробным веществам хрена, а с исчезновением этих веществ в питательной среде. Листья хрена обыкновенного обладают существенно более высокой антимикробной активностью в отношении галофильных архей, чем корень. Предложены математические модели для прогнозирования длительности антимикробного эффекта и снижения численности популяции галофильных архей в зависимости от дозы вносимого хрена. Модели демонстрируют высокое соответствие экспериментальным данным (коэффициенты детерминации  $R^2$  равны 0,992–0,999).

**Ключевые слова:** папоротник соленый, галофильные археи, хрен обыкновенный, антимикробная активность.

**Sergey V. Khizhnyak**

Krasnoyarsk State Agrarian University, professor of the chair of ecology and environmental management, doctor of biological sciences, Russia, Krasnoyarsk, E-mail: skhizhnyak@mail.ru

**Elena Ya. Muchkina**

Siberian Federal University, professor of the chair of ecology and environmental management, doctor of biological sciences, Russia, Krasnoyarsk, E-mail: emuchkina@mail.ru

**Galina A. Demidenko**

Krasnoyarsk State Agrarian University, professor head of the chair of landscape architecture and botany, doctor of biological sciences, professor, Russia, Krasnoyarsk, E-mail: demidenkoekos@mail.ru

### THE ESTIMATION OF THE POSSIBILITY OF USING HORSERADISH (*ARMORACIA RUSTICANA*) WHEN PRESERVING THE FERN

The aim of the research was to evaluate the possibility of using horseradish (*Armoracia rusticana*) as an antimicrobial agent to increase the shelf life of ferns preserved by the method of pickling. In model experiments, halophilic archaea cultures causing spoilage of salted ferns was used, previously isolated by the authors. The cultures were grown aerobically in liquid nutrient medium under the optimum temperature with the addition of crushed root or crushed horseradish leaves. Starting titer of the cultures before the addition of horseradish was equal to  $2 \cdot 10^7$  cells/ml, which was 10 times higher than the maximum recorded number of the indicated halophilic archaea in the salted fern. The cultures of the same archaea without adding horseradish were used as the control. It was found that both the leaves and the root of horseradish had reduced the number of halophilic archaea. Depending on the organs of horseradish used as an antimicrobial additive, and on the applied dose, the population of archaea was reduced by 45–93%. Antimicrobial effect was temporary. After initial decline in the numbers, the archaea population returned to exponential growth due to surviving cells. Additional experiments showed that the resumption of growth had not been associated with the adaptation of archaea to the antimicrobial substances of horseradish, but with the disappearance of these substances in the nutrient medium. Horseradish leaves had a significantly higher antimicrobial activity against halophilic archaea than the root. Mathematical models have been proposed for predicting the duration of antimicrobial effect and reducing the population of halophilic archaea depending on the dose of applied horseradish. The models show high agreement with the experimental data (the coefficients of determination  $R^2$  are equal to 0.992–0.999).

**Keywords:** salty fern, halophilic archaea, horseradish, antimicrobial activity.

**Введение.** Консервирование растительного сырья является одним из важнейших технологических процессов сохранения свойств его и качества. Ранее нами было показано, что консервированный путем засола в насыщенном солевом растворе папоротник-орляк (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) подвержен микробиологической порче. Агентом, вызывающим порчу, являются археи семейства *Halobacteriaceae*, способные к росту в средах, содержащих до 360 г/л хлорида натрия (что соответствует насыщенному раствору) [1, 2]. Таким образом, даже применение насыщенных солевых растворов при консервировании не предотвращает развитие упомянутых микроорганизмов, что ведет к снижению качества соленого папоротника при транспортировке и хранении. В этой связи нами была проверена возможность использования хрена обыкновенного (*Armoracia rusticana* G. Gaertn., V. Mey. & Scherb.) в качестве дополнительного antimicrobial средства при консервировании папоротника методом засола. Выбор хрена обыкновенного в качестве вспомогательного

консерванта был обусловлен тем, что данный вид является природным источником antimicrobial веществ [3–5]; распространен и доступен для массового производства; дешевый в применении.

