



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“

 Химически Факултет

Катедра Химична технология

ДИПЛОМНА РАБОТА

за получаване на образователно-квалификационна степен „Бакалавър“

на тема:

ХИМИЧЕН И ЛИПИДЕН СЪСТАВ НА МЪХ *Dicranum scoparium* Hedw. И *Polytrichum commune* Hedw. И ПОТЕНЦИАЛНОТО ИМ ПРИЛОЖЕНИЕ В КОЗМЕТИЧНИ ПРОДУКТИ

Дипломант: Памела Ивелинова Халачева

Специалност: Химия с маркетинг

Фак. № 2105111001

Научен ръководител: проф. д-р Гинка Атанасова Антова

Пловдив

2025 година

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	3
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	4
1. Обща ботаническа характеристика на мъхове от раздел Bryophyta	4
2. Морфолого-анатомични особености на представителите <i>Dicranum scoparium</i> и <i>Polytrichum commune</i>	6
3. Изследвания върху химичния състав на мъхове	8
4. Липиден състав на мъхове	13
4.1. Маснокиселинен състав на глицеридни масла, изолирани от мъх	16
4.2. Стеролов състав на липиди при мъхове	20
4.3. Токоферолов състав на глицеридни масла от мъховете	21
4.4. Фосфолипиден състав на мъховете	23
5. Цел и задачи	26
III. МЕТОДИЧНА ЧАСТ	27
1. Материал за изследване	27
2. Използвани аналитични методи	27
2.1. Определяне на общ азот и общ протеин по метода на Келдал	27
2.2. Определяне на въглехидрати	28
2.2.1. Определяне на неразтворимите фибри (целулоза)	29
2.3. Определяне масленото съдържание с апарат на Соксле	29
2.4. Определяне съдържанието на влага	30
2.5. Определяне на пепелното съдържание	31
2.6. Определяне на енергийна стойност	31
2.7. Определяне на индивидуалния маснокиселинен състав на триглицеридите	32
2.8. Определяне съдържанието на неосапуняеми вещества	33
2.9. Определяне общото съдържание на стероли и техния индивидуален състав	33
2.10. Определяне на токоферолов състав	35
2.11. Изолиране на фосфолипиди и определяне на индивидуалния фосфолипиден състав	36
2.12. Определяне маснокиселинен състав на индивидуалните фосфолипиди	37
3. Методика за приготвяне на козметичен крем	38
3.1. Анализи на приготвените продукти	38
IV. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ	40
1. Химичен състав на мъхове <i>Dicranum scoparium</i> и <i>Polytrichum commune</i>	40
2. Липиден състав на мъхове <i>Dicranum scoparium</i> и <i>Polytrichum commune</i>	42
2.1. Маснокиселинен състав на глицеридното масло	44
2.2. Стеролов състав	52
2.3. Токоферолов състав	54
2.4. Фосфолипиден състав и маснокиселинен състав на основните класове фосфолипиди	54
3. Приложение на липидите от мъх <i>Dicranum scoparium</i> в козметични продукти	63
V. ИЗВОДИ	67
VI. ЛИТЕРАТУРА	69

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Бриофитите са таксономичната група в растителния свят, представена с около 25 000 вида. Те се срещат навсякъде по света, освен в морето. Бриофитите се считат за най-старите сухоземни растения и растат по дървета, по почвата, езерата, реките и дори в Антарктида. Фитохимията на бриофитите е била пренебрегвана дълго време, защото те са морфологично много малки и е трудно да се съберат в големи количества като чисти проби; идентифицирането им е също много трудно дори под микроскоп. Те съдържат голям брой биологично активни съединения; въпреки това употребата им като хранителен източник е незначителна. Въпреки това, редица бриофити, по-специално мъхове, са широко използвани като лечебни растения в Китай за лечение на изгаряния, натъртвания, външни рани, ухапване от змия, белодробна туберкулоза, неврастения, фрактури, конвулсии, опарване, уропатия, пневмония, неврастения и др. Интерес представляват биологично активни вещества, открити в бриофитите, по отношение на техния химичен състав, фармакология и приложение като източници на биоактивни компоненти за козметика, медицински или селскостопански продукти.

В България съществува значително разнообразие от мъхове - документирани са над 800 вида. Като цяло в Европа се срещат около 1700 вида, което показва, че нашата страна е изключително богата на този растителен вид. Много от тях са характерни за планинските и влажните горски екосистеми. Те подпомагат задържането на влага, участват в почвообразуването и служат като индикатори за чистотата на въздуха и водата. Най-голямо разнообразие се наблюдава в Рила, Пирин, Родопите и Стара планина, където климатичните и геоложки условия благоприятстват развитието на различни видове бриофити. В научната литература има основно информация за общия химичен състав на различни видове мъх, но за съдържанието на биологично активните мастноразтворими вещества информацията е оскъдна. Поради което, интерес представлява освен определяне на общия химичен състав на два вида мъх *Dicranum scoparium* Hedw. и *Polytrichum commune* Hedw., да се охарактеризира и липидния им профил, за да се оцени тяхното потенциално приложение в различни области.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Обща ботаническа характеристика на мъхове от раздел Bryophyta

Неваскуларните растения, известни още като мъхообразни растения или накратко мъхове (Bryophytes), са група растения, характеризиращи се с отсъствието на специални тъкани, предназначени за провеждане на вода. Мъховете (Bryophyta) представляват древна група спорови растения, която включва приблизително 20 000 съвременни вида и заема междинно положение в еволюцията между водораслите и съвременните висши растения. Те се характеризират с просто устроени вегетативни органи и жизнен цикъл, доминиран от гаметофитното поколение. За разлика от по-напредналите растения, при които спорофитът е доминиращ, при мъховете зелената фотосинтезираща и самостоятелно съществуваща фаза е гаметофитът, докато спорофитът е зависим от него морфологично и физиологично.

Мъховете са най-често малки по размер (от няколко милиметра до няколко сантиметра), но могат да образуват гъсти и обширни популации върху най-разнообразни субстрати – почва, камъни, дървета, пясъци, влажни скали и дори изкуствени повърхности. Широката им екологична амплитуда се дължи на тяхната способност за адаптация към различни климатични условия и изключителна толерантност към обезводняване. Много мъхове могат да преживяват продължителни периоди на засушаване и при наличие на влага да възстановяват напълно своите физиологични функции.

Мъховете нямат истински корени, стъбла и листа, както при висшите растения. Вместо това, те притежават подобни на коренчета структури, наречени ризоиди, които служат предимно за прикрепване към субстрата, но не участват в активно всмукване на вода. Стъблото и листата им са морфологично прости, без сложна проводяща система, въпреки че при някои по-напреднали представители (като *Polytrichum commune*, вид мъх, който се среща в региони с висока влажност и валежи) се наблюдават елементи, наподобяващи проводящи тъкани.

Размножаването при мъховете е както полово, така и безполово. Половото размножаване включва развитието на мъжки (антеридии) и женски (архегонии) полови органи на гаметофита. След оплождането се образува диплоиден спорофит, състоящ

се от краче, капсула (спорангий) и често покривна структура, наречена калиптра. В капсулата се развиват хаплоидни спори, които при подходящи условия прорастат в нов гаметофит. Безполовото размножаване може да се осъществява чрез фрагментация, а при някои видове – и чрез специализирани вегетативни структури, като грудки или разклонения.

Екологичното значение на мъховете е високо. Те участват в задържането на влага в почвата, предотвратяват ерозията, улесняват процеса на почвообразуване и създават микроклиматични условия, благоприятни за развитието на други организми. В някои екосистеми, като торфищата, мъховете (например *Sphagnum* spp.) са доминиращи видове и играят ключова роля в натрупването на органична маса и въглерод.

Систематично, мъховете се делят на три основни групи: чернодробни мъхове (Marchantiophyta), листостеблени мъхове (Bryophyta) и рогоспорангиеви мъхове (Anthocerotophyta) [15]. Чернодробните мъхове (Marchantiophyta) са отдел неваскуларни растения, често дребни по размер и незабележими, наподобяват малки неправилни листоподобни плочки, покриващи големи площи на земята, макар че могат да бъдат открити и върху скали, дървета и други относително здрави повърхности. Името чернодробни мъхове идва от сходството във формата на някои видове с тази на човешки черен дроб. Най-разпространени и най-добре проучени са листостеблените мъхове, към които принадлежат и двата обекта на настоящото изследване – *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*. Листостеблените мъхове (Bryophyta) са раздел растения, който включва около 10 000 вида. Те са малки растения, обикновено с височина от 1 до 10 cm. Листостеблените мъхове растат на гъсти туфи на влажни или сенчести места. Те нямат цветове или семена, а техните прости листа са разположени около тънките стъбла. Тези видове се срещат главно в горски екосистеми на умерения климатичен пояс и са важни индикатори за екологичното състояние на средата. Рогоспорангиевите мъхове са група неваскуларни растения, които се причисляват към подклас Anthocerotidae и разред Anthocerotales. Те се отличават с характерната си структура на спорофит, която наподобява рог, откъдето идва и името им.

2. Морфолого-анатомични особености на представителите *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*

Мъховете *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune* са два от най-представителните и добре изучени от морфологична гледна точка видове листостеблени мъхове, разпространени в северното полукълбо. И двата вида принадлежат към клас Bryopsida, но се отличават с характерни морфологични и анатомични белези, които определят тяхната екологична роля и адаптивни възможности.

Dicranum scoparium Hedw.

раздел: Bryophyta; клас: Bryopsida;

семейство: Dicranaceae; род: Dicranum



Dicranum scoparium (метловиден мъх) е един от най-разпространените представители на семейство Dicranaceae. В България е широко разпространен в Рила, Родопите и Стара планина. Среща се върху кисели почви, скали и мъртва дървесина, най-често в иглолистни и смесени гори. Образува гъсти, метловидни туфи (до 10 cm) с изправени, неразклонени стъбла и със светлозелени до тъмозелени листа, които при изсъхване добиват жълтеникав оттенък. Листата му са линейно-ланцетни, завършващи с остър връх, често извити в една посока, което придава характерния „метловиден“ белег на този вид. При наблюдението им под микроскоп се наблюдават клетки с удължена форма и дебели стени, особено в средната част на листа. *Dicranum scoparium* не притежава ясно разграничени проводящи тъкани, но във вътрешността на стъблото се откроява централен цилиндър, съставен от сравнително плътно разположени удължени клетки, които се предполага, че изпълняват проводяща функция. Ризоидите, развиващи се в основата на стъблото, служат за прикрепване към субстрата и ограничено транспортиране на вода. Видът е индикатор за киселинни и влажни местообитания. Изследвания показват, че фотосинтетичната му активност варира според сезона и влажността.

 ***Polytrichum commune* Hedw.**

раздел: Bryophyta; клас: Polytrichopsida;

семејство: Polytrichaceae; род: Polytrichum



Polytrichum commune (обикновен политрихум) е един от най-често срещаните едри мъхове и добре изучени представители на семейство Polytrichaceae. В България се среща в планинските райони, особено в Рила, Западните Родопи, Витоша и други влажни планински райони. Обитава влажни, сенчести места – торфища, потоци, горски поляни. Той може да достига височина до 30 cm, като образува гъсти, изправени и компактни туфи. Характерно за вида е тъмнозеленото до кафеникаво оцветяване, както и ясно изразената диференциация на стъблото и листата. Листата са ланцетни, твърди и с характерни надлъжни ламели, които увеличават фотосинтетичната повърхност. Тези ламели са особено важни за адаптацията на вида към сухи местообитания, тъй като намаляват загубата на влага и улесняват задържането на вода върху повърхността на листа. Средната жилка на листата е силно развита и при напречен срез разкрива сложна структура с ясно разграничени проводящи елементи. Това прави *Polytrichum commune* един от малкото мъхове, при които се наблюдава подобие на проводяща система, доближаваща се по функция до тази на висшите растения. Стъблото е добре организирано, с централна проводяща тъкан, обградена от кортикални слоеве. Наличието на тази структура обяснява възможността на вида да достига значителна височина за мъх. Ризоидите на *Polytrichum commune* са по-дълги и разклонени в сравнение с тези на *Dicranum scoparium*, като те също допринасят за устойчивото закрепване към субстрата и осигуряват ограничено водоснабдяване. Участва в стабилизирането на почвата и задържането на влага. Заради високата си устойчивост и способност за задържане на влага, често се използва като индикатор за екологично състояние на местообитанията.

3. Изследвания върху химичния състав на мъхове

Мъховете имат уникален химичен състав, включващ полизахариди, полифеноли и различни липидоразтворими биоактивни съединения. Тези съединения им осигуряват адаптация към екстремни условия, допринасят за потенциалните приложения на мъха в медицината, козметиката и опазването на околната среда [13, 42]. Мъховете се отличават с високо съдържание на полизахариди и вторични метаболити (полифеноли, флавоноиди, алкалоиди, терпеноиди и др.). Основните структурни елементи в мъховете са полизахаридите - целулоза, хемицелулоза, пектинови вещества, лигнин и др. Вторичните метаболити при мъховете изпълняват защитни и регулаторни функции в условия на суша, оксидативен стрес, стрес от замърсяване (напр. въздействието на тежки метали), UV-излъчване, патогенно въздействие и имат ключова роля в цялостния им метаболизъм [34, 39, 43].

Основните съединения, съдържащи се в мъховете могат да се групират в следните групи:

- **Полизахариди** – структурни клетъчни полимерни въглехидрати (целулоза, хемицелулоза и пектин) и екстрактни вещества (слузести, свързващи влагата полизахариди с хидрогел-подобни свойства) [34].

Полизахаридите, тъй като изпълняват структурна функция (задържане на вода, изграждане на клетъчни стени), не се изследват за биологична активност. Те обаче могат да намерят приложимост като биополимери – напр. абсорбиращи субстанции или евентуални имуномодулиращи агенти при по-нататъшни проучвания.

- **Липиди** – включващи глицериди, фосфолипиди, мастни киселини (наситени и ненаситени); стероли (β -ситостерол, стигмастерол, кампестерол и др.) и токофероли (предимно α -токоферол), които подсилват структурирането на мембраните и служат като антиоксиданти.

Липидите са част от клетъчните мембрани и са отговорни за много функции в растенията, като основната е регулирането на клетъчния метаболизъм. Някои от липидните компоненти са биоактивни съединения (като токофероли, фитостероли, фосфолипиди, мастни киселини и др.), които играят важна роля в растителните организми, по-специално в мъховете, и могат да проявяват антиоксидантна активност.

Общото количество на липиди в мъховете е относително ниско, но те са богати на ненаситени дълговерижни мастни киселини. Мъховете често произвеждат полиненаситени мастни киселини, като арахидонова и ейкозапентаенова киселина, което е рядкост за висшите растения. Автори, изследвали неутралните липиди, изолирани от мъх *Dicranum polysetum*, събиран от Европейската част на Русия са установили високо съдържание на мастни киселини с тройна връзка (72,08%) [21]. Български автори разкриват, че мъх *H. cupressiforme* е обещаващ алтернативен източник на биоактивни мастноразтворими съединения, които биха могли да бъдат включени в хранителни добавки с благоприятни за здравето ефекти [44]. Според Petkova et al. [44] основните мастни киселини в изолираните липиди от *H. cupressiforme* са линолова (14,9%), олеинова (13,8%), палмитинова (12,5%) и α -линоленова (11,3%) киселини. Според Onur Okan [41] при анализа на мастнокиселинния състав на липидите от мъхове *Polytrichum formosum* и *Polytrichum commune* е установено, че преобладаващи мастни киселини са олеиновата и палмитиновата, съответно 36,6% и 35,5% за *Polytrichum formosum* и 38,0% и 37,9% за *Polytrichum commune*. Според Xian'en et al. (2006) [54] липидите от видовете мъхове от семейство Dicranaceae се отличават с високо съдържание на есенциални мастни киселини, поради което са потенциален източник на тези киселини и представляват интерес за хранителната промишленост. В своето проучване Dembitsky and Rezenka, 1994 откриват, че липидите от мъховете от същото семейство съдържат 86 мастни киселини, от които 27 са наситени мастни киселини, останалите са моноенови, диенови, триенови и тетраенови киселини [23]. Asakawa et al. (2013) също са идентифицирали в състава на бриофитите алкани, тритерпени и ненаситени мастни киселини [14].

Klavina et al. са изследвали състава на 13 вида мъх от Латвия и са установили, че основните групи съединения в хлороформните екстракти са аминокиселини (590–3266 mg/100 g сух мъх), мастни киселини (329–1707 mg/100 g сух мъх) и стероли (632–2130 mg/100 g сух мъх) [34].

Фитостеролите стабилизират клетъчните мембрани и имат антиоксидантни и противовъзпалителни свойства. В липидите, изолирани от мъх *Hypnum cupressiforme* са открити основно следните фитостероли – стигмастерол (4,37 mg/g FW), β -

ситостерол (4,29 mg/g FW) и кампестерол (3,34 mg/g FW) и др. [45]. Липидите от мъх *Dicranum scoparium* съдържат значителни количества стигмастерол (40,75%), β -ситостерол (33,7%) и ергостерол (30,9%) [26], а според Aydin (2020) липидите от същия вид мъх съдържат 7,88 μ g/g стигмастерол, 1,34 μ g/g β -ситостерол и 0,02 μ g/g ергостерол [16].

Токоферолите (форма на витамин Е) предпазват липидите от процеса на окисление. Те също присъстват в липидите, изолирани от мъховете *Hypnum cupressiforme* (1848,5 mg/kg в липидите и 23,9 mg/kg в мъха) и *Dicranum scoparium* (0,47 μ g/g), в които преобладава α -токоферол [26,44]. Поради разнообразието от биологично активни съединения, включително и откритите незаменими мастни киселини, витамини и стероли в липидите, изолирани от мъхове ги прави интересна група растения от гледна точка на приложения във фармакологията и хранително-вкусовата промишленост [16].

• **Фенолни съединения** – полифеноли, флавоноиди (кверцетин, кофеинова, кумарова, галова киселини и др.), терпеноиди и др.

Мъховете са богати на полифенолни антиоксиданти – фенолни киселини, производни на хидроксibenзоената киселина (галова, ванилова, сиринова, салицилова и 3,4-дихидроксibenзоена киселини) и хидроксиканелената киселина (розмаринова, кафеена, хлорогенова, пара-кумарова, синапена, ферулова и канелена киселини), флавоноиди и полифенолни производни. Съдържанието на общи полифеноли в етанолови и хлороформени екстракти от различни видове мъхове от Северна Европа е високо ($\approx$ 200 – 800 mg галова киселина/100 g сухо вещество). Въпреки високото им ниво, антиоксидантната активност по DPPH тест обикновено е по-ниска в сравнение с тази на висшите растения и не корелира с по-високото общо съдържание на феноли [34]. Onur Okan (2025) [41] при анализа на химичния състав на два вида бриофити (*Polytrichum formosum* и *Polytrichum commune*) чрез високоефективна течна хроматография и масспектрометрия е доказал наличието на 53 фенолни съединения, като в най-голямо количество са хининова киселина (4,45 mg/g екстракт), протокатехинова киселина (2,26 mg/g екстракт) и физетин (1,46 mg/g екстракт). Faleva et al. (2022) [28] е изследвала нискомолекулната полифенолна

фракция на мъх *Politrichum commune*, получена чрез течна екстракция под налягане с ацетон и са установили, че съдържа значителни количества дихидрохалконови производни (~7%), които не са били открити преди това в това растение и могат да се считат за доминиращи ароматни компоненти, заедно със съединения, характеризиращи се с флаванолова структура, свързана със стиролова единица. Изолираните олигомери се характеризират с висока антиоксидантна активност, варираща от 17,5 до 42,5% по отношение на Trolox, както и с ниска токсичност, което ги прави обещаващ източник за производството на биологично активни хранителни добавки и фармацевтични продукти [28]. В народната медицина *P. commune* се използва като антипиретик и антидот, за спиране на кървене и за лечение на порязвания, пневмония и дори белодробна туберкулоза. Освен това, в китайската традиционна билкова медицина, изсушеното цяло растение се използва широко за лечение на упадък на паметта и други свързани заболявания. Въпреки това, екстрактите от мъх *P. commune* все още не са намерили приложение в съвременната фармакология и други области поради сложния им и не добре проучен химичен състав [28]. Fu et al. съобщава за изолирането на два специфични стирол-флавонови хибриди и охайоензин А (ohioensin A) - нов бензонафтоксантенон от мъх *Polytrichum commune*, като тези съединения бяха оценени за цитотоксичност срещу малък набор от ракови клетъчни линии [30]. Екстрактите от мъхове *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune* показват антибактериална, противогъбична и антиоксидантна активност [26, 30].

