МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических и
естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.03.01 Биология
Профиль подготовки Биохимия
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

«ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ЭФФЕКТА ПРОДУКТОВ ПЧЕЛОВОДСТВА»

Студент _____ Лобачев Антон Юрьевич

Руководитель _____ Кручинина А.Д.

Нормоконтролер _____ Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 16.06.22 №14)

Заведующий кафедрой _____ Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой _____ хорошо _____

(протокол заседания ГЭК от 23.06.22 № 4)

Секретарь ГЭК _____ Клыченков С.В.

Пенза, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....6
1.1Продукты пчеловодства.....6
1.1.1 Мёд, как самый распространённый из продуктов пчеловодства.....6
1.1.2 Маточное молочко состав и его свойства.....8
1.1.3 Трутневый расплод и его состав.....9
1.2 Антибактериальные компоненты продуктов пчеловодства.....11
1.2.1 Антибактериальные свойства мёда.....11
1.2.2 Антибактериальная активность трутневого расплода.....13
1.2.3 Антибактериальные вещества продуктов пчеловодств.....13
1.2.4 Бактерицидные пептиды насекомых.....15
1.3 Вещества пептидной природы с антибактериальным эффектом.....17
1.3.1 Апидаецины, свойства и биологическая активность.....17
1.3.2 Абаецин, как основной антибактериальный пептид медоносных пчел (Apis Mellifera).....19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....24
2.1 Объекты исследований.....24
2.2 Методы исследований.....24
2.2.1 Тангенциальная ультрафильтрация.....24
2.2.2 Гель-фильтрация.....25
2.2.3 Определение концентрации белков и пептидов.....26
2.2.4 Проведение оценки антибактериального эффекта продуктов пчеловодства.....27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....32
3.1 Калибровка белковых молекул по БСА.....32
3.2 Результаты гель-фильтрации.....32
3.3 Изучение антибактериального эффекта белково-пептидных фракций.....36
3.3.1 Получение и характеристика опытных культур.....36

3.3.2 Оценка антибактериальной активности диско-диффузионным методом.....39
3.3.3 Оценка антибактериальной активности методом определения минимальной подавляющей концентрации.....43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....47
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....49

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность представленной темы заключается в том, что собственно почти все люди не задумываются о том, насколько уникальны продукты пчеловодства, и какую огромную роль они играют в жизни человека.

Одной из наиглавнейших проблем интересующих людей на сегодняшнее время, считается профилактика и лечение вирусных и простудных заболеваний. Главными виновниками, которых считаются различные вирусы и бактерии.

Давно известно, что мёд, прополис, маточное молочко и другие продукты пчеловодства обладают антибактериальным эффектом, благодаря наличию в их составе белков и пептидов. Эти антибактериальные белки и пептиды ещё не достаточно хорошо изучены учёными. А, как известно, вещества пептидной природы обладают высокой биологической активностью, оказывают огромное влияние на различные физиологические функции организма.

Поэтому мёд, прополис, маточное молочко, трутневый расплод и другие продукты пчеловодства, могут выступать в качестве сырья для получения новых антибактериальных препаратов, которые могут применяться в медицине.

Целью данной работы является провести оценку антибактериального эффекта продуктов пчеловодства.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Выделить пептиды и белки маточного молочка, используя методы ультрафильтрации и гель-фильтрации.

2. Выделить пептиды трутневого расплода, используя методы ультрафильтрации и гель-фильтрации.

3. Провести оценку антибактериального эффекта пептидов и белков маточного молочка и трутневого расплода на таких культурах, как сенная

палочка, клостридий и азотобактер с помощью метода диффузии в агар, диско-диффузионного метода и метода серийных разведений в жидкой питательной среде.

Дипломная работа написана на 53 листах, содержит 5 таблицы, 11 рисунков и список литературы на русском и английском языках из 48 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Продукты пчеловодства

1.1.1 Мёд как самый распространённый из продуктов пчеловодства

Достаточно длительное время исследование продуктов пчеловодства на предмет наличия антибактериальной активности является перспективным направлением в сфере научных разработок. Продукты пчеловодства, такие как пчелиный мёд, прополис, маточное молочко, трутневый расплод и др. в какой-то степени являются уникальными веществами, и уже несколько столетий так называемая народная медицина использует в качестве средств для поднятия иммунитета, восстановления после болезней, изготовления антибактерицидных и ранозаживляющих средств.

Например, мёд уже длительное время используется различными народами мира как проверенное средство, способное поднять иммунитет человека, а также для лечений различных внутренних и наружных заболеваний.

В состав мёда входят различные вещества: фруктоза и глюкоза (около 70 % сухого веса), значительно меньшее количество сахарозы и других углеводов (мальтоза, мелицитоза и т.д.), небольшое количество макроэлементов и микроэлементов, витаминов, органических кислот (винная, яблочная, щавелевая, молочная и т. д.) [7].

Совсем недавно мёд ещё применялся наружно в качестве лечения против различных кожных заболеваний.

Обычно бактерицидные качества мёда связаны с наличием в его составе метилглиоксаля, перекиси водорода и большого количества углеводов.

Помимо всего прочего мёд бывает разных сортов. Было доказано, что определенный сорт мёда мануки (*Leptospermum scoparium*) в своём составе содержит больше количество метилглиоксаля, по сравнению с другими

сортами мёда. Тем самым обладает лучшим антибактерицидным свойством [39].

Однако нельзя утверждать, что другие сорта мёда не обладают анибактерицидными свойствами из-за меньшего содержания в них метилглиоксаля. Поэтому будет неверно считать, что другие сорта мёда вовсе не обладают подобными свойствами.

Так как помимо этого компонента в составе мёда присутствуют ещё и сахара, высокая осмолярность которых также обеспечивает бактерицидные свойства. Ученые предполагают, что высокая осмолярность и низкое содержание воды не даёт возможности в росте и развитие бактерий. Также предполагалось, что в мёде помимо сахаров и углеводов находятся ещё антибактерицидные пептиды пчелиного происхождения. Потому что ещё с 80-х годов XX века было известно, что антибактерицидные пептиды — являются главным компонент врождённого иммуннитета насекомых, а в 90-х годах того же столетия были выделены два семейства антибактерицидных пептидов — абаецины и апидаецины. Это вещества пептидной природы являются наиболее изученными на сегодняшний день.

Эти пептиды синтезируются в гемолимфе и обеспечивают защитную функцию пчел против различных бактериальных заболеваний. С большим процентом уверенности можно предполагать, что антибактерицидные пептиды могут попасть в мёд в то время, когда происходит переваривания нектара в зобу пчёл, необходимым для предотвращения его порчи и сохранности.

В последние годы стала развиваться новая область в медицине, которая называется – апитерапия. Эта область всё больше и больше привлекает на свою сторону врачей и ученых, тем самым позволяет изучать новые направления.

Апитерапия предполагает проведение процедур не только на основе мёда, но и на других продуктах пчеловодства для исцеления многих болезней.

Вполне вероятен тот факт, что в мёде могут находиться и иные низкомолекулярные вещества схожие с веществами белковой природы, обладающими бактерицидными свойствами, которые ещё остаются неизвестны ученым.

Ведь благодаря изученным антибактерицидным пептидам становиться, возможно, создать антибиотик нового поколения, который бы соответствовал всем требованиям сегодняшнего времени и не обладал бы недостатками у уже существующих антибиотиков [25].

1.1.2 Маточное молочко состав и его свойства

Выделяемый секрет глоточных и верхнечелюстных желез настоящих пчел называют – маточным молочком. Который служит пищей в течение нескольких дней для личинок пчел, трутней и маткам летом и весной, в период когда они откладывают яйца.

Маточное молочко содержит желтовато-белый цвет, своеобразный вкус и кислый запах. Состав его очень разнообразен. В него входят до 18% белков, от 10 до 17% углеводов, до 5,5% жиров и 1% минеральных веществ. Также в его составе присутствует большое количество различных ферментов, витаминов, макроэлементов и микроэлементов. Точно доказано, что в маточном молочке присутствуют все незаменимые аминокислоты.

Маточное молочко по своим свойствам также превосходит всеми нами хорошо известным коровье молоко. Так как в 5 раз больше содержит белков, в 6 раз больше углеводов, 2-3 раза больше жиров и в большей степени витаминов. Причем белки являются, хорошо усвояемыми. Натуральное произведенное пчелами маточное молочко в маточнике является стерильным и обладает бактериостатическими и бактерицидными свойствами способных задерживать видимый рост и развитие многих микроорганизмов, вплоть до их уничтожения [16]. Но на этом наиболее полезные свойства маточного молочка не заканчиваются.

Также в маточном молочке были выявлены нуклеиновые кислоты, обладающие весомой ролью в процессе регулировки синтеза веществ [6].

В маточном молочке в большом количестве содержится лизоцим, который выступает в качестве гуморального фактора резистентности способный вызывать разрушение (лизис) клеточных мембран бактерий, а также выработку антител, играющую важную роль в иммуномодулирующей активности. Главными углеводами маточного молочка являются глюкоза до 20%, фруктоза до 10%, рибоза, сахароза, манноза, мальтоза и другие. В качестве минеральных веществ в маточном молочке представлены такие соединения, как натрий (Na), калий (K), кальций (Ca), фосфор (P), магний (Mg), марганец (Mn), медь (Cu), серебро (Ag), золото (Au) и в наиболее большем количестве содержится цинк (Zn), железо (Fe), кобальт (Co) [30].

Огромную роль в биологической активности маточного молочка играет его липидная фракция. Ну, как например жирные кислоты принимают участие в окислительно-восстановительных процессах, то и активность маточного молочка связывают именно с ними [11,14].

В маточном молочке находятся высочайший процент витаминов группы (B), были выявлены такие как никотиновая и пантотеновая кислоты, птеридиновые соединения (биоптерин и неоптерин), входящие в состав витаминов группы фолиевой кислоты, играющих роль в кроветворении и других процессах обмена веществ [14,21].

1.1.3 Трутневый расплод и его состав

Ещё одним известным из продуктов пчеловодства является трутневый расплод, представляющий собой открытый или запечатанный расплод из которого в дальнейшем будут развиваться трутни [1].

Трутневый расплод также является уникальным продуктом пчеловодства в своем роде.

Трутневый расплод по своим химическим свойствам и составу очень схож с характеристиками маточного молочка. Он почти идентичен, но всё же

имеет свои отличительные черты. В его составе содержание белков, жиров, углеводов, макроэлементов и микроэлементов практически одинаково [5,12].

Трутневый расплод состоит из сухих веществ на 30-40%, воды 60-70%, белков 10-58%, жиров 1,5-19%, углеводов 9-28%, органических кислот и аминокислот 7-32% и минеральных веществ 3% [5].

Однако отличается от маточного молочка трутневый расплод такими показателями, как pH, степень окисляемости, содержание количества воды, уступает по уровню деценовых кислот, однако больше содержит количество гормонов (прогестерон, эстрадиол и тестостерон) и суфгидрильных групп [4,12].

У личинок трутневого расплода в гомогенатном растворе обнаружены высокая активность различных АТР-аз. Большой активностью обладает Mg^{2+} -зависимая аденозин-5-трифосфатаза, активирующаяся ионами K^+ и Na^+ (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} - АТР-аза и –фосфогидролаза) и $Mg2^+$ -АТР-азы [2].

Эти АТР-азы интегрированы в липидном матриксе плазмалеммы и дают поток катионов через неё, что имеет огромное физиологическое значение. Огромная энергетическая активность данных ферментов гарантирует непрерывный рост и развитие личинок.