Кроме этого, хрен обыкновенный является популярным культурным растением, так как его листья и корни используются в кулинарии и медицине (традиционной и народной). В состав хрена входят: витамины (А, С, РР, группы В), минералы (натрий, железо, фосфор, калий, медь, сера и другие), углеводы, белки, жиры, эфирное масло, клетчатка, органические кислоты, смолистые вещества, фитонциды. Его антиоксидативная активность обусловлена наличием в его составе глюкозинолатов, придающих овощу своеобразный аромат. Их активность усиливается при его обработке.

**Цель исследования:** изучение возможности использования хрена обыкновенного в качестве натурального antimicrobial средства для продления срока хранения соленого папоротника-орляка.

**Задачи:** изучение влияния корней и листьев хрена на динамику численности культуры галофильных архей, вызывающих порчу соленого папоротника; анализ зависимости антимикробного эффекта вегетативных органов хрена обыкновенного от их дозировки.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования являлись листья и корни свежесобранного хрена обыкновенного. Тест-объектом служила накопительная культура экстремально галофильных архей, выделенных из засоленного папоротника производства ООО «Курагинское промыслово-охотничье хозяйство».

Археи выращивали на жидкой среде следующего состава, г/л: пептон ферментативный – 9,0; гидролизат казеина – 8,0; дрожжевой экстракт – 3,0; натрия гидроортофосфат – 2,0; натрия хлорид – 300,0; рН среды –  $7,2 \pm 0,2$ . Эксперименты проводили в пробирках емкостью 5 мл, в которые вносили по 1 мл культуры с начальным титром  $2 \cdot 10^7$  клеток/мл. В опытных вариантах в культуры вносили измельченные листья или корни хрена обыкновенного в дозировке 50; 100; 150 и 200 мг/мл. Контролем служила культура без внесения хрена. Инкубацию пробирок проводили аэробно при температуре  $+35^\circ\text{C}$  во влажной камере для предотвращения

высыхания культур. Подсчет численности клеток архей проводили методом прямого счета с использованием фазово-контрастной микроскопии с периодичностью от 8 до 24 ч в зависимости от динамики роста культуры.

**Результаты исследования.** В дозировке 200 мг/мл культуры корень хрена обыкновенного полностью подавляет рост культуры и вызывает снижение численности клеток в соответствии с эмпирической моделью:

$$n = \frac{a_0}{\tau + a_1}, \quad (1)$$

где  $n$  – численность клеток;  $\tau$  – продолжительность культивирования;  $a_0$  и  $a_1$  – коэффициенты.

После подбора коэффициентов методом наименьших квадратов коэффициент детерминации  $R^2 = 0,999698$ , т. е. модель демонстрирует практически полное совпадение с экспериментальными данными (рис. 1). Падение численности архей в присутствии корня хрена происходит за счет отмирания клеток. Тем не менее, даже при максимальном падении численности в культуре присутствуют живые клетки, в том числе – делящиеся (рис. 2).

