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:
«ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БЕЛКОВ МАТОЧНОГО МОЛОЧКА НА КАТАЛАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ»

Студент _____ Могучева Маргарита Руслановна

Руководитель _____ Кручинина А.Д.

Нормоконтролер _____ Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 16.06.22 №15)

Заведующий кафедрой _____ Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой хорошо

(протокол заседания ГЭК от 13.06.22 № 5)

Секретарь ГЭК _____ Клыченков С.В.

Пенза, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....4

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 6

1.1 Маточное молочко – биологический продукт, состав и свойства.....6

1.2 Физико-химические свойства маточного молочка.....8

1.3 Химический состав маточного молочка.....9

1.4 Роль маточного молочка в выращивании личинок маток пчел.....13

1.5 Белки маточного молочка.....14

1.6 Физиологические свойства белков маточного молочка.....17

1.7 Действие маточного молочка на организм человека. Медико-биологическая активность маточного молочка.....18

1.8 Каталазная активность микроорганизмов 20

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....22

2.1 Материалы исследования.....22

2.2 Методы исследования 22

2.2.1 Тангенциальная ультрафильтрация.....22

2.2.2 Гель-фильтрация 25

2.2.3 Метод Лоури.....25

2.2.4 Определение каталазной активност.....25

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....27

3.1 Построение калибровочных кривых по БСА.....27

3.2 Получение белковых фракций маточного молочка методом гель-фильтрации 27

3.3 Получение тестовых культур микроорганизмов и контроль их качества.....29

3.4 Определение каталазной активности микроорганизмов.....34

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....39
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....40

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день практически весь спектр продуктов пчеловодства широко используется в народной медицине. Маточное молочко, прополис, трутневый расплод, пчелиный мёд, перга применяются как биологически активные добавки к пище и паралекарственные средства. Изучение биологической активности данных продуктов пчеловодства является перспективной задачей, т. к. многие заболевания человека и другие неблагоприятные явления, такие как антибиотикорезистентность, поиск новых биологически активных соединений и прочее, является передовым направлением биологической науки. Таким образом, изучение биологически активных продуктов пчел, а именно изучение свойств маточного молочка, является весьма актуальным и действительно очень важным не только для общебиологического интереса, а также для медицины и ветеринарии.

Проведено значительное количество исследований, которые показывают, насколько широк спектр применения биологически активных продуктов пчел в животноводстве, медицине и ветеринарной практике. Из меда, трутневого расплода и маточного молочка выделено и охарактеризовано огромное количество индивидуальных веществ, сочетание которых используются для создания лекарственных средств и биологически активных добавок.

Благодаря своему уникальному составу, оно оказывает на организм иммуномодулирующее действие, общетонизирующее, стимулирует обменные процессы, способствует повышению устойчивости к различным инфекциям, интенсивным физическим нагрузкам, а также успешно применяется при лечении многих заболеваний сердечно-сосудистой, бронхо-легочной систем, желудочно-кишечного тракта, однако механизм действия маточного молочка на организм пока еще недостаточно изучен, что обуславливает ограниченное применение этого продукта в различных практических целях. Таким образом, изучение биологической активности

различных компонентов маточного молочка является актуальной и перспективной задачей.

Целью данного исследования было изучение биологической активности белков маточного молочка на примере влияния белковых фракций маточного молочка на каталазную активность модельных микроорганизмов.

В соответствии с поставленной целью были решены следующие задачи:

1. Выделить белковую фракцию маточного молочка с использованием различных методов фракционирования биомолекул.
2. Получить накопительные, а зачем чистые тестовые культуры микроорганизмов рода *Clostridium, Azotobacter* и вида *Bacillus subtilis*.
3. Воздействовать на тестовые культуры полученными белковыми фракциями маточного молочка и изучить их биологическое действие на примере изменения каталазной активности микроорганизмов.