Также в гомогенатном растворе личинок трутневого расплода обнаружена большая активность кислой и щелочной фосфатаз. И причём активность кислой фосфатазы в 3 раза меньше, чем активность щелочной фосфатазы. Большая активность фермента у трутневых личинок может быть связана с интенсивным белковым обменом.

В трутневом расплоде количество незаменимых аминокислот составляет огромный процент «идеального белка». Большая часть, которых в трутневом расплоде находится либо в свободном состоянии, либо в составе транспортных олигопептидов. В гомогенате трутневого расплода также присутствуют растительные стеролы: это бета-ситостерол, сигма-стерин, гидроксиситостерол и кампостерин [9,12].

1.2 Антибактериальные компоненты продуктов пчеловодства

1.2.1 Антибактериальные свойства мёда

Первые упоминания об антибактериальных свойствах мёда были описаны Ван Кетелем в 1892 году. О том, что мёд обладает антибактериальными и бактерицидными свойствами говорят ряд факторов. Одним из которых является ингибин. Он достаточно хорошо изучен на сегодняшний день.

Изучив его свойства и происхождение, было выявлено, что этим веществом оказалась перекись водорода (H_2O_2). Как выяснилось перекись водорода (H_2O_2) образуется из глюкозы в процессе воздействия секрета фарингиальной железы пчел, фермента-глюкозооксидазы с участием кислорода. В итоге из глюкозы получается глюконолактон, который потом переходит в глюконовую кислоту и в перекись водорода. В дальнейшем была установлена прямая зависимость между перекисью водорода (H_2O_2) и её антибактериальными свойствами в мёде.

Однако потом в мёде обнаружили ещё один бактерицидный фактор – фитонциды в состав, которого входит бензойная кислота [10].

Фитонциды очень схожи с такими веществами, как авенацин, танины, пиносульфан, джуглон, флоридзин, и др. Все эти вещества собираются пчелами и откладываются ими в продуктах пчеловосдства. Антибактериальные компоненты, находящиеся в мёде способствуют нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

В благоприятных условиях развития пчелиной семьи, пчелы могут выделять уникальные по своим свойствам белки, выполняющие разные функции. И наоборот в менее благоприятных условиях выделение таких белков значительно сокращается.

Эти уникальные белки, медоносные пчелы образуют с помощью мандибулярных и гипофарингеальных слюнных желез. Помимо белков в этих железах медоносных пчел содержатся ещё и пептиды, служащие пищей

для кормления личинок, образования перги и пыльцевых ножек, а также создания мёда из нектара [45].

Следует знать, что при потреблении пчелиного мёда его антибактерицидные свойства снижаются под воздействием кишечного и желудочного сока [20].

Из этого можно сделать вывод, чтобы получить хороший эффект при различных заболеваниях ЖКТ, нужно приготовить его для употребления вовнутрь в виде гипертонического раствора. В противном случае не достигнится нужный нам эффект. Важно перед применением нейтрализовать кислую среду желудочного сока, выпив предварительно раствор питьевой соды или мёд с молоком. Мёд является сильным оружием против многих микроорганизмов. В желудке, например, он губительно действует на такой микроорганизм, как *Helicobacter pylori*. Он является одним из факторов развития язвенных болезней желудка у человека.

С. Младенов своими исследованиями установил такой факт, что если на протяжении 20 дней при суточной дозе в 120 г употреблять мёд, то повысится фагоцитарную активность лейкоцитов. В подтверждении этого факта, существуют ещё несколько проделанных этим ученым исследований на животных, связанные с повышением резистентности организма при довольно длительном употреблении мёда.

Другой же ученый Д. С. Джарвис, утверждает тот факт, что настоящий мёд, собранный в сотах имеет десенсибилизирующие действие. Предполагают, что сотовом мёде и в воске, применяемый для закупорки сотов, находятся вещества-антиаллергены, которые продуцируются пчелами. Но пока что их химическая природа до конца не изучена.

Можно предположить, что десенсибилизирующие свойства могут быть связанны с антитоксической активностью мёда. Существует гипотеза, то что сахар, входящий в состав мёда обладает антитоксическим действием.

Выше перечисленные компоненты мёда могут оказывать благоприятный эффект и на сердечнососудистую систему человека. Мёд

также способствует уменьшение вязкости крови, расширению коронарных сосудов, более лучшему питанию сердечной мышцы и обладает мягким гипотензивным эффектом в сочетании соков хрена, лимона и моркови [18].

1.2.2 Антибактериальная активность трутневого расплода

Антибактериальный эффект у продуктов пчеловодства в большой степени зависит от содержания в них деценовых кислот [37].

Вследствие этого антибактериальная активность гомогената трутневого расплода в отношении золотистого стафилококка, кишечной и слизеобразующей палочки буквально почти отсутствует, в отличие от угнетающего действия маточного молочка. Что является отличительной чертой трутневого расплода. А также собственно не исключено, маленькое содержание в трутневом расплоде деценовых кислот,а также реакция среды с pH=7, которое оказывается допороговым для антибактериального эффекта микроорганизма. Это согласуется с исчезновением антибактериального эффекта маточного молочка при нейтрализации его щелочным раствором [5].

Впрочем, присутствие бактерицидных пептидов в продуктах пчеловодства,в том числе и в трутневом расплоде предоставляет необходимость последующего изучения биологических свойств этого продукта на антибактериальный эффект, который на сегодняшний момент является ещё мало изученным.

1.2.3 Антибактериальные вещества продуктов пчеловодства

Бактерицидные пептиды (АБП) считаются боле менее изученными пептидами природного происхождения на сегодняшний момент. И основная часть из этой группы пептидов представлена катионными пептидами. Они способны встраиваться в мембранные структуры бактериальных клеток и приводить к разрушению липидной бислойной структуры мембран [48].

Причём большая часть антибактериальных пептидов (АБП) этой группы являются амфипатричны, т.е. обладают как гидрофильными, так и

гидрофобными структурами. Такие фрагменты обеспечивают способность взаимодействия пептидов с липидными компонентами (гидрофобная область) и фосфолипидными группами (гидрофильная область) [33].

Некоторые бактерицидные пептиды при очень малых концентрациях способны на уничтожение бактерий, даже не касаясь изменений в их мембранной структуре. Тем самым вместо направленного воздействия АБП на мембранную структуру, приводящую к их гибели, они действуют на некоторые другие не менее важные процессы, проходящие внутри клетки, такие как репликация и синтез белка. Которые никаким образом не влияют на целостность мембранной структуры. Это делает их уникальными в своей группе.

Ярким примером является буфомин II. Он способен проникать в клетки бактерий и взаимодействовать с ДНК и РНК без каких-либо повреждений мембраны [42].

Ещё одними из таких бактерицидных пептидов помимо буфомина II относятся и дрозоцин, пиррокорицин и апидаецин. Эти перечисленные АБП содержат в своём составе от 18 до 20 аминокислотных остатков с активным центром для внутриклеточной мишени [33].

В проведённых некоторых научных исследованиях было доказано, собственно, что некоторые пептиды из группы АБП способны к уничтожению устойчивых к антибиотикам бактерии.

К примеру, низин (АБП) и антибиотик ванкомицин способны заблокировать синтез клеточной стенки. Но есть штаммы, которые устойчивы одновременно и к метициллину и к ванкомицину, например, штамм *S. Aureus*, но в тоже время является чувствительным к низину.

У некоторых видов насекомых, как и у пчел, также были найдены пептиды с антибактериальными свойствами. Медоносные пчелы, которые были инфицированы настоящими живыми культурами *EscherichiaColi*, в процессе приводили к большому синтезу продуктов термостойких антибактериальных веществ.

Подобный гуморальный иммунитет существует и у ряда других насекомых. Например, у *Hyroophoracecropia*, у родственных молей, у мухи *Surcophagaperegrina*, и у *Phormiuterranovae*. Такие антибактериальные компоненты, синтезируемыми медоносными пчелами обладают уникальными по своим свойствам характеристиками по сравнению с другими изученными пептидами (АБП), некоторых позвоночных и беспозвоночных организмов [22].

1.2.4 Бактерицидные пептиды насекомых

Как известно у насекомых главным звеном в гуморальном иммунитете считаются антибактерицидные пептиды. К данной группе относятся катионные соединения белковой природы с молекулярной массой от 500 – 10.000 Да, обладающими антибактериальными и фунгицидными свойствами. Антибактериальные пептиды могут либо быть ассоциированы с пограничным эпителием или же находится в свободном состоянии в гемолимфе.

Например, в ядах насекомых были обнаружены катионные пептиды с бактерицидной активностью, такие как мелиттин, бомболитин, мастопараны и др. [44]

Воспроизводство антибактериальных пептидов у насекомых носит, индуцибельный характер. В гемолимфе содержится относительно низкая концентрация бактерицидных пептидов, но их концентрация способна повышаться при инфицировании. Тем более структуры, которые находятся на поверхности мембран, могут служить триггером иммунного ответа. Поступающий сигнал об инфицировании поступает на иммунокомпетентные клетки, что дает началу запуску синтеза антибактерицидных генов. Антибактерицидные пептиды функционально действуют, как против бактерий, грибков, так и против простейших и опухолевых клеток [46].

Уникальной особенность гуморального иммунитета насекомых считается, то что в какой-то степени он является параспецифичным т.е.

синтезируются различного рода семейств бактерицидных пептидов в зависимости от природы патогенна [32].

Антимикробные пептиды были впервые обнаружены у насекомых в 50-х гг. XX века [24]. Глубокое изучение антибактериальных пептидов насекомых начинается с работ коллектива Ганса Бомана, выполненных на сатурнии *Hyalophora cecropia* [43].

На сегодняшний момент уже известно больше 800 антибактериальных пептидов природного происхождения, и большая часть из них это пептиды синтезируемые насекомыми.

Сперва бактерицидную активность гемолимфы связывали с содержанием в ней активного лизоцима. Муколитический фермент – лизоцим, гидролизует гликозидную связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой пептидогликана клеточной стенки бактерий. Впрочем, как и основная доля антибактериальных пептидов, синтезируемыми насекомыми, лизоцим обладает индуцибельным характером синтеза. Например, титр фермента может возрасти в несколько сотен раз при септическом заражении [29].

Отличительной особенностью является, то, что лизоцим исключительно активен только в отношении грамм (+) бактерий. Для грамм (-) бактерий он является мало активным. Скорее всего, это связано с полной отсутствием у первых наружной мембраны и хорошей доступностью пептидогликанового слоя. Но все, же большая часть ученых придерживаются мысли о том, что антибактерицидные свойства лизоцима не являются преобладающими. Главная функция этого муколитического фермента скорее всего является удалением фрагментов клеточных стенок, которые остаются в гемолимфе после работы атибактерицидных пептидов [34].

Кроме всего этого лизоцим может осуществлять распознование и показ коротких фрагментов петидогликанового слоя иным распознающим молекулам и, в конечном итоге, эффекторным клеткам иммунной системы.

Итогом этого процесса является синтез антибактерицидных пептидов, который является пуском для клеточного механизма защиты [41].

Все анибактериальные пептиды синтезированные насекомыми, согласно их особенностям строения можно поделить на 3 большие группы:

1) линейные пептиды с α-спиралью, или цекропины;
2) пептиды, содержащие в своём составе дисульфидные связи;
3) пептиды с регулярно повторяющимися аминокислотами.

В первые две группы входят антибактериальные пептиды естественно-природного происхождения. А к третьей группе относятся все молекулы, компоненты которых имеют различное происхождение [38].

1.3 Вещества пептидной природы с антибактериальным эффектом

1.3.1 Апидаецины, свойства и биологическая активность

Некоторые насекомые в процессе эволюции смогли разработать собственные механизмы защиты против различных инфекций. Как уже было сказано ранее у некоторых видов насекомых, были обнаружении различные виды антибактериальных пептидов, способных проявлять бактерицидный эффект. Так сказать смогли создать свое оружие против врагов.