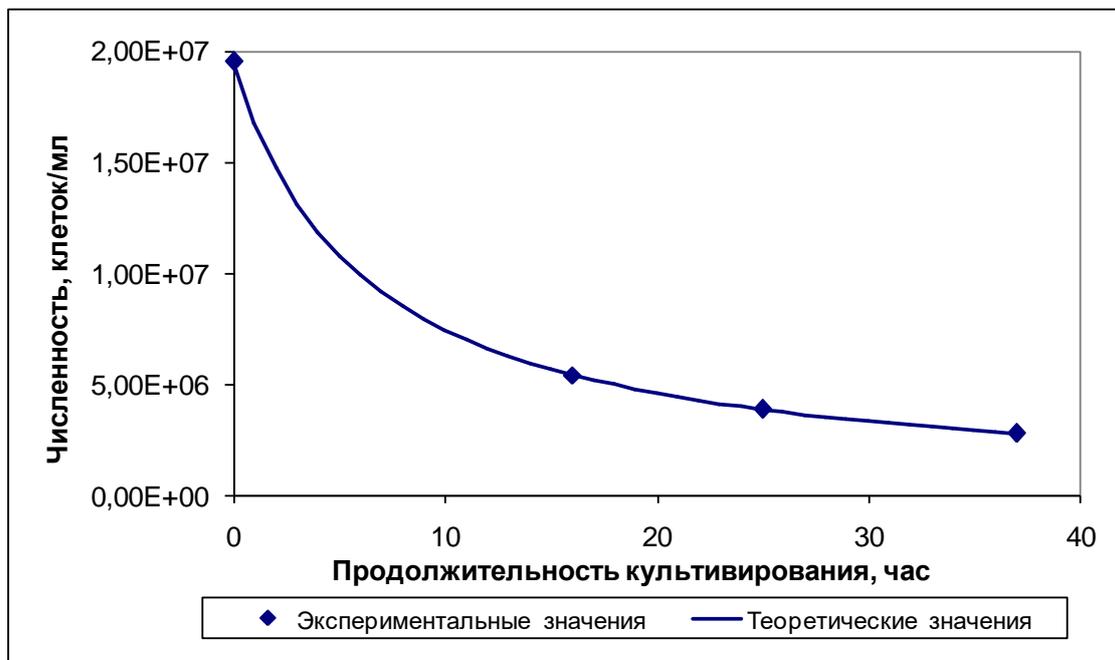


Рис. 1. Динамика численности галофильных архей в присутствии 200 мг/мл корня хрена обыкновенного

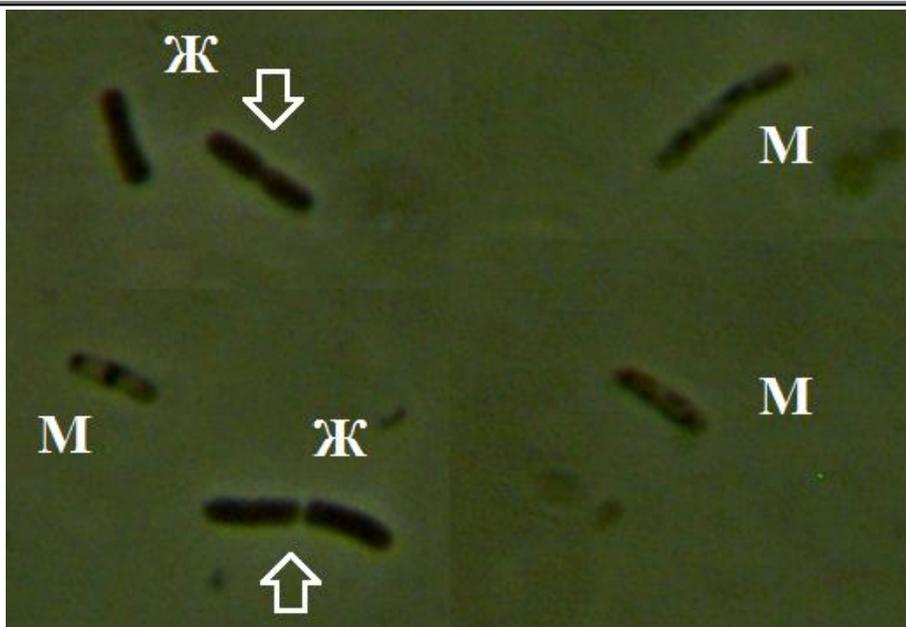


Рис. 2. Живые (Ж) и мертвые (М) клетки культуры архей в присутствии 200 мг/мл корня хрена обыкновенного (стрелками показаны делящиеся клетки)

Между 50-м и 60-м ч культивирования в присутствии корня хрена численность жизнеспособных клеток галофильных архей достигает минимального значения, соответствующего 12 % от

исходного титра. Однако при дальнейшем культивировании культура возобновляет экспоненциальный рост за счет выживших клеток (рис. 3).