Дипломная работа написана на 44 листах, содержит 5 таблиц, 12 рисунков и 45 источников литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Маточное молочко - биологический продукт, состав и свойства

Маточное молочко - секрет глоточных и верхнечелюстных желез пчел, служит специальным кормом для личинок рабочих пчел и трутней трехдневного возраста, а также маточных личинок на всех стадиях развития. Пчелиная матка питается маточным молочком на протяжении всей своей жизни. На вид маточное молочко – это сметанообразная масса молочного цвета с слегка желтоватым оттенком. По своему составу маточное молочко содержит воду, жиры, белки, углеводы, минеральные вещества и витамины[7].

Практика пчеловодства при выводе маток подтверждает, что матки и рабочие пчелы генетически идентичны, и только отличия в рационе питания личинок старшего возраста определяют превосходство пчелиной матки [3].

Состав маточного молочка, которым пчелы кормят личинок всех стаз в первые сутки, отличается от молочка, потребляемого старшими личинками. На состав маточного молочка оказывают влияние различные факторы, такие как расовые и индивидуальные генетические отличия пчелиных семей, погодно-климатические условия, а также внешние и внутренние факторы среды обитания пчелиной семьи.

Маточное молочко включает 29 аминокислот, в том числе и незаменимые [11].

Оно содержит: 65 – 66,5% воды, 9 – 19% белков, 8 – 9% сахаров, 2 – 9% жиров, более 1% минеральных солей.

Подробный химический состав включает:

1)белки, которые в основном представлены альбуминами и глобулинами в соотношении 2:1 (белки маточного молочка близки к белкам сыворотки крови)

2)углеводы, представлены в виде глюкозы, фруктозы и сахарозы

3)витамины А, Д, С, В1, В2, В3, В6, В12, В15, Н, Е, РР, пантотеновую кислоту

4)свободные жирные кислоты, такие как янтарная, стеариновая и др.

5)гормоны (прогестерон, тестостерон, эстрадиол)

6)молочную и пировиноградную кислоты

7)минеральные соли

8)микроэлементы

9)ацетилхолин

10)стерины

11)липиды

Маточное молочко способствует ускоренному развитию пчелиной матки, обычно для этого требуется 17 дней. Личинка рабочей пчелы, в сравнении с личинкой матки, не получает такого количества маточного молочка в время своего развития, поэтому оно длится 21 день, а на развитие трутня до 24-х дней [12].

Кормление потомства высокопитательными секреторными веществами характерно для высокоразвитых эволюционных ветвей, таких как млекопитающих. Помимо того, что потомство получает необходимые вещества для роста и развития, возможно снабжение факторами иммунитета.

Маточное молочко обладает высокой и многообразной биологической активностью, оказывает влияние на различные стороны обмена веществ в организме.

Установлено влияние маточного молочка на восстановление костной ткани, а также на регенеративные процессы в роговой оболочке глаза [8].

Позитивное действие маточного молочка обнаружено в случае ослаблении иммунитета при хронических инфекционных заболеваниях и неблагоприятной экологической обстановке [2].

Многие ученые считают, что в биологии и медицине нет другого вещества, которое бы оказывало подобный эффект на развитие организма и продолжение рода, как маточное молочко. Этот биологический продукт

можно применять в качестве дополнительной поддержки в лечебном питании ослабленных больных. И все это из-за его состава.

1.2 Физико-химические свойства маточного молочка

Свежее маточное молочко имеет специфический запах, это кислая и острая (жгучая) непрозрачная или полупрозрачная масса на вкус.

Маточное молочко, как любой полноценный пищевой продукт, в своем составе содержит воду, жиры, белки, углеводы, минеральные вещества и витамины.

По своему липидному составу маточное молочко не имеет аналогов, т. к. на 80-90% состоит из короткоцепочечных (8-10 атомов углерода) гидрокси- и дикарбоновых жирных кислот [7].

Маточное молочко содержит 34% сухих веществ и 66% воды.

При содержании 33+-2% сухих веществ и 20+-1°С удельная электропроводность водного раствора маточного молочка равна (244+-8) * 10-6 сим (5%-ный раствор); поверхностное натяжение – 51+-2 (1%-ный) и 66,5+-1,0 (0,1%-ный) дин/см2; вязкость- (10,0+-0,3) * 10-3 пуаз (0,25%-ный раствор).

