

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОТАНИКИ ИМЕНИ  
В.Ф. КУПРЕВИЧА НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 651.322:547.972.3

**ЭЛЬКАИБ**  
**Хоссам Мохамед М.**

**СОСТАВ ФЛАВОНОИДОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ,  
ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В ЛИВИИ, И ИХ АКТИВНОСТЬ  
ПО ОТНОШЕНИЮ К БАКТЕРИЯМ РОДА *PSEUDOMONAS***

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Минск, 2019

Работа выполнена в учреждении образования  
«Белорусский государственный технологический университет», г. Минск

- Научный руководитель:** **Леонтьев Виктор Николаевич,**  
кандидат химических наук, доцент,  
заведующий кафедрой биотехнологии  
факультета технологии органических веществ  
учреждения образования «Белорусский  
государственный технологический университет»
- Официальные оппоненты:** **Юрин Владимир Михайлович,**  
доктор биологических наук, профессор, профессор  
кафедры клеточной биологии и биоинженерии  
растений биологического факультета Белорусского  
государственного университета
- Ладутько Елена Ивановна,**  
кандидат биологических наук, ведущий  
научный сотрудник лаборатории «Коллекция  
микроорганизмов» государственного научного  
учреждения «Институт микробиологии  
Национальной академии наук Беларуси»
- Оппонирующая организация:** государственное научное учреждение «Центральный  
ботанический сад Национальной академии наук  
Беларуси»

Защита диссертации состоится 27 июня 2019 г. в 14.30 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.38.01 при государственном научном учреждении «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.

E-mail: nan.botany@yandex.by, тел./факс (+375-17) 284-18-53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Я. Коласа Национальной академии наук Беларуси.

Автореферат разослан « 20 » мая 2019 г.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций,  
кандидат биологических наук



А. Ф. Судник

## ВВЕДЕНИЕ

Среди вторичных метаболитов растений центральное место занимают полифенольные соединения, представленные в первую очередь флавоноидами. Их содержание в свободном или гликозилированном состоянии может составлять 30 % и более от массы сухого остатка экстракта. Эти соединения участвуют во многих ключевых физиологических процессах онтогенеза растений. Однако наиболее заметную роль флавоноиды играют в защите растений от различных неблагоприятных факторов окружающей среды: ультрафиолетового излучения, температурного стресса, ксенобиотиков, бактериальной, вирусной и грибковой инфекций.

Широкий спектр биологической активности флавоноидов обуславливает возрастающий интерес к использованию растений для производства лекарственных препаратов. Несмотря на то, что антимикробную активность проявляют главным образом фитонциды – летучие эфирные масла, эффективно ингибировать рост целого ряда бактерий, в том числе и рода *Pseudomonas*, могут также флавоноиды, например кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид.

Большим разнообразием лекарственных растений с высоким содержанием полифенольных соединений, обладающих противомикробной активностью и фитонцидными свойствами, отличается флора Ливии. В их числе пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.), фимбра головчатая (*Thymbra capitata* L.), ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla* L.), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.), ладанник шалфеелистный (*Cistus salviifolius*).

Известно, что пряно-ароматические растения находят применение в качестве антисептических средств, предохраняющих пищевые продукты от развития нежелательной микробиоты и способствующих их более длительному сохранению. Однако в последние годы в ряде стран ведутся исследования по использованию для этих же целей экстрактов лекарственных растений.

В связи с вышеизложенным, очевидны актуальность и целесообразность проведения исследований по поиску лекарственных растений, экстракты которых будут эффективно защищать пищевые продукты от микробной порчи за счет содержащегося в них флавоноида кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с научными программами (проектами), темами.** Диссертационная работа выполнена в рамках задания «Изучение антимикробных свойств природных и синтетических биологически активных веществ» Тематического плана научно-исследовательских работ учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет» на 2016–2020 годы (протокол заседания Совета БГТУ № 5 от 26.01.2016 г.).

Тематика работы соответствует п. 3 «Биологические системы и технологии», п. 9 «Агропромышленный комплекс и продовольственная безопасность» и п. 12 «Междисциплинарные исследования» Перечня приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы, утвержденного Постановлением Совета Министров Республики Беларусь № 190 от 12 марта 2015 г., а также п. 6 «Био- и nanoиндустрия» (биотехнологии в сельскохозяйственном производстве и пищевой промышленности) Перечня приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 годы, утвержденного Указом Президента Республики Беларусь № 166 от 22 апреля 2015 г.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы явился поиск среди лекарственных растений, произрастающих в Ливии и обладающих антисептическими свойствами, растения, содержащего флавонол – кемпферол-3- $\beta$ -D-глюкопиранозид, обуславливающий антимикробную активность по отношению к бактериям рода *Pseudomonas*, а также изучение возможности использования экстракта этого растения для защиты пищевых продуктов от микробной порчи.

Задачи исследования:

1. Идентификация флавоноидов в экстрактах лекарственных растений методом хромато-масс-спектрометрии.
2. Выбор лекарственного растения, экстракт которого максимально угнетает рост и развитие бактерий рода *Pseudomonas*.
3. Определение условий экстракции и фракционирования флавоноидов лекарственных растений.
4. Разработка методики одновременного количественного определения флавонолов, флавонов и флаван-3-олов в экстрактах лекарственных растений.
5. Выделение и идентификация бактерий рода *Pseudomonas*, вызывающих порчу пищевых продуктов.
6. Изучение антимикробных свойств активной фракции экстракта лекарственного растения на образцах пищевых продуктов для последующей разработки биопрепарата.

**Объекты исследования** – экстракты лекарственных растений, произрастающих в Ливии, и пищевые продукты, приобретенные в торговой сети города Минска.

**Предмет исследования** – состав флавоноидов и антимикробная активность экстрактов лекарственных растений.

**Научная новизна.** Впервые установлено, что среди лекарственных растений, произрастающих в Ливии (пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.), фимбра головчатая (*Thymbra capitata* L.), ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla* L.), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.), ладанник шалфеелистный (*Cistus salviifolius*)), наивысшей антимикробной активностью по отношению к бактериям рода *Pseudomonas*, вызывающим порчу пищевых продуктов, обладает экстракт ладанника шалфеелистного за счет содержащегося в нем флавонола – кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида. Разработана оригинальная методика одновременного количественного определения флавонолов, флавонов и флаван-3-олов в экстрактах лекарственных растений. Установлена возможность защиты пищевых продуктов от микробной порчи с помощью активной фракции экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*).

**Положения, выносимые на защиту:**

▪ Состав флавоноидов лекарственных растений – пажитника греческого (*Trigonella foenum-graecum* L.), фимбры головчатой (*Thymbra capitata* L.), ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) и ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*), произрастающих в Ливии, и выраженная антибактериальная активность экстрактов ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*).

▪ Условия экстракции и фракционирования флавоноидов ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*), позволившие выделить фракцию I, содержащую флавонолов – 0,21 мг/мг, флавонов – 0,17 мг/мг, флаван-3-олов – 0,06 мг/мг и обладающую антимикробной активностью по отношению к бактериям рода *Pseudomonas* за счет наличия кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида.

▪ Активная фракция I экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) защищает пищевые продукты от микробной порчи, вызванной бактериями *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas aeruginosa* выделенных штаммов, а также спонтанно развивающейся микробиотой, увеличивая сроки хранения в 1,5–4 раза.

**Личный вклад соискателя.** Автором самостоятельно подобрана и проанализирована научная литература по теме диссертации, получены и систематизированы экспериментальные данные, осуществлен их анализ и статистическая обработка, подготовлены публикации. Научный руководитель

сформулировал тему диссертации, обеспечил необходимые методические подходы, поставил цели и задачи исследований, участвовал в обсуждении результатов и написании статей.