Aydin е установил сравнително по-висока антиоксидантна активност (по метода DPPH) на метаноловия екстракт от *Dicranum scoparium* в сравнение с този от *Porella platyphylla*, като предполага, че това се дължи на по-голямото количество полифеноли, витамини, α -токоферол (витамин Е), стигмастерол и β -ситостерол в сравнение с *Porella platyphylla* [16]. Авторы от Турция установяват, че метаноловият екстракт и неговите фракции (етилацетат, хексан, вода), получени от *Dicranum scoparium* Hedw. демонстрират значително по-висок антиоксидантен капацитет на екстрактите от този вид мъх спрямо други видове, както и силна антибактериална активност срещу патогенни бактерии (особено срещу *Bacillus* spp.), отговорни за заболявания по пчелите [31]. Това показва, че тези екстракти биха могли да се използват като

потенциално лекарство за предотвратяване на бактериалните заболявания, засягащи медоносните пчели.

В последните години расте интересът към използване на мъховете в зеления синтез на наноматериали, като *D. scoparium* се утвърждава като ценен източник на биоактивни молекули, участващи в редукцията на метални йони [50]. Зеленият синтез на сребърни наночастици с помощта на екстракти от мъх *D. scoparium* се оказва ефективна не само като екологична технология, но и като метод за получаване на наноструктури с изразени антимикробни и цитотоксични свойства. Сребърните наночастици, синтезирани с воден екстракт на *Dicranum scoparium*, демонстрират значителен инхибиторен ефект срещу щамове на *E. coli* и *P. aeruginosa*, като редуцират колонииите с над 80% [50].

От посоченото по-горе се вижда, че мъховете са ценен източник на биологично активни природни продукти, особено терпенови и фенолни съединения с уникална структура и потенциал за фармакологично приложение [39, 43].

• **Минерални компоненти** - Основните и следовите метални елементи са важни група елементи, характеризиращи състава на мъховете. Предполага се, че предимно естествените процеси са източници на основни елементи, докато наличието на следови елементи може да се дължи на замърсяване на околната среда [17]. Концентрациите на следови елементи в мъховете се използват за целите на екологичния мониторинг [48, 49]. Въпреки това, сред изследваните метали, тези, пряко свързани със замърсяването (Pb, Cd, Ni), имат най-ниска вариабилност и ниски концентрации, но концентрациите на основни елементи (Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn), както и основни следови елементи с преобладаващ естествен произход (Ni, Cu, Zn), имат най-висока вариабилност сред видовете мъхове [35]. Проучвания върху елементния състав на мъха *Polytrichum commune* показват богато съдържание на калций и други макроелементи (напр. Ca ~8430 mg/kg) [41]. Мъховете се използват от редица години като естествени биоиндикатори за различни тежки метали и като източници на информация за контрол на околната среда. Натрупването на метали в мъховете може значително да повлияе на качеството и количеството на липидите [25].

• **Летливи органични съединения** - те могат да имат различни функции в околната среда и могат да бъдат полезни в биотехнологични приложения. В гаметофитите на някои видове мъхове, принадлежащи към семейство Splachnaceae, са открити няколко летливи съединения. Сред тях са летливи органични киселини: оцетна, пропионова, маслена, капронова, валерианова, изовалерианова и бензоена киселина; алкохоли: 3-октанол, 1-октен-3-ол, 1-октанол, 2-октанол, 2-хексанол и бензилов алкохол; алдехиди: транс-2-октенал, 2-етилхексанал, октанал и фенилацеталдехид [25].

• **Други** – каротеноиди, органични киселини, аминокиселини и др., които също допринасят за екологичните адаптации и биологичната активност. Каротеноидите са изследвани в голям брой мъхове и те са едни от най-важните естествено срещащи се пигменти. Проучвания на голям брой мъхове показват наличието на α - и β -каротин, лутеин и др. [25]. Съставът на редица мъхове показва, че разпределението на каротеноидите изглежда е сравнително равномерно в мъховете, като разликата е главно в количествата при всеки вид [35].

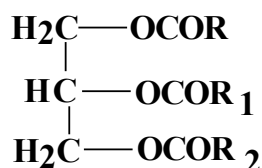
Основни аналитични методи за изследване на химичния състав включват хроматография и спектроскопия. Газова хроматография с мас детектор се използва за идентификация на летливи и мастноразтворими компоненти (мастни киселини и стероли). Течна хроматография с масспектрометрия позволява анализ на индивидуалния състав на полярни метаболити и феноли. За определяне на общото съдържание често се прилагат и спектрофотометрични методи. Атомно-емисионна спектроскопия се използва за определяне съдържанието на микроелементи в мъхове. На различните екстракти на мъховете се провеждат тестове за антиоксидантна активност (DPPH, FRAP и др.), както и биологични тестове за антибактериално, противотуморно и др. действия.

4. Липиден състав на мъхове

В химично отношение липидите, представляват сложни смеси от глицериди на мастни киселини, които са в количество 90,0 - 99,0% и съпътстващи вещества – стероли, токофероли, фосфолипиди, въглеродороди, каротеноиди и др. Основната

част на липидите – ацилглицеролите са естери на глицерина с висши и низши мастни, хидроксимастни и други киселини.

Общата им формула е:



където R, R₁, R₂ са радикали на висши мастни киселини

Липидният състав на мъховете представлява специфична и изключително важна част от тяхната биохимична характеристика. Липидите играят ключова роля в структурата на клетъчните мембрани, в процесите на междуклетъчна комуникация, фотосинтеза, както и в адаптацията към неблагоприятни екологични условия. Проучванията върху липидния профил на мъховете, макар и ограничени в сравнение с тези при висшите растения, показват наличие на значителен биохимичен потенциал, който може да бъде от интерес както за екологични, така и за фармакологични и биотехнологични изследвания [18]. Липидният комплекс на мъховете включва различни класове съединения – неутрални липиди (триглицериди, стероли и др.), полярни липиди (главно фосфолипиди и гликолипиди), както и свободни мастни киселини, восъчни естери и мастни алкохоли. Наличието и относителното съотношение между тези компоненти варира в зависимост от вида, етапа на развитие, условията на средата, както и специфичните анатомични структури на растението [35, 37, 44, 47, 51].

Съдържанието на липиди е изследвано в относително много видове мъхове, от които са взети проби в различни региони на света, и е от 21,9 до 68,0 mg/g суха маса или от 1 до 9,1% от сухата маса [25], като същевременно проучванията показват значителни промени в концентрациите на липиди в зависимост от сезонните процеси, региона и условията на растеж [35, 37]. Количеството на общите липиди в зелената част на субарктическият *Dicranum elongatum* е най-високо в края на зимата и през пролетта (през април - 102 mg/g суха маса), докато през есента значително намалява (през септември-октомври – 63 mg/g суха маса). За екстракцията на липиди от бриофити могат да се използват различни разтворители, но условията на екстракция и изборът на разтворител не са много добре проучени. При изследване на екстракцията

на липиди от мъхове с различни разтворители е установено, че хлороформът и диетиловият етер могат да се считат за най-подходящи за екстракция, като за увеличаване на добива на екстракция може да се приложи обработка с ултразвук [35].

Количество на липиди (mg/g), изолирани от мъхове с различни разтворители

Вид мъх	C ₆ H ₁₂	CH ₂ Cl ₂	CHCl ₃	C ₂ H ₅ OOCCH ₃	(C ₂ H ₅) ₂ O
<i>Polytrichum commune</i>	7,2	6,8	10,8	8,8	8,0
<i>Dicranum polysetum</i>	4,0	11,7	12,4	9,2	12,0

Изследваните видове мъх (*Polytrichum commune* и *Dicranum polysetum*) съдържат < 12 mg/g липиди, евентуално при по-продължителната екстракция (многократна обработка с пресен разтворител) количеството на липиди може да достигне до 21–60 mg/g в зависимост от вида мъх [35]. Количеството на липидите в мъха зависят основно от сезона, за различните видове мъхове максимални количества са достигнати в различни времеви периоди, което показва разлики в биосинтезните процеси. Сезонният модел на промените в концентрацията на липидите в мъховете е важен за разбирането на характера на регулаторните процеси в мъховете и бриофитите като цяло, както и за избора на сезони за вземане на проби при био проучванията - за изучаване и изолиране на биологично активни вещества от мъховете [35, 37] .

Липофилните химични съставки са една от причините бриофитите да се използват в много страни като етномедицина за лечение на порязвания, изгаряния и натъртвания поради техните противогъбични, противовъзпалителни и антиоксидантни функции [37]. Родовете *Sphagnum*, *Marchantia* и *Polytrichum* са най-широко използваните бриофити в световен мащаб, най-вече в Китай, следван от САЩ и Канада, докато *Physcomitrella patens* е единственият, използван за промишлени биотехнологични цели. Повечето вещества, изолирани от бриофити проявяват антивирусна, антимикробна, противогъбична и инсектицидна, активност, което показва потенциалът им на обещаващ биопестицид, заместващ синтетично получените пестициди [14, 37, 42]. Дълговерижните полиненаситени мастни киселини са обект на голям интерес през последните години поради благоприятния им ефект върху здравето при хора и животни. Бриофитите произвеждат високо количество арахидонова (C20:4)

и ейкозапентаенова киселина (C20:5), които рядко се срещат в липидите при висшите растения. Това предполага, че бриофитите са генетично по-близки до водораслите, отколкото до други сухоземни растения. Високото съотношение на n-3 : n-6 също предполага алтернативен и устойчив подход за подобряване на приема на полиненаситените мастни киселини при хората чрез вмъкване на бриофит-гени с високо съдържание на тези киселини, с цел модифициране на настоящите гени на маслодайни култури. Тези изследвания показват потенциалното използване на бриофитите като нови източници на дълговерижни полиненаситени мастни киселини [37].

От гледна точка на екологичната физиология, липидите при мъховете са тясно свързани със способността им да преживяват продължителни периоди на дехидратация. При условия на засушаване се наблюдават промени в състава на липидите, изграждащи клетъчните мембрани – например увеличаване на наситените мастни киселини и намаляване на полиненаситените, с цел стабилизиране на мембранната структура. Тази адаптация е от особено значение за мъхове, растящи върху открити скали, дървета или в субалпийски (до 1900 m) и алпийски (до 2300 m) екосистеми, където условията са силно променливи [25].

4.1. Мастнокиселинен състав на глицеридни масла, изолирани от мъх

Характерни за растителните масла са едноосновните висши мастни киселини с права въглеродородна верига и четен брой въглеродни атоми. В зависимост от наличието на двойни връзки в молекулата, мастните киселини в растителните масла биват:

а) наситени мастни киселини

Наситените мастни киселини са предимно с четен брой въглеродни атоми - от 2 до 16 като най-широко разпространени са:

палмитинова (хексадеканова) киселина - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$;

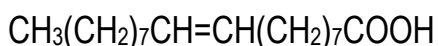
стеаринова (октадеканова) киселина - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$.

б) ненаситени мастни киселини

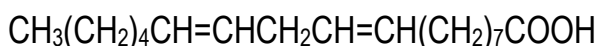
Те са преобладаващи в растителните масла. Всички открити до сега ненаситени мастни киселини са с права въглеродна верига, като броят на двойните връзки е от 1 до 4, 5 или 6.

От ненаситените мастни киселини най-разпространени са:

- с една двойна връзка – олеиновата (цис – 9 – октадеканова) киселина:



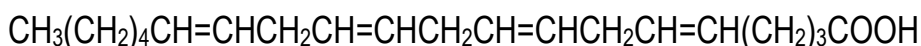
- с две двойни връзки – линоловата (цис – 9, цис – 12 – октадекадиенова) киселина:



- с три двойни връзки – линоленовата (цис – 9, цис – 12, цис – 15 – октадекатриеновата) киселина:



- с четири двойни връзки – арахидоновата (5, 8, 11, 14 – ейкозатетраенова) киселина:



Проучванията показват, че при липидите, изолирани от мъховете най-често се срещат мастни киселини с верижна дължина от 14 до 22 въглеродни атома, включително както наситени, така и ненаситени. Съставът на мастните киселини на триацилглицеролите в мъховете е доста подобен на този на някои растителни масла от семена [Dembitski, 1993].

Палмитиновата киселина (C16:0) и стеариновата киселина (C18:0) са важни наситени мастни киселини, открити в мъховете и присъстват както в свободна форма, така и като част от фосфолипидите и триглицеридите. Палмитиновата киселина е основен компонент на мембраните и участва в съхранението на енергия, докато стеариновата киселина помага за поддържане на стабилността на мембраните, особено при ниски температури [41].

Сред ненаситените мастни киселини, особено важни са олеиновата (C18:1) и линоловата киселина (C18:2), които допринасят за еластичността на мембраните и за тяхната способност да функционират при променящи се външни условия. Наличието на α -линоленова киселина (C18:3), която е полиненаситена n-3 мастна киселина, е от

особено значение, тъй като тя участва в защитата срещу оксидантния стрес и подобрява устойчивостта към дехидратация и UV-лъчение. Дълговерижните полиненаситени мастни киселини, като арахидонова, ейкозапентаенова и докозахексаенова киселини, често се срещат в бриофитите. Тези растения натрупват ненаситени мастни киселини при ниски или минусови температури, за да поддържат клетъчната течливост [25, 38].

Мастнокиселинният състав е компонент от липидния профил на растенията, включително и на мъховете, и представлява ключов биохимичен показател за метаболитната активност, адаптационния потенциал и физиологичното състояние на клетките. Масните киселини участват в изграждането на клетъчните и органелните мембрани, осигуряват структурна цялост, играят роля в енергийния метаболизъм и са свързани с редица сигнални пътища в растителната клетка. Освен мастни киселини, мъховете съдържат и различни биологично активни вещества като витамини B2 и D3, стероли и токофероли, които играят роля при противовъзпалителни и антиоксидантни процеси [13]. При мъховете, както при други спорови растения, съставът на масните киселини отразява специфичните им адаптивни механизми, свързани с дехидратация, студоустойчивост и светлинен режим. Мастнокиселинният профил на липидите от мъховете се влияе значително от фактори на средата като светлина, температура и влажност [25]. При излагане на неблагоприятни условия (например суша или студ), мъховете променят съотношението на наситени към ненаситени мастни киселини, като увеличават дела на наситените за стабилизиране на мембраните. Тази биохимична пластичност е един от основните механизми, чрез които мъховете преживяват екстремни условия, характерни за техните местообитания [35].

В състава на липидите от *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune* са открити основно следните мастни киселини: от наситените - палмитинова (C16:0) за *Dicranum scoparium* – 16,54% и за *Polytrichum commune* – 37,86%, стеаринова (C18:0) – съответно – 3,01% и 6,05% и от ненаситените - олеинова (C18:1) – 3,62% и 38,02%, линолова (C18:2) – 6,9% и 7,758% и α -линоленова (C18:3) – 3,49% и 35,6 -72,2% [25, 26, 41]. Тези мастни киселини са ключови за поддържането на флуидността и функционалността на мембраните, особено в хлоропластите, където се осъществяват

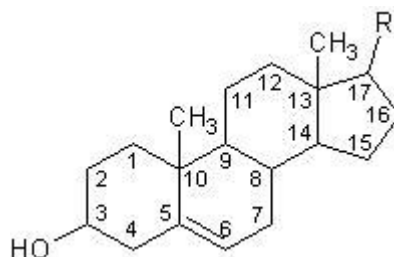
фотосинтетичните процеси. Ненаситени мастни киселини с брой на въглеродните атоми 20-24 са открити в много мъхове, като например в липидите на *Dicranum scoparium*, *D. japonicum* и във видове *Leucobryum*. Тези и други ненаситени мастни киселини представляват вискозни течности и се смята, че те са от съществено значение за термозащитата на тревопасни животни в студени климатични зони, като същевременно изпълняват и антиоксидантна функция [13]. В липидите от *Dicranum scoparium* се съдържат по-високи количества полиненаситени мастни киселини (18:2 (n-6), 18:3 (n-3), 20:3 (n-3), 20:5 (n-3)) мастна киселина) в сравнение с *Polytrichum commune*, което е свързано с по-сложната анатомична структура на вида и повишената му физиологична активност. Високото ниво не само на α -линоленова, но и на по-дълговерижни полиненаситени мастни киселини се счита за индикатор за високо еволюционно ниво и е свързано с по-голяма устойчивост при ниска влажност и с по-висока антиоксидантна активност (по DPPH-метод) на вида *Dicranum scoparium* [13, 16, 41].

Съществуват различия в профила на мастните киселини между отделните семейства мъхове, като вътрешносемейните вариации са по-малки в сравнение с тези между различните семейства. Наличието или отсъствието на конкретни мастни киселини може да служи като биохимичен маркер. Липидният състав може да се използва като допълнителен таксономичен критерий наред с морфологичните характеристики. Допълнителни изследвания върху липидите на бриофитите могат да разкрият специфични модели и маркерни мастни киселини, както и вариации в липидните класове, които да подпомогнат класификацията на мъховете [5].

В последните години мастните киселини, изолирани от мъховете привличат внимание не само от гледна точка на растителната физиология, но и като потенциален източник на биоактивни вещества. Някои мастни киселини, изолирани от мъхове, показват антимикробни и противотуморни свойства, което открива възможности за бъдещо използване на мъховете като суровина в биотехнологични и фармацевтични приложения [13, 14, 26, 35].

4.2. Стеролов състав на липиди при мъхове

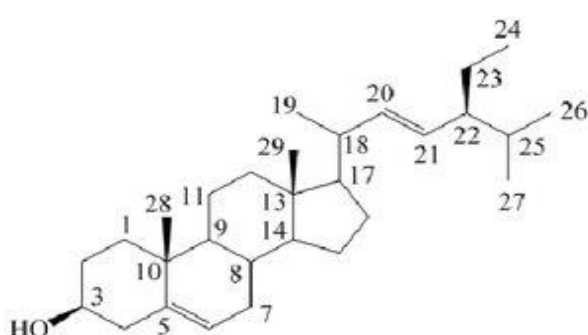
Стеролите са важна група биологично активни вещества, които присъстват в състава на всички растителни и животински организми, като изпълняват редица жизненоважни функции. Стеролите представляват едновалентни полициклични алкохоли от клас стероиди с обща формула:



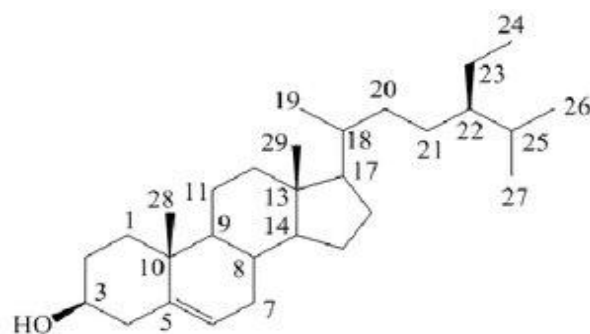
където на 10 и 13 позиция са метилови групи (CH_3), R на 17 позиция е въглеродороден радикал, а на 3 позиция е хидроксилна група. В природата съществуват растителни (фито), животински (зоо) и гъбични (мико) стероли.