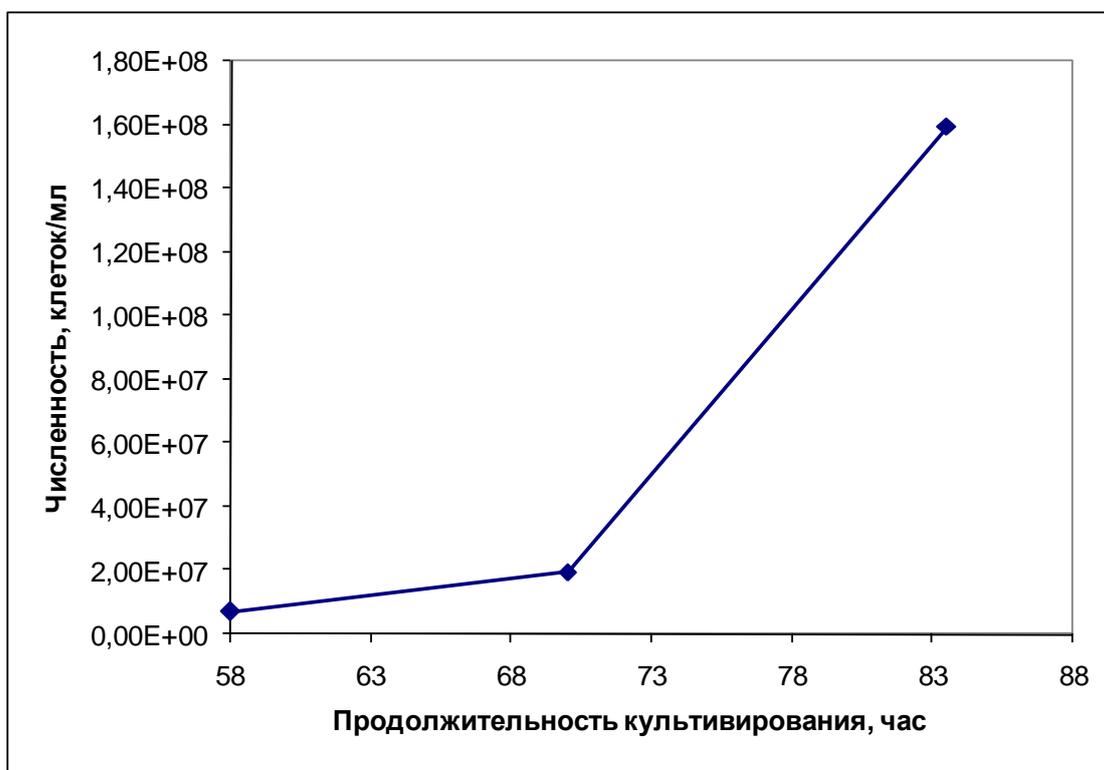


Рис. 3. Динамика численности галофильных архей в присутствии 200 мг/мл корня хрена обыкновенного после 58-го часа культивирования

Важно отметить, что зафиксированная на стадии восстановления численности максимальная удельная скорость роста галофильных архей ( $0,225 \text{ ч}^{-1}$ ) соответствует максимальной удельной скорости роста, зафиксированной в контрольных вариантах (от  $0,217$  до  $0,255 \text{ ч}^{-1}$ ). Это свидетельствует о полном исчезновении антимикробной активности корня хрена обыкновенного в отношении указанных микроорганизмов после 50–60 ч инкубирования.

Дополнительные эксперименты показали, что исчезновение антимикробной активности корня хрена обыкновенного не связано с адаптацией культуры к входящим в состав корня ан-

тимикробным соединениям. Так, при пересадке на свежую среду с внесением свежего корня хрена обыкновенного, динамика численности культуры, выращенной в присутствии 200 мг/мл корня хрена обыкновенного, идентична аналогичной динамике культуры, ранее не инкубированной в присутствии корня хрена.