Автор выражает признательность сотрудникам кафедры биотехнологии: доценту, к.б.н. Белясовой Н.А. за научные консультации в области микробиологии и старшему научному сотруднику, к.т.н. Феськовой Е.В. за методическую помощь в выполнении хромато-масс-спектрометрических исследований.

**Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов.** Результаты диссертационной работы представлены на научных конференциях: Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы получения и применения биологически активных природных соединений» (Минск–Нарочь, 2013 г.); 78-й и 79-й научно-технических конференциях профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов БГТУ (Минск, 2014 г., 2015 г.); XI Международной научно-технической конференции «Техника и технология пищевых производств» (Могилев, 2017 г.); Международной научно-практической конференции «Молекулярно-генетические и биотехнологические основы получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ» (Нарочанские чтения – 11) (г. Минск–Ставрополь, 2017 г.); 2<sup>nd</sup> Libyan Conference on Medical and Pharmaceutical Sciences (Tripoli, 2018).

Результаты исследований внедрены в учебный процесс на кафедре биотехнологии учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет».

**Опубликование результатов диссертации.** Основные результаты диссертационной работы изложены в 13 публикациях (объем в авторских листах – 3,38), из них 4 статьи (объем в авторских листах – 1,42) в научных изданиях, включенных в перечень ВАК Республики Беларусь, 3 статьи в других рецензируемых научных журналах, 6 материалов конференций и тезисов докладов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, 3 глав, заключения, списка использованных источников (128 наименований на 10 страницах), списка работ соискателя, 4 приложений на 8 страницах. Работа изложена на 115 страницах, содержит 6 таблиц на 10 страницах, 54 рисунка на 38 страницах.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В **первой главе** приведены литературные данные о лекарственных растениях, биологической активности и химической структуре их компонентов, методах экстракции, фракционирования и идентификации флавоноидов, микробной контаминации пищевых продуктов и использовании лекарственных и пряно-ароматических растений для защиты от микробиологической порчи.

**Вторая глава** посвящена объектам и методам исследования.

Объектами исследования служили экстракты лекарственных растений, обладающих антисептическими свойствами и произрастающих в Ливии: пажитника греческого (*Trigonella foenum-graecum* L.), фимбры головчатой (*Thymbra capitata* L.), ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) и ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*), а также пищевые продукты растительного и животного происхождения.

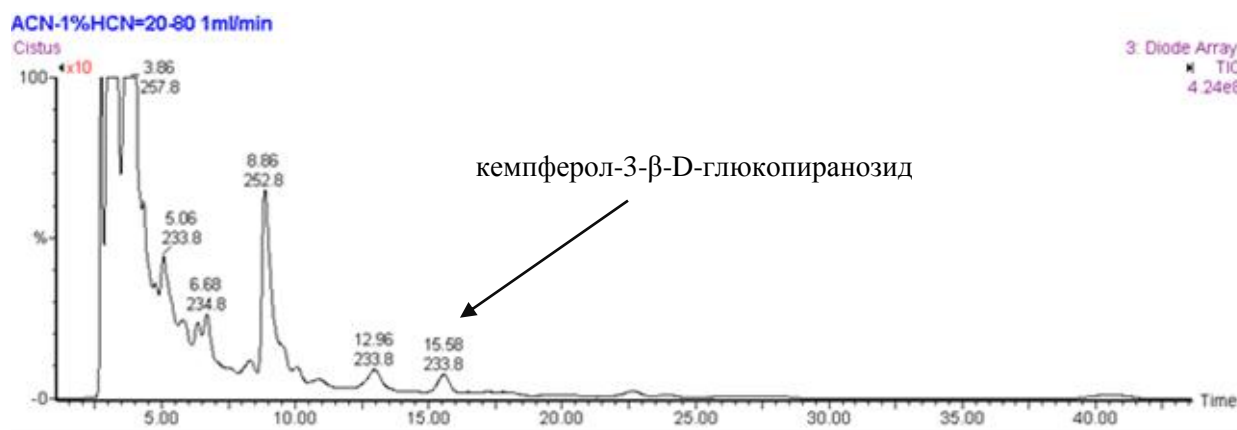
Идентификацию флавоноидов в экстрактах лекарственных растений осуществляли при помощи хромато-масс-спектрометра (Waters, США) с использованием колонки BDS HYPERSIL C18 250×4,6 мм, 5 мкм (Thermo Electron Corporation, США). Для одновременного количественного определения флавонолов, флавонов и флаван-3-олов в экстрактах лекарственных растений с помощью спектрофотометрического метода использовали реакции: 1) с реактивом Фолина-Чокольтеу; 2) с хлоридом алюминия; 3) с 2,4-динитрофенилгидразином. Фракционирование экстрактов осуществляли на Sephadex-LH60. Разделение компонентов активной фракции экстракта ладанника шалфеелистного проводили с помощью гидрофобной гель-хроматографии на колонке с Sephadex-LH60. ТСХ анализ проводили на пластинках с силикагелем (TLC Silica gel 60). Для выделения бактерий из испорченных пищевых продуктов использовали селективную плотную питательную синтетическую среду MM9. Для отбора бактерий рода *Pseudomonas* использовали их способность расти в присутствии L-триптофана (единственного источника углерода и энергии) в аэробных условиях. Для удаления патогенных псевдомонад применяли дифференциально-диагностическую среду Блеск. Изоляты непатогенных бактерий рода *Pseudomonas* идентифицировали по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам. Антимикробные свойства активной фракции экстракта ладанника шалфеелистного изучали на образцах свежих пищевых продуктов, инфицированных бактериями *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas aeruginosa* выделенных штаммов.

Статическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием компьютерной программы Excel 2007 (Microsoft Inc, 2007).

**Третья глава** посвящена обсуждению полученных экспериментальных результатов.

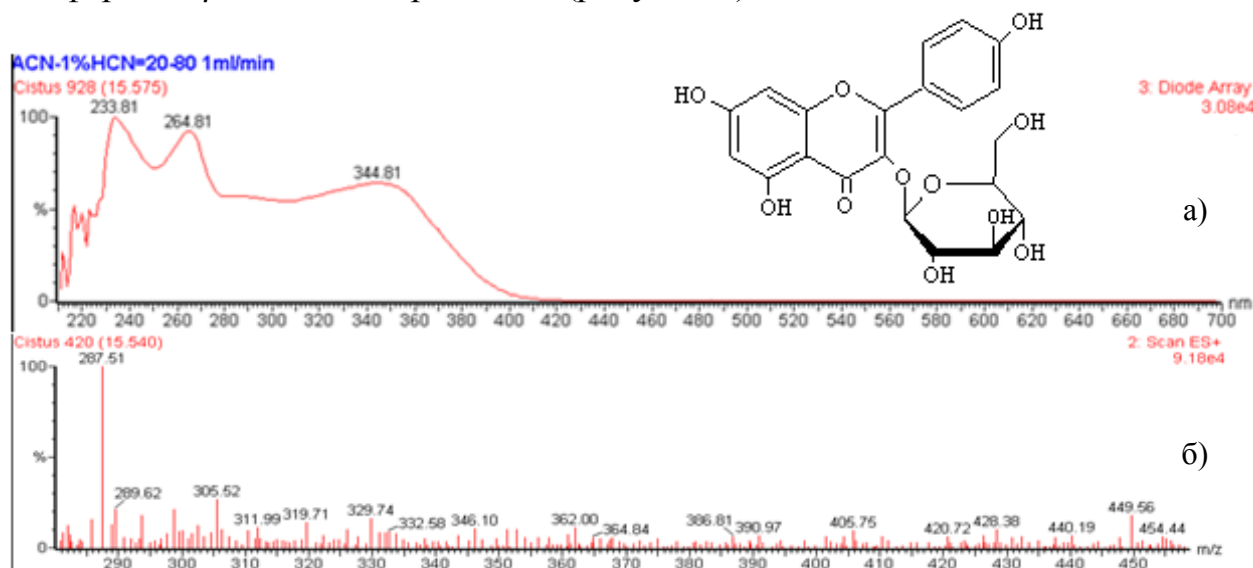
Первым этапом работы явился анализ компонентного состава экстрактов лекарственных растений методом ВЭЖХ-МС. Для идентификации флавоноидов использовали времена удерживания, максимумы полос поглощения в электронных спектрах и сигналы в масс-спектрах.