При мъховете, които са сред най-примитивните сухоземни растения, стероловият състав заема особено място в биохимичния им профил. Тези съединения са от решаващо значение за стабилността на клетъчните мембрани, за регулацията на пропускливостта и флуидността на липидния бислой, както и за поддържането на нормалната физиологична функция на клетката. Те допринасят за тяхната устойчивост при механичен стрес, температурни колебания, обезводняване, на патогени и ултравиолетова радиация [47].

Стигмастеролът и β -ситостеролът са едни от най-разпространените стероли в мъховете.



Стигмастерол



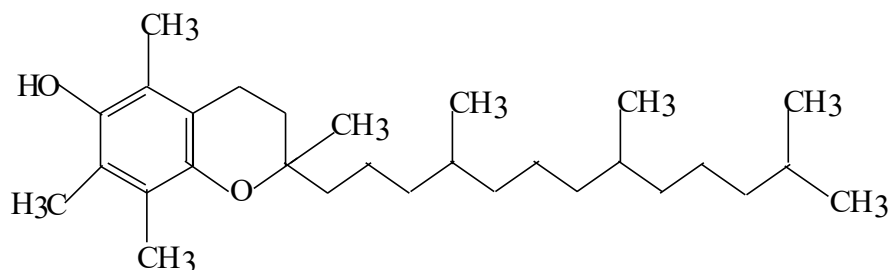
β -Ситостерол

В мъховете стеролите не са много проучени, но са открити редица стероли, сред които: кампестерол, 22-дихидробрасикастерол, стигмастерол, ситостерол, ланостерол, холестерол, 24-метил-17-стерол, 24-етилиден-17-стерол и други [19]. Съставът на стеролите в шест вида мъхове варира от 0,04 до 0,21% в сухото вещество. Стероли в мъховете са открити в четири вида: а) свободна форма, б) естери на мастни киселини, в) гликозиди и г) естерифицирани гликозиди [Klavinaq dis]. Основните фитостероли, идентифицирани при листостеблените мъхове, включително *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*, са стигмастерол, β -ситостерол, кампестерол и ергостерол, а в по-малки количества – брасикастерол, авенастерол и изофукостерол [16, 26, 34]. Сравнително рядко, но доказуемо, се откриват и производни на холестерол, което е интересен еволюционен белег, тъй като мъховете представляват преходна група между водораслите и висшите растения. При мъх *Physcomitrella patens* бяха анализирани свободните стероли, като е установено, че преобладаващ е стигмастеролът (44%), следван от кампестерол (40%) и ситостерол (16%), докато брасикастеролът и холестеролът присъстват в малки количества. Стеролови естери не са открити в този вид мъх [47]. Изследванията показват [16], че при липидите от мъх *Dicranum scoparium* съдържанието на стигмастерол може да достига значително високи стойности (7,88 $\mu\text{g/g}$) в сравнение с други мъхове, особено при екземпляри, събрани от сухи, открити местообитания. Тази концентрация се разглежда като адаптационен механизъм за поддържане на клетъчната цялост при ниска влажност и интензивна слънчева радиация. Неутралните липиди при *Dicranum scoparium* включват също така свободни и естерни форми на стероли, сред които най-често се откриват кампестерол, ситостерол и стигмастерол [25]. Изследванията и върху стероловия състав на мъховете показват, че те са интересен обект за изолирането на биоактивни природни съединения с фармакологичен потенциал.

4.3. Токоферолов състав на глицеридни масла от мъховете

Токоферолите и токотриенолите представляват съответно наситени и ненаситени бензапиранови производни. В природните липиди са идентифицирани 4 вида токофероли и 4 техни ненаситени производни. Известни са следните им форми: α

- токоферол (5, 7, 8 - триметилтокол), β - токоферол (5, 8 - диметилтокол), γ - токоферол (7, 8 - диметилтокол) и δ - токоферол (8 - метилтокол), като те се различават по броя и разположението на метиловите групи по хромановото ядро.



α - токоферол (5, 7, 8 - триметилтокол)

α -Токоферолът е най-биологично активната форма и най-често срещаната в растителните организми, включително и при представители на Bryophyta. Мъховете *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune* са доказано носители на високи концентрации от този изомер, което подчертава тяхната способност да се справят с екологичен стрес [13, 16, 26, 35].

Токоферолите, познати още като витамин Е, представляват група от мастноразтворими съединения, които играят съществена роля в защитата на клетките от оксидативен стрес. Те са основни липидоразтворими антиоксиданти и са изолирани от някои видове мъхове, където се синтезират в значителни количества. При растенията, включително и при мъховете, токоферолите са основни компоненти на антиоксидантната система, която предпазва липидните структури от увреждане, причинено от кислородните радикали, образувани по време на метаболизма и под въздействие на неблагоприятни фактори като UV-лъчение, високи температури или дехидратация. α -Токоферолът, който е открит в почти всички чернодробни мъхове, е разглеждан като значителен антиоксидантен агент за липидите на тези растения. Проучванията показват, че съдържанието на токофероли в мъховете е пряко свързано с интензивността на фотосинтезата, тъй като тези съединения се намират предимно в хлоропластните мембрани – особено в тилакоидите, където са подложени на действието на свободни радикали, генерирани в хода на фотохимичните реакции. Именно тук токоферолите действат като мощни липидни антиоксиданти,

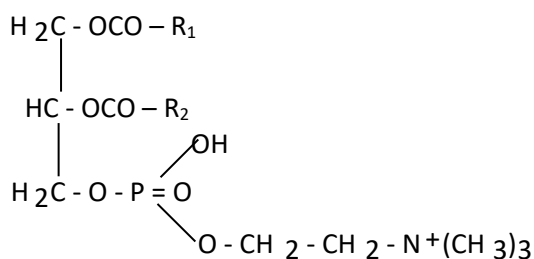
предотвратявайки пероксидацията на полиненаситените мастни киселини в мембраните и стабилизирайки структурата на липидния бислой [13].

При мъха от вид *Polytrichum commune*, наличието на фотосинтетични ламели по листата води до повишена токоферолна активност. Високото съдържание на α -токоферол (55,8 mg/100g) при този вид се разглежда като адаптационен механизъм към повишена светлинна интензивност и засушаване, характерни за откритите местообитания, в които той обичайно се среща [34]. Липидите при мъх *Dicranum scoparium* съдържат според Aydin 0,47 μ g/g α -токоферол, докато според Demirbag et al. – 4,65 μ g/g, като авторите са установили, че токоферолите подпомагат опазването на мембранната цялост при стресови условия, особено при дълги периоди на изсушаване и последващо възстановяване [16,26].

Токоферолите представляват интерес и от фармакологична гледна точка. Установено е, че екстракти от мъхове, богати на α - и γ -токоферол, проявяват противовъзпалителни, антиоксидантни и дермопротективни свойства, което отваря възможности за тяхното използване в козметични и медицински продукти. Съчетанието на токофероли с други биоактивни вещества в мъховете създава потенциал за разработване на натурални антиоксидантни системи [13].

4.4. Фосфолипиден състав на мъховете

Фосфолипидният профил на мъховете се характеризира с наличие на основните класове фосфолипиди, наблюдавани и при висшите растения. Сред тях се открояват фосфатидилхолин, фосфатидилетаноламин, фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин и фосфатидилглицерол [24]. Тези съединения участват в изграждането на клетъчните и вътрешноклетъчните мембрани на бактериалните, растителните и животинските клетки, като осигуряват структурна стабилност и регулират взаимодействията между клетката и околната среда [2]. Фосфатидилхолинът е един от най-разпространените фосфолипиди в клетъчните мембрани на мъховете.



Фосфатидилхолин (лецитин)

Съдържанието на фосфолипиди в различни видове мъхове и чернодробни мъхове показва силни вариации, например мъх *Sphagnum majus* съдържа 25,3%, а *Sphagnum fimbriatum* - 17,4% фосфолипиди [25]. Както е съобщено от Dembitsky et al. [22], фосфолипидите показват забележителни вариации, вариращи от 6,71% (*Mnium marginatum*) до 27,56% (*Brachythecium* sp.). Swanson et al. [51] са изследвали съдържанието на фосфолипиди в шест вида мъхове и са открили 8% от общите липиди в *Ceratodon purpureus*, 19% в *Tortula ruralis*, 13% в *Hypnum curvifolium*, 29% в *Mnium cuspidatum*, 23% в *Mnium punctatum* и 19% в *Hygrohypnum luridum*. Първият качествен анализ показва наличието на фосфатидилхолин и фосфатидилглицерол като основни фосфолипиди в два вида мъх: а именно *Mnium cuspidatum* и *Mnium medium*.

Съществен аспект на фосфолипидния състав е съдържанието на свързаните с фосфолипидите мастни киселини, включително дълговерижни полиненаситени мастни киселини. Установено е, че фосфолипидната фракция се отличава с по-високо съдържание на арахидонова и ейкозапентаенова киселини в сравнение с това на неутралните или гликолипидите и количеството им достига 15% в *M. polymorpha* [22]. В условията на стрес, включително UV-излъчване, дехидратация или засоляване, мъховете показват способност за реорганизация на фосфолипидния състав, като се наблюдава повишаване на дела на наситени мастни киселини или промени в относителното съдържание на фосфолипидните класове.

Изследванията върху липидния профил на мъховете имат не само теоретично, но и практическо значение. Част от установените съединения демонстрират антиоксидантни, антимикробни и противовъзпалителни свойства [26, 34, 41], което предизвиква засилен интерес към потенциалното им използване в сферата на

фармацията и козметиката. През последните години се наблюдава нарастваща научна активност, насочена към изследване на липидните екстракти от мъхове като основа за създаване на иновативни натурални продукти.

В научната литература има основно информация за общия химичен състав на различни видове мъх, както и за полифенолния състав на екстракти от тях. За съдържанието на биологично активните вещества (мастни киселини, стероли, токофероли и фосфолипиди) в глицеридните масла, изолирани от мъхове информацията е оскъдна. Поради което, интерес представлява освен определяне на общия химичен състав на мъховете, да се провеждат изследвания и върху липидния им състав с оглед по-пълна оценка на съдържанието на биологично активни вещества в тях и евентуалното им използване при разработването на нови натурални козметични продукти.

5. Цел и задачи

Цел на настоящата дипломна работа е да се изследва общия химичен състав на два вида мъх *Dicranum scoparium* Hedw. и *Polytrichum commune* Hedw., да се охарактеризират изолираните липиди по отношение на мастнокиселинен състав и съдържание на биологично активни вещества в тях (токофероли, стероли и фосфолипиди), както и да се оцени тяхното потенциално приложение в козметични продукти.

За целта е необходимо да бъдат решени **следните задачи**:

1. Да се определи общия химичен състав на два вида мъх *Dicranum scoparium* Hedw. и *Polytrichum commune* Hedw., с местообитание Пазарджишка област.
2. Да се охарактеризира груповия състав на липидите, изолирани от изследваните мъхове.
3. Да се определи мастнокиселинния състав на липидите, изолирани от тях.
4. Да се установи съдържанието и състава на стеролите и токоферолите.
5. Да се определи съдържанието и индивидуалния състав на фосфолипидната фракция на липидите, както и мастнокиселинния състав на основните фосфолипидни класове.
6. Да се приготви козметичен продукт с участието на масла, изолирани от изследваните мъхове.

III.МЕТОДИЧНА ЧАСТ

1. Материал за изследване

За провеждане на изследванията са използвани проби от два вида мъх – *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*, събрани от местност Атолука, намираща се на 4 km от с. Равногор, Пазарджишка област, Южна България, надморска височина 1450 m, координати: 41.964544° с. ш. 24.333331° и. д.



Dicranum scoparium Hedw.



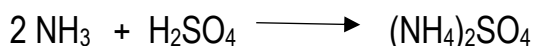
Polytrichum commune Hedw.

2. Използвани аналитични методи

2.1. Определяне на общ азот и общ протеин по метода на Келдал [4]

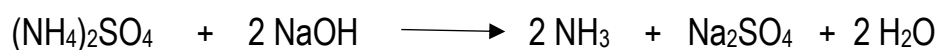
Същност на метода: Основава се на количественото определяне на амоняка, отделен при сернокиселата минерализация на белтъчния продукт. На базата на общия азот се изчислява съдържанието на общ протеин.

При загряване с концентрирана сярна киселина органичните съединения се окисляват до CO_2 и H_2O , а азотът се освобождава под формата на NH_3 и се свързва със сярната киселина като амониев сулфат:



За ускоряване на процеса се използват катализатори като медни и живачни соли, селенова смес, водороден пероксид и др.

Образуваият се амоняк се освобождава от сулфата с основа и се абсорбира в разтвор на борна киселина (H_3BO_4):



Начин на работа: Претегля се около $0,5 \pm 0,001$ g проба от мъха и количествено се прехвърля в епруветка от апарат на Келдал (Velp Scientifica). Прибавят се 2 g катализаторна смес (10 g Na_2SO_4 , 0,2 g CuSO_4 и 0,2 g Se), 10 ml концентрирана H_2SO_4 и 5 ml H_2O_2 . Нагрява се в продължение на 30 min при 420°C в нагревателен блок на апарат DK6. Пробата се охлажда до $50 - 60^\circ\text{C}$, добавя се 50 ml дестилирана H_2O и следва дестилация на NH_3 с водна пара. Амонякът се абсорбира в 4% разтвор на H_3BO_3 . Дестилацията продължава 5 min, като в приемната колба се събира 150 ml дестилат. Отделеното количество амоняк се определя чрез титруване с 0,1 N H_2SO_4 .

Изчисляване на резултатите: Изчисляването на общия азот (N, %) се извършва по формулата:

$$N = \frac{(V - V_1) \cdot F \cdot 0,0014 \cdot 100}{m}, \quad \%$$

където: V – обемът на 0,1 N H_2SO_4 , изразходван за титруване на пробата, ml

V_1 – обемът на 0,1 N H_2SO_4 , изразходван за титруване на празната проба, ml

F – фактор на 0,1 N H_2SO_4

m – масата на пробата, g

0,0014 – количество азот, съответстващо на 1 ml 0,1 N H_2SO_4

Изчисляването на общия протеин в % се извършва чрез умножаване на общия азот по коефициент (k) за преизчисляване на азота в протеин. Изследвания са показали, че голяма част от белтъците съдържат средно 16 % азот. От това следва, че количеството на белтъците може да се изчисли, като се умножи намереното азотно съдържание с фактора 6,25 ($100:16=6,25$).

$$\text{Белтъци} = N \cdot 6,25, \quad \%$$

2.2. Определяне на въглехидрати

Общото количество на въглехидрати (BX) се определя по формулата :

$$\text{BX, \%} = 100 - (\% \text{ Б} + \% \text{ М} + \% \text{ Вл} + \% \text{ П}),$$

където: %Б, %М, %Вл, %П – са количеството на протеини, масло, водно и пепелно съдържание в 100 g мъх.

2.2.1. Определяне на неразтворимите фибри (целулоза) [3]

Същност на метода: Методите за определяне на фибри са основани на устойчивостта на целулозата спрямо обикновените хидролизиращи средства – киселини и основи, които разлагат и разтварят голяма част от придружаващите я вещества, без почти да засягат самата целулоза. При тези методи заедно с целулозата се определят и съпътстващите я хемицелулози, лигнин и др.

Начин на работа: В чаша от 600 ml се притеглят 0,5 – 1 g от пробата и се заливат с 200 ml 1,25 % H_2SO_4 . Обемът на течността в чашата се маркира и се нагрява в продължение на 30 min, като с вряща вода постоянно се поддържа началния обем. След като нагряването се прекрати и утайката падне на дъното, горещата течност се изсмуква с фунийка, затворена с двоен пласт марля и съединена посредством смукална колба с помпа. Пробата се промива с 200 ml гореща вода. Утайката се прехвърля количествено в чаша от 600 ml и се залива с 200 ml 1,25 % КОН и се нагрява 30 min, като обемът се поддържа чрез доливане. След като приключи нагряването, горещата течност се филтрува през стъклен шотов филтър, промива се с гореща вода, след това със спирт и етер за обезводняване и се суши при температура 100 – 105 °C до постоянно тегло.

Изчисляване на резултатите: Съдържанието на фибри (X, %) се изчислява по формулата:

$$X = \frac{a}{m} \cdot 100, \quad \%$$

където: a – маса на фибрите, g

m – маса на изходната проба, g

2.3. Определяне масленото съдържание с апарат на Соксле [12]

Същност на метода: Основава се на извличане на маслото с органичен разтворител (най-често хексан или петролеев етер), отстраняване на разтворителя и тегловно определяне на маслото.

Начин на работа: В специална гилза се претеглят от 5 до $10 \pm 0,002$ g проба от мъха и се зарежда в екстрактора на апарата на Соксле. Добавя се необходимото количество хексан и колбата се заграва на водна баня. Времето на екстракция е между

8 - 12 h. След завършване на екстрахирането загряването се прекратява и се изважда колбата с мисцелата (разтвор на маслото в етера). За отстраняване на евентуално преминали фини частици от материала, разтворът се филтрува. Разтворителят се дестилира чрез изпаряване на ротационен вакуум изпарител, след което колбата с маслото се суши 30 min при 105 °C, темперира се до стайна температура в ексикатор и се претегля.

Изчисляване на резултатите: Масленото съдържание (M, %) се изчислява по формулата:

$$M = \frac{a}{m} \cdot 100, \quad \%$$

където: а – маса на маслото, g

m – маса на заредената проба, g

2.4. Определяне съдържанието на влага [3]

Същност на метода: Методът се състои в отделянето на влагата при нагряване до 100 – 105 °C и съдържанието ѝ се изразява като процент загуба в масата на предварително претеглената проба.

Начин на работа: В тегловно стъкло с диаметър 40 – 50 mm, предварително изсушено и претеглено до постоянна маса, се претегля $1,0 \pm 0,005$ g продукт и се суши 2 h при 105 °C. Тегловното стъкло след изваждане от сушилнята бързо се затваря, поставя се в ексикатор за темперирание до стайна температура и се тегли. Сушенето се повтаря по 30 min, докато разликата между две последователни претегляния не надвишава 0,006 g.

Изчисляване на резултатите: Съдържанието на влага (X, %) се изчислява по формулата:

$$X = \frac{m - m_1}{m_2} \cdot 100, \quad \%$$

където: m – маса на тегловното стъкло и пробата преди сушене, g

m₁ – маса на тегловното стъкло и пробата след сушене, g

m₂ – маса на изследваната проба, g

2.5. Определяне на пепелното съдържание [3]

Начин на работа: Претеглят се $1,0 \pm 0,001$ g от смляната проба мъх в предварително накален при $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ до постоянна маса порцеланов тигел и внимателно се нагрива на котлон, докато пробата се изсуши и овъгли. След това пробата се накалява в муфелна пещ при $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ до постоянна маса. Охлажда се в ексикатор и се тегли.