Динамика численности изучаемых архей при внесении меньших количеств измельченного корня хрена (50; 100 и 150 мг/мл) соответствует динамике, наблюдающейся при внесении 200 мг/мл. После фазы снижения численности культуры наступает фаза экспоненциального (либо близкого к экспоненциальному) роста (рис. 4).

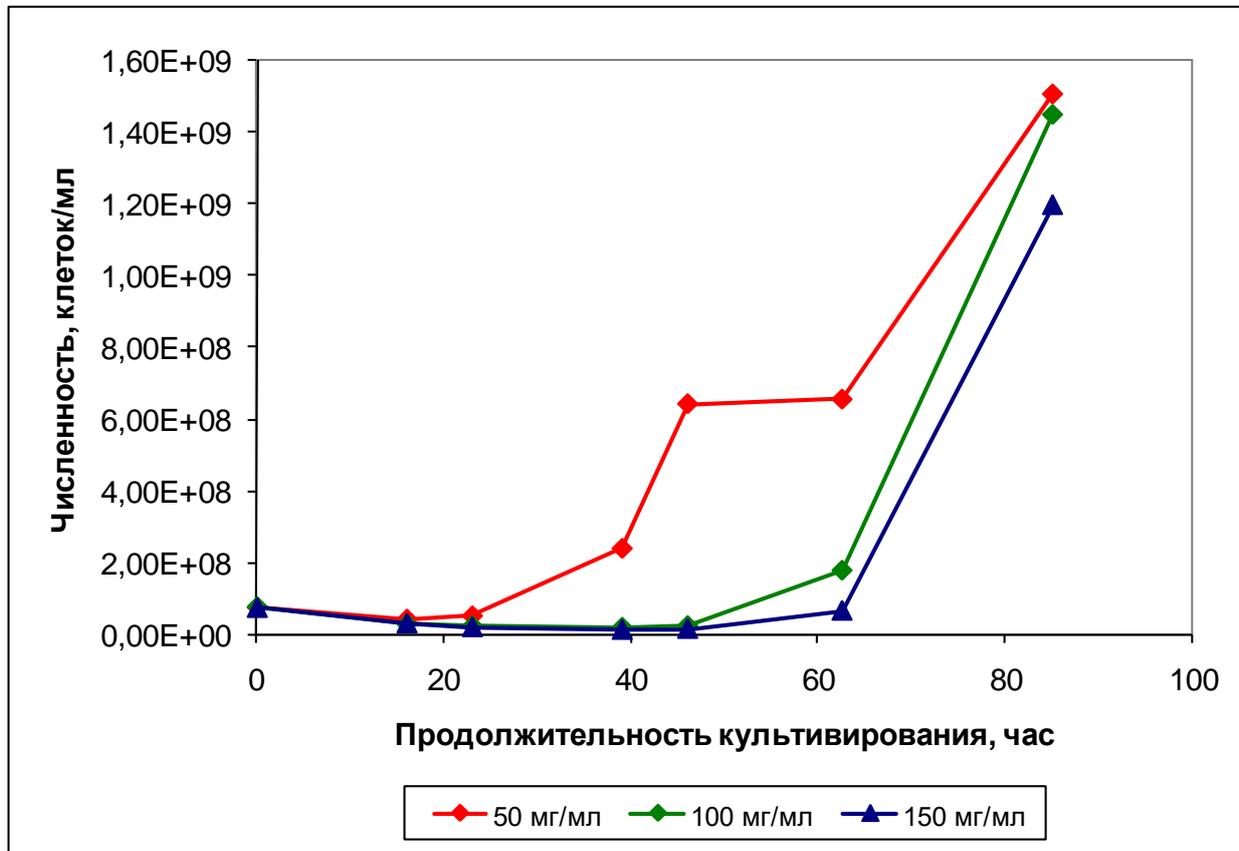


Рис. 4. Динамика численности галофильных архей в присутствии 50; 100 и 150 мг/мл корня хрена обыкновенного

Однако период антимикробного действия с уменьшением дозировки сокращается, причем продолжительность антимикробного действия

практически линейно зависит от количества внесенного корня хрена (рис. 5).