На рисунке 1 представлена хроматограмма водно-спиртового экстракта листьев ладанника шалфеелистного.



**Рисунок 1. – Хроматограмма экстракта листьев ладанника шалфеелистного**

Анализ электронного и масс-спектров компонентов экстракта ладанника шалфеелистного позволил установить соединение с временем удерживания 15,58 мин, которое является кемпферол-3-β-D-глюкопиранозидом, что подтверждено с помощью стандартного образца коммерческого препарата кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида (рисунок 2).



**Рисунок 2. – Электронный спектр (а) и масс-спектр в области положительных ионов (б) соединения с временем удерживания 15,58 мин**



В масс-спектре в области положительных ионов наблюдаются сигналы молекулярного иона  $[M+H]^+$  с  $m/z$  449,56, который принадлежит протонированной форме кемпферол-3- $\beta$ -D-глюкопиранозида, и молекулярного иона  $[M-glu+H]^+$  с  $m/z$  287,51, относящегося к агликону кемпферол-3- $\beta$ -D-глюкопиранозида – кемпферолу [6, 11].

Результаты идентификации флавоноидов в экстрактах лекарственных растений представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Флавоноиды лекарственных растений [4, 7, 11]

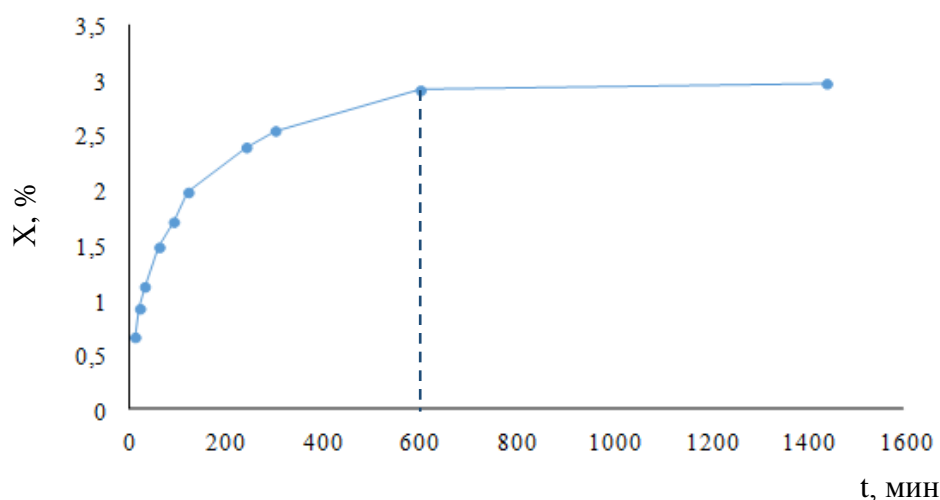
Лекарственное растение	Время удерживания, мин	Ионы, m/z	Идентифицированные флавоноиды
Пажитник греческий ( <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.)	6,33	$[M-H_2O+H]^+$ , 431,35	Изоориентин
	7,10	$[M+H]^+$ , 449,49	Ориентин
	9,56	$[M+H]^+$ , 433,52	Витексин
	10,23	$[M-H_2O+H]^+$ , 415,51	Изовитексин
Фимбра головчатая ( <i>Thymbra capitata</i> L.)	12,44	$[M+H]^+$ , 463,54	Скутелларин
	19,88	$[M+H]^+$ , 609,62; $[M-2glu+H]^+$ , 301,63	Диосмин
	21,98	$[M+H]^+$ , 447,58; $[M-glu+H]^+$ , 271,68	Байкалин
	25,18	$[M-C_9H_{10}O_5+H]^+$ , 163,41; $[M+H]^+$ , 361,67	Розмариновая кислота*
	41,73	$[M+H]^+$ , 289,62	Эриодиктиол
Ромашка аптечная ( <i>Matricaria chamomilla</i> L.)	9,41	$[M+H]^+$ , 465,65	Кверцимеритрин
	34,86	$[M+H]^+$ , 177,53	Герниарин
Шалфей лекарственный ( <i>Salvia officinalis</i> L.)	11,26	$[M+H]^+$ , 463,61	Лютеолин-7-О-глюкуронид
	18,91	$[M+H]^+$ , 609,62; $[M-2glu+H]^+$ , 301,70	Диосмин
	20,56	$[M+H]^+$ , 447,58; $[M-glu+H]^+$ , 271,68	Байкалин
	23,64	$[M-C_9H_{10}O_5+H]^+$ , 163,47; $[M+H]^+$ , 361,67	Розмариновая кислота*
Ладанник шалфеелистный ( <i>Cistus salviiifolius</i> )	15,58	$[M+H]^+$ , 449,56; $[M-glu+H]^+$ , 287,51	Кемпферол-3- $\beta$ -D-глюкопиранозид

Примечание: \* – не является флавоноидом.

Как видно из таблицы 1, кемпферол-3- $\beta$ -D-глюкопиранозид содержится в экстракте ладанника шалфеелистного.

Исследования антибактериальной активности экстрактов лекарственных растений методом лунок с применением коллекционных штаммов бактерий *Pseudomonas fluorescens* 303 и *Pseudomonas aeruginosa* 209 показали, что наивысшей активностью обладал водно-спиртовой экстракт ладанника шалфеелистного [2, 8, 9, 10, 13].

Для определения времени максимального извлечения флавоноидов из листьев ладанника шалфеелистного экстракцию проводили 50 %-ным этиловым спиртом при комнатной температуре и периодическом перемешивании. Содержание суммы флавоноидов определяли спектрофотометрически по реакции с  $AlCl_3$  (рисунок 3).