Такие гуморальные компоненты способны синтезироваться при инфекции. Их называют – апидаецины. Они выделяются из лимфатической жидкости пчелы (*Apis melifera*).

Апидаецины представляют собой новое семейство индуцибельных пептидных антибиотиков с базовой структурой: GNNRP (V/1) YTPQPRPPHPR (L/I). Это термостабильные, устойчивые, не спиральные пептиды, которые активно реагируют против большого ряда, как растительно-ассоциированных, так и человеческих патогенных бактерий. Полученные химическим путем синтезированные апидаецины обладают всё теми же свойствами, что и природные аналоги. Но к активным антибактериальным пептидам относятся только те пептиды, которые обнаруживаются в лимфе у взрослых пчел, в то время как у личинок пчел

содержатся всего лишь небольшое количество ещё неактивных предшествующих молекул.

В процессе исследования были открыты три близкородственных пептида: апидаецин Ia, Ib и II [15]. Перечисленные катионные пептиды являются стабильными при сниженном уровне значения pH и при высокой температуре t 100 °C. Присутствие шести пролинов помогает им быть стабильными. Существует три апидаецина, которые по своей первичной структуре практически схожи. Они имеют различия только в нескольких остатках.

Большое содержание пролина (33%) в этих пептидах делает их совершенно уникальными. Тем более, большое содержание пролина в апидаецине исключает пептидную и предполагает спиральную структуру. Скорее всего, такая структура предназначена для бактериолитической активности цекропинов или для некоторых других пептидных антибиотиков [36].

Обработанная апидаецином жизнеспособная клетка *E.coli*, отмечается значительно высоким ограничением видимого роста.

Апидаецины полностью сохраняют клеточные мембраны, не нарушая их целостности. Что делает их особенными. Соответственно, апидаецины могут обладать бактериостатическим, а не бактериологическим эффектом, как это было предложено для аттацинов.

Конкретное воздействие апидаецинов представляет собой достаточно медленное действие аттацинов, впоследствии при котором отмечен сниженный рост культуры *E. Coli* с задержкой по времени на 1 или 2 часа [27].

Магаинины, цекропины и мелиттины владеют литической активностью и разрушают мембранные структуры клетки [31,35].

Все апидаецины обладаю высокой активностью против грамм <+> бактерий. Все эти три разных апидаецина обладают одинаковой активностью против бактерий.

Есть мнение, что пчелы создали собственную систему защиты, специально нацеленную на те микроорганизмы, с которыми они довольно часто сталкиваются.

Невысокий уровень зрелых апидаецинов, совместно с преапидоецином в лимфе пчелиных личинок ясно показывает на снижение дипептидиламинопептидазы в личиночной лимфе. Отличные различия между иммунным ответом имагинального и преимагинального этапа, которые связаны с социальным поведением, позволяют личинкам пчел, в отличие от других личинок одиночных насекомых, присутствовать в более защищенной среде.

Более сниженная концентрация активных антибактериальных компонентов в лимфе личинок пчел грозит нарушением эффективности их иммунной системы.

Но, однако, кормят личинок рабочие пчелы, которые в дальнейшем отбирают пищу в провисекулусе и тем самым уменьшают степень риска инфицирования преимагинальных стадий [40].

Мощное бактерицидное воздействие апидаецинов и их кажущая не токсичность по отношению к клеткам эукариот имеет возможность быть использоваться, как антибиотическое лекарство при лечении бактериальных инфекций человека и животных.

Благодаря выделенным и изученным апидаецинам, а также экспрессируемым их генам на сегодняшний момент, позволяют получить сорта сельскохозяйственных культур, являющимся резистентными к болезнетворным микроорганизмам. Эта область находит всё большее распространение во всём мире и пользуется большим спросом.

1.3.2 Абаецин, как основной антибактериальный пептид медоносных пчел (Apis Mellifera)

Известно, что при заражении живыми клетками *E. Coli* , у медоносной пчелы (*Apis mellifera*) начинает синтезироваться некоторое количество

термостабильных бактерицидных компонентов. И как уже было сказано ранее, подобный гуморальный иммунитет существует и у ряда других насекомых.

Например, у *Hyroophoracecropia*, у родственных молей, у мухи *Surcophagaperegrina*, и у *Phormiuterranovae*. Такие антибактериальные компоненты, синтезируемыми медоносными пчелами обладают уникальными по своим свойствам характеристиками по сравнению с другими изученными пептидами (АБП) [22].

На сегодняшний день, по последним данным, известно, что три индуцированных антибактериальных компонентов медоносных пчел точно относятся к уже известному семейству апидаецинов. Ранее было сказано об изоляции и свойствах данных веществ [26].

Эти антибактериальные пептиды по своей структуре являются уникальными среди подобных антибактериальных веществ позвоночных и беспозвоночных.

Помимо уже известных трех антибактериальных компонентов медоносных пчел, был идентифицирован ещё один четвертый индуцибельный бактерицидный фактор. Благодаря химическим методам анализа было установлено его структура и свойства. Присвоено название этому фактора – *abaecin*.

Этот *abaecin* представлен в виде пептида в состав, которого входит 34 аминокислотных остатков. В нём присутствует 10 остатков пролина – (29%) и полное отсутствие кислотных остатков и цистеинов. В сгруппированных положениях 12, 13, 27, 29 суммарный заряд равен (4^+). Пролин размещается по всей длине таким образом, что исключает вероятность образования у пептида α-спиральной конформации [23].

Более того, такие пролины дублируются и имеют возможность выравниваться изнутри.

Поиск в базе данных NBRF последовательности белков (*Washington,DC*) практически не дал выявить никакого совпадения с уже

известными белками. Поиск в процессе установил только белок – коллаген богатым содержанием пролином.

Более тщательный анализ результатов показал, то, что они носят случайный характер. А также в ходе анализа были обнаружены уникальные сходства последовательности с другими бактерицидными пептидами, с такими как абаецин, диптерицин А и апидаецин [25].

Схожесть структуры пролина и наличие гидрофобных аминокислотных остатков в первых 18 и 19 остатков присутствуют в каждом из 3-х пептидов. Другая же часть последовательности *abaecin* ещё демонстрирует значительное сходство с диптерицином А. Но важным отличием является, то что диптерицин А был получен от личинок *Phormia*, в то время как другие от взрослых пчел. Получается, что диптерицин А хоть и относится к антибактерицидным пептидам, но представляет предшествующую молекулу полученную от взрослой особи мухи с менее коротким циклом.

Главные дипептидные очередности считаются отлично изученными участками нескольких препропептидов, охватывая даже маганины. Очередность последовательности Arg-Lys (27-28) в диптерицине А считается потенциальным сайтом. Не находят сходства между: абаецином, аттацинами, секропинами/саркотоксинами, сапецинами/дефензинами, лизоцимами насекомых и бактерицидными пептидами, таких как магаинины, гистатины тахиплезины и яичный лизоцим.

Если сильно не обращать внимания на то, что абаецин, апидаецин и диптерецин А имеют четкое соединение конкретными последовательностями в молекуле. Но все равно находится, хотя бы одна структурная или физиологическая разница. Поэтому, с какой бы стороны не подходить к этому вопросу всё равно найдутся отличия.

Также скажем, что диптерицин А гораздо длиннее других, выше сказанных пептидов (82 против 34 и 18).

И конкретное воздействие апидаецина контрастирует с задержанным воздействием абаецина и диптерицина [25,47].

Обращее внимание о сходстве последовательности между апидаецином и абаецином, говорит о том, что абаецин относится к последнему пептиду. В прочем это считается не так, на основаниях шести биологических свойствах. Для начала, апидаецины считаются селективно антибактериальными для грамм (-) бактерий; абаецины – являются умеренно антибактериальными и идентично интенсивно работают, как для грамм (+), так и для грамм (-) бактерий.

Также апидаецины обычно где-то в 200 раз более интенсивно активней проявляют свои свойства против *Agrobacterium, Erwinia* и *E. Coli*. И потом мутантная форма *E. Coli*с больше высочайшей стабильностью к апидаецину, чемего родительский штамм, не содержит нужной степени резистентности к абаецину, чем к апидаецину. Наблюдаемая активность у абаецина была ориентировачно направлена против *Xunthomonus Cumpestris*, устойчивому к апидаецину.

Далее активность абаецина не была выявлена в питательных бульонах, забуференных фосфатно-солевым раствором, но была выявлена бактерицидная активность только тогда когда заменили воду фосфатно-буферным солевым раствором. Раньше уже было сказано, что апидаецины проявляют активно свои свойства в этих забуференных средах.

Важно заметить, что абаецин в отличие от апидаецина обладает менее бысто действующей бактерицидной активностью. Поэтому все перечисленные эти отличия показывают на определенный способ воздействия. Беря во внимание их неаллергическую структуру и условную неважность осмотического стресса для их работы, практически мало вероятно, либо апидаецин, либо абаецин относящихся к литическими пептидами, которые разрушают клеточные стенки. Не считая того, что каталитическая активность гликозидгидролазы лизоцима была присуждена остаткам Glu и Asp, находящихся в каталитическом сайте, оба из которых отсутствуют в последовательностях абаецина и апидаецина [28].

Помимо всего прочего, существует ещё одна таинственная особенность абаецина, которая заключается в полной потери антибактериального свойства в присутствии фосфатно-буферных солевых или разведенной пчелиной лимфе средах. Они довольно схожи с их физиологической средой. Итого, если не обращать внимание на то, что абаецин без сомнения связан с антибактериальной активностью пчел значит его вклад in vivo в бактерицидную защиту не понятен.

Ещё многое остается до конца не ясным и не изученным в этой области. Некоторые моменты, конечно, ещё требуют более детального исследования. У абаецина есть такая возможность перехода в более короткое состояние очень похожего на пептида – апидаецин. Абаецин имеет возможность работать, как с одним, так и сразу с несколькими другими значимыми бактерицидными компонентами пчел и оказывать антибактериальную активность против тех штаммов, которые стали обладать повышенной резистентностью к тем или иным антибактериальным компонентам.

В конце концов, ещё множество различных семейств бактерий нуждаются в детальном изучении и тестировании на чувствительность и устойчивость к абаецину.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследований

В качестве исходных продуктов для получения белков и пептидов продуктов пчеловодства с целью оценки их антибактериальной активности диско-диффузионным методом и методом минимальной ингибирующей концентрации были использованы маточное молочко и гомогенат трутневого расплода.

Работы по выделению пептидных и белковых фракций из растворов маточного молочка и гомогената трутневого расплода и оценка антибактериального эффекта полчуенных фракций проводились в Пензенском государственном университете в лабораториях кафедры «Общая биология и биохимия».

Для выделения пептидов и белков использовали 30%-й водный раствор маточного молочка и 20%-й гомогенат трутневого расплода на основе 0,9%-го раствора NaCl, предварительно отцентрифугированный при скорости 5000 об/мин в течение 15 минут для удаления остатков клеток и тканей. Полученные растворы хранились в морозильной камере при -25° С.

В ходе проведения исследований по оценке антибактериального эффекта в выбранных продуктах пчеловодства в качестве модельных микроорганизмов использовалась сенная палочка (*Bacillus subtilis*), клостридии (*Clostridium)* - как модель грамположительных бактерий, и азотобактер (*Azotobacter*) как модель грамотрицательных бактерий.

2.2 Методы исследований

2.2.1 Тангенциальная ультрафильтрация

Тангенциальная ультрафильтрация – это процесс мембранного разделения жидкостей, который выполняется путем пропускания их под

действием повышенного давления, создаваемого перистальтическим насосом, через полупроницаемую мембрану [3].