Изчисляване на резултатите: Съдържанието на пепел (X, %) се изчислява по формулата:

$$X = \frac{m - m_1}{m_2} \cdot 100, \quad \%$$

където: m – маса на тигела и пробата след изгаряне, g

m_1 – маса на тигела, g

m_2 – маса на изследваната проба, g

2.6. Определяне на енергийна стойност

Енергийната стойност (енергийно съдържание, калоричност) е количеството енергия на приетата храна, което се отделя при биологичното окисление на съдържащите се в нея въглеhidрати (В), мазнини (М), белтъци (Б), органични киселини и алкохоли. За да се определи енергийната стойност (ЕС) е необходимо да се определи общото количество в g на В, М и Б в 100 g продукт. След това количествата им се умножават по съответните енергийни еквиваленти (това е количеството енергия, което се отделя при биологичното окисление на 1 g от даден нутриент). Сумата от трите произведения представлява енергийната стойност на продукта.

$$ЕС = В \cdot 17 + М \cdot 38 + Б \cdot 17 \quad (\text{kJ}/100\text{g})$$

$$ЕС = В \cdot 4 + М \cdot 9 + Б \cdot 4 \quad (\text{kcal}/100\text{g})$$

В - съдържание на въглеhidрати (%);

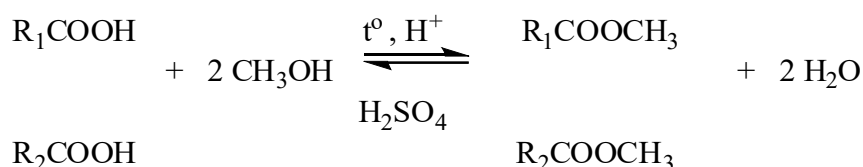
М - съдържание на мазнини (%);

Б - съдържание на белтък (%);

Енергийният еквивалент на въглеhidратите е 17 kJ (4 kcal), на мазнините е 38 kJ (9 kcal) и на белтъците 17 kJ (4 kcal).

2.7. Определяне на индивидуалния мастнокиселинен състав на триглицеридите [6, 7]

Същност на метода: Висшите мастни киселини предварително се естерифицират с нисши алкохоли, предимно метанол, с цел получаване на по-лесно летливи, при условията на анализа, метилови естери на мастните киселини:



Начин на работа: В ерленмайерова колба от 100 ml се поставят 50 - 100 mg масло. Прибавят се 1 ml петролеев етер и 5 ml метилираща смес (2 % сярна киселина в абсолютен метанол), пемза и естерификацията се провежда при кипене на обратен хладник в продължение на 2 h. Реакционната смес се прехвърля количествено в делителна фуния от 100 ml и метиловите естери се екстрахират двукратно с по 20 ml петролеев етер. Обединените етерни извлеци от двете екстракции се промиват с дестилирана вода до неутрална реакция, филтруват се през безводен натриев сулфат и разтворителят се отдестилира на вакуум изпарител. Получените метилови естери се пречистват чрез тънкослойна хроматография. Хроматографира се във вана с подвижна фаза петролеев етер : диетилов етер = 97 : 3. Ивицата на метиловите естери се проявява във вана с кристален йод. Ивицата се остъргва в хроматографска колонка и се елюира с 10 – 20 ml петролеев етер. След изпаряване на разтворителя метиловите естери на мастните киселини са готови за хроматографиране.

Определянето на индивидуалния мастнокиселинен състав става при следните условия:

- газов хроматограф HP 8860 с пламъково – йонизационен детектор
- капилярна колона DB Fast FAME с дължина 30 m и диаметър 0,25 mm
- газ – носител – азот със скорост 25 ml/min
- температура на инжектора и детектора – 270 и 300 °C
- температура на колоната – 70 °C в продължение на 1 min, увеличение до 180 °C със стъпка 6,0 °C/min, повишаване до 250 °C със стъпка 5,0 °C/min.

Индивидуалният състав на мастните киселини се определя чрез сравняване на получените времена на задържане от хроматограмата на анализираната смес с времената на свидетелите – метилови естери на мастните киселини. Количественият състав на мастните киселини в същата смес се определя от процентното съотношение между площите на отделните пикове в хроматограмата.

2.8. Определяне съдържанието на неосапуняеми вещества [11]

Същност на метода: Неосапуняемите вещества не реагират с алкална основа при условията на осапунването и се извличат с хексан от осапунената мазнина. Неосапуняемите вещества не се разтварят във вода.

Начин на работа: В колбата за осапунване се притеглят $1,0 \pm 0,001$ g масло, прибавят се 50 ml 2 M алкохолна КОН и пробата се осапунва при нагряване 1 h с обратен хладник на водна баня. Полученият сапунен разтвор се охлажда, към него се прибавят 50 ml дестилирана вода и количествено се прехвърля в делителна фуния. Неосапуняемите вещества се екстрахират шесткратно с по 50 ml хексан. Обединените етерните извлеци се промиват няколко пъти с 50% етилов алкохол за пълно отстраняване остатъците от сапун. Разтворителят се изпарява на вакуум изпарител и колбата с неосапуняемите вещества се суши при 105 °C до постоянно тегло.

Изчисляване на резултатите: Съдържанието на неосапуняеми вещества (НЕО, %) се определя по формулата:

$$HEO = \frac{a}{m} \cdot 100, \quad \%$$

където: а - маса на неосапуняемите вещества, g

m - маса на пробата масло, g

2.9. Определяне общото съдържание на стероли и техния индивидуален състав [8]

Принцип на метода: Спектрофотометричният метод за определяне съдържанието на стероли в масло се основава на количествено измерване на абсорбцията на цветни съединения с участието на стеролите.

Начин на работа: Получените неосапуняеми вещества се разтварят в 3 ml хлороформ (V_1) и 1 ml от този разтвор се нанася на ивица чрез накапване върху алкална плоча за тънкослойна хроматография. Хроматографира се във вана с подвижна фаза – хексан : диетилов етер = 1 : 1. Проявените с метанол млечнобели ивици на стеролите се очертават, остъргват се и се елюират с 30 ml хлороформ. Разтворителят се отдестилира на ротационен вакуум изпарител и стероловият остатък в колбата се разтваря в 2 ml хлороформ (V_2). 1 ml от този разтвор се поставя в колба и се добавят 1,8 ml чист хлороформ. Във втора колба за приготвяне на празна проба се отмерват 2,8 ml чист хлороформ, след което към двете проби се добавят в еднаква последователност, в камина, следните реагенти:

- 1) 0,4 ml ледена оцетна киселина
- 2) 2,0 ml 12 % разтвор на сулфосалицилова киселина в оцетна
- 3) 6,0 ml оцетен анхидрид
- 4) 0,8 ml концентрирана сярна киселина

Двете колби се оставят на тъмно 20 min, за пълното протичане на цветната реакция. Веднага след това се спектрофотометрират при 597 nm.

Изчисляване на резултатите: Съдържанието на стероли (S, %) в изследваното масло се изчислява по формулата:

$$S = \frac{C_s \cdot V_1 \cdot V_2}{m \cdot 1000000} \cdot 100, \quad \%$$

където: S – съдържание на стероли в изследваното масло, %

C_s – концентрация на стеролите в измервания разтвор, $\mu\text{g/ml}$

V_1 – обем хлороформ, в който е разтворена пробата, ml

V_2 – обем хлороформ, в който са разтворени пречистените стероли, ml

m – тегло на пробата масло, g

1000000 – коефициент за преизчисляването на μg в g

Индивидуалният състав на стероловата фракция е определен с помощта на газова хроматография при следните условия:

- газов хроматограф HP 8860 с пламъково – йонизационен детектор
- капилярна колона DB – 5 с дължина 25 m и диаметър 0,25 mm

- газ – носител – азот със скорост 25 ml/min
- температура на детектора – 320 °C
- температура на инжектора – 300 °C
- температура на колоната – 90 °C в продължение на 2 min, увеличение до 290 °C със стъпка 15 °C/min и след това до 310 °C със стъпка 4°C/min и задържане 10 min при тази температура.

Индивидуалният състав е идентифициран с помощта на свидетели и по относителното време на задържане.

2.10. Определяне на токоферолов състав [10]

Принцип на метода: Определянето на токофероли в растителни масла става чрез високо ефективна течно - течна хроматография с използването на флуоресцентен детектор. За детектирането им се използва свойството на токоферолите да флуоресцират при облъчване със светлинен лъч с определена дължина на вълната – 290 nm за възбуждане и 330 nm за емитиране.

Начин на работа: Работи се с течен хроматограф „Merck – Hitachi”, оборудван с флуоресцентен детектор и колона с размери 25 x 0,4 cm с неподвижна фаза Nucleosyl Si 50-5. Подвижната фаза е смес от n – хексан : диоксан = 96 : 4, скорост на подвижната фаза 1,5 ml/min при налягане 50 bar.

Приготвя се стандартен разтвор на смес от индивидуално чисти токофероли (α -, β -, γ - и δ -) с точна концентрация за всеки токоферол. Първо в инжектора се впръскват 20 μ l от стандартния разтвор на свидетелите, за да се установят времената на задържане на токоферолите. Приготвя се 1 или 2 % разтвор на маслото в n – хексан и следва инжектирането на 20 μ l от разтвора на изследваното масло. Накрая се сравняват времената на задържане от двата разтвора и се определя индивидуалния токоферолов състав на изследваната проба.

Изчисляване на резултатите: Общото количество токофероли (T, mg/kg) в масло се изчислява по формулата:

$$T = \frac{\sum \text{от площите}(\alpha + \beta + \gamma + \delta) \cdot K}{\text{площ на свидетеля}(\alpha)}, \text{ mg/kg}$$

където: T – общо съдържание на токофероли в масло, mg/kg

K – коефициент, получаващ се при пресмятане на разреждането на пробата с маслото и това на стандартния разтвор на свидетеля (10000 – при 1 % разтвор; 5000 – при 2 % разтвор).

2.11. Изолиране на фосфолипиди и определяне на индивидуалния фосфолипиден състав [9]

Принцип на метода: Фосфолипидите са изолирани от останалите липидни компоненти чрез екстракция по Фолч, пречистени от нежелани компоненти чрез утаяване със силно охладен ацетон.

Начин на работа: Фосфолипидите се разтварят в хлороформ : метанол (2 : 1) и 0,1 ml се нанася под формата на петно в долния ляв ъгъл на плочата. Хроматографира се първо във вана с подвижна фаза – система I (хлороформ : метанол : амоняк = 65 : 25 : 5). След изсушаването ѝ се хроматографира още веднъж с друга подвижна фаза – система II (хлороформ : ацетон : метанол : оцетна киселина : вода = 50 : 20 : 10 : 10 : 5). Плочата се проявява във вана с йод. Петната се очертават, остъргват се внимателно от повърхността на плочата и се прехвърлят количествено в суха епруветка. Прибавя се по 0,4 ml минерализиращ реактив (сярна киселина : перхлорна киселина = 1:1) и всички епруветки се поставят в пясъчна вана за изгаряне при $T = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$. След това към всяка епруветка се прибавят по 4,3 ml молибденов реактив и 0,5 ml редуциращ реактив. Поставят се на кипяща водна баня за 10 min за пълното протичане на цветната реакция, охлаждат се до стайна температура, след което се измерва абсорбцията на всеки от разтворите при $\lambda = 700\text{ nm}$.

Изчисляване на резултатите: Количеството на индивидуалните фосфолипиди (ФЛ, %) се изчислява по следната формула:

$$\Phi Л = \frac{12,46 \cdot A \cdot V_1 \cdot R}{V_2 \cdot 1000000 \cdot m} \cdot 100, \quad \%$$

където: A – измерената абсорбция

V_1 – количеството разтворител, в който са разтворени фосфолипидите, ml

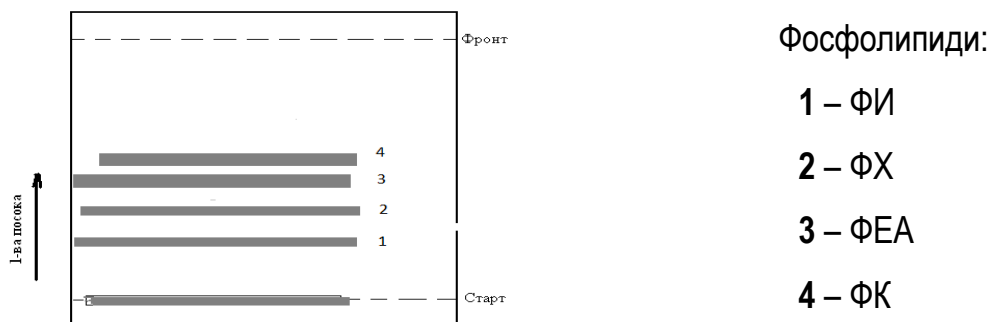
R – коефициент специфичен за отделните фосфолипиди: за фосфатидилхолин – 25,0; за фосфатидилетаноламин – 23,2; за фосфатидилинозитол – 28,3 и за всички останали фосфолипиди – 25,0

m – тегло на масло (семена), от които е изолиран фосфолипидния концентрат, g
 V_2 – количеството разтвор от фосфолипиди, нанесено на плочата за тънкослойна хроматография, ml
1000000 – степента на разреждане на пробата от фосфолипиди.

2.12. Определяне мастнокиселинен състав на индивидуалните фосфолипиди [7]

Методът за определяне на индивидуалния мастнокиселинен състав на фосфолипидите се основава на изолиране на фосфатидилхолина, фосфатидилинозитола, фосфатидилетаноламина и фосфатидните киселини, получаването на съответните метилови естери и тяхното идентифициране чрез газова хроматография.

Пречистените фосфолипиди се разтварят в хлороформ : метанол и от разтвора се нанася върху сулфатна плоча. Хроматографира се във вана с подвижна фаза – хлороформ : ацетон : метанол : оцетна киселина : вода = 50 : 20 : 10 : 10 : 5. След изсушаване плочата се поставя във вана с йод, ивиците на основните фосфолипиди се оцветяват в жълто и се очертават в следния ред:



Ивиците на индивидуалните фосфолипиди се елюират с около 50 ml хлороформ: метанол. Разтворителят се одестилира и сухият остатък от фосфолипиди се метилира по киселинния метод, описан в т. 2.7. Мастнокиселинният състав на фосфолипидите е определен чрез газова хроматография. Масните киселини, съдържащи се в отделните фосфолипиди са определени чрез сравняване на получените времена на задържане от хроматограмите с времената на задържане на свидетели от метилови естери на индивидуално чисти мастни киселини.

Количественият състав е определен на базата на съотношението на пиковите на метиловите естери на мастните киселини.

3. Методика за приготвяне на козметичен крем

Базовата рецептура за приготвянето на козметичния крем за хидратация е:

50 g алое вера гел

25 g кокосово масло

20 g бадемово масло

5 g пчелен восък

0,2 g етерично масло по избор (портокал)

Технология за приготвяне на емулсионните кремове

Кокосовото масло и пчелният восък се разтопяват на слаб огън. Добавя се бадемовото масло и сместа се хомогенизира, след което се охлажда. В друг съд се смесва гел от алое вера и етеричното масло. Постепенно сместа от маслата се добавя към алое вера гела при непрекъснато разбъркване до получаване на хомогенна консистенция. Така приготвеният продукт се прехвърля в непрозрачна стъклена опаковка и се съхранява на хладно.

За приготвянето на крем с добавка на масло от мъх е използвана същата рецептура и технология. В състава му е добавено 5 g глицеридно масло от мъх *Dicranum scoparium*, като е намалено количеството на кокосовото масло.

3.1. Анализи на приготвените продукти

3.1.1. Определяне съдържанието на влага [1]

Същност на метода: Методът се състои в отделянето на влагата при нагряване до 100 – 105 °C и съдържанието ѝ се изразява като процент загуба в масата на предварително претеглената проба (вж. т. 2.4).

3.1.2. Определяне на pH [1]

Определянето е извършено директно в продукта с помощта на pH метър със стъклен електрод (Adwa) AD12.

3.1.3. Определяне на емулсионна стабилност [1]

В епруветки се поставя определено количество от изследваните проби и се нагряват на водна баня за 20 min при 45°C. След това се подсушават и се центрофугират при 6000 rpm за 5 min. Наблюдава се дали се получава разслояване на продукта.

3.1.4. Определяне на оксидантна стабилност на масла и емулсионни продукти с апарат „Rancimat” [36]

Определянето се извършва при температура от 110 °C и скорост на подаване на въздух за окисление 20 l/h. Работи се с проби от емулсионния продукт от 1 g и 3 g полиетиленгликол. Необходимото количество проба се прехвърля в реакционните съдове на апарат „Rancimat”, които се поставят в гнездата на нагревателния блок и се свързват с измервателните съдове. След достигане на работната температура се включва подаването на въздуха и започва измерването. Вторичните продукти на окисление се улавят в съд, където електроди, потопени в бидестилирана вода отчитат проводимостта на разтвора. Сигналът се предава на компютър с печатащо устройство. Графично се регистрира промяната на проводимостта във времето. От получената графика на пишещото устройство се определя оксидантната стабилност, измервана чрез индукционен период в часове - това е времето, необходимо за започване на окислителни процеси при определени условия.

IV. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

1. Химичен състав на мъхове *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*

Химичният състав на растенията дава представа за тяхната физиология, хранителна стойност и способност да се съпротивляват на различни атмосферни условия и оксидативен стрес. Някои компоненти са силно свързани със специфични функции - въглехидратите са важни източници на енергия, протеините могат да участват в биосинтеза, фотосинтезата, транспорта и др., а липидите участват в регулирането на клетъчния метаболизъм [33, 46, 52]. Други компоненти на химичния състав, като минерално и водно съдържание се влияят най-вече от условията на околната среда, почвите, замърсяването и др. Ето защо установяването на основните компоненти на химичния състав на изследваните мъхове *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune* е от голямо значение. Данните за съдържанието на основните компоненти, определящи химичния състав изследваните мъхове (протеини, въглехидрати, липиди, минерални вещества, фибри и вода) са представени в Таблица 1.

Таблица 1

Общ химичен състав на мъхове *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*

Показатели	<i>Dicranum scoparium</i>	<i>Polytrichum commune</i>
Протеини, %	7,2±0,2	10,0±0,1
Липиди, %	2,8±0,3	1,5±0,3
Въглехидрати, %	73,3±0,9	73,6±0,8
» фибри, %	36,5±0,9	32,8±0,7
Пепел, %	5,8±0,2	3,3±0,2
Влага, %	10,9±0,2	11,6±0,2
Енергийна стойност, kJ/100g (kcal/100g)	1475 (347)	1478 (348)

Извършените анализи показват, че изследваните мъхове са с високо съдържание на общи въглехидрати, съответно 73,3% за *Dicranum scoparium* и 73,6% за *Polytrichum commune*, като съдържанието на фибри е забележително голям процент от

общите въглехидрати, около 45-50%. Получените резултати за общи въглехидрати са близки до тези при изследванията на Petkova et al. (2023) [44] за мъх *Hypnum cupressiforme* (76,41%), докато данните за общи въглехидрати представени от Klavina et al. при изследванията на 13 вида мъх от Латвия варират от 5,6 до 15,3 mg/100g сухо вещество. Мъх *Dicranum scoparium* се отличава с по-високо съдържание на влакнини (36,5%) в сравнение с това на вида *Polytrichum commune* (32,8%). Съдържанието на фибри в мъх *H. cupressiforme* е 30,81% и също представлява голям процент от общите въглехидрати (около 40% от всички въглехидрати) [44]. Изследваните мъхове се характеризират със средно съдържание на протеини (5-15%), съответно при *Dicranum scoparium* протеините са 7,2%, а при *Polytrichum commune* – 10,0%. При изследване химичния състав на мъх *Polytrichum commune*, Onur Okan е получил 11,64% за протеиновото му съдържание [41], което е близко до получените от нас резултати. И двата изследвани мъха са със забележително ниска концентрация на глицеридно масло. Мъхът *Dicranum scoparium* е с по-високо съдържание на липиди (2,8%), в сравнение с мъх *Polytrichum commune* (1,5%). Много по-висока стойност за съдържание на липиди е получил Okan [41], при изследване на състава на мъх *Polytrichum commune* (4,91%), събран от платото Каябашъ в Турция. Съдържанието на обща пепел и влага е съответно 5,8% и 10,9% при *Dicranum scoparium* и 3,3% и 11,6% при *Polytrichum commune*. Получените резултати за обща пепел са близки до тези при изследванията на Petkova et al. [44] за мъх *Hypnum cupressiforme* (3,36%), но са много по-ниски от тези на Onur Okan [41], които е получил 15,29% пепелно съдържание в *Polytrichum commune* и 17,84% за *Polytrichum formosom* Hedw. Според изследвания на Okan, 2023 върху мъх *Plagiochila asplenioides*, количествата на общ протеин, пепел и общи липиди са съответно 10,27%, 33,83% и 1,67% [42]. Установено е, че средното съдържание на протеини и мазнини в бриофитите е сравнимо с това на някои зърнени култури (от 9% до 25% и 1,9% до 7%), което предполага потенциалната им хранителна стойност и благоприятно влияние върху хранителната диета [41].