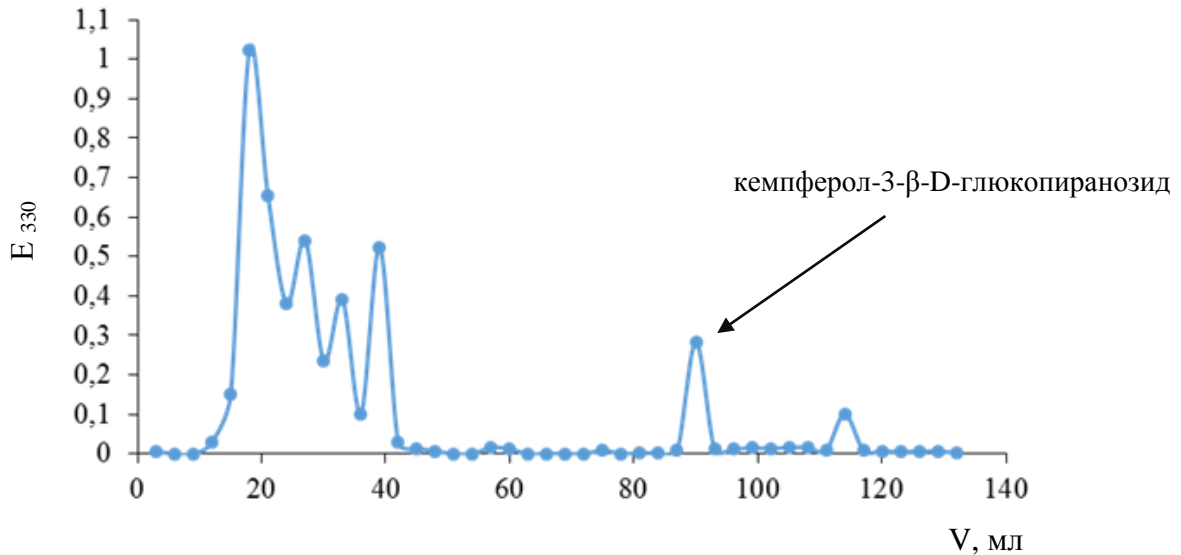
**Рисунок 3. – График зависимости содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин от времени экстракции**

Как видно из рисунка 3, максимальное извлечение флавоноидов ладанника шалфеелистного наблюдался через 10 ч.

Для фракционирования и последующей колоночной гидрофобной гель-хроматографии использовали Sephadex-LH60. Экстракт ладанника шалфеелистного в 50 %-ном этиловом спирте разделяли на две фракции на фильтре Шотта с гелем Sephadex-LH60. Фракция I свободно проходила через гель, а фракцию II элюировали из геля 96 %-ным этиловым спиртом.

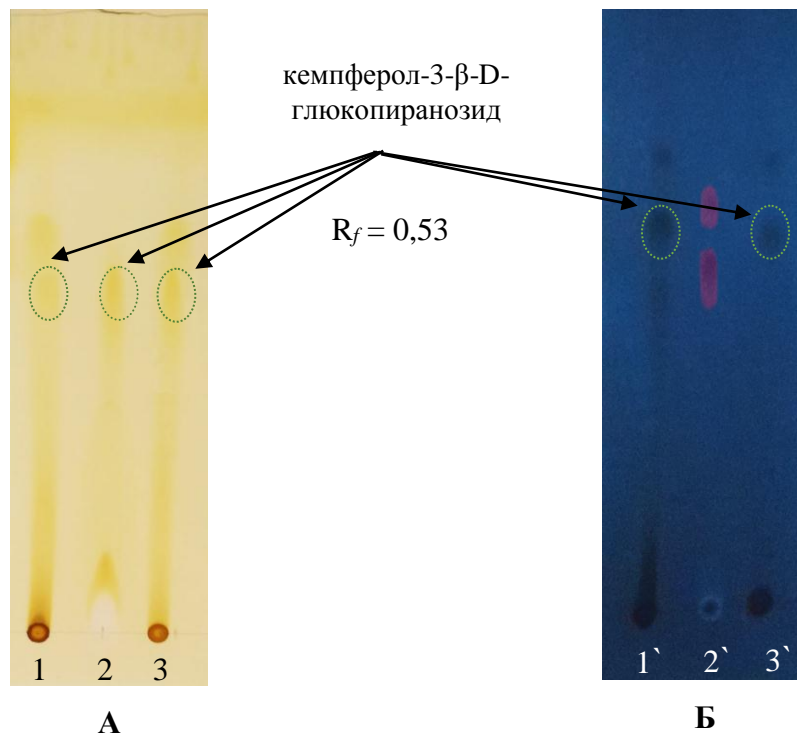
На рисунке 4 представлена хроматограмма активной фракции I на колонке с гелем Sephadex-LH60.

Хроматографический пик с объемом выхода 90 мл принадлежит кемпферол-3-β-D-глюкопиранозиду, так как по объему выхода соответствует стандартному образцу. Таким образом, колоночная гель-хроматография на Sephadex-LH60 может быть использована для препаративного выделения кемпферол-3-β-D-глюкопиранозиды из активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного [4, 7].



**Рисунок 4. – Профиль элюирования компонентов активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного**

С целью экспрессной идентификации кемпферол-3-β-D-гликопиранозида в исходном экстракте и фракции I ладанника шалфеелистного проводили ТСХ на пластинках с силикагелем (TLC Silica gel 60) в элюирующей системе изопропиловый спирт:гексан:уксусная кислота 10:1:0,5 (рисунок 5).



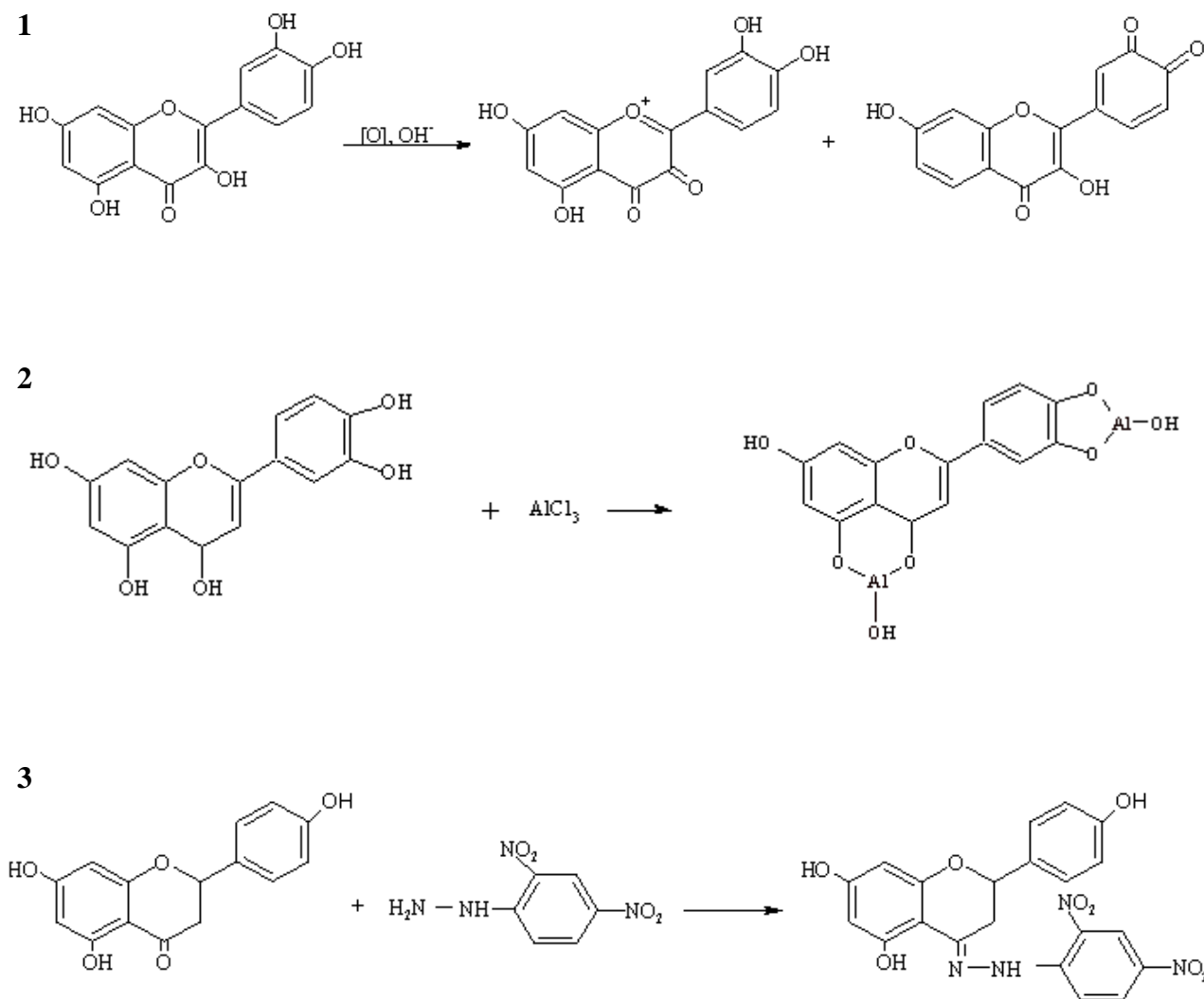
**А – в парах йода; Б – в УФ-свете;**

**1 и 1' – исходный экстракт ладанника шалфеелистного; 2 – кемпферол-3-β-D-гликопиранозид; 2' – неактивная фракция II; 3 и 3' – активная фракция I**