Фильтрацию проводили с использованием перистальтического насоса MasterFlex и селективной мембраны Vivaflow 200, которая позволяет разделить в тангенциальном потоке молекулы на основе их молекулярной массы: пропускает через себя молекулы массой меньше 10 кДа и задерживает молекулы с большей массой. Такая установка очень производительна и имеет высокую эффективность, т. к. позволяет разделить растворы объемом от 100 мл до 5 л.

Перед использованием мембраны необходимо очистить её поверхность от возможных остатков предыдущих фильтраций. Для этого в резервуар заливают дистиллированную воду и запускают перистальтический насос, после чего меняют дистиллированную воду на 0,5 н раствор NaOH для омыления и удаления трудноотмываемых частиц. После заново промывают всю систему дистиллированной водой для удаления остатков NaOH и других примесей.

Для разделения молекул исследуемого раствора в резервуар заливали достаточный объём разделяемого раствора, закрывали все клапаны и запускали перистальтический насос, регулируя скорость оборотов в минуту, так чтобы давление в мембране не превышало 2,5 Бар. После прекращения фильтрации промывали всю систему аналогичным образом, как это было сказано выше.

2.2.2 Гель-фильтрация

Для проведения гель-фильтрации использовался сефадекс G-25. Для подготовки геля небольшое количество сухого порошка было суспендировано в десятикратном объёме дистиллированной воды и оставлено для набухания на ночь. Полученный гель взмучивают и оставляют отстояться, повторяя данную процедуру несколько раз, чередуя её с декантацией для удаления обломков гранул геля.

Перед заполнением гелем колонку закрепляют строго вертикально, закрывают нижний фитинг и помещают в основание колонки вырезанный нужного размера кружок из фильтровальной бумаги для предотвращения утечки геля из колонки. Далее колонку заполняют небольшим количеством воды до полного заполнения объёма фитинга. После удаления воздуха из полости фитинга в колонку заливается суспензия геля при открытом фитинге. В этот момент важно следить за состоянием колонки и не допускать, чтобы уровень воды подходил вплотную к уровню столба геля. После окончания забивки колонки гелем сверху помещается ещё один кружок фильтровальной бумаги для предотвращения колебания уровня геля или взмучивания верхних частиц сефадекса из-за добавления пробы или элюента. После заполнения колонки она должна быть уравновешена путём промывания элюирующим растворов в объёме ~10 объёмов колонки (в зависимости от назначения колонки в качестве элюента использовался либо 0,9%-й раствор NaCl, либо дистиллированная вода).

Для разделения пептидов маточного молочка и трутневого расплода соответствующие растворы наносили в объёме 0,5 мл на колонку и собирали фракции объёмом по 2 мл, используя сефадекс G-25 и ручную колонку. Для разделения белков маточного молочка использовали колонку TSKgel G3000SW, заполненную силикагелем, модифицированным диольными функциональными группами, подключённую к хроматографической системе NGC Quest 10 plus, фракции собирали объёмом 1 мл коллектором фракций. В обоих случаях элюция велась с использованием 0,9%-го раствор NaCl.

Вариант гель-фильтрации с сефадексом G-25 использовался также и для обессоливания полученных фракций, в данном случае в качестве элюента использовали дистиллированную воду.

2.2.3 Определение концентрации белков и пептидов

В данной работе для определения присутствия или количественного определения белков или пептидов в пробе использовался либо метод Лоури,

либо спектрофотометрический метод по поглощению электромагнитного излучения на длине волны 220 нм.

Метод Лоури – это метод количественного определения содержания окрашенных продуктов белковой природы с реактивом Фолина-Чокальтеу совместно с биуретовой реакцией на пептидные связи [17].

Суть метода состоит в том, что к аликвоте исследуемой фракции объёмом 0,5 мл приливали 1 мл реактива С, являющийся смесью реактива В (0,5%-й раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 1%-м растворе или цитрата натрия) и реактива А (2%-й раствор Na_2CO_3 в 0,1 М NaOH). Смесь хорошо перемешивали и оставляли инкубироваться 10 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробирку добавляли по 100 мкл реактива Фолина-Чокальтеу и после перемешивания оставляли инкубироваться на 40 мин при комнатной температуре [8].

После на фотоэлектроколориметре КФК-2 проводили измерение оптической плотности в кювете толщиной 1 см против контроля с длинной волны λ = 750 нм (в контрольные пробы вместо определяемых проб добавляли такой же объём дистиллированной воды). Для количественного определения была построена калибровочная прямая по разведениям БСА от 10 до 100 мкг/мл. Концентрацию белка в опытных пробах вычисляли по уравнению данной прямой.

2.2.4 Проведение оценки антибактериального эффекта продуктов пчеловодства

Для изучения антибактериальной активности полученных фракций белков и пептидов методами минимальной ингибирующей концентрации и диско-диффузионным методом необходимо выполнить несколько шагов:

1. Подготовка питательной среды для накопительных и опытных культур.
2. Подготовка суспензии опытных микроорганизмов и инокулята.
3. Подготовка опытных образцов.
4. Проведение эксперимента.

5. Обработка полученных результатов.

Проведение диско-диффузионного метода

Для начала исследуемую бактериальную культуру засевают газоном на питательный агар в чашке Петри:

Готовят микробную взвесь и 1 мл взвеси и наносят на всю поверхность чашки. На засеянную поверхность пинцетом помещается на одинаковом расстоянии друг от друга несколько бумажных дисков, содержащие определенные дозы разных антибактериальных веществ. И оставляются посевы инкубировать до следующего дня при 37°С. Диффузия антибиотика в агаре, приводит к формированию зоны подавления видимого роста микроорганизмов вокруг дисков. Результат учитывается путем измерения диаметра зоны отсутствия роста вокруг диска в миллиметрах.

В качестве материала из продуктов пчеловодства для исследования используются образцы трутневого расплода и маточного молочка. В начале готовятся растворы гомогената из маточного молочка и трутневого расплода.

Используя методы: тангенциальная ультрафильтрация полученные растворы гомогенатов проходят фильтрование через специальную мембрану, с разделением на пептиды и белки. Затем проводится гель-фильтрация для получения отдельных фракций на которых проводят исследование антибактериальный эффект на тестируемых культурах микроорганизмов.

Перед исследованием по проведению оценки антибактериального эффекта продуктов пчеловодства, приготавливаются питательные среды (агар-агар) на которых производятся посевы с тестируемыми культурами. В данном исследовании тестируемыми культурами являются: Сенная палочка (*Bacillussubtilis), Клостридии (Clostridium)* и Азотобактер (*Azotobacter*).

Для выделения азотобактера используют метод посева почвенных комочков на безазотистую агаризованную среду Эшби.

Состав среды Эшби (г/л водопроводной воды):

Маннит или сахароза или глюкоза	20,0
K2HPO4	0,2
MgSO4·7H2O	0,2
NaCl	0,2
KH2PO4	0,1
CaCO3	5,0
Агар-агар	20,0

Приготовленную питательную среду стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин. и разливают в стерильные чашки Петри.

МПА применяют для выращивания неприхотливых микроорганизмов и как основу для приготовления плотных специальных сред для культивирования более требовательных микробов (Сенная палочка, *Клостридии*). Состав среды МПА:

Пептон	10,0 г
NaCl	5,0 г
Вода мясная	1000,0 мл
Агар-агар	1,0-20,0 г
pH	7,3±0,2

Смесь кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения добавленных ингредиентов. Бульон фильтруют, устанавливают pH и добавляют измельченный агар (в зависимости от качества агара и назначения среды). После добавления агара среду кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара. Приготовленную среду разливают в пробирки или флаконы, стерилизуют в автоклаве при 121 °С в течение 20 мин.

Затем приготавливаются суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма).

Для инокуляции используется стандартная микробная взвесь, эквивалентная 0,5 по стандарту МакФарланда, разведённая в 100 раз на питательной среде. Приготовление инокулюма готовится из агаровой культуры. Для этого используется чистая суточную культуру микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах. Отберается несколько однотипных, четко изолированых колоний. Петлей перенесится небольшое кол-во материала с верхушек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором, доведя плотность инокулюма до 0,5 по стандарту МакФарланда. И не позднее, чем через 15 мин, после инокуляции, на поверхность чашки петри с питательной средой наносятся несколько дисков пропитанных АБП. После наложения дисков, чашки помещают в термостат на инкубирование 18-20 ч при 37°С кверху дном. Результат учитывается путем измерения диаметра получившейся зоны отсутствия видимого роста вокруг диска в миллиметрах (штангенциркулем или линейкой).Проведение оценки антибактериального эффекта проводил согласно МУК 4.2.1890-04.

Проведение метода серийных разведений.

Для проведения данного метода необходимо 3 основных реагента: это питательная среда, противомикробный препарат и тестируемые микроорганизмы. Метод основан на использовании двойных последовательных разведений концентраций АБП от максимального к минимальному. Антимикробная концентрация регулируется до правильной концентрации путем смешивания антибактериального препарата со средой. Отрегулированный противомикробный препарат последовательно разводится в нескольких пробирках для получения градиента. Инокулянт готовится также, как и для диско-диффузионного метода. Для проверки положительный контроль пересевается в стократном разведении для подсчета колониеобразующих единиц. Микроорганизмы засеваются в пробирки и инкубируются в течение 16-20 часов. Результат (МПК) обычно определяется по мутности: если среда мутная, то это означает, что культура

выросла, а значит концентрация недостаточно высокая; если среда прозрачная, значит этой концентрации хватает чтобы подавить рост культуры.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Калибровка белковых молекул по БСА

Для определения количественного содержание в каждой пробе и фракциях белковых молекул аналитическим методом строится калибровочный график по БСА. Построение калибровочного графика проводится по данным измерениям оптической плотности БСА с применением метода Лоури. Калибровочный график и полученное уравнение представлено на (рис. 1).

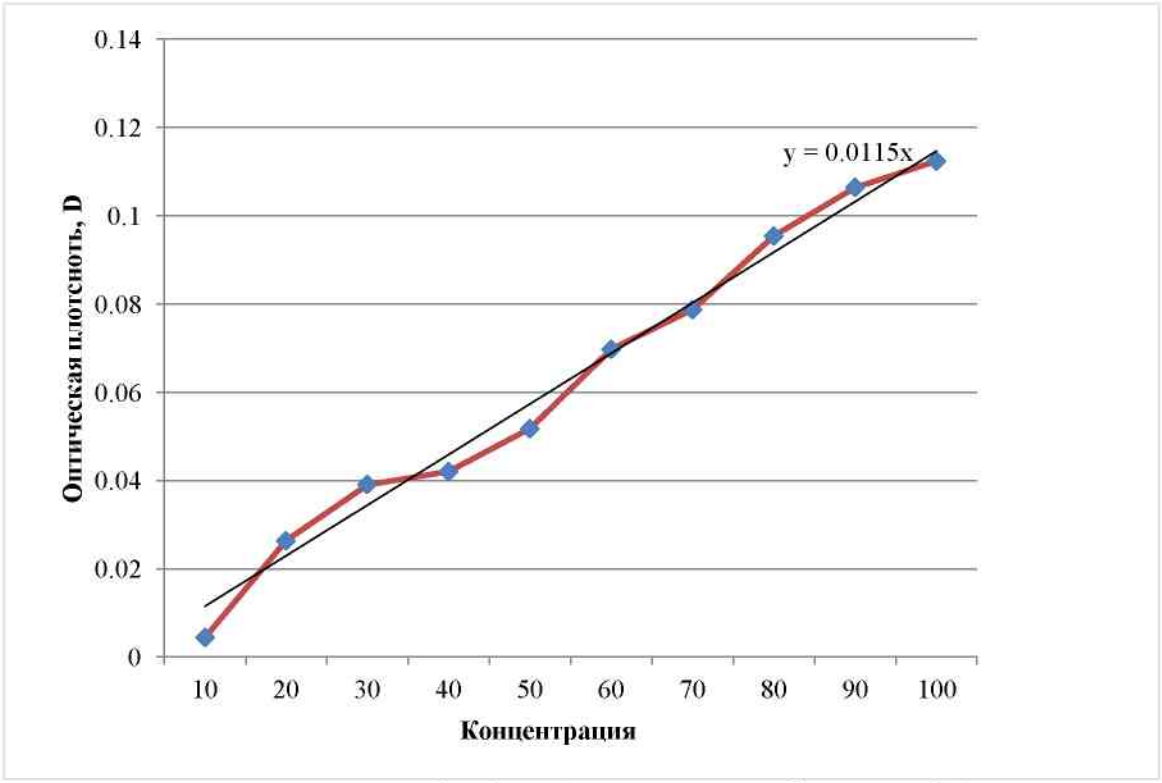

Рисунок 1. Калибровочный график по БСА

3.2 Результаты гель-фильтрации

После разделения приготовленных растворов гомогената маточного молочка и трутневого расплода на соответствующие белки и пептиды методом ультрафильтрации, полученные растворы были подвергнуты разделению методом гель-фильтрации.