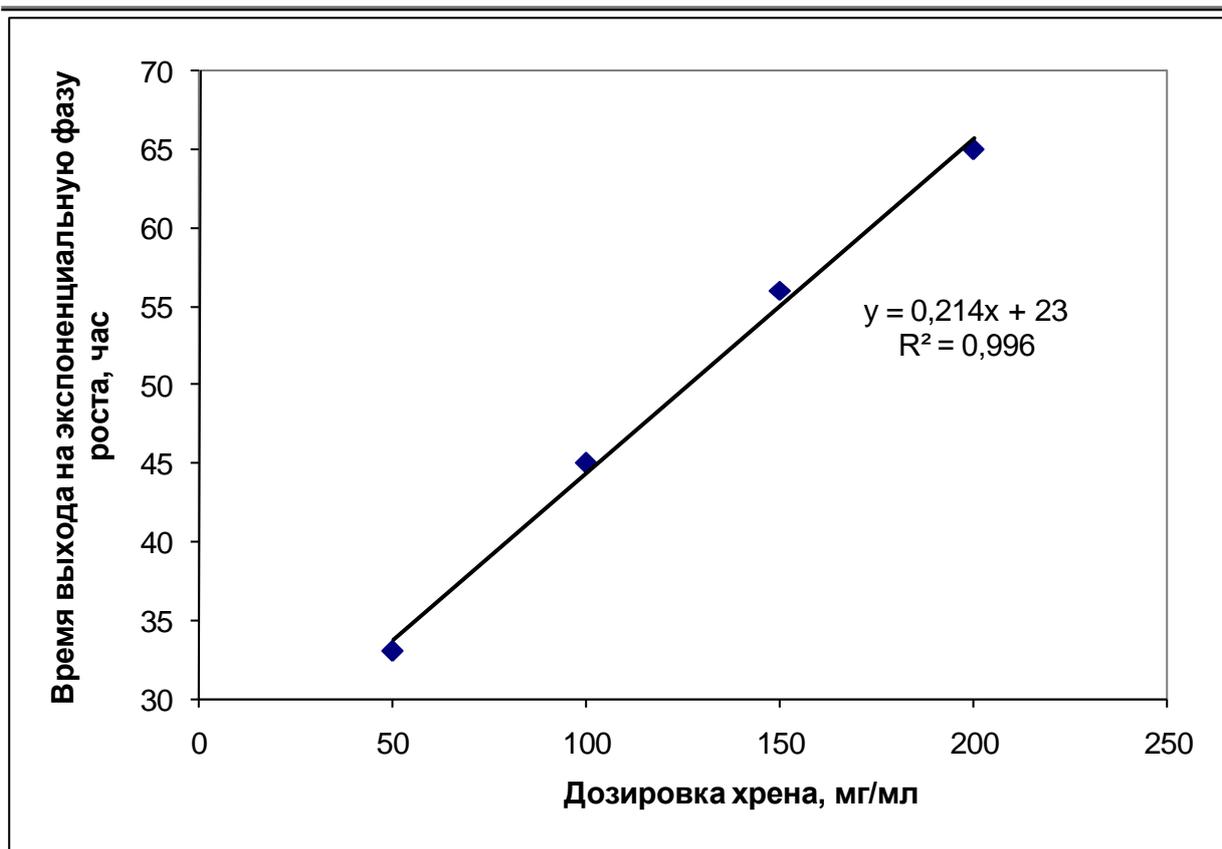


Рис. 5. Продолжительность антимикробного действия корня хрена обыкновенного в отношении галофильных архей в зависимости от дозировки

Учитывая, что в фазу антимикробной активности численность клеток галофильных архей снижается согласно уравнению (1), а продолжительность упомянутой фазы линейно зависит от дозы внесенного корня хрена, зависимость максимального снижения численности клеток от дозы внесенного корня хрена может быть описана уравнением

$$n = \frac{b_0}{b_1 C + b_2}, \quad (2)$$

где  $n$  – численность клеток к исходному значению, %;  $C$  – дозировка хрена, мг/мл;  $b_0$ ,  $b_1$  и  $b_2$  – коэффициенты.