**Рисунок 5. – Хроматограммы компонентов экстракта ладанника шалфеелистного и кемпферол-3-β-D-гликопиранозида**

Как видно из рисунка 5, кемпферол-3- $\beta$ -D-глюкопиранозид имеет пятно с  $R_f = 0,53$ , которое присутствует и на хроматограмме раствора фракции I, а на хроматограмме исходного экстракта ладанника шалфеелистного наблюдается очень слабо выраженное пятно с этим значением  $R_f$  [4].

Для одновременного количественного определения флавонолов, флавонов и флаван-3-олов в экстрактах лекарственных растений использовали их взаимодействие с реактивом Фолина-Чокольтеу, хлоридом алюминия и 2,4-динитрофенилгидразином. Уравнения реакций представлены на рисунке 6.



**Рисунок 6. – Уравнения реакций флавоноидов с реактивом Фолина-Чокольтеу (1), хлоридом алюминия (2) и 2,4-динитрофенилгидразином (3)**

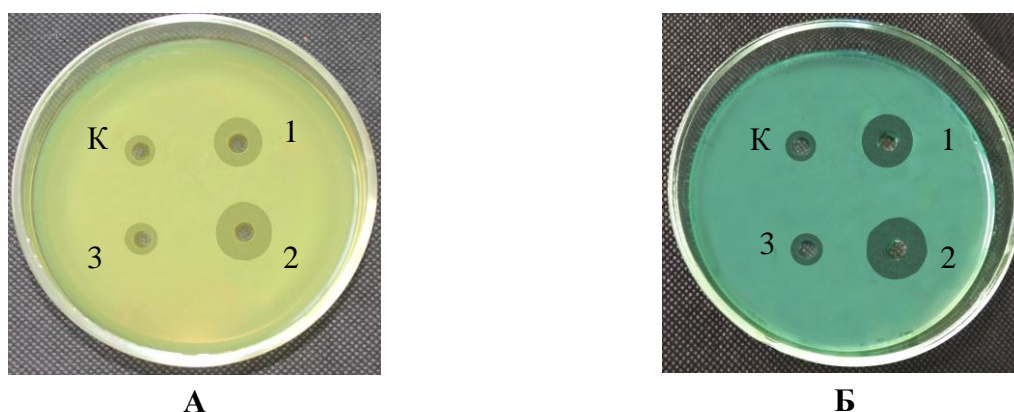
Результаты одновременного количественного определения флавонолов, флавонов и флаван-3-олов в сухом остатке фракции I экстракта ладанника шалфеелистного представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Содержание флавоноидов в сухом остатке фракции I

Флавоноиды	Содержание, мг/мг	Реакция
Флавонолы, флаван-3-олы, флавоны	0,44±0,05 в пересчете на кверцетин	Фолина-Чокольтеу
Флавонолы, флавоны	0,38±0,04 в пересчете на кверцетин	с AlCl <sub>3</sub>
Флавонолы	0,21±0,03 в пересчете на нарингин	с 2,4-динитро-фенилгидразином

Из данных, представленных в таблице 2, количество флавоноидов в сухом остатке фракции I составило: флавонолов – 0,21 мг/мг, флавонов – 0,17 мг/мг, флаван-3-олов – 0,06 мг/мг [3].

Антибактериальную активность фракций I и II, а также кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида определяли методом лунок в питательной агаризованной среде, засеянной суточными культурами *Pseudomonas aeruginosa* 209 и *Pseudomonas fluorescens* 303. Эксперимент выполняли тоекратно. Результаты одного из них представлены на рисунке 7.



А – *Pseudomonas aeruginosa* 209; Б – *Pseudomonas fluorescens* 303;

К – контроль (50 %-ный этиловый спирт)

Рисунок 7. – Антибактериальная активность кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида (1), фракции I (2) и фракции II (3)

Прозрачные зоны вокруг лунок (1) и (2) свидетельствуют об антибактериальной активности кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида и фракции I как по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* 209, так и к *Pseudomonas fluorescens* 303 [6, 7]. Средние значения диаметров зон просветления для кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида и активной фракции I равны 14,25±0,87 мм и 17,32±0,94 мм (контроль – 9,17±0,19 мм) для *Pseudomonas fluorescens* 303, а для *Pseudomonas aeruginosa* 209 – 13,15±0,66 мм и 16,07±1,17 мм соответственно (контроль – 9,10±0,12 мм). Средние значения диаметров зон

просветления фракции II практически не отличаются от контрольных, следовательно, эта фракция не обладает антибактериальной активностью и в дальнейшей работе ее не использовали.

Для проверки активности фракции I экстракта ладанника шалфеелистного на реальных объектах из испорченных пищевых продуктов (72 образца) были выделены 44 изолята доминирующих бактерий. Установлены их морфологические и физиолого-биохимические характеристики, на основании которых идентифицированы непатогенные бактерии рода *Pseudomonas* (19 штаммов), из которых бактерии 10 штаммов принадлежат к виду *fluorescens*, а бактерии 9 штаммов – к виду *aeruginosa* (таблица 3) [1, 5, 12].

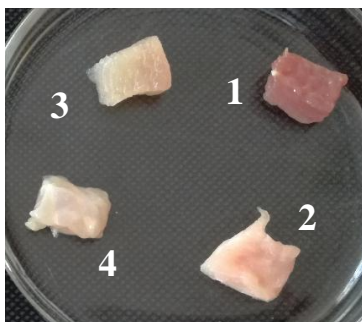
Таблица 3. – Основные признаки *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas aeruginosa*

Характеристика	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Вид колоний (на МПА)	Бесцветные или желтоватые плоские колонии	Бесцветные или желтоватые, выпуклые, гладкие, блестящие колонии
Флуоресцирующий пигмент	+	+
Нефлуоресцирующий пигмент	+	–
Потребление лактозы	–	+/-
Окисление глюкозы	–	+
Размножение при 41 °С	+	–
Размножение при 4 °С	–	+
Восстановление нитратов	+	+/-
Рост на ацетамидном агаре	+	–

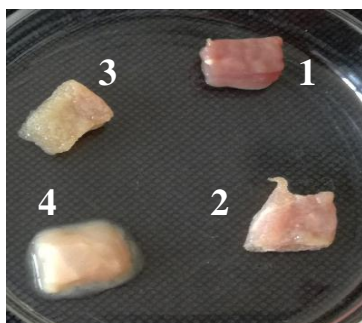
Для оценки эффективности защиты пищевых продуктов от микробной контаминации с помощью раствора активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного использовали модельную систему.