Въз основа на химичния състав на мъха е изчислена енергийната стойност на мъховете *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*. Поради високото съдържание на въглехидрати и много ниските нива на глицеридно масло, енергийната стойност е

изчислена на 347 и 348 kcal/100 g или 1475 и 1478 kJ/100 g. Тези стойности са много близки до изчислената енергийна стойност на друг вид мъх *Hypnum cupressiforme* Hedw. (346 kcal/100 g или 1469 kJ/100 g) [44].

2. Липиден състав на мъхове *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*

Изследван е липидния състав на глицеридно масло, изолирано от двата вида мъх, т. е. мастнокиселинния състав на маслото, състава на някои представители на неосапуняемите вещества (стероли и токофероли), съдържанието и състава на фосфолипидната фракция, както и мастнокиселинния състав на основните класове фосфолипиди.

Данните за съдържанието на биологично активни вещества (стероли, токофероли и фосфолипиди) в глицеридното масло, изолирано от изследваните видове мъхове са представени в таблица 2.

Таблица 2

Съдържание на биологично активни вещества в глицеридно масло, изолирано от изследваните видове мъх и в самия мъх

Показатели	<i>Dicranum scoparium</i>	<i>Polytrichum commune</i>
Неосапуняеми вещества, %		
• в маслото	18,9±0,4	53,9±0,5
• в мъх	0,5±0,04	0,8±0,02
Стероли, %		
• в НЕО	12,9±0,1	16,4±0,2
• в маслото	2,4±0,2	8,8±0,4
• в мъх	0,07±0,002	0,13±0,004
Токофероли, mg/kg		
• в маслото	77,5±5	227,4±10
• в мъх	2,2±0,2	3,4±0,2
Фосфолипиди, %		
• в маслото	13,4±0,2	48,4±0,1
• в мъх	0,38±0,1	0,73±0,2

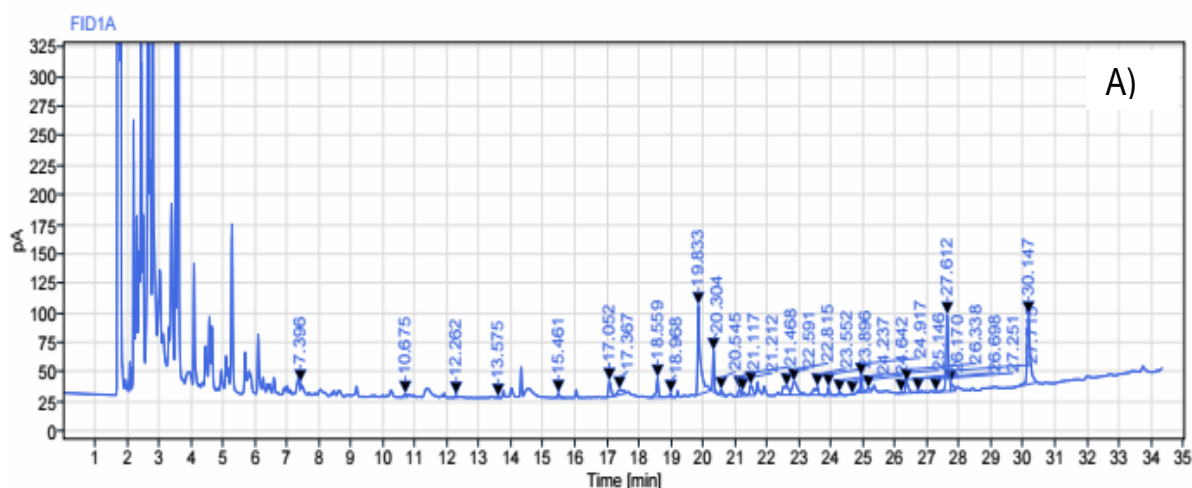
Количеството на неосапуняемите вещества в изследваното масло от мъх *Dicranum scoparium* е 18,9%, докато в маслото от мъх *Polytrichum commune* е около 2,5-3 пъти по-високо (53,9%), но съдържанието им в мъха е под 1%. Получените данни са много по-високи от данните за неосапуняемите вещества в сурови растителни масла според Codex Alimentarius (0,3 – 2,0%) [20]. Високи стойности за неосапуняеми вещества са получени също в масло от ший (9,8%) [27] и в масло от авокадо (76,9%) [29]. Съдържанието на стероли в маслото от *Dicranum scoparium* е 2,4% (0,07% в мъха), докато в маслото от мъх *Polytrichum commune* е значително по-високо - 8,8% (0,13% в мъха). Установено е 13,40 mg/g общо съдържание на стероли в мъх *Hypnum cupressiforme*, което според авторите е относително високо за невакуларните растения [45]. Получените от нас резултати за съдържанието на стероли в изследваните видове мъхове (съответно 70 mg/100g и 130 mg/100g) е сравнимо с общото количество на стероли в 19 вида ядки и семена, където то варира от 10 mg/100 g проба (в кестени) до 331 mg/100 g проба (в сусамови семена) [53]. Това предполага, че този вид растения могат да бъдат потенциален естествен източник на фитостероли. Прави впечатление по-високото съдържание на токофероли (витамин Е) в липидите и мъха *Polytrichum commune*, съответно 227,4 mg/kg и 3,4 mg/kg в сравнение с това в другия вид мъх *Dicranum scoparium* (77,5 mg/kg и 2,2 mg/kg). Общото съдържание на токофероли в маслото на двата изследвани мъха е много по-ниско от това при изследванията на мъх *Hypnum cupressiforme*, където общото количество на токоферолите в маслото е 1848,5 mg/kg и съответно в мъха е 23,9 mg/kg [44]. Klavina et al. [34] са установили двойно по-високо съдържание на токофероли 55,8 mg/100 g при изследване състава на мъх *Polytrichum commune* в сравнение с полученото от нас токоферолно съдържание за същия вид мъх (22,7 mg/100g). Значително по-ниско съдържание на токофероли в липидите на мъх *Dicranum scoparium* (4,65 µg/g) са установили и Demirbag et al. [26]. Съдържанието на фосфолипиди в маслото от мъх *Dicranum scoparium* е 13,4%, като съответно в мъха е 0,38% и е около два – три пъти по-малко, отколкото в липидите на мъх *Polytrichum commune* (48,4% и 0,73%). Dembitsky and Rezanka (1995) са установили съдържание на фосфолипиди от 8,3% до 30,6% в 13 изследвани сибирски мъха [24]. При изследване на 3 вида мъх от

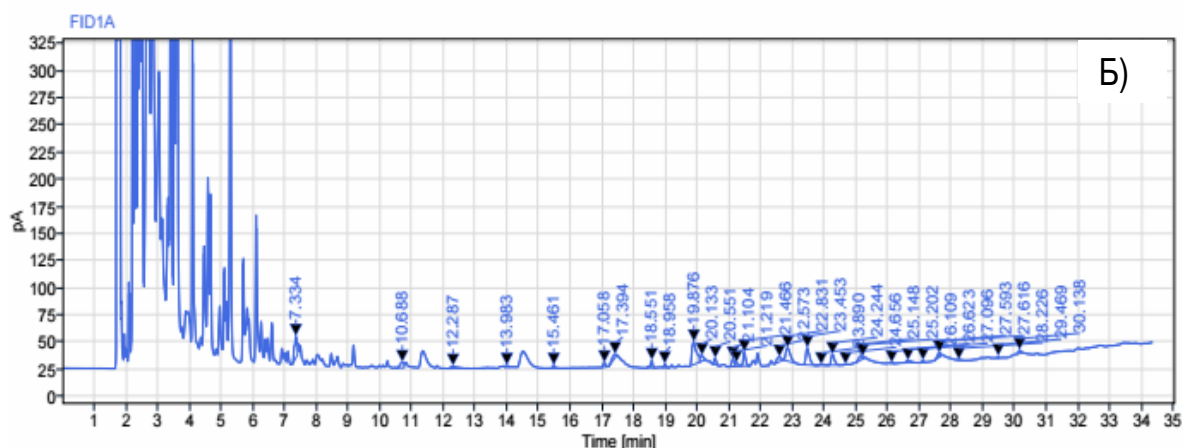
Европейската част на Русия (от семейство Dicranaceae – вид *Dicranum polysetum*; от семейство Entodontaceae - *Peurorium schreberi* и от семейство Polytrichaceae - *Polytrichumju niperinum*) е установено количество на фосфолипиди съответно 13,96%, 12,07% и 17,05% [22]. Съдържанието на фосфолипиди в мъх *Dicranum polysetum* е близо до това на определеното от изследвания от нас мъх *Dicranum scoparium*, но *Polytrichumju niperinum* е с три пъти по-ниско съдържание на фосфолипиди от *Polytrichum commune*, въпреки, че са от едно семейство. Изследваните мъхове са с ниско маслено съдържание, но са богати на биологично активни вещества и по-специално на стероли и фосфолипиди.

2.1. Мастнокиселинен състав на глицеридното масло

Мастнокиселинният състав на маслата може да варира в известни граници, в зависимост от местообитанието и климатичните условия, където се отглеждат съответните мъхообразни растения. Мастнокиселинният състав на маслото е определен чрез газова хроматография на съответните метилови естери.

На фигура 1 са показани хроматограми на метилови естери на мастни киселини от масло, изолирано от мъховете *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*.





Фигура 1. Хроматограми на метилови естери на мастни киселини от масло, изолирано от мъх *Dicranum scorarium* Hedw. (А) и от мъх *Polytrichum commune* Hedw. (Б)

В таблица 3 е представен мастнокиселинния състав на глицеридни масла, изолирани от изследваните мъхове.

Таблица 3

Мастнокиселинен състав на глицеридно масло, изолирано от изследваните видове мъх

Мастни киселини (МК), %		<i>Dicranum scorarium</i>	<i>Polytrichum commune</i>
C 8:0	Каприлова	0,6±0,1	9,3±0,5
C 10:0	Капринова	0,9±0,1	3,5±0,2
C 11:0	Ундеканова	0,5±0,1	2,0±0,3
C 12:0	Лауринова	0,1±0,0	0,9±0,2
C 13:0	Тридеканова	0,8±0,1	1,0±0,2
C 14:0	Миристинова	3,2±0,3	1,9±0,2
C 14:1	Миристолеинова	2,3±0,1	2,8±0,2
C 15:0	Пентадеканова	3,3±0,2	2,7±0,3
C 15:1	Пентадецениова	0,5±0,1	1,0±0,2
C 16:0	Палмитинова	20,3±0,3	17,5±0,5
C 16:1	Палмитолеинова	5,0±0,2	3,3±0,2
C 16:2 (n-6)	7,10-Хексадекадиенова	1,1±0,1	2,6±0,3
C 17:0	Хептадеканова	1,4±0,2	3,3±0,1
C 16:3 (n-3)	7,10,13-Хексадекатриенова	0,8±0,1	1,5±0,2
C 17:1	Хептадецениова	2,8±0,2	5,8±0,4

C 18:0	Стеаринова	4,0±0,3	3,5±0,3
C 18:1	Олеинова	6,1±0,1	10,2±0,2
C 18:2 (n-6)	Линолова	2,9±0,2	10,6±0,4
C 18:3 (n-6)	γ-Линоленова	1,6±0,2	0,7±0,1
C 18:3 (n-3)	α-Линоленова	0,8±0,1	6,2±0,2
C 18:4 (n-3)	Стеаридонова	0,1±0,0	0,2±0,0
C 20:0	Арахинова	2,2±0,2	2,6±0,3
C 20:1	Гадолеинова	1,0±0,1	0,5±0,1
C20:3 (n-6)	Ди-хомо-γ-линоленова	0,2±0,1	0,2±0,1
C 20:4 (n-6)	Арахидонова	2,7±0,2	1,3±0,1
C20:3 (n-3)	Ейкозатриенова	0,3±0,1	-*
C 22:0	Бехенова	0,1±0,0	0,7±0,2
C 20:5 (n-3)	Ейкозапентаенова	14,6±0,4	1,6±0,2
C22:1	Ерукова	1,8±0,2	0,9±0,1
C22:2 (n-6)	Докозациенова	-	0,1±0,0
C24:0	Лигноцеринова	-	0,2±0,0
C22:6 (n-3)	Докозахексаенова	18,0±0,5	1,4±0,3
n-3		34,6	10,9
n-6		8,5	15,5
Съотношение n-3/n-6		4,07	0,70

-* - неидентифициран

Основните мастни киселини в маслото от мъх *Dicranum scoparium* са наситената палмитинова (C16:0 - 20,3%) и есенциалните докозахексаенова (C20:6 (n-3) - 18,0%) и ейкозапентаенова (C20:5 (n-3) - 14,6%) киселини. Следващи по количество са мононенаситените олеинова (C18:1 - 6,1%), палмитолеинова (C16:1 - 5,0%), хептадеценива (C17:1 - 2,8%) и миристолеинова (C14:1 - 2,3%) киселини. Полиненаситените арахидонова, линолова, γ-линоленова и α-линоленова киселини са съответно 2,7%, 2,9%, 1,6% и 0,8%. От наситените мастни киселини в по-голямо количество са стеаринова (C18:0 - 4,0%), миристинова (C14:0 - 3,2%) и арахиновата (C20:0 - 2,2%) киселини. В състава е открито и наличието на 7,10-хексадекадиенова (C16:2 - 1,1%) и 7,10,13-хексадекатриенова (C16:3 - 0,8%) киселини, които са

характерни за липиди, изолирани от водорасли. Липидите от мъх *Dicranum scoparium* са богати на дълговерижни полиненаситени мастни киселини, които имат повече от две двойни връзки във въглеводородната верига (C20:4, C20:5 и C22:6). Те играят важна роля за правилното функциониране на мозъка, нервната система, имунните процеси и метаболизма на холестерола, както и притежават противовъзпалителни и антиоксидантни свойства [37]. Настоящият източник на тези киселини са рибените масла и водораслите, поради което бриофитите и по-специално мъх *Dicranum scoparium* могат да бъдат нов източник на полиненаситени мастни киселини.

Близки до нашите резултати са изследванията на Aydın за мастнокиселинния състав на липидите от мъх *Dicranum scoparium* [16], който е установил, че в състава им преобладава наситената палмитинова киселина (5,62%), последвана от α -линоленовата (3,61%), ейкозатриеновата (2,29%), линоловата (2,21%) и стеаринова (1,75%) киселини. Количеството на ейкозапентаеновата киселина (C20:5) е много ниско (0,35%) [16] в сравнение с полученото от нас (14,6%). При изследването на състава на мастните киселини на масло, изолирано от мъх *Dicranum scoparium* от Demirbag et al. беше установено, че олеиновата (C18:1 – 3,62 $\mu\text{g/g}$), линоловата (C18:2 – 6,9 $\mu\text{g/g}$), α -линоленовата (C18:3 (n-3) – 3,49 $\mu\text{g/g}$) и докозахексаенова (C22:6 – 6,31 $\mu\text{g/g}$) киселини са преобладаващите ненаситени мастни киселини, а палмитиновата (C16:0 – 16,54 $\mu\text{g/g}$) и бехеновата киселина (C22:0 – 16,56 $\mu\text{g/g}$) са основните наситени мастни киселини [26]. В състава на липидите на турския мъх в сравнително високо количество е и мононенаситената палмитолеинова киселина (C16:1 – 5,66 $\mu\text{g/g}$), която и при нашите изследвания също е 5,0% от общото количество мастни киселини.

Много по-различен мастнокиселинен състав е установен от Dembitsky (1993) при изследване на мастнокиселинния състав на масло, изолирано от мъх *Dicranum scoparium*. Установено е, че в състава на маслото преобладават мастни киселини с тройна връзка в молекулата, т.е. C18:3A, която е преобладаваща (83,7%), докато линоленовата (3,2%), палмитиновата (2,0%), арахидоновата (1,6%), линоловата (1,3%), олеиновата (1,1%) и стеариновата (0,9%) са в много ниски количества. Докато линоленовата киселина с двойни връзки е често срещана в растителните масла, то мастните киселини с тройна връзка се срещат по-рядко в природата, но в част от

изследванията на липиди, изолирани от различни видове мъхове е установено наличието на мастни киселини с тройни връзки [22, 23, 25]. Доказано е, че производството на полиненаситени мастни киселини се регулира от наличието на реактивни кислородни молекули, а комбинацията от тях и светлинен стрес може да инициира натрупване на ацетиленови мастни киселини [35].