Оно не полностью растворяется в воде, в отличии от щелочной среды. В воде дает опалесцирующую суспензию, в щелочной среде же часть механических примесей всплывает, а часть оседает [25].

Плотность маточного молочка 1,1 г/см3, плотность его сухих веществ 1,40+-0,05 г/см3 [14].

Уникальные структуральные свойства маточного молочка были изучены под микроскопом со сканированием (SEM). В некоторых зонах слой маточного молочка содержит относительно крупные шаровидные частицы. Размер из варьируется от 20 до 80 μм. Данные сферы связаны между собой системой каналов волокон. Диаметр волокон составляет 2 μм, а длина их вариабельна. Существует предположение, что такая тонкая структура

маточного молочка определяется гипофарингеальными железами медоносной пчелы [40].

При фракционировании маточного молочка ультрацентрифугированием получаются три слоя, различные с физической точки зрения. Сверхнатантная фракция – зелено-желтоватая жидкость, которая представляет 61% из маточного молочка, а также названная плазмой. Средний слой – желтовато-коричневая, достаточно вязкая масса, названная молочком. Данная фракция составляет 32% из всего количества маточного молочка. Белый осадок на дне (7% из общего количества маточного молочка) практические твердое вещество [41]

1.3 Химический состав маточного молочка.

Химический состав зависит от возраста личинки и внешних воздействий. В маточном молочке можно обнаружить загрязняющие примеси, такие как растительные волокна, пылевые частицы, нити мицелия, кусочки шкурок личинок, воска, прополиса, пыльца [21].

Маточное молочко имеет весьма сложный состав. Включает в себя аминокислоты, белки, липиды, углеводы, органические вещества, витамины, минеральные вещества и другие соединения. (таблицы 1,2,3) [13].

Таблица 1. Состав маточного молочка, %на сухой вес, кроме влажности

Наименование компонента	Минимальное содержание	Максимальное содержание
Влажность	57	70
Протеин	17	45
Сахара	18	52
Липиды	3,5	19
Зольность	2	3

Таблица 2. Примерный состав сухих веществ маточного молочка

Составная часть	Содержится %		Составная часть	Содержится %	
	пределы	в среднем		пределы	в среднем
Белки	18-58	40	Аденозин	-	0,35
Жиры (нейтральные)	-	0,8	Ацетилхолин	0,08-0,13	0,1
			Птерины	-	0,01
Фосфолипиды	-	1,3	Витамины	-	0,08
Стерины	0,04-0,3	0,2	Зола	0,7-3,9	2,3
Углеводы	13-30	21	Прочие	-	16
Органические кислоты	7-32	17	вещества		

Таблица 3. Химический состав маточного молочка

Вещества	Содержание, %	Вещества	Содержание, %
Вода	60-70	Жиры и липоиды	1,5-7
Сахара	9-15	Белки	10-18
Сухое вещество	30-40	Минеральные вещества	0,7-1,5

Главные углеводы маточного молочка- это глюкоза, фруктоза, сахароза и мальтоза. Больше всего глюкозы и фруктозы, количество которых в сыром молочке составляет соответственно 8,5-12,5% и 13,8 – 30,2 в перерасчете на абсолютно сухое вещество молочка. Количество сахарозы в сыром молочке значительно ниже - 0,1-4%, мальтозы – 0,21%, изомальтозы -0,06%, гентиобиозы – 0,1%, туранозы – 0,09%, содержится также рибоза и другие сахара.