После подбора коэффициентов методом наименьших квадратов данное уравнение дает

очень высокое совпадение расчетных значений с экспериментальными данными ( $R^2 = 0,992$ ) (рис. 6).

Антимикробный эффект листьев хрена обыкновенного был существенно сильнее, чем эффект корня. Так, при внесении 200 мг/мл листьев фаза антимикробной активности продолжалась примерно на 100 ч дольше, чем при использовании такой же дозировки корня, а падение численности галофильных архей было более глубоким – до 7 % от первоначального титра. Тем не менее, как и в случае с корнем, фаза антимикробной активности сменялась фазой экспоненциального роста, во время которой удельная скорость роста не отличалась от аналогичного показателя для контрольных вариантов.

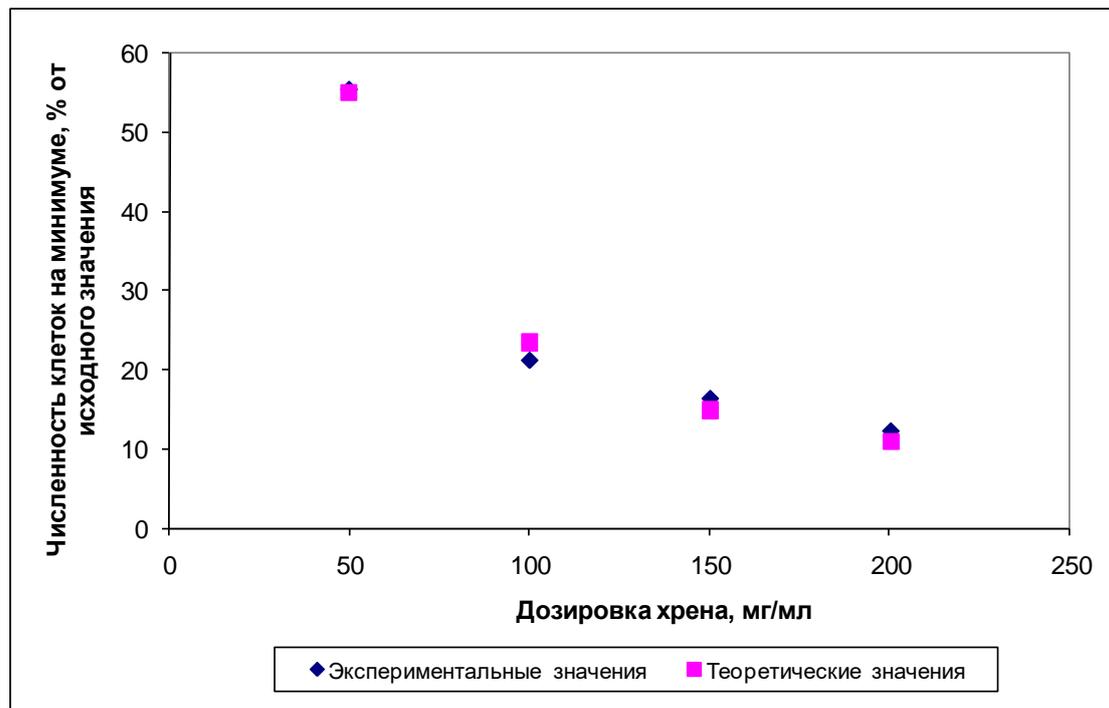


Рис. 6. Влияние дозировки корня хрена обыкновенного на максимальное снижение численности галофильных архей в фазе антимикробной активности

**Выводы.** Корень и листья хрена обыкновенного проявляют ярко выраженный антимикробный эффект в отношении галофильных архей, вызывающих порчу соленого папоротника-орляка. Однако этот эффект носит временный характер и при длительном культивировании исчезает, а культура архей возобновляет экспоненциальный рост за счет выживших клеток, доля которых варьирует от 7 до 55 % в зависимости от типа (листья или корни) и количества внесенного растительного материала.