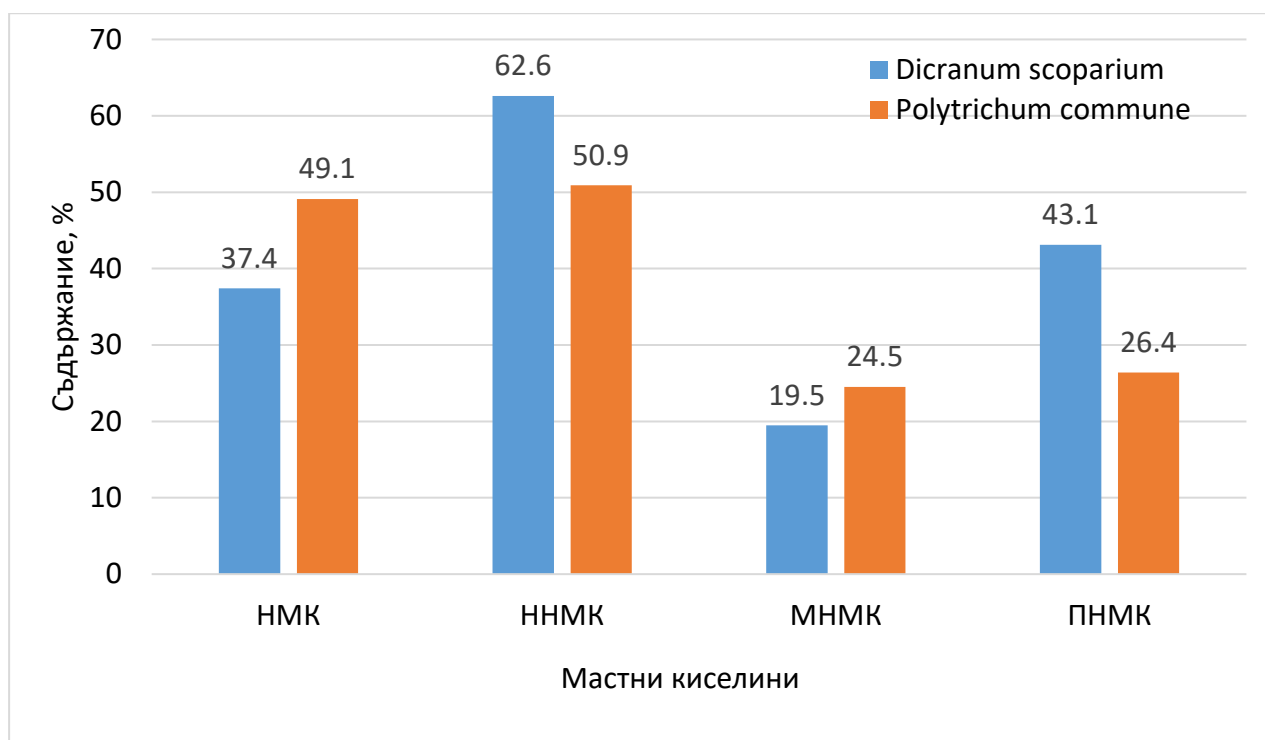
При липидите от мъх *Polytrichum commune* доминират наситената палмитинова (C16:0 - 17,5%), мононенаситената олеинова (C18:1 - 10,2%) и полиненаситените линолова (C18:2 - 10,6%) и α -линоленова (C18:3 - 6,2%). Незаменимите мастни киселини, като арахидонова, ейкозапентаенова и докозахексаенова са съответно 1,3%, 1,6% и 1,4%. В състава се забелязва значително количество на средноверижни наситени мастни киселини – каприлова (C8:0) и капринова (C10:0), съответно 9,3% и 3,5%. Мононенаситените мастни киселини са представени и от хептадеценевата (C17:1 - 5,8%), палмитолеиновата (C16:1 - 3,3%) и миристолеиновата (C14:1 - 2,8%). В състава на този мъх е открито и наличието на 7,10-хексадекадиенова (C16:2 - 2,6%) и 7,10,13-хексадекатриенова (C16:3 - 1,5%) киселини, които са в количества два пъти по-високи от тези в липидите на мъх *Dicranum scoparium*. Получените от нас резултати се различават с данните от различните литературни източници. Dembitsky (1993) и Anderson et al. (1974) са установили, че преобладаващи мастни киселини в липидите на мъх *Polytrichum commune* са линоленовата (23,37%), линоловата (20,15%) и олеиновата (14,24%) киселини. Есенциалните мастни киселини - арахидонова (7,4%) и ейкозапентаенова (2,3%) [5, 25] са в по-високо количество от установеното при нашите изследвания. Klavina et al. са установили при изследване на мастнокиселинния състав на липидите от мъх *Polytrichum commune*, че преобладават ненаситените мастни киселини – линоловата (C18:2 – 31,2 mg/100g), олеинова и линоленова (C18:1 + C18:3 (n-3) – 74,2 mg/100g), арахидоновата (C20:4 – 7,5 mg/100g) и ейкозапентаеновата (C20:5 – 5,5 mg/100g). От наситените мастни киселини в по-голямо количество са бехеновата (C22:0 – 28,7 mg/100g), стеариновата (C18:0 - 25,5 mg/100g) и хексакозанова (C26:0 – 6,2 mg/100g) киселина, а палмитиновата киселина (C16:0) е само 2,6 mg/100g [34]. Karunen (1977) [32] е анализирал мастнокиселинния състав на триглицеридните, моно- и диглицеридните фракции на липиди, изолирани от спорите

на *Polytrichum commune*. Установено е, че съставът на мастните киселини в липидните фракции се различава само количествено: диглицеридната фракция се характеризира с високо съдържание на α -линоленова киселина (C18:3 (n-3) - 67,7%), докато три- и моноглицеридните фракции съдържат около 35% линоленова киселина. Моноглицеридната фракция съдържа висок процент на миристиновата киселина (C14:0 - 18,4%). Във всички фракции съдържанието на полиненаситени C 20 киселини е ниско, варирайки от следи до 4,9%. Единствено по-високо съдържание е наблюдавано на арахидоновата киселина (C20:4) при моноглицеридната фракция – 4,9%, при триглицеридите – 3,4% и при диацилглицеридите – 1,1% [32]. Onur Okan [41] при изследване на мастнокиселинния профил на два вида мъх *Polytrichum formosum* Hedw., и *Polytrichum commune* Hedw. е установил по-високи концентрации на олеинова киселина (36,6% за *P. formosum* и 38,0% за *P. commune*) и палмитинова киселина (35,5% за *P. formosum* и 37,8% за *P. commune*). Anderson et al. [5] също са изследвали мастнокиселинен състав на мъх *Polytrichum commune* и са установили следните основни мастни киселини: линоленова (C18:3 – 23%), линолова (C18:2 – 20%), олеинова (C18:1 – 14%), арахидонова (C20:4 – 7%) и ейкозапентаенова (C20:5 – 2%). Според тези автори по отношение на състава на мастните киселини, някои мъхове показват сходство с водораслите, докато други са по-подобни на семенните растения. Те са установили, че мъховете, които растат в сухи местообитания, обикновено са морфологично по-сложни поради адаптации, които намаляват изпарението и те се ограничават в синтеза си главно до C18 киселини. Мъховете, растящи във вода или близо до нея, изглеждат морфологично по-прости, но те имат ненаситени C20 киселини във високи нива и в някои случаи имат и силно ненаситени C22 киселини. Както се вижда, има големи вариации в мастнокиселинните състави на липидите на мъхове в рамките на едно семейство, а разликите в нивата на определени киселини са още по-големи при мъхове от различни семейства, поради което авторите смятат, че мастнокиселинният състав може да се превърне в таксономичен критерий, допълващ морфологията на мъховете и тези данни ще подпомогнат класификацията на мъховете [5, 32].

Между получените от нас резултати и данните от литературните източници за състава и количествата на мастните киселини има различия, които най-вероятно се дължат на разликите в местообитанията на бриофитите, съответно различните климатични условия, както и на различията в хранителните вещества, тъй като разликата в използвания източник на въглерод влияе върху активността на ензимите, които са отговорни за синтеза на мастните киселини [16]. Според Окан условията на околната среда са основната причина видовете бриофити от един и същи вид, растящи на различни места, да съдържат различни количества и/или различни компоненти на мастни киселини, въпреки, че и полярността на разтворителите също влияе върху съотношението и откриването на компонентите на мастните киселини [41]. Lu et al. (2019) [37] посочват, че факторите на околната среда (температура, светлина, pH и хранене) играят ключова роля в производството на полиненаситени мастни киселини в бриофитите. Докладвано е, че съставът на мастните киселини е различен в различните части на изследваните мъхове и варира през целия годишен цикъл, като е установено, че е най-високи стойности се получават през периода на бързо развитие на репродуктивните части [35].

Сумата на n-3 полиненаситени мастни киселини при липидите на мъх *Dicranum scoparium* е 34,6%, а на n-6 – 8,5 % и съотношението n-3 : n-6 е 4,07. Сумата на n-3 полиненаситени мастни киселини в липидите на мъх *Polytrichum commune* е 10,9 %, на n-6 – 15,5 % и съответно съотношението на n-3 : n-6 е 0,70. Съотношението n-6 : n-3 е важен индикатор за ползите от консумираните растителни масла за здравето на човек, поради което се препоръчва да се консумират масла със стойност на това съотношение до 4. И двете изследвани масла са с оптимално съотношение на тези мастни киселини.

На фигура 2 е представено съотношението на наситени, ненаситени и в това число на мононенаситени и полиненаситени мастни киселини в маслата изолирани от изследваните мъхове.



Фигура 2. Съдържание на наситени (НМК), ненаситени (ННМК), мононенаситени (МНМК) и полиненаситени (ПНМК) мастни киселини в масла, изолирани от изследваните мъхове

От фигурата се вижда, че количеството на ненаситените мастни киселини е по-високо при липидите на мъх *Dicranum scoparium* (62,6%), като количеството на полиненаситените (43,1%) е по-високо от това на мононенаситените (19,5%) киселини в сравнение с това на липидите при мъх *Polytrichum commune*, съответно ненаситени мастни киселини – 50,9%, поли- и мононенаситени – 26,4% и 24,5%. Съотношението между наситени и ненаситени мастни киселини при липидите на *Dicranum scoparium* е приблизително 40 : 60, докато при мъх *Polytrichum commune* е 50 : 50.

Основните представители на полиненаситените мастни киселини в маслото от мъх *Dicranum scoparium* са есенциалните докозахексаенова (C20:6 (n-3) - 18,0%) и ейкозапентаенова (C20:5 (n-3) - 14,6%) киселини, докато арахидонова, линолова, γ-линоленова и α-линоленова киселини са представени в по-малки количества 2,7%, 2,9%, 1,6% и 0,8%. При липидите на мъх *Polytrichum commune* съотношението между количествата на мононенаситените и полиненаситените киселини е 1 : 1, мононенаситената олеинова (C18:1 - 10,2%) и полиненаситените линолова (C18:2 -

10,6%) и α -линоленова (C18:3 - 6,2%). Незаменимите мастни киселини, като арахидонова, ейкозапентаенова и докозахексаенова са съответно 1,3%, 1,6% и 1,4%.

Подобни резултати за количеството на наситените и ненаситените мастни киселини в липидите на мъх *Polytrichum commune* е представил Окан – наситени мастни киселини – 54,221% и ненаситени мастни киселини – 45,780% (мононенаситени – 38,022% и полиненаситени мастни киселини – 7,758%) [41], въпреки, че при нас моно- и полиненаситените мастни киселини са в съотношение 1:1. Aydin [16] при изследване на състава на липидите на *Dicranum scoparium* е установил наситени мастни киселини – 7,72 $\mu\text{g/g}$ (46%), мононенаситени – 0,32 $\mu\text{g/g}$ (2%) и полиненаситени – 8,71 $\mu\text{g/g}$ (52%) мастни киселини, т.е НМК : ННМК е 46% : 54, докато установеното от нас съотношение е 37,4 : 62,6.

2.2. Стеролев състав

Данните за индивидуалния състав на свободните стероли в маслото от изследваните мъхове са представени в таблица 4.

Таблица 4

Индивидуален стеролов състав на масло от изследваните мъхове

Стероли, %	<i>Dicranum scoparium</i>	<i>Polytrichum commune</i>
Холестерол	2,4 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,3
Брасикастерол	0,6 $\pm$ 0,1	-*
Кампестерол	30,4 $\pm$ 0,4	22,7 $\pm$ 0,5
24-метиленхолестерол	-	14,9 $\pm$ 0,3
Стигмастерол	27,3 $\pm$ 0,3	24,8 $\pm$ 0,4
Δ^7 -Кампестерол	0,1 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,1
β -Ситостерол	39,0 $\pm$ 0,5	25,3 $\pm$ 0,2
Δ^5 -Авенастерол	0,2 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1
Δ^7 -Стигмастерол	-	1,0 $\pm$ 0,1
Δ^7 -Авенастерол	-	0,6 $\pm$ 0,2

-* - неидентифициран

β - Ситостеролът е един от най-разпространените растителни стероли и е установено, че при липидите на двата вида мъх той е основен стерол, но относителните проценти се различават. В маслото от *D. Scoparium* β -ситостеролът е 39,0%, следван от кампестерол (30,4%) и стигмастерол (27,3%). При *P. Commune* β -ситостеролът е 25,3%, следван от стигмастерол (24,8%) и кампестерол (22,7%). За този вид мъх е характерно идентифицирането на 24-метилхлестерол (14,9%). Идентифицирани са също така малки количества Δ^7 -кампестерол (1,1%), Δ^7 -стигмастерол (1,0%) и Δ^7 -авенастерол (0,6%) в липидите на мъх *P. Commune*, докато в липидите на мъх *D. Scoparium* в малки количества са открити брасикастерол (0,6%), Δ^7 -кампестерол (0,1%), Δ^5 -авенастерол (0,2%). Холестеролът е зоостерол, но може да се открие и в малки количества в растенията. Липидите на *P. Commune* се характеризират с по-високо съдържание на холестерол (7,5%) в сравнение с това при мъх *D. Scoparium* (2,4%).

Нашите резултати за индивидуалния стеролов състав се различават от тези на други изследователи. Aydin [16] при изследване на липидите на мъх *Dicranum scoparium* е установил най-високо съдържание на стигмастерол (7,88 $\mu\text{g/g}$), последван от β -ситостерол (1,34 $\mu\text{g/g}$) и ергостерол (0,02 $\mu\text{g/g}$), докато Demirbag [26] за същия вид мъх е получил също различни резултати - стигмастерол (40,75 $\mu\text{g/g}$), последван от β -ситостерол (33,7 $\mu\text{g/g}$) и ергостерол (30,9 $\mu\text{g/g}$). Klavina et al. [34] при изследване на липидите от мъх *Polytrichum commune* е установила най-високо съдържание на кампестерол (453,7 mg/100g), последван от стигмастерол (408,8 mg/100g), β -ситостерол (153,8 mg/100g) и изофукостерол (44,6 mg/100g). Asakawa (2018) [13] също е установил, че чернодробните мъхове, принадлежащи към семейство Marchantiaceae, произвеждат фитостероли, като кампестерол, стигмастерол и β -ситостерол. Petkova et al. [45] при изследване на мъх от вида *H. Cupressiforme* са установили следния стеролов профил: стигмастерол (4,37 mg/g), β -ситостерол (4,29 mg/g) и кампестерол (3,34 mg/g). Заслужава да се отбележи, че при висшите растения видът стигмастерол присъства в по-малки количества, докато във всички анализирани досега бриофити той е преобладаващ [16, 26].

2.3. Токоферолов състав

Токофероловият състав е определен директно в маслото чрез високоефективна течно-течна хроматография с флуоресцентна детекция, като получените резултати са представени в таблица 5.

Таблица 5

Индивидуален токоферолов състав на масло, изолирано от изследваните мъхове

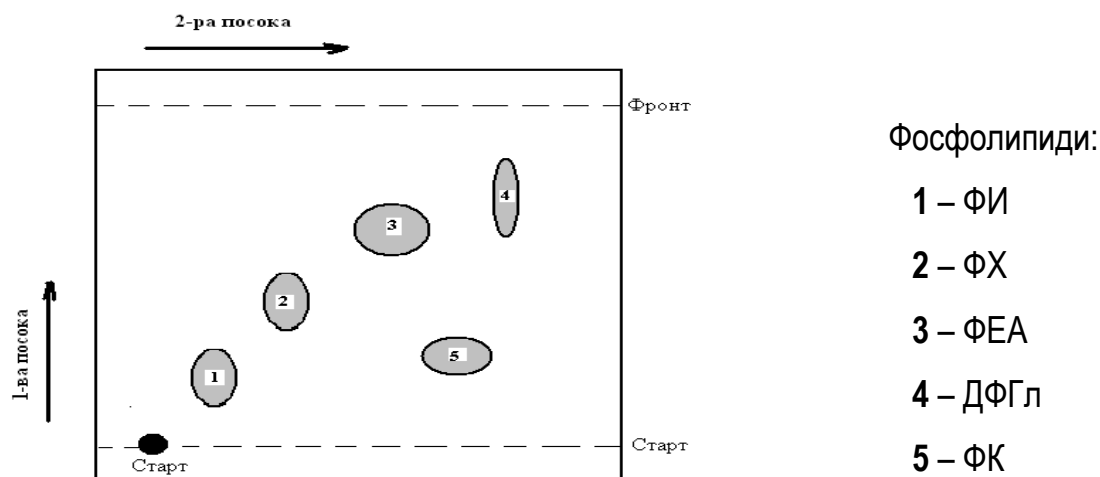
Токофероли, %	<i>Dicranum scoparium</i>	<i>Polytrichum commune</i>
α - токоферол	100±0,0	96,4±0,2
β - токоферол	-	3,6±0,2

В състава на токоферолите на липидите при мъх *Dicranum scoparium* е установен само α - токоферол (100%), докато при другия вид мъх *Polytrichum commune* са открити основно α - токоферол (96,4%) и в по-малко количество - β - токоферол (3,6%), което потвърждава данните, че мъховете от раздел Bryophyta акумулират предимно тази биологично най-активна форма.

Klavina et al. [34] е установила наличието на α-tocopherol + cholesterol в количество $55,8 \pm 4,8$ mg/100g в липидите на мъх *Polytrichum commune*, а липидите при мъх *Dicranum scoparium* съдържат според Aydin 0,47 µg/g α- токоферол, а според Demirbag et al. съдържанието на α- токоферола е 4,65 µg/g, [16, 26]. При анализиране на чернодробни мъхове е установено, че почти всички от тях съдържат α - токоферол и сквален. Специално чернодробните мъхове *Marchantia polymorpha*, *Pellia endiviifolia*, *Atrichum undulatum* и *Mnium hornum* произвеждат витамин Е (α - токоферол) и витамин К. α - Токоферолът, който е открит в почти всички чернодробни мъхове се предполага, че играе роля на антиоксидант за липидите в тези растения [13].

2.4. Фосфолипиден състав и мастнокиселинен състав на основните класове фосфолипиди

Индивидуалният фосфолипиден състав е определен спектрофотометрично, след разделяне на компонентите с помощта на двупосочна тънкослойна хроматография.



Фигура 3. Тънкослойна хроматограма на индивидуални фосфолипиди

Получените данни за състава на фосфолипидната фракция в липидите от изследваните мъхове са представени в таблица 6 .

Таблица 6

Индивидуален състав на фосфолипидната фракция, изолирана от изследваните мъхове

Фосфолипиди, %	<i>Dicranum scoparium</i>	<i>Polytrichum commune</i>
Фосфатидилхолин	10,3±0,3	10,2±0,2
Фосфатидилинозитол	30,1±0,5	27,3±0,3
Фосфатидилетаноламин	12,7±0,4	10,1±0,1
Фосфатидилсерин	11,0±0,2	10,7±0,5
Фосфатидни киселини	21,1±0,1	16,2±0,2
Лизофосфатидилхолин	-*	9,8±0,2
Лизофосфатидилетаноламин	7,6±0,3	9,5±0,2
Дифосфатидилглицерол	7,2±0,1	6,2±0,3

-* неидентифициран

Във фосфолипидната фракция, изолирана от мъховете *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune* са идентифицирани почти всички основни класове фосфолипиди. Във фосфолипидните им фракции преобладават фосфатидилинозитолът (30,1% и 27,3%) и фосфатидните киселини (21,1% и 16,2%). Останалите класове фосфолипиди са представени в почти едно и също количество – фосфатидилхолин – съответно 10,3

и 10,2%, фосфатидилетаноламин – 12,7% и 10,1% и фосфатидилсерин – 11,0 и 10,7%. Лизофосфатидилетаноламинът е 7,6% при вид *Dicranum scoparium*, докато при вид *Polytrichum commune* е 9,5%, а дифосфатидилглицеролът е съответно 7,2% и 6,2%. Забелязва се и високо съдържание на лизофосфатидилхолин само при вид *Polytrichum commune* (9,8%), което вероятно се дължи на започващия процес на хидролиза в тъканите на мъха и особено в техните липиди.

Качественият състав на фосфолипидната фракция на двата изследвани от нас мъха е близък, но по количествата на основните класове фосфолипиди се различава от данните за фосфолипидния състав на други видове мъхове. Dembitsky (1993) [25] е изследвал фосфолипидния състав на девет вида бриофити, събрани в Русия, около средната част на река Волга. Установено е, че основните класове фосфолипиди в бриофитните видове са фосфатидилхолин, фосфатидилглицерол и фосфатидилетаноламин. Съдържанието на фосфатидилхолин варира от 22,3% в *Atrichum angustatum* до 72,2% в *Anomodon viticulosus*, фосфатидилглицеролът варира от 8,8% в *Dicranum polysetum* до 28,9% в *Mnium marginatum*, фосфатидилетаноламинът - от 7,9 до 25,0% и фосфатидилсерин е открит във всички изследвани видове (с изключение на един вид *Pleurozium schreberi*), като най-високите нива са открити в чернодробния мъх *Marchantia polymorpha* (11,7%).