Витамины, содержащиеся в натуральном маточном молочке, имеют жизненно важное значения для роста и развития личинок маток пчел. В сравнении с цветочной пыльцой маточное молочко содержит большое количество витамина В8, но меньшее витамина С. Практические не содержит витаминов Е, А, К. (таблица 4)

Таблица 4. Содержание витаминов в маточном молочке

Наименование	Минимально – максимальное содержание, мг/кг
В, тиамин	1-17
В2,рибофлавин	5-24
В5,пантотеновая кислота	36-265
В6, пиридоксин	2-55
РР, ниацин	45-190
Н, биотин	1,5-5
Фолиевая кислота	0,1-0,6

Так же в маточном молочке обнаружены специфические органические соединения – птеридиновые производные: биоптерин и неоптерин, наличием которых объясняется синее свечение его растворов в ультрафиолетовых лучах. Биоптерина на 1 г маточного молочка приходится 25 мг. Эти вещества поступают в молочко с секретом мандибулярных желез пчел и входят в состав витаминов группы фолиевой кислоты, играющих роль в процессах кроветворения и обмена веществ [24].

Кислотный состав маточного молочка на 80-90% состоит из особых короткоцепочечных (8-10 атомов углерода) гидрокси- дикарбоновых жирных кислот (таблица 3). Ненасыщенные карбоновые кислоты на 70-80% состоят из 10-окси-транс-2-деценовой кислоты, а в остальном из 9-окси-2-деценовой,

10-оксидекановоц, 2-децендикарбоновой, себациновой, n-оксибензойной, янтарной и других [24].

Содержание пировиноградной кислоты в нативном молочке является постоянным и ее количество в среднем составляет 0,11%.

Менее характерный показатель качества молочка – это молочная кислота. Ее количество непостоянно и зависит также от породы пчел, то есть не только от внешних и внутренних факторов. Плесень и стафилококк уменьшает содержание молочной кислоты в молочке на 50%, а ацидофильная палочка – наоборот вызывает небольшое увеличение, что показывает на незначительные превращения углеводов в анаэробных условиях.

В составе молочка присутствует как минимум четыре фосфолипида (сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин и др.), пять гликолипидов (ганглиозиды) и девять стеролов (холестерол, стигмастерол, 24-метиленхолестерол и др.) [25].

На сегодняшний день в маточном молочке обнаружены и нуклеиновые кислоты, такие как рибонуклеиновая кислота (РНК) и дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). РНК-3.9 - 4,8 мг/г, а ДНК в разы меньше – 200 -233 мгк/г. Содержание РНК сохраняется в маточном молочке даже при его длительном хранении, в отличии от ДНК. Ферменты, выделенные из маточного молочка, принимают участие в обмене нуклеиновых кислот [23].

Микроэлементы, входящие в состав маточного молочка, и их количество, варьируется от зоны проживания пчел. Из минеральных компонентов представлены неорганическим фосфатом, а также 15 катионами (K, Ca, Na, Zn, Fe, Cu, Mn, никель, кольбат, кремний, хром, золото, ртуть и др.) с существенным преобладанием K. Всего более 100 зольных элементов. [23,25].

1.4 Роль маточного молочка в выращивании личинок маток пчел.

Продолжение рода – одно из важнейших функций живых существ, и пчелиная семья не исключение. Чтобы пчелы могли поддерживать свою силу, а в весенне-летний период расти, в гнезде должны непрерывно выращиваться новые молодые пчелы. Пчелы выращивают маток в особых ячейках – маточниках, отстраиваемых при подготовке к роению на ребрах сотов, а при внезапной гибели матки на обычных пчелиных ячейках.

У маток стадия яйца длится трое суток, но вышедшей личинке пчелы дают так много молочка, что она плавает сверху в массе этого корма. Такое молочко пчелы дают маточной личинке на протяжении всего ее развития, в то время как рабочие пчелы кормятся им 2,5- 3 дня. Так как личинки маток пчел питаются маточным молочком на протяжении всей жизни, то характеризуются схожими с маточным молочком химическими свойствами и качественным составом [1].

Маточное молочко богато витаминами. Также в маточном молочке обнаружены инсулиноподобное вещество, гетероциклические вещества биоптерин и неоптерин, свободные нуклеотиды и нуклеиновые кислоты, ацетилхолин и глюконовая кислота [9].