Для получения пептидных и белковых фракций маточного молочка и трутневого расплода на колонку наносится определенный объём раствора. В

случае получения пептидных фракций маточного молочка и трутневого расплода колонку заполняли сефадексом G-25, наносили разделяемый раствор в объёме 500 мкл и элюировали 0,9%-м раствором NaCl, собирая фракции объёмом в 2 мл, а затем в каждой фракции определяли концентрацию пептидов методом Лоури.

В случае разделения белковой фракции маточного молочка использовали хроматографическую систему NGC Quest 10 plus. Элюирование проводили 0,9%-м раствором NaCl, фракции собирали коллектором фракий, объём фракций — 1 мл. Детекция осуществлялась по измерению оптической плотности на длине волны $\lambda = 220$ нм.

Профили элюции пептидов трутневого расплода и маточного молочка представлены на рис. 2 и 3 соответственно, профиль элюции белков маточного молочка представлен на рис. 4.

Рисунок 2. Профиль элюции пептидов трутневого расплода

Первый пик пептидов представлен выходом с 9 по 11 фракцию. С наличием в 10 фракции наибольшей оптической плотности 0,126 вышедшим в свободном объёме. Второй и третий пики представлены выходом в 18 и 26 фракциях с оптической плотностью 0,014 и 0,022, а четвёртый и пятый пики с выходом в 29 и 36 фракциях с оптической плотностью 0,027 и 0,019.

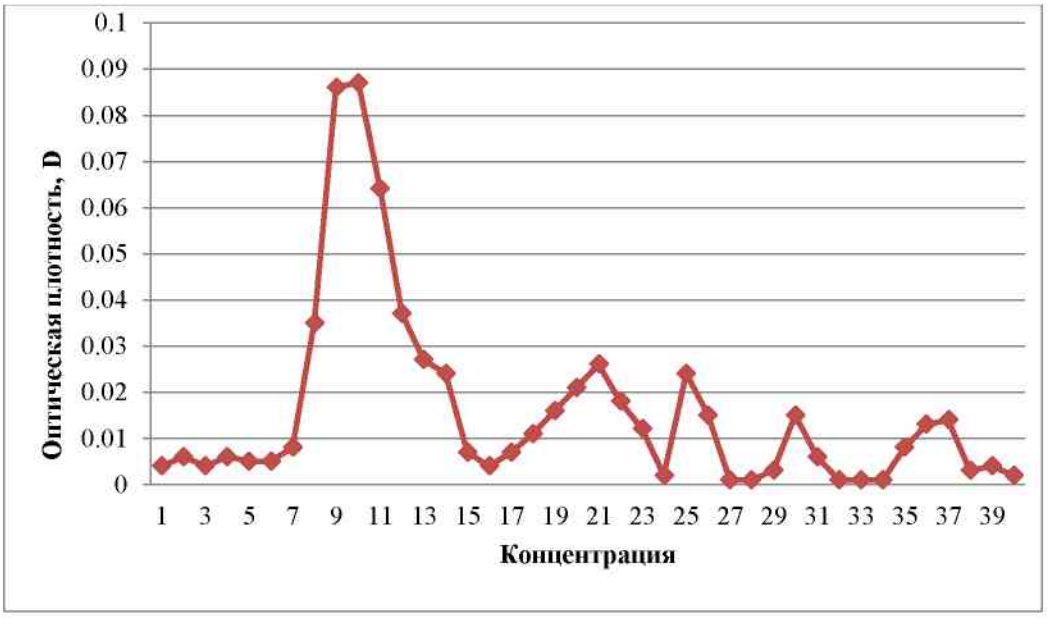

Рисунок 3. Профиль элюции пептидов маточного молочка

Первый пик пептидов представлен выходом с 9 по 11 фракцию. С наличием в 10 фракции наибольшей оптической плотности 0,087 вышедшим в свободном объёме. Второй и третий пики представлены выходом в 21 и 25 фракциях с оптической плотностью 0,026 и 0,024, а четвёртый пик с выходом в 30 фракции с оптической плотностью 0,015. Пятый пики выходом с 36 по 37 фракцию с оптическими плотностями 0,013 и 0,014.

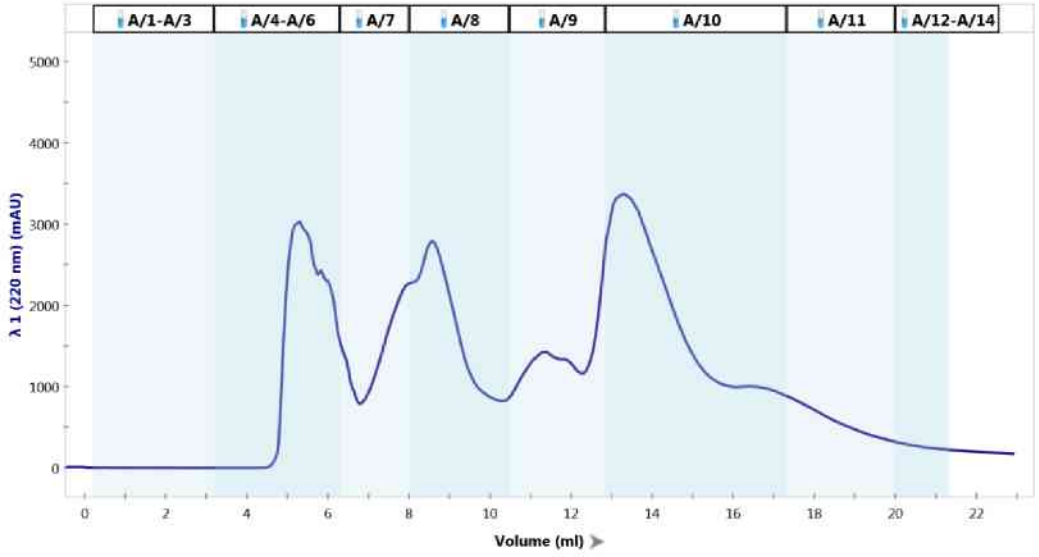

Рисунок 4. Профиль элюции белков маточного молочка на колонке TSKgelG3000SW

Первый пик пептидов выходом с (6-7) фракции представлен с оптической плотностью 3020,33 вышедшим в свободном объёме. Второй и третий пик выходом с (7-8) и (9-10) фракции, представлены с оптической плотностью 2754,27 и 3294,05.

В табл. 1 представлены хроматографические характеристики пиков профиля элюции белков маточного молочка, полученные с использованием ПО ChromLab.

Таблица 1 – Характеристика хроматографа TSKgelG3000SW

Номер пика	Высота пика, mAU	Относительная площадь пика
1	3020,33	21,14
2	2754,27	41,01
3	3294,05	37,85

Далее многократно проводили несколько повторностей разделения при неизменных параметрах для того, чтобы получить сравнительно большое количество пептидов маточного молочка, трутневого расплода и белков маточного молочка.

После многократного разделения растворов пептидов маточного молочка, трутневого расплода и белков маточного молочка фракции, характеризующиеся одинаковыми пиками разных повторностей разделения, были объединены в общий объем. В результате всего было получено 13 образцов различных групп пептидов и белков продуктов пчеловодства, которые использовались для дальнейшего определения антибактериальной активности, предварительно пройдя концентрирование и очистку, т. к. исходный раствор каждой из тринадцати фракций представлял собой 0,9%-й раствор NaCl с белками и пептидами различной концентрации, в большинстве случаев слишком низкой для эффективного определения какой-либо биологической активности. Для очистки и концентрирования суммарный объём каждой фракции был сконцентрирован в суховоздушном термостате при 45° С до полного испарения воды, сухой остаток был

перерастворён в 1 мл дистиллированной воды, и получившийся раствор был обессолен на колонке с сефадексом G-25 (элюция велась дистиллированной водой). После получения обессоленных фракций в них была определена концентрация белка методом Лоури, результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Результаты концентраций каждой полученной фракции

Название фракций	Номер тестируемой фракции	Концентрация в мкг/мл
Пептиды трутневого расплода	1	32
	2	46
	3	38
	4	38
	5	348
Пептиды маточного молочка	6	2128
	7	102
	8	57
	9	7
	10	18
Белки маточного молочка	11	142
	12	197
	13	144

3.3 Изучение антибактериального эффекта белково-пептидных фракций

3.3.1 Получение и характеристика опытных культур

Для исследования антибактериального эффекта полученных фракций белков и пептидов трутневого расплода и маточного молочка методом определения минимальной ингибирующей концентрации и диско-диффузионным методом были подготовлены накопительные культуры бактерий рода *Clostridium* и вида *Bacillus subtilis* как модель грамположительных микроорганизмов и накопительная культура бактерий

рода *Azotobacter* как модель грамотрицательных микроорганизмов. Накопительные культуры были получены следующим способом:

1. Клостридии: нагретый до 80° С картофельный отвар с кусками сырого картофеля остужали до комнатной температуры и оставляли инкубироваться в суховоздушном термостате в закрытой ватно-марлевой пробкой колбе 5 суток. О созревании культуры говорило появление пено- и газообразования.
2. Сенная палочка: сенной настой — кипячёная в течение 30 минут дистиллированная вода в объёме 200 мл с 25 г мелко нарезанного сена — был оставлен в суховоздушном термостате в закрытой ватно-марлевой пробкой колбе на 3 суток. О созревании культуры говорило появление бактериальной плёнки на поверхности жидкости в колбе.
3. Азотобактер: на среду Эшби помещали комочки грунта и термостатировали при 35° С в течение 5 суток. Вывод о появлении культуры делали на основании появлении белого налёта вокруг комочков грунта.

На рис. 5 представлены фотографии полученных накопительных культур.

После созревания накопительных культур был произведён контроль качества культуры путём микроскопирования мазков с окраской по Граму для подтверждения чистоты культуры сенной палочки и клостридий и с тушью для подтверждения чистоты культуры Азотобактера. Результаты представлены на рис. 6.