Dembitsky et al. (1993) [21] при изследване на липидния състав на три вида мъх от Европейската част на Русия са установили, че във фосфолипидната фракция са открити само шест фосфолипидни класа – фосфатидилхолин, фосфатидилетаноламин, фосфатидилглицерол, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол и лизофосфатидилетаноламин. Фосфатидилхолинът в два вида мъх (*Dicranum polysetum* и *Pleurozium schreberi*) надвишава 55%, а в третия вид (*Polytrichum juniperinum*) е 33,4%, вторият по количество е фосфатидилетаноламин (17,7-25,0%), следван от фосфатидилглицерол (8,8 – 20,8%). Фосфатидилсеринът е открит в малки количества само в *D. polysetum* и *P. juniperinum* съответно 2,9 и 4,2%.

Dembitsky et al. (1993) [22] анализират полярните липиди и мастните киселини от още три бриофита (*Atrichum angustatum*, *Brachythecium* sp. *Marchantia polymorpha*), взети от басейна на река Волга. Сред класовете полярни липиди са открити седем

фосфолипида: фосфатидилглицерол, фосфатидилетаноламин, лизофосфатидилетаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилхолин, неидентифициран полярен липид, съдържащ фосфор и диацилглицеротриметилхомосерин. Фосфатидилхолинът варира от 18,3% в *Marchantia polymorpha* до 36,0% в *Brachythecium* sp. и е основният фосфолипид. Особен интерес представлява откриването на диацилглицеротриметилхомосерин във всички проби от бриофити, като количеството му варира от 13,8% в *Brachythecium* sp. до 20,8% в *A. angustatum*, тъй като той се наблюдава в някои микроводорасли, морски зелени водорасли и папрати.

При изследване на липидния състав на мъх вид *Hypnum cupressiforme* Petkova et al. (2023) [44] са установили, че основните фосфолипиди във фосфолипидната фракция са фосфатидилхолин (19,9%), фосфатидилинозитол (19,8%) и фосфатидилсерин (17,0%). Другите компоненти на фосфолипидите също присъстват в значителни количества от 15,1% (фосфатидни киселини) до 15,7% (фосфатидилетаноламин).

Определен е и мастнокиселинния състав на основните класове фосфолипиди (фосфатидилинозитол, фосфатидилхолин, фосфатидилетаноламин и фосфатидни киселини). Данните от получените резултати са представени в таблица 7.

Таблица 7

Маснокиселинен състав на индивидуалните фосфолипиди, изолирани от мъхове

Масни киселини (МК), %		<i>Dicranum scoparium</i>				<i>Polytrichum commune</i>			
		ФИ	ФХ	ФЕА	ФК	ФИ	ФХ	ФЕА	ФК
С 8:0	Каприлова	0,7±0,1	0,2±0,0	0,4±0,1	0,2±0,0	0,1±0,0	0,6±0,1	1,3±0,2	0,4±0,1
С 10:0	Капринова	1,7±0,2	5,3±0,3	10,4±0,2	2,8±0,2	1,4±0,1	1,3±0,1	1,6±0,2	4,8±0,1
С 11:0	Ундеканова	0,1±0,0	1,1±0,1	2,8±0,3	1,4±0,1	0,5±0,1	0,3±0,0	0,5±0,1	2,5±0,3
С 12:0	Лауринова	1,1±0,1	2,2±0,2	2,3±0,1	2,7±0,3	0,9±0,1	2,2±0,1	3,5±0,4	1,7±0,1
С 13:0	Тридеканова	0,4±0,1	0,5±0,1	1,2±0,1	0,9±0,2	0,5±0,1	0,4±0,0	1,1±0,1	0,4±0,1
С 14:0	Миристинова	1,6±0,3	1,4±0,1	1,9±0,2	5,7±0,3	1,0±0,2	1,1±0,1	1,5±0,3	1,5±0,1
С 14:1	Миристолеинова	0,3±0,1	0,2±0,0	0,3±0,1	0,2±0,0	0,1±0,0	0,4±0,1	0,3±0,0	0,2±0,0
С 15:0	Пентадеканова	2,4±0,2	0,2±0,1	0,1±0,0	0,6±0,1	0,5±0,1	1,4±0,1	1,5±0,2	0,2±0,1
С 15:1	Пентадеценова	0,5±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	0,3±0,0	2,5±0,3	0,3±0,0	0,8±0,1	0,3±0,0
С 16:0	Палмитинова	53,9±0,4	60,3±0,5	43,4±0,3	52,9±0,2	56,6±0,5	52,3±0,3	55,7±0,5	40,6±0,4
С 16:1	Палмитолеинова	0,4±0,1	0,2±0,0	0,5±0,1	0,7±0,2	0,4±0,1	0,9±0,1	1,3±0,2	0,4±0,1
С 16:2 (n-6)	7,10-Хексадекадиенова	-*	-	-	-	-	-	0,3±0,1	-
С 17:0	Хептадеканова	16,3±0,4	3,5±0,1	6,2±0,2	2,2±0,1	1,2±0,2	1,2±0,1	0,9±0,1	13,8±0,3
С 16:3 (n-3)	7,10,13-Хексадекатриенова	0,6±0,1	0,7±0,2	3,2±0,1	1,7±0,2	0,9±0,1	1,1±0,1	0,2±0,0	2,2±0,2
С 17:1	Хептадеценова	1,0±0,2	0,4±0,1	1,2±0,2	1,0±0,1	1,0±0,2	1,2±0,2	2,6±0,3	0,8±0,1
С 18:0	Стеаринова	1,9±0,3	2,8±0,2	4,8±0,3	3,6±0,2	1,7±0,1	2,8±0,2	3,6±0,3	2,3±0,1
С 18:1	Олеинова	7,3±0,3	5,0±0,2	6,3±0,3	5,9±0,4	17,1±0,3	9,2±0,2	8,8±0,3	13,7±0,2

C 18:2 (n-6)	Линолова	4,4±0,2	4,4±0,1	5,0±0,3	4,6±0,2	8,1±0,1	7,5±0,4	8,6±0,3	6,5±0,2
C 18:3 (n-6)	γ-Линоленова	-	-	0,3±0,0	0,5±0,1	0,1±0,0	1,1±0,1	1,5±0,3	0,7±0,1
C 18:3 (n-3)	α-Линоленова	3,7±0,1	5,2±0,2	0,9±0,1	1,0±0,2	1,6±0,3	4,5±0,4	1,1±0,1	1,0±0,1
C 18:4 (n-3)	Стеаридонова	-	0,2±0,0	0,1±0,0	-	0,2±0,0	-	-	-
C 20:0	Арахидонова	-	-	0,1±0,0	1,7±0,2	0,4±0,1	6,5±0,2	0,2±0,0	1,7±0,3
C 20:1	Гадолеинова	-	-	-	-	0,1±0,0	-	-	-
C 20:4 (n-6)	Арахидонова	0,4±0,1	-	0,3±0,0	-	0,4±0,1	0,2±0,0	-	2,7±0,2
C20:3 (n-3)	Ейкозатриенова	-	0,3±0,1	-	-	-	-	-	-
C 22:0	Бехенова	-	-	0,2±0,0	3,8±0,3	0,1±0,0	0,8±0,1	0,3±0,0	0,3±0,1
C 20:5 (n-3)	Ейкозапентаенова	-	-	-	-	0,1±0,0	0,2±0,1	0,1±0,0	
C22:1	Ерукова	-	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,6±0,1	0,8±0,2	-	1,1±0,1
C22:2 (n-6)	Докозациенова	-	-	-	-	-	-	-	0,2±0,0
C24:0	Лигноцеринова	-	-	-	1,6±0,3	-	0,5±0,1	0,7±0,1	-
C22:6 (n-3)	Докозахексаенова	1,3±0,2	5,2±0,1	7,6±0,2	3,9±0,1	1,9±0,2	1,2±0,1	2,0±0,2	-

ФИ – фосфатидилинозитол; ФХ – фосфатидилхолин; ФЕА – фосфатидилетаноламин; ФК – фосфатидни киселини

-* - неидентифицирани

Установено е, че палмитиновата киселина преобладава в мастнокиселинния състав на всички основни фосфолипидни класове (при мъх *Dicranum scoparium* – от 43,4 до 60,3%; при мъх *Polytrichum commune* – от 40,6 до 56,6%), следващи по количество е олеиновата (при мъх *Dicranum scoparium* – от 5,0 до 7,3%; при мъх *Polytrichum commune* – от 8,8 до 17,1%) и линоловата (при мъх *Dicranum scoparium* – от 4,4 до 5,0%; при мъх *Polytrichum commune* – от 6,5 до 8,6%) киселина. От наситените мастни киселини в количество от 2 до 5% е представена и стеариновата (при мъх *Dicranum scoparium* – 1,9 до 4,8%; при мъх *Polytrichum commune* – от 1,7 до 3,6%) киселина. Забелязва се по-голямо количество на хептадекановата киселина (C17:0) във фосфатидилинозитола (16,3%) и фосфатидилетаноламина (6,2%) и на каприновата киселина (C10:0) във фосфатидилетаноламина (10,4%) и фосфатидилхолина (5,3%) на мъх *Dicranum scoparium*. Наблюдава се и по-голямо количество на хептадекановата киселина (C17:0) във фосфатидните киселини (13,8%) при мъх *Polytrichum commune*. Количеството на есенциалната докозахексаенова киселина в изследваните фосфолипидни класове варира от 1,3 до 7,6% при мъх *Dicranum scoparium* и от 1,2 до 2,0% при мъх *Polytrichum commune*, което показва, че и фосфолипидите на мъх *Dicranum scoparium* са по-богати на тази есенциална мастна киселина, както и триглицеридите. Останалите мастни киселини са представени в незначителни количества (0,1 – 1,0 %).

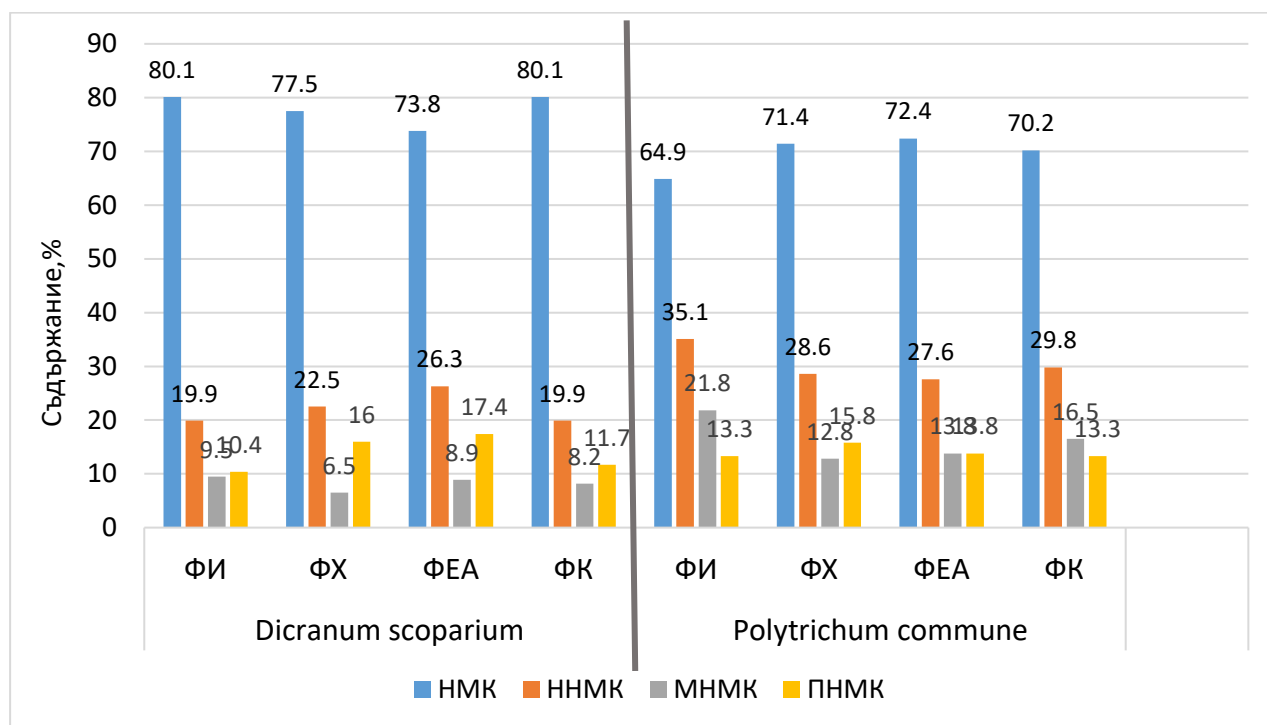
Подобни на нашите изследвания са съобщени в монографията на Dembitsky (1993) [25], където е описан мастнокиселинния състав на отделни фосфолипидни класове - фосфатидилглицерол, фосфатидилетаноламин и фосфатидилхолин в два вида мъх, *Pogonatum urnigerum* и *Fissidens adianthoides*. Основните мастни киселини във фосфатидилглицерола са съответно палмитиновата (C16:0 - 23,8 и 16,5%) и арахидоновата (C20:4(n-6) - 24,4 и 18,5%) киселини, фосфатидилетаноламинът от *F. adianthoides* съдържа висок процент хомо- α -линоленова киселина (C20:3 (n-3) - 13,3%), а фосфатидилхолинът - арахидонова киселина (C20:4 - 33,3%).

При мъх *Dicranum scoparium* се наблюдава тенденция на нарастване на съдържанието на палмитинова киселина в посока фосфатидилетаноламин – фосфатидни киселини – фосфатидилинозитол – фосфатидилхолин, на олеиновата

киселина в посока фосфатидилхолин – фосфатидни киселини – фосфатидилетаноламин – фосфатидилинозитол и на линоловата киселина в посока фосфатидилинозитол – фосфатидилхолин – фосфатидни киселини – фосфатидилетаноламин. Съдържанието на есенциалната докозахексаенова киселина нараства в посока фосфатидилинозитол – фосфатидни киселини – фосфатидилхолин – фосфатидилетаноламин.

При мъх *Polytrichum commune* се наблюдава тенденция на нарастване на съдържанието на палмитинова киселина в посока фосфатидни киселини – фосфатидилхолин – фосфатидилетаноламин – фосфатидилинозитол, на олеиновата киселина в посока фосфатидилетаноламин – фосфатидилхолин – фосфатидни киселини – фосфатидилинозитол и на линоловата киселина в посока фосфатидни киселини – фосфатидилхолин – фосфатидилинозитол – фосфатидилетаноламин. Съдържанието на есенциалната докозахексаенова киселина нараства в посока фосфатидилхолин – фосфатидилинозитол – фосфатидилетаноламин.

На фигура 4 е представено съотношението между наситени и ненаситени мастни киселини в основните фосфолипидни класове в изследваните два мъха.



Фигура 4. Съдържание на наситени (НМК), ненаситени (ННМК), мононенаситени (МНМК) и на полиненаситени (ПНМК) мастни киселини в основните фосфолипидни класове на изследваните два мъха

Количеството на наситените киселини в изследваните фосфолипидни класове при мъх *Dicranum scoparium* нараства в посока фосфатидилетаноламин (73,8%), фосфатидилхолин (77,5%), фосфатидилинозитол и фосфатидни киселини (80,1%). В посочения ред се наблюдава намаление на съдържанието на ненаситените мастни киселини. Количеството на мононенаситените мастни киселини в основните фосфолипидни класове е почти от един и същ порядък (6,5 – 9,5%), докато това на полиненаситените мастни киселини нараства в посока фосфатидилинозитол (10,4%) – фосфатидни киселини (11,7%) – фосфатидилхолин (16,0%) – фосфатидилетаноламин (17,4%).

Количеството на наситените киселини във изследваните фосфолипидни класове при мъх *Polytrichum commune* нараства в посока фосфатидилинозитол (64,9%), фосфатидни киселини (70,2%), фосфатидилхолин (71,4%) и фосфатидилетаноламин (72,4%). В посочения ред се наблюдава намаление на съдържанието на ненаситените мастни киселини. Количеството на мононенаситените мастни киселини в основните фосфолипидни класове е най-високо при фосфатидилинозитола (21,8%), последвано от това при фосфатидните киселини (16,5%), на фосфатидилетаноламина (13,8%) и на фосфатидилхолина (12,8%). Делът на полиненаситените мастни киселини нараства в посока фосфатидилинозитол и фосфатидни киселини (13,3%), фосфатидилетаноламин (13,8%) и фосфатидилхолин (15,8%).

В сравнение с мастнокиселинния състав на глицеридното масло се наблюдават големи различия. В мастнокиселинния състав на глицеридните масла преобладават ненаситените мастни киселини (при мъх *Dicranum scoparium* - 62,6%, при мъх *Polytrichum commune* - 50,9%), докато в мастнокиселинния състав на изследваните фосфолипидни класове преобладават наситените мастни киселини (при мъх *Dicranum scoparium* – 73,8 – 80,1%, при мъх *Polytrichum commune* - 64,9 – 72,4%). Съотношението между наситени и ненаситени мастни киселини при липидите на мъх *Dicranum scoparium* е приблизително 40 : 60, докато при мъх *Polytrichum commune* е 50 : 50, докато при изследваните фосфолипидни класове е около 80 : 20 при мъх *Dicranum scoparium* и около 70 : 30 при мъх *Polytrichum commune*. Установено е, че има значителни разлики и в съотношението на съдържанието на мононенаситени и

полиненаситени мастни киселини в глицеридните масла (при мъх *Dicranum scoparium* – МНМК : ПНМК = 19,5 : 43,1%, при мъх *Polytrichum commune* – МНМК : ПНМК=24,5 : 26,4%) и в основните фосфолипидни класове (при мъх *Dicranum scoparium* – МНМК : ПНМК = 6,5 – 9,5 : 10,4 - 17,4%, при мъх *Polytrichum commune* – МНМК : ПНМК = 12,8 – 21,8 : 13,3 – 15,8%).

Тези различия могат да се обяснят с различните етапи на биосинтез на мастни киселини от една страна на фосфолипидите и на триацилглицеролите от друга. На първия етап от биосинтеза се синтезират основно наситени мастни киселини, както и фосфолипидите в реда фосфатидилинозитол, фосфатидилетаноламин и фосфатидни киселини и накрая се синтезират триацилглицеролите. При това положение в молекулите на фосфолипидите се включват повече наситени мастни киселини, най-напред във фосфатидилинозитола, а след това във фосфатидилетаноламина, фосфатидните киселини и накрая в триацилглицеролите, когато нараства и интензивността на синтез на ненаситени мастни киселини [40].

3. Приложение на липидите от мъх *Dicranum scoparium* в козметични продукти

Подробните изследвания на химичния и липиден състав на мъх *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune* показват, че и двата вида имат потенциал на източник на биологично активни вещества и по-специално на есенциални мастни киселини, стероли и фосфолипиди. Специално в състава на липидите от мъх *Dicranum scoparium* са идентифицирани високи количества на дълговерижни полиненаситени мастни киселини (C20:4 - 2,7%, C20:5 - 14,6% и C22:6 - 18,0%), които притежават противовъзпалителни и антиоксидантни свойства. Нашите изследвания подчертават неизползвания биоактивен потенциал на бриофитите, както и, че тези два вида мъх могат да бъдат източници на ценни биологично активни вещества, особено за козметичната и фармацевтичната индустрия. Именно поради високото съдържание на омега-3 мастни киселини в глицеридното масло от мъх *Dicranum scoparium*, то бе избрано да се вложи в състава на козметичен крем. Омега-3 мастните киселини подобряват нивата на хидратация на кожата и подсилват бариерната функция на

кожата, като не позволяват кожата да се изсуши. Смята се също, че омега-3 киселините намаляват производството на себум, поради което са подходящи и за мазна кожа. Предпазват кожата и от ултравиолетовите лъчи, които предизвикват появата на фини линии, бръчки, пигментация и др. Те успокояват кожата, предотвратяват дразненето, възпаленията и зачервяванията, причинени от външни фактори. Това се дължи на противовъзпалителните свойства на киселините.