В опытах in vitro выявлено бактерицидное действие маточного молочка [45]. Маточное молочко обладает антиоксидантными свойствами [5], снижает перекисное окисление липидов, оказывая этим гиполитическое действие, приводящее к нормализации липидного спектра крови. Тем самым уменьшая риск развития атеросклероза, инсульта и инфаркта миокарда [17]. Маточное молочко способствует расширению мелких кровеносных сосудов, что хорошо влияет на микроциркуляцию крови в тканях органов. Прежде всего в миокарде [16]. Помимо всего этого, благодаря своим адаптогенным свойствам маточное молочко, повышает устойчивость к физическим и психическим нагрузкам.

Маточное молочко – это биостимулятор, который приводит в норму обмен веществ в организме, усиливает активность ферментов, улучшает

трофику тканей регулирует клеточное питание, тонус сосудов, гормональную деятельность, способствует снятию ангиоспазма, снижает уровень холестерина и триглицеридов в крови. Оно богато БАВами (биологически активными веществами), необходимых для нормализации гормональных и ферментативных функций, стимулирует процесс кроветворения, восстанавливает защитные функции организма, повышает его выносливость, с помощью маточного молочка ускоряется выведения ядов из организма, а также оно обладает противорадиационными свойствами. [4, 17,19].

1.5 Белки маточного молочка

Основные компоненты, образующие неповторимый состав маточного молочка, известны науке уже давно. Это вода, белковые вещества, углеводы, жиры, минеральные соединения, витамины, аминокислоты, ферменты и гормоны. Однако для каждого региона характерно свое содержание этих веществ. Иногда их больше, иногда меньше, есть и такие образцы, в которых вовсе не присутствует какой-либо элемент, имеющийся в молочке, полученном в другом месте страны или даже планеты.

Каждый продукт питания содержит различные белковые соединения, характерные конкретно для него. Это утверждение справедливо и для маточного молочка.

Белки составляют около 50 % сухой массы маточного молочка [27]. Белки подразделяют на две группы, водорастворимые и нерастворимые в воде. Растворимые белки составляют 46-89% от общего количества белка в маточном молочке [23, 25]. Большую часть исследований водорастворимых белков маточного молочка проводят благодаря хроматографическим и электрофоретическим анализам.

Эти сложные органические вещества, именуемые также протеинами, являются важнейшими соединениями, без которых невозможна жизнедеятельность человека и животных. Они контролируют множество

процессов, начиная от построения клеток, и заканчивая синтезом молекул ДНК. Также они отличаются тем, что содержат в себе незаменимые аминокислоты – это одна из главных причин, по которой белки так необходимы живым существам.

Зарубежные учёные установили, что 90% всех белков, содержащихся в данном апипродукте, то есть маточном молочке, приходится на долю так называемых апальбуминов. По мнению исследователей, эти протеины подобны альбуминам. К слову сказать, одной из разновидности альбуминов являются сыворотка крови и семена растений. Вот почему во многих источниках пчеловодческой литературы встречается следующая фраза: «Белки маточного молочка идентичны белкам человеческой крови».

На сегодняшний день ученым удалось установить девять апальбуминов в составе маточного молочка. Более того, они доказали, что кроме пчел ни одно другое живое существо не может производить данные соединения. Именно эта причина побуждает всех исследователей проводить эксперименты и выяснять свойства апальбуминов.

Так, к примеру, было подтверждено, что эти белки маточного молочка способны бороться с бактериями и грибками, повышать иммунитет, оказывать влияние на рост здоровых клеток.

Еще одним важным отличием протеинов, содержащихся в корме маток, является тот факт, что они легко усваиваются. Если сравнивать их с белками мяса, усвоение которых составляет лишь 64%, протеины молочка пчел усваиваются на 81%.

Характеристике отдельных белков маточного молочка посвящено достаточно мало исследований. Изучены следующие ферменты маточного молочка: инвертаза [32, 39], амилаза [29, 44], аскорбиноксидаза [31], каталаза [44], кислая фосфотаза [33] и инсулинопододбный пептид [37, 38].

Первым белком маточного молочка, для которого была определена полная аминокислотная последовательность является антибактериальный пептид royalizin [30]. Потом были секвенированы следующие белки

маточного молочка: RJP57-1 и RJP57-2, а также белок с молекулярной массой 56кДа.