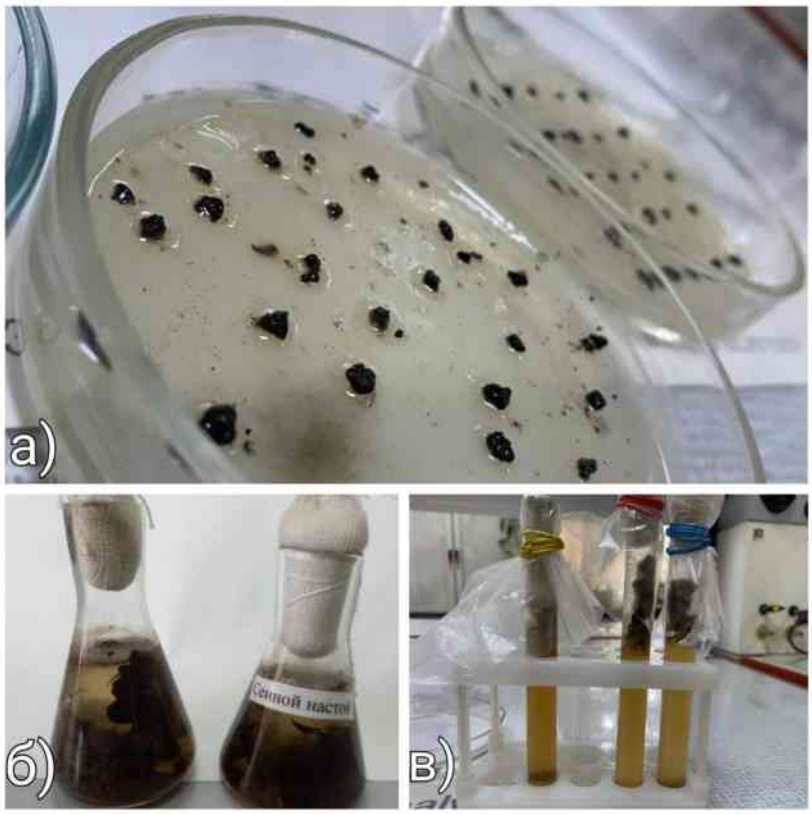

Рисунок 5. Накопительные культуры: а) Azotobacter на среде Эшби; б)Bacillus subtilis; в)Clostridium

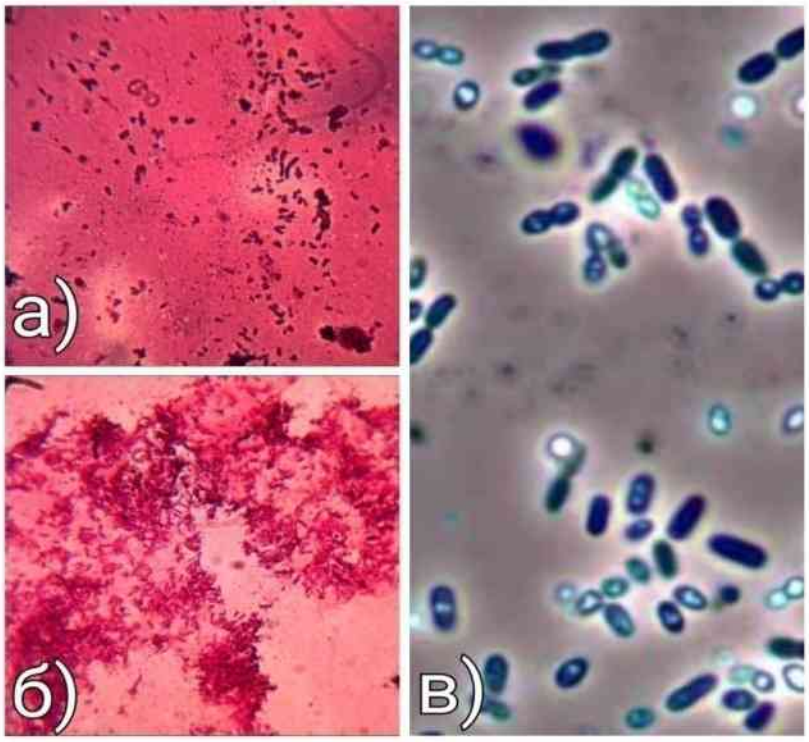

Рисунок 6. Микроскопия накопительных культур: а) Сенная палочка (Bacillus subtilis); б) Клостридии (Clostridium); в)Азотобактер (Azotobacter)

3.3.2 Оценка антибактериальной активности диско-диффузионным методом

После созревания накопительных культур микробиологической петлёй были произведены посевы на плотные питательные среды в чашки Петри и на косой агар в пробирки (МПА для клостридий и B. subtilis, Эшби для Азотобактера) (рис. 7).

После пересева на чашки Петри на поверхность твёрдой питательной среды были наложены стерильные диски из фильтровальной бумаги диаметров 6 мм, пропитанные растворами исследуемых фракций в объёме 20 мкл на каждый диск. Каждый диск был представлен в трёх повторностях, дополнительно для каждой культуры были подготовлены диски с отрицательным контролем — пропитанные 20 мкл 0,9%-м раствором NaCl. После нанесения дисков на культуры, чашки Петри были убраны в термостат для инкубации в течение 3 суток при 37° С (рис. 8)

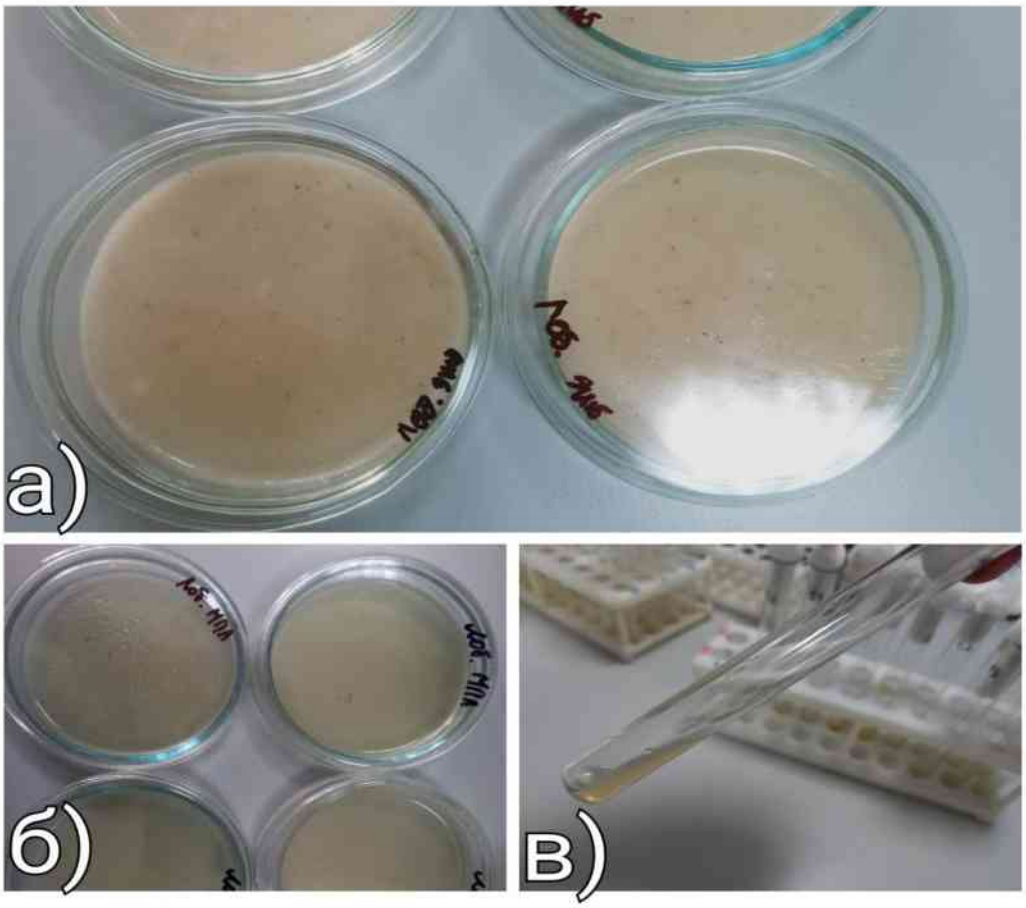

Рисунок 7. Сделанные посевы микроорганизмов на плотных питательных средах: а) Посев на плотной питательной среде Эшби в чашки Петри; б) Посев на плотной питательной среде МПА в чашки Петри; в) Посев на косой агар МПА в пробирке.

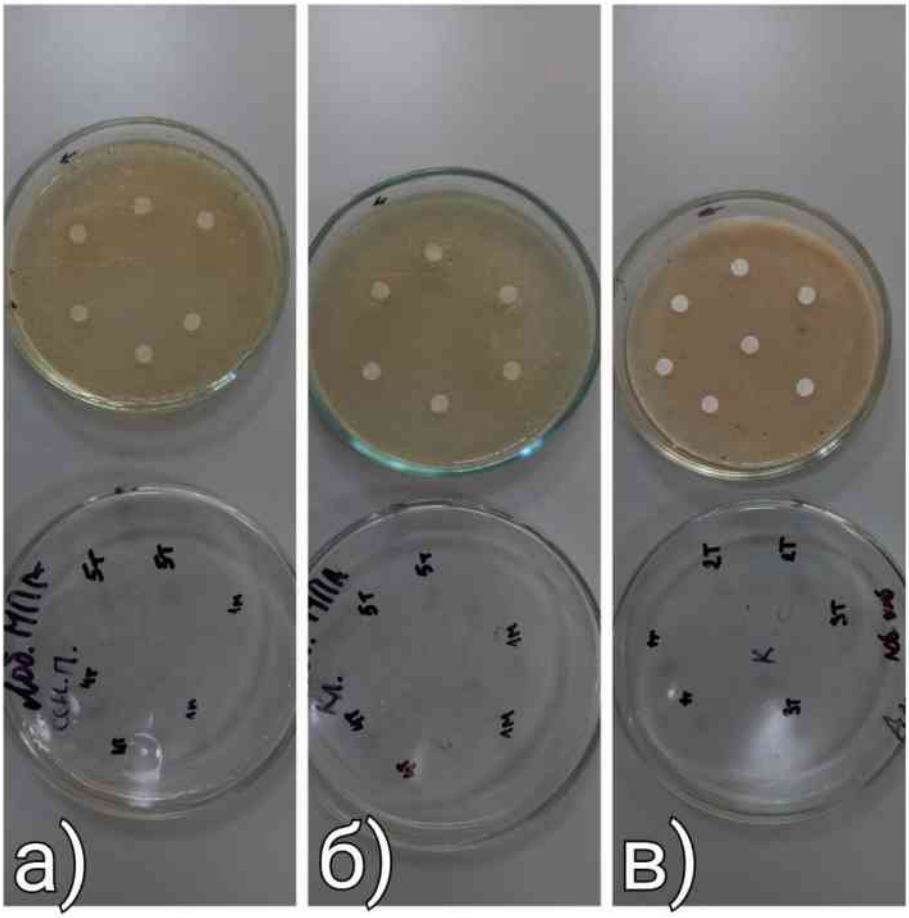

Рисунок 8. Пример характера наложения тестовых дисков: а) Bacillus subtilis; б)Clostridium; в)Azotobacter

По прошествии трёх суток термостатирования культуры были визуально исследованы на предмет наличия зон задержки роста вокруг дисков, пропитанных белково-пептидными фракциями маточного молочка и трутневого расплода. Результаты учитывали путем измерения диаметра зоны отсутствия роста вокруг диска в миллиметрах. Пример культуры после инкубации представлен на рис. 9.