Приготвени са два емулсионни крема по описаната рецептура и методика – контрола и крем, съдържащ глицеридно масло от мях *Dicranum scoparium*.



Контрола



Крем с липиди от мях *Dicranum scoparium*

Фигура 5. Приготвени емулсионни кремове

Получените емулсионни продукти се характеризират със следния цвят – контролата със снежно бял цвят, кремът с липиди от мях *Dicranum scoparium* – с леко жълтеникъв оттенък; консистенцията им се отличава с хомогенност, без зърнести образувания. Имат специфичен мирис на етерично масло от портокал. Продуктите лесно се нанасят върху кожата на ръцете и лицето, попиват бързо и не оставят маслена следа.

След приготвяне на емулсионните кремове, бяха охарактеризирани и проследени в период от два месеца важни характеристики, които определят стабилността на получените продукти: съдържание на вода, респ. сухо вещество, pH и оксидантна стабилност по ускорения метод чрез апарат “Rancimat”.

В таблица 8 са представени резултатите за водно съдържание, рН, стабилност на емулсията и оксидантна стабилност на получените козметични кремове в момента след приготвянето им и след два месеца съхранение на хладно.

Таблица 8

Водно съдържание, рН и оксидантна стабилност на получените козметични кремове

Показател	Крем - контрола		Крем с липиди от мъх <i>Dicranum scoparium</i>	
	0 месец	2 месеца	0 месец	2 месеца
Водно съдържание, %	53,6	50,2	53,1	50,7
рН	6,27	6,18	6,16	6,13
Стабилност на емулсията	Неразслоена	Неразслоена	Неразслоена	Неразслоена
Оксидантна стабилност, h	1,0	0,8	1,5	1,3

Съдържанието на вода е важен показател, който има пряко значение за стабилността на приготвените продукти и респективно тяхната дълготрайност. Вижда се, че съдържанието на вода в приготвените продукти е около 50%. Следователно, процентното съдържание на сухо вещество в изследваните проби е също около 50%.

Непосредствено след приготвянето на емулсионните кремове е измерена тяхната стойност на рН. Тя варира в много малки граници - от 6,27 (в контролата) до 6,16 (крем с масло от мъх). По време на съхранението на продуктите се наблюдава леко понижаване на рН стойността, като в края на втория месец се наблюдават следните стойности - 6,18 (в контролата) до 6,13 (крем с масло от мъх).

След съхранение на продуктите за два месеца не се наблюдава разслояване на кремове, което е показател за добре подбрана рецептура и технология за приготвянето им.

Определена е и оксидантната стабилност (при 110°C) на приготвените емулсионни кремове в началото и след два месеца съхранение. Оксидантната стабилност на изготвените продукти е ниска при условията на измерване - варира от 1,0 h (контрола) до 1,5 h (крем с масло от мъх). Очаквано, по време на съхранението на

емулсионните кремове оксидантната им стабилност намалява, съответно на 0,8 h при контролата и на 1,3 h при крем с масло от мъх.

Добавянето на масло от мъх *Dicranum scoparium* при приготвянето на емулсионен продукт води до обогатяването на състава му с незаменими мастни киселини, които имат и антиоксидантни свойства и съответно го предпазват от окисление и удължават срока му на годност.

V.ИЗВОДИ

За първи път у нас са проведени детайлни изследвания върху химичния, в т.ч. и на липидния състав на два вида мъх *Dicranum scoparium* Hedw. и *Polytrichum commune* Hedw., събрани от местност Атолука, Пазарджишка област, Южна България. На базата на получените резултати от тези изследвания могат да се направят следните обобщени изводи:

1. Определен е общия химичен състав на два вида мъх *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*. Установено е, че изследваните мъхове са с високо съдържание на общи въглехидрати (73,3% - *Dicranum scoparium* и 73,6% - *Polytrichum commune*), като съдържанието на фибри е забележително голям дял от общите въглехидрати, около 45-50%, със средно съдържание на протеини (7,2% - *Dicranum scoparium* и 10% - *Polytrichum commune*) и са с ниско съдържание на липиди (2,8% - *Dicranum scoparium* и 1,5% - *Polytrichum commune*), което обуславя енергийна стойност в порядъка 347 и 348 kcal/100 g.

2. Определен е и груповия състав на липидите, изолирани от двата вида мъх *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*. Основната част са триглицеридите, следвани от фосфолипидите, стеролите и токоферолите. Установено е, че изследваните два мъха са с ниско маслено съдържание, но са богати на биологично активни вещества и по-специално на фосфолипиди, стероли и токофероли.

3. Установен е мастнокиселинния състав на изолираните липиди. Основните мастни киселини в маслото от мъх *Dicranum scoparium* са наситената палмитинова (C16:0 - 20,3%) и есенциалните докозахексаенова (C20:6 (n-3) - 18,0%) и ейкозапентаенова (C20:5 (n-3) - 14,6%) киселини, докато при липидите от мъх *Polytrichum commune* доминират палмитинова (C16:0 - 17,5%), олеинова (C18:1 - 10,2%), линолова (C18:2 - 10,6%) и α -линоленова (C18:3 - 6,2%) киселини. Липидите на мъх *Dicranum scoparium* са добър източник на n-3 полиненаситени мастни киселини (34,6%) и съотношението n-3 : n-6 е 4,07, докато липидите на мъх *Polytrichum commune* са с по-високо съдържание на n-6 полиненаситени мастни киселини и съотношението на n-3 : n-6 е 0,70. И двете изследвани масла са с оптимално съотношение на тези мастни киселини.

4. Установен е индивидуалния състав на стероловата, токофероловата и фосфолипидната фракция на липидите от двата вида мъх *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune*.

✓ Данните за състава на стеролите в липидите показват, че основният компонент в тях е β – ситостерол (39,0% - при мъх *Dicranum scoparium* и 25,3% при мъх *Polytrichum commune*), следван от стигмастерол и кампестерол.

✓ Липидите от мъх *Dicranum scoparium* съдържат само α -токоферол (100%), докато от мъх *Polytrichum commune* - α -токоферол (96,4%) и β -токоферол (3,6%).

✓ Във фосфолипидната фракция на двата вида мъх *Dicranum scoparium* и *Polytrichum commune* преобладават фосфатидилинозитолът (30,1% и 27,3%) и фосфатидните киселини (21,1% и 16,2%). Определен е и мастнокиселинния състав на основните класове фосфолипиди. Установено е, че палмитиновата киселина преобладава в мастнокиселинния състав на всички основни фосфолипидни класове, следваща по количество е олеиновата и линоловата киселина. В мастнокиселинния състав на изследваните фосфолипидни класове преобладават наситените мастни киселини, докато в състава на триацилглицеролите - ненаситените мастни киселини.

5. Приготвени са два емулсионни продукта, в един от които в маслената фаза е включено масло от мъх *Dicranum scoparium*. Получените кремове са с гладка консистенция, без зърнести образувания и се отличават със значителна емулсионна и оксидантна стабилност.

Въз основа на получените експериментални данни може да се заключи, че двата изследвани вида мъхове се характеризират с високи нива на въглехидрати, фибри и протеини, както и с наличие на биологично активни компоненти като есенциални мастни киселини, фосфолипиди, стероли и токофероли. Глицеридното масло, получено от мъх *Dicranum scoparium*, се отличава с потенциал за приложение в козметични формули за грижа на кожата. Резултатите от изследването подчертават значимостта на мъховете като източник на нови природни съединения с висока приложимост, особено в областта на козметиката и фармацевтиката.

VI.ЛИТЕРАТУРА

1. БДС 3741-80, Козметични кремове и тоалетни млека. Методи за изпитване, 1980, т.3.
2. Попов А., П. Илинов, Химия на липидите, изд. Наука и изкуство, София, 1986.
3. AOAC—Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis, 20th ed.; AOAC: Arlington, VA, USA, 2016.
4. American Oil Chemists Society (AOAC), „Official methods of analysis of AOAC International”, 16th Ed., method 945, 18-B, “Kjeldahl’s method for protein determination in cereals and feed”, 1996.
5. Anderson W. H., J. M. Hawkins, J. L. Gellerman and H. Schlenk, Fatty acid composition as criterion in taxonomy of mosses, *Journ. Hattori Bot. Lab.*, 1974, 38: 99-103.
6. Animal and vegetable fat and oils. Preparation of methyl esters of fatty acids, ISO 5509, 2000, p. 30.
7. Animal and vegetable fats and oils. Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids, ISO 5508, 2004, p. 9.
8. Animal and vegetable fats and oils. Determination of individual and total sterols contents - Gas chromatographic method, ISO 12228, 1999, p. 24.
9. Animal and vegetable fats and oils. Determination of phosphorus content – Part 1: Colorimetric method, ISO 10540-1, 2003, p. 10.
10. Animal and vegetable fats and oils. Determination of tocopherols and tocotrienols contents. Method using high-performance liquid chromatography, ISO 9936, 2006, p. 23.
11. Animal and vegetable fats and oils. Determination of unsaponifiable matter. Method using hexane extraction, ISO 18609, 2000, p.8.
12. Animal and vegetable fats and oils. Oilseeds – Determination of oil content (Reference method). ISO 659, 2009, p. 12.
13. Asakawa, Y., Ludwiczuk, A. Chemical Constituents of Bryophytes: Structures and Biological Activity. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(3), 641–660.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01046>

14. Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., Nagashima, F. Phytochemical and Biological Studies of Bryophytes, *Phytochemistry*, 2013, 91, 52–80. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.012>
15. Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F. Chemical constituents of bryophytes. Bio- and chemical diversity, biological activity, and chemosystematics. Part of the book series: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 2013; 95:1-796. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1084-3_1
16. Aydın, S. The free radical scavenging activities of biochemical compounds of *Dicranum scoparium* and *Porella platyphylla*. *Anatolian Bryology*, 2019, 5(2), 120–126. <https://doi.org/10.26672/anatolianbryology.701466>
17. Berg Torunn, Eiliv Steinnes, Use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) as biomonitors of heavy metal deposition: From relative to absolute deposition values, *Environmental Pollution*, 1997, 98(1), 61-71. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00103-6](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00103-6).
18. Biswas-Raha, A., Mitra, S. Poddar Sarkar, M. Ecological Impact on Fatty Acid Composition of Mosses from Two Biodiversity Hotspots of Hungary and India. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 2020, 90, 55–61. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01080-2>
19. Chiu, Pei-Lu, Glenn W. Patterson, Gregory P. Fenner, Sterols of bryophytes, *Phytochemistry*, 1985, 24, 2, 263-266. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83534-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83534-7).
20. Codex standard for named vegetable oils, Codex-Stan 210 – 1999, Revisions 2001, 2003, 2009. Amendment 2005, 2011. p.16.
21. Dembitsky V. M., T. Rezanka, I. A. Bychek, O. M. Afonina,.Acetylenic acids and lipid compositions of some mosses from Russia,.*Phytochemistry*,. 1993, 33, 5, 1021-1027. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85015-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85015-J)
22. Dembitsky, V. M., T. Rezanka, I. A. Bychek, O. M. Afonina, Polar lipid and fatty acid composition of some bryophytes, *Phytochemistry*, 1993, 33, 5, 1009-1014. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85013-h](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85013-h)
23. Dembitsky V. M. and T. Rezanka, Acetylenic fatty acids of the Dicranaceae, *Phytochemistry*, 1994, 36, 3, pp 685-689.

24. Dembitsky, V. M., T. Rezanka, Distribution of diacylglycerylhomoserines, phospholipids and fatty acids in thirteen moss species from Southwestern Siberia, *Biochemical Systematics and Ecology*, 1995, 23, 1, 71-78. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(95\)93660-U](https://doi.org/10.1016/0305-1978(95)93660-U).
25. Dembitsky V.M., Lipids of bryophytes. *Prog Lipid Res.* 1993, 32(3):281-356. doi: 10.1016/0163-7827(93)90010-t. PMID: 8140115
26. Demirbağ M. Yıldırım M., Batan N., Yılmaz Ö., Emre İ., Alataş M. The Biochemical Properties of Some Species of Dicranum Hedw. *Anatolian Bryology*. 2022, 8:2, 140-148. DOI: 10.26672/anatolianbryology.1205930
27. Garti H., Agbemaflle R., & Mahunu G. K. Physicochemical properties and fatty acid composition of shea butter from tamale, northern Ghana. *UDS International Journal of Development*, 2019, 6(3), 35–40. <https://doi.org/10.47740/389.UDSIJD6i>
28. Faleva A.V., Ul'yanovskii N.V., Falev D.I., Onuchina A.A., Budaev N.A., Kosyakov D.S. New Oligomeric Dihydrochalcones in the Moss *Polytrichum commune*: Identification, Isolation, and Antioxidant Activity. *Metabolites*. 2022, 12(10):974. <https://doi.org/10.3390/metabo12100974>
29. Flores M., Saravia C., Vergara C.E., Avila F., Valdés H., Ortiz-Viedma J. Avocado Oil: Characteristics, Properties, and Applications. *Molecules*. 2019, 24(11):2172. <https://doi.org/10.3390/molecules24112172>
30. Fu P., Lin S., Shan L., et al. Constituents of the Moss *Polytrichum commune*. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(7), 1335–1337. <https://doi.org/10.1021/np800830v>
31. Karaoğlu Ş. A., Yaylı N., Erik İ., et al. Biological Activity and Phytochemical Analysis of Dicranum scoparium Against the Bacterial Disease for Honey Bee. *Chemistry & Biodiversity*, 2022, 19(7), e202100887. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100887>
32. Karunen P., Determination of Fatty Acid Composition of Spore Lipids of the Moss *Polytrichum commune* by Glass Capillary Column Gas Chromatography, *Physiologia Plantarum*, 1977, 40, 4. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1977.tb04065.x>
33. Kim, H. U. Lipid Metabolism in Plants. *Plants*, 2020, 9, 871. <https://doi.org/10.3390/plants9070871>

34. Klavina L., Springe G., Nikolajeva V., Martsinkevich I., Nakurte I., Dzabijeva D., & Steinberga I. Chemical composition analysis, antimicrobial activity and cytotoxicity screening of moss extracts (moss phytochemistry). *Molecules*, 2015, 20(9), 17221–17243. <https://doi.org/10.3390/molecules200917221>
35. Kļaviņa Laura, "Composition of mosses, their metabolites and environmental stress impacts." (2018), Doctoral thesis, submitted for the degree of doctor of Biology, Environmental Science Subfield of Environmental protection, University of Latvia, Faculty of Geography and earth sciences.
36. Läubli M., Bruttel P., Determination of oxidative stability of fats and oils: Comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat method, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1986, 63 (6), 792-795.
37. Lu Y.; Eiriksson F.F., Thorsteinsdóttir M., Simonsen H.T. Valuable fatty acids in bryophytes—Production, biosynthesis, analysis and applications, *Plants*, 2019, 8 (11), 524. <https://doi.org/10.3390/plants8110524>
38. Lu Y. Eiriksson F.F.; Thorsteinsdóttir M., Cronberg N., Simonsen H. T., Lipidomes of Icelandic bryophytes and screening of high contents of polyunsaturated fatty acids by using lipidomics approach, *Phytochemistry*, 2023, 206, 113560. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113560>
39. Ludwiczuk, A., Asakawa, Y. Bryophytes as a Source of Bioactive Volatile Terpenoids – A Review. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 132, 110649. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110649>
40. Munshi S.K., Sukhija S.P., Bahatia I.S., Lipids biosynthesis in developing kernels of almond (*Prunus amygdalus* Batsch.), *Phytochemistry*, 1983, 22, 79-83.
41. Okan Onur Tolga, Chemical Constituents and Bioactivity Studies of Two Polytrichaceae Species, *Polytrichum formosum* Hedw. and *Polytrichum commune* Hedw., *BioResources*, 2025, 20(1), 305-321. DOI: 10.15376/biores.20.1.305-321
42. Okan, O. T. Antioxidant, antimicrobial and some chemical composition of *Plagiochila asplenioides* (L.) Dumort extract, *Anatolian Bryology* 2023, 9(1), 11-19. DOI: 10.26672/anatolianbryology.1281694

43. Peters K., Treutler H., Döll S., Kindt A. S. D., Hankemeier T., Neumann S. Chemical diversity and classification of secondary metabolites in nine bryophyte species. *Metabolites*, 2019, 9(10), 222. doi: [10.3390/metabo9100222](https://doi.org/10.3390/metabo9100222)
44. Petkova Z., Teneva O., Antova G., Angelova-Romova M., Gecheva G., Dimitrova-Dyulgerova I. Chemical Composition, Lipid-Soluble Bioactive Compounds and Potential Health Benefits of the Moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. *Plants*. 2023; 12(24):4190. <https://doi.org/10.3390/plants12244190>
45. Petkova Z., Todorova M., Dincheva I., Ognyanov M., Naimov S., Apostolova E., Teneva O., Antova G., Gecheva G. Phytochemical Composition, Antioxidant, Anti-Inflammatory Activity, and DNA Protective Capacity of Moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. from Bulgaria. *Forests*. 2025; 16(6):951. <https://doi.org/10.3390/f16060951>
46. Rasheed, F.; Markgren, J.; Hedenqvist, M.; Johansson, E. Modeling to understand plant protein structure-function relationships – Implications for seed storage proteins. *Molecules*, 2020, 25, 873.
47. Resemann Hanno C., M. Lewandowska, J. Gömann, I. Feussner, Membrane Lipids, Waxes and Oxylipins in the Moss Model Organism *Physcomitrella patens*, *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60, 6, 1166–1175. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz006>
48. Šakalys J., K. Kvietkus, J. Sucharová, I. Suchara, D. Valiulis, Changes in total concentrations and assessed background concentrations of heavy metals in moss in Lithuania and the Czech Republic between 1995 and 2005, *Chemosphere*, 2009, 76, 1, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.009>.
49. Schröder W., R. Pesch. Long-term monitoring of the metal accumulation in forests measured by use of the moss technique. *European Journal of Forest Research*, 2010, 129(3): 475–488. doi: 10.1007/s10342-009-0298-y
50. Semerjyan G., Semerjyan I., Ginovyan M., & Avtandilyan N. Characterization and Antibacterial/Cytotoxic Activity of Silver Nanoparticles Synthesized from Dicranum scoparium Moss Extracts Growing in Armenia. *AIMS Biophysics*, 2025, 12(1), 29–42. <https://doi.org/10.3934/biophy.2025003>
51. Swanson E. S., W. H. Anderson, J. L. Gellerman and H. Schlenk, Ultrastructure and Lipid Composition of Mosses, *The Bryologist*, 1976, 79, 339-349.

52. Trouvelot S.; Héloir M.C.; Poinssot B.; Gauthier A.; Paris F.; Guillier C.; Combier M.; Trdá L.; Daire X.; Adrian M. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: Roles and potential application as foliar sprays. *Front. Plant Sci.*, 2014, 5, 592.

53. Vecka M., Stanková B., Kutová S., Tomášová P., Tvrzická E., Žák A. Comprehensive Sterol and Fatty Acid Analysis in Nineteen Nuts, Seeds, and Kernel. *SN Appl. Sci.* 2019, 1, 1531.

54. Xian'en Z., Honglun W., Chenxu D., Yourui S., Jing S., Guichen C., Xuejun S., Jinmao Y. Determination of Free Fatty Acids from Soil and Bryophyteby HPLC with Fluorescence Detection and Identification with Mass Spectrometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34: 150-155.