Выделено несколько фракций водорастворимых белков с молекулярной массой от 47 до 80 кДа, которые производятся в головной железе пчел-кормилиц [34]. Предполагается, что они выполняют питательную функцию.

Совсем недавно было проведено исследование, в котором выяснили, что один из гликопротеинов с молекулярной массой 55 кДа участвует в поддержании высокой жизнеспособности в культуре клеток печени крыс. Важным открытием в медицине, является то, что мажорные белки с молекулярной массой 47 и 50 кДа являются основными аллергенными белками маточного молочка. Эти белки могут служить маркерами для диагностики аллергической чувствительности к маточному молочку, так как они дают положительную реакцию с сыворотками пациентов чувствительных к маточному молочку, страдающих от астмы, ринита и / или экземы [42].

Белок с молекулярной массой 57 кДа, названный белком фактора роста был выделен из маточного молочка в начале XXI в. Это стало научным достижением. Значение этого белка заключается в формировании пчелиных каст (групп). Именно этот белок индуцирует дифференциацию личинок пчел в королев. Во время научных исследований было выяснено, что маточное молочко активирует p70 S6 киназу, которая ответственна за увеличение размера тела, повышая активность митоген-активированной протеинкиназы, которая в свою очередь вовлечена в снижении времени развития и повышение количества ювенильного гормона, необходимого для развития яичников. Результаты показали, что этот белок маточного молочка вызывает развитие пчелиных королев через EGFR-опосредованный сигнальный путь [35], отсюда и название – белок фактора роста.

1.6 Физиологические свойства белков маточного молочка

Белковые фракции маточного молочка содержат много значимых компонентов и биологически активных веществ. Помимо мажорных белков маточное молочко содержит и небольшое количество минорных белков, среди которых антибиотические пептиды [28]. Биоактивные белки и пептиды, присутствующие во фракции аминокислот белков из корма играют особый интерес в биологии. Они могут быть освобождены энзиматическим протеолизом, например, во время переработки корма. И уже после освобождения в теле биоактивные пептиды могут действовать как регулирующие компоненты. Структуры этих биоактивных компонентов еще не до конца изучены, для этого следует продолжать исследования энзиматического пищеварения in vitro и/или желудочно-кишечного пищеварения этих белков in vivo.

Исследования, проведенные не так давно, доказывают значительное влияние на очень важные физиологические процессы, биоактивных компонентов маточного молочка, а именно ряда мажорных белков. Биологически-активные пептиды из маточного молочка и из его мажорных белков следует иметь ввиду как возможных модуляторов ряда регулирующих процессов в живом организме. Механизм, через который мажорные белки маточного молочка оказывают иммунномодулярные эффекты пока еще не определены, но результаты, полученные с 350 кДа и 55 кДа пептидами, из маточного молочка, показали, что его мажорные белки могут влиять на важные клеточные процессы. Белки 350 кДа стимулируют размножение моноцитов человека (линия клеток U 937) и гибридомы человек-человек (линия клеток HB4C5) [36]. Белок 55 кДа маточного молочка, идентичен со вторым важным белком маточного молочка, поддерживающим высокую жизнеспособность первичной структуры клеток крысы, но не стимулирующего размножение моноцитов в человеческом организме [28]. Оценка химических структур мажорных белков маточного молочка - важный

шаг к открытию молекулярного механизма их физиологической активности вместе с другими биоактивными компонентами маточного молочка.

Информация о физиологических свойствах белков маточного молочка, как регуляторов и стимуляторов размножения моноцитов в человеческом организме или имунномодулирующие свойства продукта, активность в защите против аллергии к маточному молочку расширяют возможность применения этого продукта пчеловодства и указывают на природную функцию в процессе эволюции медоносной пчелы, в случае которой могут индуцировать механизм защиты в период личиночного развития. Если все верно, белки маточного молочка могли бы индуцировать выработку биорегуляторов типа цитокина, с важной функцией в иммунитарной системе. Так же установлено, что белки маточного молочка отвечают за стимулирование in vitro выработки TNF-a в моноцитах человека [43].