Листья хрена обыкновенного обладают существенно более высокой антимикробной активностью в отношении изучаемых галофильных архей, чем корни. Это проявляется в существенно (в три раза) более продолжительном периоде антимикробного действия и более глубоком падении процента жизнеспособных клеток при использовании листьев в сравнении с аналогичными показателями при использовании корня в той же дозировке.

Следует учитывать, что исследования антимикробной активности хрена обыкновенного проводились на культурах, имеющих экстремально высокий начальный титр ( $2 \cdot 10^7$  клеток/мл), инкубирующихся на богатой питательной среде при

оптимальной температуре (+35 °С). В то же время при консервировании папоротника методом засола состав субстрата и температура хранения существенно менее благоприятны для развития галофильных архей, а их максимальный зафиксированный нами титр ( $2,6 \cdot 10^6$  клеток/мл) на порядок ниже, чем в обсуждаемых экспериментах.

С учетом сказанного можно ожидать, что при засоле папоротника антимикробный эффект хрена обыкновенного будет существенно выше, чем в модельных экспериментах. В этой связи листья хрена можно рекомендовать для производственных испытаний в качестве средства, увеличивающего срок хранения продукции за счет подавления развития экстремально галофильных архей.

### Литература

1. Хижняк С.В., Демиденко Г.А., Мучкина Е.Я. Микрофлора консервированной растительной продукции при использовании насыщенного рассола в качестве консерванта // Вестник КрасГАУ. 2015. № 11 (110). С. 120–124.

2. Хижняк С.В., Янова М.А., Мучкина Е.Я., Демиденко Г.А. Влияние концентрации соли на скорость роста экстремально галофильных архей // Известия высших учебных заведений. Сер. Пищевая технология. 2016. № 1 (349). С. 34–37.
3. Зеленуха С.И. Антимикробные свойства растений, употребляемых в пищу. Киев: Наукова думка, 1973. 193 с.
4. Лизоцим *Armoracia rusticana*: аминокислотный состав, форма макромолекулы / Н.К. Черно, Г.В. Крусир, О.В. Севастьянова [и др.] // Харчова наука і технологія. 2010. № 1. С. 31–34. URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Khnit\\_2010\\_1\\_12](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Khnit_2010_1_12).
5. *Schaechter M.* Desk Encyclopedia of Microbiology. New York: Academic Press, 2009. 1276 p.
- pri ispol'zovanii nasyshhennogo rassola v kachestve konservanta // Vestnik KrasGAU. 2015. № 11 (110). S. 120–124.
2. *Hizhnjak S.V., Janova M.A., Muchkina E.Ja., Demidenko G.A.* Vlijanie koncentracii soli na skorost' rosta jekstremal'no galofil'nyh arhej // Izvestija vysshih uchebnyh zavedenij. Ser. Pishhevaja tehnologija. 2016. № 1 (349). S. 34–37.
3. *Zelepuha S.I.* Antimikrobnye svojstva rastenij, upotrebljaemyh v pishhu. Kiev: Naukova dumka, 1973. 193 s.
4. *Lizocim Armoracia rusticana: aminokislotnyj sostav, forma makromolekuly / N.K. Cherny, G.V. Krusir, O.V. Sevast'janova [i dr.]* // Harchova nauka i tehnologija. 2010. № 1. S. 31–34. URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Khnit\\_2010\\_1\\_12](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Khnit_2010_1_12)
5. *Schaechter M.* Desk Encyclopedia of Microbiology. New York: Academic Press, 2009. 1276 p.

#### Literatura

1. *Hizhnjak S.V., Demidenko G.A., Muchkina E.Ja.* Mikroflora konservirovannoj rastitel'noj produkcii