Образцы пищевых продуктов в виде кусочков рыбы, говядины, свинины и мяса птицы массой 2 г помещали в чашки Петри, инфицировали 0,03 мл суточных культур бактерий *Pseudomonas aeruginosa* 11, *Pseudomonas aeruginosa* 410, *Pseudomonas fluorescens* 27 и *Pseudomonas fluorescens* 224 с титром  $\approx 10^8$  КОЕ/мл и обрабатывали 0,5 %-ным раствором активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного. Затем чашки Петри с образцами выдерживали при 4 °С в течение 9 суток и при 30 °С в течение 5 суток. Контрольные образцы ничем не обрабатывали; их микробная контаминация была обусловлена спонтанно развивающейся микробиотой (рисунки 8 и 9).

Через 3 суток



Через 9 суток



А

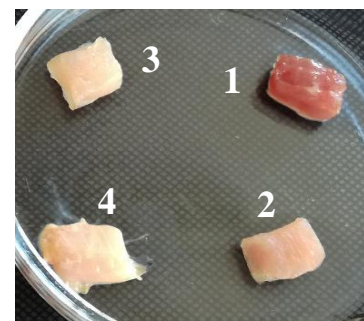
Б

1 – образцы говядины; 2 – образцы свинины; 3 – образцы мяса птицы;

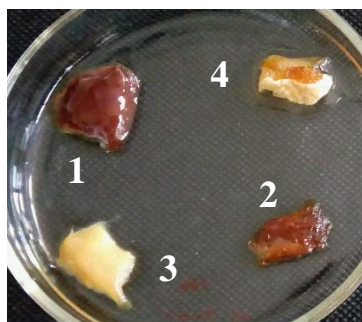
4 – образцы рыбы; А – *P. aeruginosa* 11; Б – *P. aeruginosa* 11 + фракция I

Рисунок 8. – Образцы продуктов после обработки суспензией бактерий *P. aeruginosa* 11 и раствором активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного (при 4 °С)

Через сутки



Через 3 суток



А

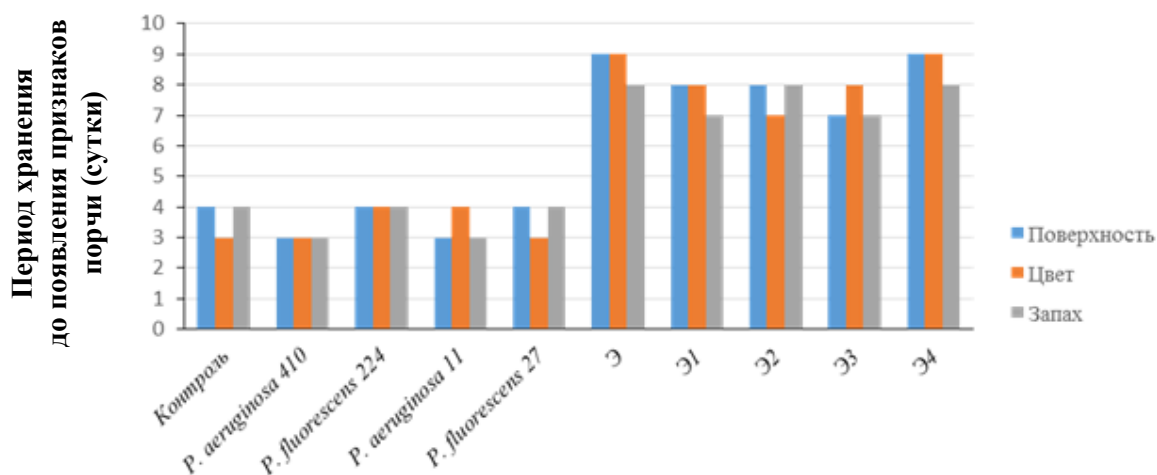
Б

1 – образцы говядины; 2 – образцы свинины; 3 – образцы мяса птицы;

4 – образцы рыбы; А – *P. aeruginosa* 11; Б – *P. aeruginosa* 11 + фракция I

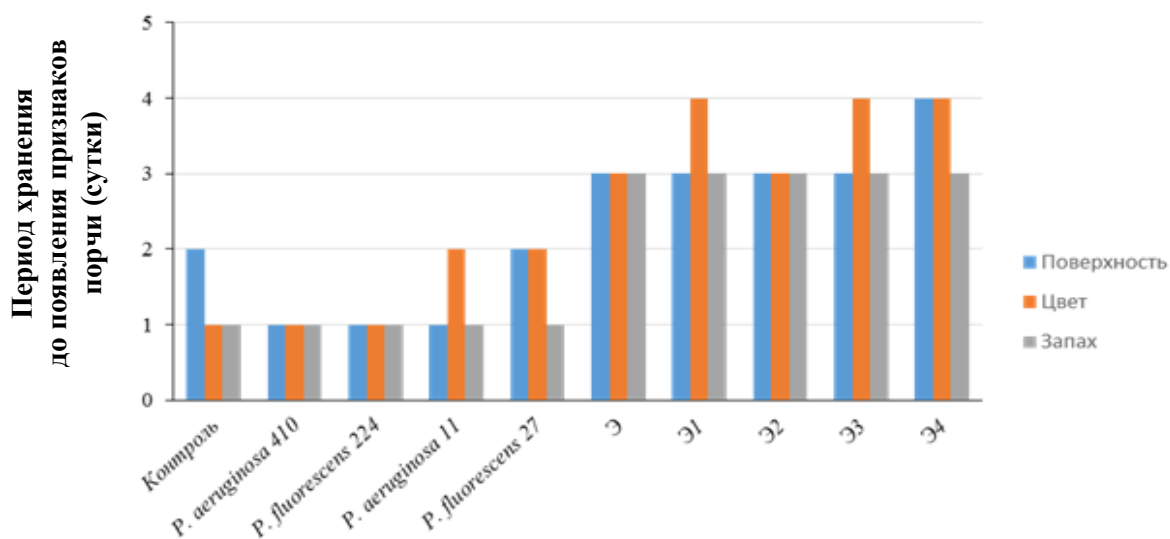
Рисунок 9. – Образцы продуктов после обработки суспензией бактерий *P. aeruginosa* 11 и раствором активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного (при 30 °С)

В образцах ежедневно анализировали характер поверхности, цвет и запах. Определяли временные интервалы, в течение которых изменялись органолептические свойства. Результаты, отражающие изменения органолептических свойств образцов говядины после обработки суспензиями бактерий и раствором активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного, представлены в виде гистограмм (рисунки 10 и 11).



Э – фракция I; Э1 – *P. fluorescens* 224 + фракция I; Э2 – *P. aeruginosa* 410 + фракция I;  
Э3 – *P. fluorescens* 27 + фракция I; Э4 – *P. aeruginosa* 11 + фракция I

Рисунок 10. – Изменение органолептических свойств образцов говядины после обработки суспензиями бактерий и раствором активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного (при 4 °C)



Э – фракция I; Э1 – *P. fluorescens* 224 + фракция I; Э2 – *P. aeruginosa* 410 + фракция I;  
Э3 – *P. fluorescens* 27 + фракция I; Э4 – *P. aeruginosa* 11 + фракция I

Рисунок 11. – Изменение органолептических свойств образцов говядины после обработки суспензиями бактерий и раствором активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного (30 °C)



При температуре хранения 4 °С изменения органолептических свойств в контроле и в образцах говядины, инфицированных бактериями *Pseudomonas aeruginosa* 11, *Pseudomonas aeruginosa* 410, *Pseudomonas fluorescens* 27 и *Pseudomonas fluorescens* 220, происходили практически синхронно. На третьи сутки на поверхности образцов появилась слизь, а также запах. Цвет образцов становился более темным. Использование раствора активной фракции I в 1,75–4 раза увеличивало сроки появления признаков порчи.