Медоносные пчелы, как и другие насекомые отвечают на бактериальные инфекции повышенным индуцировнаием генов для противомикробных пептидов, которые затем выделяются гемолимфой. Такой «иммунный ответ» очень быстро появляется, но часто не является специфичным. Определенные противомикробные пептиды специфично индуцированы и выделены в гемолимфе только после появления бактериальной инфекции, в то время как дефенсин-роялиин и аписимин, вероятно, синтезируются всю жизнь медоносной пчелы [21,28,30].

Помимо регуляторных и стимулирующих функций, белки маточного молочка играют роль в защитном механизме медоносной пчелы против патогенных агентов непосредственным инактивированием микроорганизмов из продуктов жизнедеятельности пчелы, а также индуцированием цитокинов.

1.7 Действие маточного молочка на организм человека. Медико-биологическая активность маточного молочка

Благодаря своему сложному химическому составу маточное молочко имеет широкий спектр воздействия на человеческий организм. Оно может

воздействовать как на процессы регуляции, так и на метаболизм клеток и тканей [18].

Около 90% жирных кислот маточного молочка состоят из особых короткоцепочечных (8-10 атомов углерода) гидрокси- и дикарбоновых жирных кислот. В нем содержатся различные ненасыщенные кислоты. Основное место занимают пальмитиновая, олеиновая, линолевая и липоевая. Эти кислоты выполняют пластическую функцию и играют важную роль в восстановлении эндотелия сосудов, являясь предшественниками простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов. Механизм действия маточного молочка мало изучен и, вероятно, основан на липотропном эффекте – способности ненасыщенных жирных кислот встраиваться в биологические мембраны, меняя их свойства и активность мембраносвязанных белков.

Другая часть липидов молочка – это фосфолипиды. Эти соединения являются основными компонентами плазматических мембран, и выполняют различные функции метаболизма.

Во время исследования плазмы крови пациентов с повышенным содержанием холестерола, липопротеидов высокой и низкой плотности, триглицеридов установлено, что на фоне приема маточного молочка отмечается их снижение, что положительно влияет на микроциркуляцию органов и тканей в целом [26].

Этот апипродукт оказывает неоднозначное действие на тонус сосудов. Его прием стимулирует симпатический и парасимпатический отделы вегетативной нервной системы, способствует нормализации артериального давления и гипер- и гипотоников. Благодаря этому маточное молочко можно применять в терапии ангиогенного варианта эректильной дисфункции.

Маточное молочко повышает устойчивость организма к гипоксии, улучшая процессы тканевого дыхания, потребление ими кислорода [18]. Оно оказывает влияние на клеточные и гуморальные звенья иммунной системы,

что позволяет рассматривать его в качестве перспективного иммунномодулятор [15].

В опытах in vitro выявлено противомикробное действие маточного молочка. Антимикробную активность молочко проявляет против грамположительных микроорганизмов, а при увеличении концентрации – против грамотрицательных. Основными факторами антибактериальной активности маточного молочка являются 10-гидрооксидекановая и 10-гидроокси-2-де-ценовая жирные кислоты. Активность снижается в процессе хранения и под влиянием температуры.

1.8 Каталазная активность микроорганизмов

Каталаза - фермент класса оксидоредуктаз, входящий в состав антиоксидантной системы клетки и выполняющий функцию антиперекисной защиты. В клинической биохимии преимущественно определяют активность каталазы фотометрическим методом в следующих биологических средах: цельная кровь, плазма, эритроциты. Активность каталазы крови - один из прогностических тестов выраженности эндотоксикоза организма человека. Анализ активности каталазы находит применение в экологии человека в качестве биомаркера нарушений метаболических процессов в организме, как в крови, так и в других биологических средах (например слюне). Для оценки качества окружающей среды в экологии человека используется фотометрическое измерение концентраций каталазы в воздухе рабочей зоны.