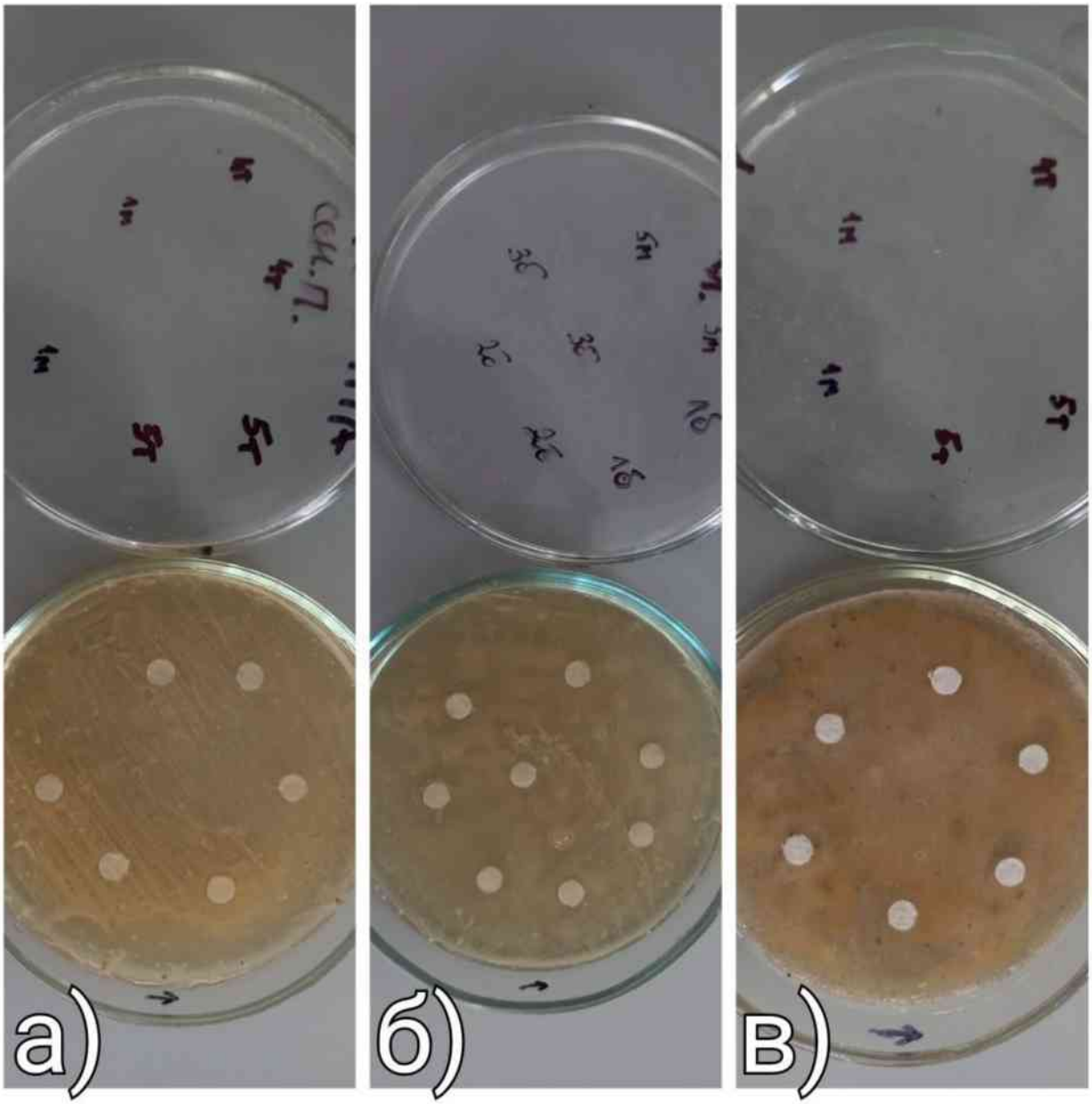

Рисунок 9. Результаты исследования антибактериального эффекта: а) Bacillus subtilis; б)Clostridium; в)Azotobacter

Результаты измерения зон задержки видимого роста тестируемых культур, представлены в таблице (таблица 3).

Таблица 3 – Зона задержки видимого роста тестируемых культур, мм при анализе антибактериального эффекта продуктов пчеловодства

Источник	Номер фракции	Азотобактер *(Azotobacter)*	Сенная палочка *(Bacillus subtilis)*	Клостридии (*Clostridium)*
Пептиды трутневого расплода	1	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста
	2	2±1 мм	4±1 мм	Нет зоны задержки роста
	3	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста
	4	1±1 мм	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста
	5	2±1 мм	2±1 мм	Нет зоны задержки роста
Пептиды маточного молочка	6	Нет зоны задержки роста	1±1 мм	1±1 мм
	7	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста
	8	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста
	9	1±1 мм	1±1 мм	Нет зоны задержки роста
	10	Нет зоны задержки роста	1±1 мм	1±1 мм
Белки маточного молочка	11	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста	1±1 мм
	12	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста	Нет зоны задержки роста
	13	1±1 мм	4±1 мм	4±1 мм

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии антибактериальной активности исследованных фракций белков и пептидов трутневого расплода и маточного молочка в отношении бактерий родов *Clostridium, Azotobacter* и бактерий вида *Bacillus subtilis.* Не смотря на это,

минимальное подавление роста в 4 мм вокруг диска, пропитанного фракциями №2 (пептиды трутневого расплода) и №13 (белки маточного молочка) свидетельствует о том, что отсутствие антибактериальной активности может быть вызвано не столько отсутствием такого действия у белков и пептидов данных фракций, сколько недостаточной концентрацией этих белков и пептидов.

3.3.3 Оценка антибактериальной активности методом определения минимальной подавляющей концентрации

Другим методом оценки антибактериальной активности был метод определения минимальной подавляющей концентрации (метод серийных разведений).

В качестве тестируемой культуры использовался суточный инокулят *Bacillus subtilis*, посеянный на косой агар (рис. 10).

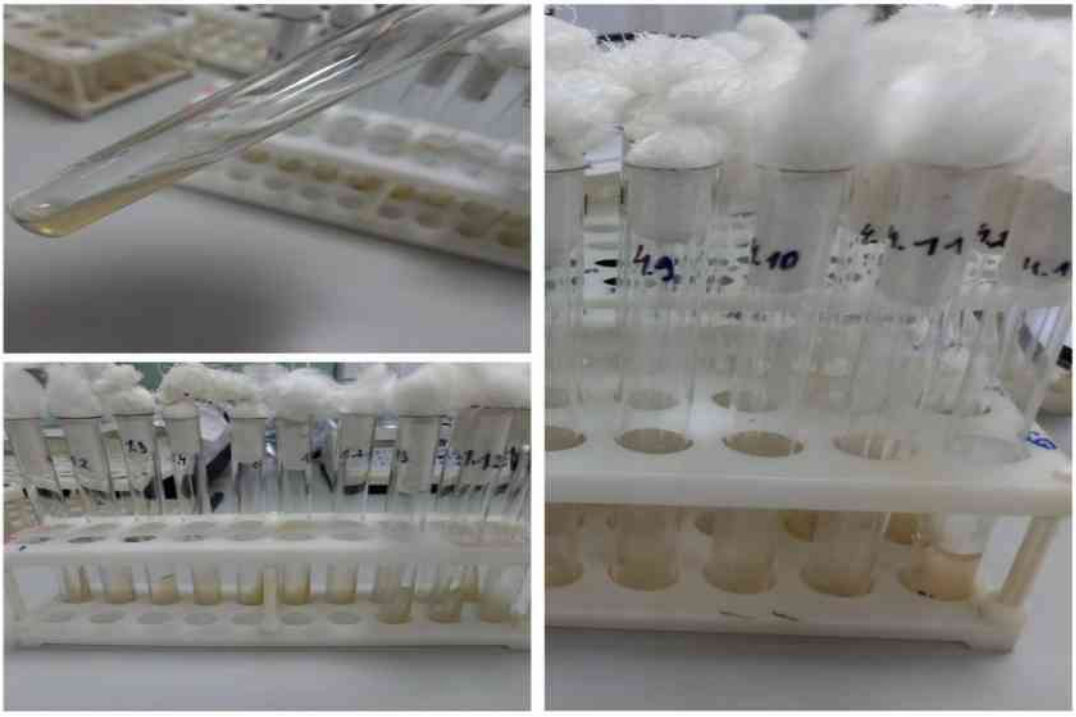

Рисунок 10. Пробирки с косым агаром после суток развития инокулята сенной палочки

После застывания питательной среды в пробирке каждый образец МПА инокулировали *B. subtilis* с использованием стерильной микробиологической петли. После суток инкубации в культуру добавляли 40 мкл исследуемой фракции белков или пептидов продуктов пчеловодства в различных разведениях (табл. 4).

Таблица 4 – Методика приготовления серийных разведений

Номер серии разведений	Исходная фракция, мкл	Дистиллированная вода, мкл	Общий объём в мкл
1	40 мкл	0 мкл	40 мкл
2	20 мкл	20 мкл	40 мкл
3	10 мкл	30 мкл	40 мкл
4	5 мкл	35 мкл	40 мкл

Первые 13 пептидных и белковых фракций наносились на тестируемую культуру в объёме 40 мкл, а три других разведения готовились с уменьшением предыдущей концентрации в 2 раза. Общий объём, наносивший на культуру, оставался равным 40 мкл.

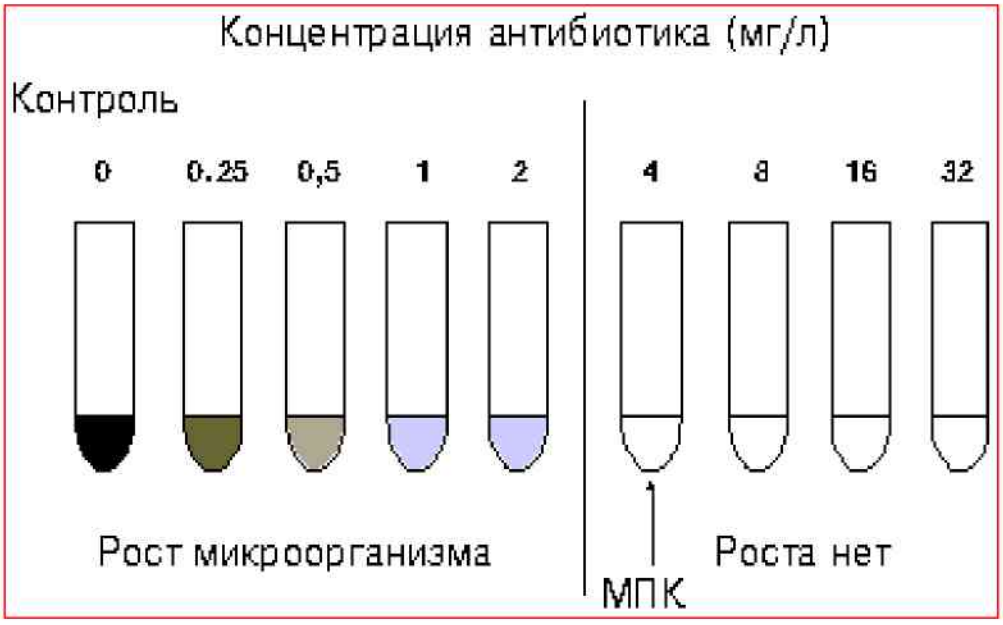

Рисунок 11 . Принцип определения минимальной ингибирующей концентрации

Таким образом был получен ряд из 39 пробирок 4 серий разведений. Пробирки были плотно закрыты стерильными ватно-марлевыми пробками и термостатировались в суховоздушном термостате при 37° С в течение 24 часов.