При температуре хранения 30 °С и спонтанная микробиота (контроль), и конкретные штаммы бактерий рода *Pseudomonas* вызывали изменение органолептических свойств образцов говядины на первые сутки. Применение раствора активной фракции I увеличивало сроки появления признаков порчи в 1,5–4 раза по разным показателям [4, 7].

Таким образом, защита образцов говядины при температуре хранения 30 °С также эффективна, как и при температуре 4 °С.

Для образцов свинины, мяса птицы и рыбы также наблюдали защитное действие раствора активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с электронной и масс-спектрометрией, идентифицированы флавоноиды в экстрактах следующих лекарственных растений, произрастающих в Ливии: пажитника греческого (ориентин, изоориентин, витексин и изовитексин), фимбры головчатой (байкалин, скутелларин, диосмин и эриодиктиол), ромашки аптечной (кверцимеритрин и герниарин), шалфея лекарственного (лютеолин-7-О-глюкуронид, диосмин и байкалин) и ладанника шалфеелистного (кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид) [4; 7; 11].

2. У водно-спиртовых экстрактов фимбры головчатой, шалфея лекарственного и ладанника шалфеелистного с помощью метода лунок установлена антибактериальная активность по отношению к бактериям рода *Pseudomonas* [2; 8; 9; 10; 13].

3. Наивысшей антибактериальной активностью за счет кемпферол-3-β-D-глюкопиранозидом обладает фракция I экстракта ладанника шалфеелистного, полученная на Sephadex-LH60 [4; 6; 7].

4. Разработанная методика одновременного количественного определения флавонолов, флавонов и флаван-3-олов позволила установить, что в сухом остатке активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного содержится флавонолов – 0,21 мг/мг, флавонов – 0,17 мг/мг и флаван-3-олов – 0,06 мг/мг [3].

5. Выделены 44 изолята доминирующих бактерий, вызывающих порчу пищевых продуктов, установлены их морфологические и физиолого-биохимические характеристики, на основании которых идентифицированы непатогенные бактерии рода *Pseudomonas* (19 штаммов), из которых бактерии 10 штаммов принадлежат к виду *fluorescens*, а бактерии 9 штаммов – к виду *aeruginosa* [1; 4; 5; 12].

6. На образцах пищевых продуктов с использованием выделенных непатогенных бактерий рода *Pseudomonas* продемонстрирована возможность защиты продуктов от микробной порчи с помощью активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного [4; 7].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Полученные экспериментальные результаты подтверждают возможность защиты пищевых продуктов от микробной контаминации с помощью активной фракции I экстракта ладанника шалфеелистного, которая может быть использована при создании биопрепарата.

Применение такого биопрепарата может обеспечить увеличение сроков хранения пищевых продуктов.

Для практического применения в составе биопрепарата могут быть использованы экстракт ладанника шалфеелистного, активная фракция I экстракта ладанника шалфеелистного или кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид. Однако предпочтительнее, на наш взгляд, использовать активную фракцию I экстракта ладанника шалфеелистного.

Результаты экспериментальных исследований по анализу эффективности антимикробной защиты пищевых продуктов экстрактами лекарственных растений от бактерий рода *Pseudomonas* внедрены в лекционный курс по дисциплине «Микробиология» для студентов III курса специальности 1-48 02 01 «Биотехнология» (раздел 2 «Физиология микроорганизмов», подраздел 2.3 «Влияние внешних факторов на рост микроорганизмов»).

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

### Статьи в научных изданиях, включенных в перечень ВАК Республики Беларусь

1. Элькаиб, Х. М. Порча пищевых продуктов: виды, причины и способы предотвращения / В. Н. Леонтьев, Х. М. Элькаиб, А. Э. Эльхедми // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер.: Физиол., биохим. и молекуляр. основы функционирования биосистем. – 2013. – Т. 8, ч. 1. – С. 125–130.

2. Элькаиб, Х. М. Ингибирование роста бактерий рода *Pseudomonas* растительными экстрактами / Х. М. Элькаиб, В. Н. Леонтьев // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер.: Физиол., биохим. и молекуляр. основы функционирования биосистем. – 2015. – Т. 10, ч. 1. – С. 104–106.

3. Элькаиб, Х. М. Количественное определение флавоноидов ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) / Х. М. Элькаиб, В. Н. Леонтьев, П. Н. Саввин // Вестн. Воронеж. гос. ун-та инженер. технологий. – 2017. – Т. 79, № 1. – С. 271–275.

4. Элькаиб, Х. М. Новая область применения флавоноидов лекарственных растений / Х. М. Элькаиб, В. Н. Леонтьев // Наука и инновации. – 2018. – № 8. – С. 50–53.

### Другие статьи в рецензируемых научных журналах

5. Элькаиб, Х. М. Характеристика бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из пищевых продуктов / Х. М. Элькаиб, А. Э. Эльхедми, В. Н. Леонтьев // Тр. Белорус. гос. технол. ун-та. Сер.: Химия, технология органических веществ и биотехнология. – 2015. – № 4. – С. 251–255.

6. Elkaib, H. M. Growth inhibition of bacteria from the genus *Pseudomonas* determined by kaempferol-3- $\beta$ -D-glucopyranoside extracted from sage-leaved rockrose (*Cistus salviifolius* L.) / H. M. Elkaib, A. E. Elhedmi, V. N. Leontiev // International Journal of Chemistry, Pharmacy and Technology. – 2018. – Vol. 3, no. 4. – P. 28–32.

7. Элькаиб, Х. М. Применение экстрактов лекарственных растений, произрастающих в Ливии, для защиты пищевых продуктов от микробной порчи / Х. М. Элькаиб, В. Н. Леонтьев // Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2018. – Т. 11, № 1. – С. 81–90.

### Материалы конференций и тезисы докладов

8. Элькаиб, Х. М. Компоненты лекарственных растений – ингибиторы развития бактерий рода *Pseudomonas*, вызывающих порчу пищевых продуктов / Х. М. Элькаиб, В. Н. Леонтьев, И. В. Генюш // Технология органических веществ : тез. докл. 78-й науч.-техн. конф. проф.-преподават. состава, науч.

сотрудников и аспирантов, Минск, 3–13 февр. 2014 г. / Белорус. гос. технол. ун-т. – Минск, 2014. – С. 58.

9. Элькаиб, Х. М. Ингибирование роста бактерий рода *Pseudomonas* растительными экстрактами / Х. М. Элькаиб, В. Н. Леонтьев // Технология органических веществ : тез. докл. 79-й науч.-техн. конф. проф.-преподават. состава, науч. сотрудников и аспирантов, Минск, 2–6 февр. 2015 г. / Белорус. гос. технол. ун-т ; гл. ред. И. М. Жарский. – Минск, 2015. – С. 16.

10. Элькаиб, Х. М. Лекарственные растения – ингибиторы развития бактерий рода *Pseudomonas* в пищевых продуктах / Х. М. Элькаиб // Техника и технология пищевых производств : тез. докл. XI Междунар. науч.-техн. конф., Могилев, 20–21 апр. 2017 г. / Могилев. гос. ун-т продовольствия ; ред.: А. В. Акулич [и др.]. – Могилев, 2017. – С. 140.

11. Элькаиб, Х. М. Идентификация флавоноидов в экстрактах лекарственных растений методом ВЭЖХ-МС / Х. М. Элькаиб, Е. В. Феськова, В. Н. Леонтьев, О. С. Игнатовец // Молекулярно-генетические и биотехнологические основы получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ: Нарочанские чтения – 11 : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 20–23 сент. 2017 г. / Белорус. гос. ун-т, Сев.-Кавк. федер. ун-т ; сост.: В. П. Курченко, А. Д. Лодыгин. – Минск ; Ставрополь, 2017. – С. 156–160.

12. Элькаиб, Х. М. Характеристика бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из различных пищевых продуктов / Х. М. Элькаиб, В. Н. Леонтьев // Молекулярно-генетические и биотехнологические основы получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ: Нарочанские чтения – 11 : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 20–23 сент. 2017 г. / Белорус. гос. ун-т, Сев.-Кавк. федер. ун-т ; сост.: В. П. Курченко, А. Д. Лодыгин. – Минск ; Ставрополь, 2017. – С. 285–290.

13. Elkaib, H. Plant extracts inhibition effect on *Pseudomonas* bacteria growth / H. Elkaib, A. Elhedmi // 2<sup>nd</sup> Libyan Conference on Medical and Pharmaceutical Sciences, Tripoli, 28 April 2018 / University of Tripoli Alahlia. – Tripoli, 2018. – P. 35–36.

**РЭЗІЮМЭ**  
**Элькайб**  
**Хасам Махамед М.**

**Склад флаваноідаў лекавых раслін, якія растуць у Лівіі,  
і іх актыўнасць у адносінах да бактэрыі роду *Pseudomonas***

**Ключавыя словы:** лекавыя расліны, ладанік шалфейліставага (*Cistus salviifolius*), флаваноіды, кэмпферол-3- $\beta$ -D-глюкопіраназід, харчовыя прадукты, мікробная кантамінацыя, бактэрыі роду *Pseudomonas*.

**Мэта даследавання:** пошук сярод лекавых раслін, якія растуць у Лівіі і валодаюць антысептычнымі ўласцівасцямі, расліны, што ўтрымлівае флаванол – кэмпферол-3- $\beta$ -D-глюкопіраназід, які абумоўлівае антымікробную актыўнасць у адносінах да бактэрыі роду *Pseudomonas*, а таксама вывучэнне магчымасці выкарыстання экстракта гэтай расліны для абароны харчовых прадуктаў ад мікробнага пашкоджання.

**Метады даследавання:** храматаграфічныя, спектральныя, фізіялагічныя, біяхімічныя, мікрабіялагічныя, органалептычныя, матэматычная статыстыка.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** упершыню ўстаноўлена, што сярод лекавых раслін, якія растуць у Лівіі (пажытнік грэцкі, фімба галаўчатая, рамонак аптэчны, шалфей лекавы, ладанік шалфейліставага), найвышэйшай антымікробнай актыўнасцю ў адносінах да бактэрыі роду *Pseudomonas*, валодае экстракт ладаніка шалфейліставага за кошт таго, што ён утрымлівае кэмпферол-3- $\beta$ -D-глюкопіраназід. Распрацавана метадыка адначасовага колькаснага вызначэння флаванолаў, флаванаў і флаван-3-олаў ў экстрактах лекавых раслін. Устаноўлена магчымасць абароны харчовых прадуктаў ад мікробнага пашкоджання з дапамогай актыўнай фракцыі экстракта ладаніка шалфейліставага.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** вынікі пацвярджаюць магчымасць абароны харчовых прадуктаў ад мікробнай кантамінацыі з дапамогай актыўнай фракцыі экстракта ладаніка шалфейліставага.

Вынікі даследаванняў, што выкладзены ў дысертацыі, ўкаранены ў лекцыйны курс па дысцыпліне «Мікрабіялогія» для студэнтаў III курса спецыяльнасці 1-48 02 01 «Біятэхналогія».

**Вобласць выкарыстання:** фізіялогія і біяхімія раслін, мікрабіялогія, харчовая біятэхналогія.

**РЕЗЮМЕ****Элькаиб****Хоссам Мохамед М.****Состав флавоноидов лекарственных растений, произрастающих в Ливии, и их активность по отношению к бактериям рода *Pseudomonas***

**Ключевые слова:** лекарственные растения, ладанник шалфеелистный (*Cistus salvifolius*), флавоноиды, кемпферол-3- $\beta$ -D-глюкопиранозид, пищевые продукты, микробная контаминация, бактерии рода *Pseudomonas*.

**Цель исследования:** поиск среди лекарственных растений, произрастающих в Ливии и обладающих антисептическими свойствами, растения, содержащего флавонол – кемпферол-3- $\beta$ -D-глюкопиранозид, обуславливающий антимикробную активность по отношению к бактериям рода *Pseudomonas*, а также изучение возможности использования экстракта этого растения для защиты пищевых продуктов от микробной порчи.

**Методы исследования:** хроматографические, спектральные, физиолого-биохимические, микробиологические, органолептические, математическая статистика.

**Полученные результаты и их новизна:** впервые установлено, что среди лекарственных растений, произрастающих в Ливии (пажитник греческий, фимбра головчатая, ромашка аптечная, шалфей лекарственный, ладанник шалфеелистный), наивысшей антимикробной активностью по отношению к бактериям рода *Pseudomonas* обладает экстракт ладанника шалфеелистного за счет содержащегося в нем кемпферол-3- $\beta$ -D-глюкопиранозида. Разработана методика одновременного количественного определения флавонолов, флавонов и флаван-3-олов в экстрактах лекарственных растений. Установлена возможность защиты пищевых продуктов от микробной порчи с помощью активной фракции экстракта ладанника шалфеелистного.

**Рекомендации по использованию:** результаты подтверждают возможность защиты пищевых продуктов от микробной контаминации с помощью активной фракции экстракта ладанника шалфеелистного.

Результаты исследований, изложенные в диссертации, внедрены в лекционный курс по дисциплине «Микробиология» для студентов III курса специальности 1-48 02 01 «Биотехнология».

**Область применения:** физиология и биохимия растений, микробиология, пищевая биотехнология.

## SUMMARY

Elkaib

Hossam Mohamed M.

### **Composition of flavonoids of medicinale plants found in Libya and their activity against bacteria of the genus *Pseudomonas***

**Key words:** medicinal plants, Sage-leaved Rockrose (*Cistus salviifolius*), flavonoids, kaempferol-3- $\beta$ -D-glucopyranoside, food products, microbial contamination, bacteria of the genus *Pseudomonas*.

**Objectives:** to find the plant (among medicinal plants with antiseptic properties found in Libya) which in fact contains flavonol – kaempferol-3- $\beta$ -D-glucopyranoside, that specifies antimicrobial activity against bacteria of the genus *Pseudomonas* and to study the possible use of this plant extract for food protection from microbial deterioration.

**Investigation methods:** chromatographic, spectral, physiological and biochemical, microbiological, organoleptic, mathematical statistics.

**The results obtained and their novelty:** having studied the properties of medicinal plants found in Libya (Fenugreek, Spanish oregano, German chamomile, Garden sage and Sage-leaved Rockrose), it has been determined, for the first time, that Sage-leaved Rockrose possesses the highest antimicrobial activity against bacteria of the genus *Pseudomonas* owing to the content of kaempferol-3- $\beta$ -D-glucopyranoside in its composition. The original technique for simultaneous quantitative determination of flavonols, flavones and flavin-3-ol in medicinal plant extracts has been developed. It has been determined that active fraction of Sage-leaved Rockrose extract can protect food from microbial deterioration.

**Recommendations on the use:** the results confirm the properties of Sage-leaved Rockrose extract active fraction to be vital for protection of food products from the microbial spoilage.

The research results stated in the thesis have been included to the lecture course on “Microbiology” for the third year students majoring in 1-48 02 01 “Biotechnology”.

**Field of application:** plant physiology and biochemistry, microbiology, food biotechnology.