Результат учитывали в проходящем свете, чтобы рассмотреть наличие роста исследуемой культуры в пробирках. Минимальную подавляющую концентрацию определяли по наименьшей концентрации исследуемых пептидных и белковых фракций продуктов пчеловодства, которая подавляла видимый рост тестируемой культуры (принцип представлен на рис.11). Видимый рост культуры сенной палочки выражался в потемнении косого агара, появлении глянцевой плёнки на поверхности среды и изменении цвета массы питательной среды.

Данные по определению минимальной подавляющей концентрации пептидов маточного молочка, трутневого расплода и белков маточного молочка с использованием суточного инокулята сенной палочки в качестве тестового организма представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты оценки МПК изученных фракций

Серия	Фракция												
	Пептиды трутневого расплода					Пептиды маточного молочка					Белки маточного молочка		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Анализируя полученные результаты по оценке минимальной подавляющей концентрации фракций белков и пептидов маточного молочка и трутневого расплода можно сказать, что в изученных концентрациях

фракции не оказывали влияния на рост тестируемой культуры сенной палочки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Продукты пчеловодства такие, как мёд, маточное молочко, трутневый расплод по своей природе являются многокомпонентными уникальными продуктами, обладающими целебными свойствами. В этих продуктах содержаться огромное количество витаминов, ферментов, микро- и макроэлементов, сахаров, азотосодержащих соединений, органических кислот, пептидов и белков.

Эти продукты пчеловодства обладают антибактериальным эффектом, который обусловлен содержанием в них таких веществ, как перекиси водорода, метилглиоксаля, а также антибактериальных пептидов и белков.

В ходе исследования была изучена антибактериальная активность пептидов и белков таких продуктов пчеловодства, как маточное молочко и трутневый расплод. Исследования проводились с использованием методов определения минимальной подавляющей концентрации и диско-диффузионным методом.

В итоги исследования можно сделать следующие **выводы:**

1. Маточное молочко и трутневый расплод содержат ряд пептидов и белков различного химического состава, которые можно выделить и разделить с использованием методов ультрафильтрации и гель-фильтраии.

2. Полученные фракции белков маточного молочка, пептидов маточного молочка и трутневого расплода не показали достоверной антибактериальной активности против использованных культур бактерий рода *Azotobacter, Clostridium* и вида *Bacillus subtilis* с использованием диско-диффузионного метода.

3. Отсутствие антибактериальной активности изученных фракций пептидов может быть следствием недостаточной концентрации пептидов и белков в изучаемых образцах, т. к. некоторые образцы показали сомнительные результаты по наличию зон задержки роста (4 мм).

4. В ходе исследования не удалось получить подтверждения наличия антибактериального эффекта пептидных и белковых фракций маточного молочка и трутневого расплода методом МПК на тестируемой культуре *Bacillus subtilis.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белик, Э.В. Большой современный справочник пчеловода / Э. В. Белик. Донецк, 2004. 512 с.

2. Бондарчук, Л. И. АТР-азная и фосфатазная активность трутневого расплода / Л. И. Бондарчук, О. С. Стахман // Укр. Биохим. Журн. 2004. Т. 76, №6. С. 123-126.

3. Брок, Т. Мембранная фильтрация: пер. с англ. / Т. Брок. М.: Мир, 1987. 464 с.

4. Бурмистрова, Л. А. Метаболическая оценка гонадотропного эффекта трутневого расплода / Л. А. Бурмистрова, В. Г. Макарова, А. И. Рябков, К. В. Савилов // Апитерапия сегодня: Сб. 7 Материалы VII научнопрактической конференции по апитерапии (Рязань, 3-5 октября, 1999). Рыбное, НИИ пчеловодства, 2000. С. 95-97.

5. Бурмистрова, Л. А. Физико-химический анализ и биохимическая оценка биологической активности трутневого расплода / Л. А. Бурмистрова // Апитерапия сегодня: Сб. 7 Материалы VII научно-практической конференции по апитерапии. Рязань, НИИ пчеловодства, 1999. С. 100-103.

6. Вавилов, Ю. Л. Биохимические компоненты маточного молочка медоносной пчелы и морфологическое действие: автореф. Дисс.… канд. Мед. Наук / Ю. Л. Вавилов. Горький, 1971.

7. Вахонина Т. В. Пчелиная аптека / Т. В. Вахонина. СПб.: Лениздат. 1995. 240 с.

8. Доусон, Р. Справочник биохимика / Р. Доусон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. М.: Мир, 1991. 544 с.

9. Илиешиу, Н. В. Апиларнил новый естественный продукт пчеловодства личиночного происхождения / Н. В. Илиешиу // XXIX Международный конгресс по пчеловодству. Бухарест: Апимондия, 1983. С. 398.

10. Каблуков, И.А. О меде, воске, пчелином клее и их подмесях / И. А. Каблуков. 2 изд. М.: Сельхозгиз, 1941. 176 с.

11. Лудянский, Э. А. Апитерапия / Э. А. Лудянский. Вологда, 1994. 462 с.

12. Неделька, В. И. Аминокислотный состав трутневого молочка / В. И. Неделька, А. Ф. Неделька, В. В. Петренко // Апитерапия сегодня: Мат. Конф. По апитерапии. Рыбное, 1994. С. 32-33.

13. Неделька, В. И. Аминокислотный состав трутневого молочка / В. И. Неделька, А. Ф. Неделька, В. В. Петренко // Апитерапия сегодня: Мат. Конф. По апитерапии. Рыбное, 1994. С. 32-33.

14. Овощников, В. Н. Биологические свойства компонентов маточного молочка / В. Н. Овощников // Биологически активные продукты пчеловодства и их использование. Горький, 1990. С. 60-71.

15. Овчинникова Т. В. Структурно-функциональное исследование природных пептидных антибиотиков // автореф. Дис. Д-ра хим. наук. М., 2011. 77с.

16. П 92 Пчеловодство: Настольная книга / Авт.- сост. В. М. Жабцев. М.: АСТ; Мн.: Харвест, 2005.- 560 с.,[32] л. ил.: ил.

17. Резяпкин, В. И. Лабораторный практикум по биохимии и биофизике / В. И. Резяпкин, В. С. Слышенков, И. Б. Заводник, В. Н. Бурдь. Гродно: ГрГу, 2009. 175 с.

18. Рут, А.И. Энциклопедия пчеловодства./ А. И. Рут, Э. Р. Рут, Х. Х. Рут, Е. И. Северецова. М.: Художественная литература, 1993 368 с.

19. Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. М.: Мир, 1985. 358 с.

20. Хисматуллина, Н. З. Апитерапия / Н. З. Хисматулина. Пермь: Мобиле, 2005. 296 с.

21. Шкендеров, С. Пчелиные продукты / С. Шкендеров, Ц. Иванов. София: Земиздат, 1985. 193 с.

22. Allen H. K. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals // Trends Microbiol. 2012. P. 114-119.

23. Ando, K. Biochemistry / K. Ando, S. Natori. 1988. 1721 p.

24. Briggs J. D. Humoral immunity in lepidopterous larvae // J. Exp. Zool. 1958. Vol. 138. P. 155-188.

25. Casteels, P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees / P. Casteels, C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, P. Tempst // The EMBO journal. 1989. V. 8. Issue 8. PP. 2387-2381

26. Casteels, P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees / P. Casteels, C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, P. Tempst // The EMBO Journal. 1989. Vol. 8, №8. P. 2387-2391.

27. Castle, M. Lethal effects of apidaecin on Escherichia coli involve sequential molecular interactions with diverse targets / M. Castle, A. Nazarian, S. S. Yi, P. Tempst // J Biol Chem. 1999. №274. P. 32555-32564.

28. Dixon, M. Enzymes, 3rd edn, pp. / M. Dixon, E. C. Webb. Langmans, London, 1979. 313 p.

29. Dunn P. E. Biochemical aspects of insect immunology // J. An. Rev. Entomology. 1986. Vol. 31. P. 321-339.

30. Echigo, N. Comporative studies on Camical composition of Honey, Royalielly and Pollen Loades / N. Echigo, T. Takenaha, K. Iatsunami // Bull. Fuc. Agr. Tamagava Univ. 1986. № 26. P. 1-8.

31. Guaní-Guerra, E. Antimicrobial peptides: immunomodulatory properties, functions and therapeutic applications in humans / E. Guaní-Guerra, M. L. Terán // Antimicrobial Peptides / M. D. Seong, Y. I. Hak. NY: Nova Science Publishers, 2013. 168 p.

32. Hancock R. E. W., Chapple D. S. Peptide antibiotics // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. Vol. 43. P. 1317-1323.

33. Jenssen, H. W. Peptide antimicrobial agents / H. W. Jenssen, P. Hamill, R. E. Hancock // Clin. Microbiol. Rev. 2006. №19. P. 491-511.

34. Kanost M. R., Dai W., Dunn P. E. Peptidoglycan fragments elicit antibacterial protein synthesis in larvae of Manduca sexta // Arch. Insect Biochem. Physiol. 1988. Vol. 8. P. 147-164

35. Lai, Y. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have muptiple roles in immune defence / Y. Lai, R. L. Gallo // Trends in Immunology. 2009. vol. 30, Issue 3. P. 131-141.

36. Lee, S. Biochim. Biophys. Acta / S. Lee, H. Mihara, H. Aoyagi, T. Kato, N. Izumiya and N. Yamasaki. 1986. 862 p.

37. Lees, P. Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans / P. Lees, Shojaee Aliabadi F // International Journal of Antimicrobial Agents. 2002. №19. P. 269-284.

38. M. Zasloff. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. // Nature,. 2002. Vol. 415.P.389-395

39. Mavric, E. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (Leptospermum scoparium) honeys from New Zealand / E. Mavric, S. Wittmann, G. Barth, T. Henle // Molecular nutrition & food research. 2008. V. 52. Issue 4. PP. 483-489.

40. Monisha, G. Scott. The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifinctional Modulator of Innate Immune Responses / M. G. Scott, D. J. Davidson, M. R. Gold, D. Bowdish, R. E. W. Hancock // The Journal of Immunology. 2002. Vol. 169, №7. P. 3883-3891.

41. Morishima I., Yamada K., Ueno T. Bacterial peptidoglycan as elicitor of antibacterial protein synthesis in larvae of the silkworm, Bombyx mori // Ins. Biochem. Mol. Biol. 1992. Vol. 22, No. 4. P. 363-367.

42. Park, C.B. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin ii: Buforin ii kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions / C. B. Park, H. S. Kim, S. C. Kim // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. №244. P. 253-257.

43. Pye A. E., Boman H. G. Insect immunity. III. Purification and partial characterization of immune protein P5 from hemolymph of Hyalophora cecropia pupae // Infect. Immun. 1977. Vol. 17. P. 408-414.

44. Ratcliffe N. A., Mello C. B., Garcia E. S. et al. Insect natural products and processes: New treatments for human disease // Ins. Bioch. AndMol. Biol. 2011. Vol. 41. P. 747-769.

45. Schmitzova, J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee Apis mellifera / J. Schmitzova, J. Klaudiny, S. Albert, W. Schröder, W. Schreckengost, J. Hanes // Cell Mol. Life. Sci. 1998. V. 54. P.1020-1030.

46. Slocinska M., Marciniak P., Rosinski G. Insects antiviral and anticancer peptides: new leads for the future? // Protein Pept. Lett. 2008. Vol. 15, No. 6. P. 578-585.

47. Wei-Fen, Li. Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure-function relationships and mode of action / Wei-Fen Li, Guo-Xia Ma, Xu-Xia Zhou // Peptides. 2006. Vol. 27, Issue 9. P. 2350-2359.

48. Zhang, L. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes / L. Zhang, A. Rozek, R. E. Hancock // J. Biol. Chem. 2001. №276. P. 35714-35722.