Каталаза метаболизирует пероксид водорода, предотвращая его накопление в клетке, с образованием воды и кислорода [10]. Это высокоактивный фермент, не требующий энергии для активации. Снижение активности каталазы возникает при избытке метионина, цистина, меди, цинка.

Каталаза - хромопротеид с молекулярной массой около 240 000 Д, состоит из 4 субъединиц, имеющих по одной группе гема. Она, как один из

ферментативных антиоксидантов, относится к первому звену внутриклеточной защиты от активных форм кислорода.

Ферментативные антиоксиданты характеризуются высокой специфичностью действия, а также клеточной и органной локализацией, использованием в качестве катализаторов некоторых металлов (медь, цинк, марганец, железо). Каталаза - фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз, который катализирует гетеролитическое расщепление О-О-связи в перекиси водорода. Каталаза всегда присутствует в системах, где осуществляется транспорт электронов с участием цитохромов, т. е. там, где образуется токсичный для клетки пероксид водорода. Она локализована преимущественно в пероксисомах клетки и цитоплазме. У человека высокое содержание каталазы обнаружено в эритроцитах, а также в печени и почках [20].

Определение каталазы в клинической биохимии наиболее распространено в таких биологических средах, как цельная кровь, плазма, эритроциты. Суть данных методов сводится к фотометрической регистрации комплексных соединений молибдата аммония с неразложившейся перекисью водорода.

Определение активности каталазы нашло применение в экологии человека для оценки качества окружающей среды. Разработаны методические указания по фотометрическому измерению концентраций каталазы в воздухе рабочей зоны для обеспечения контроля соответствия фактических концентраций вредных веществ их предельно допустимым концентрациям (ПДК) и ориентировочно безопасным уровням воздействия (ОБУВ) -обязательным санитарно-гигиеническим нормативам. Метод основан на реакции взаимодействия остаточных количеств пероксида водорода (после взаимодействия фермента) с молибдатом аммония и последующим фотометрическим измерением окрашенного продукта реакции при длине волны 415 нм. Отбор проб при применении данного метода проводят с концентрированием на фильтр.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Для получения белковых фракций, которые в дальнейшем будут использоваться для изучения их влияния на каталазную активность микроорганизмов, был приготовлен 30%-й водный раствор маточного молочка.

Выделение белковых фракций из раствора маточного молочка, а также проведение оценки влияния этих фракций на каталазную активность микроорганизмов проводились в Пензенском государственном университете в лабораториях на базе кафедры «Общая биология и биохимия».

Для исследования использовался приготовленный 30%-й раствор маточного молочка, разведённый на основе 0,9% раствора NaCl. С последующим хранением этого раствора в морозильной камере для дальнейших исследований.

В ходе проведения исследований по изучению влияния белков маточного молочка на каталазную активность в качестве модельных микроорганизмов использовалась сенная палочка (*Bacillus subtilis*) и бактерии рода *Clostridium* как модель грамположительных бактерий и бактерии рода *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

Неподвижной фазой являются материалы, обычно гели, со строго контролируемой пористостью, в результате чего одни компоненты смеси в соответствии с размером и формой молекул могут проникать между частицами геля, а другие не могут. Наиболее часто этот вид хроматографии используется для разделения высокомолекулярных соединений. Один из вариантов применения этого метода – определение молекулярных масс разделяемых веществ Гель-фильтрация (синоним гель-хроматография) — метод разделения смеси веществ с различными молекулярными массами путем фильтрации через различные так называемые ячеистые гели. Гель-фильтрация широко используется для определения величин молекулярных масс, обессоливания растворов нативных белков, концентрирования

растворов полимеров. В медицине Гель-фильтрация применяют для диагностического разделения белков сыворотки крови, например при макроглобулинемии, гемоглобинопатиях, при ранней диагностике беременности, для получения очищенных препаратов ферментов. Гель-фильтрация проводят на хроматографических колонках, заполненных набухшим гранулированным гелем, например гелем сефадексов (коммерческое название полисахаридов декстранов, прошедших специальную химическую обработку, в результате которой между линейными структурами их молекул образуется множество поперечных связей, или «сшивок»), биогелем и т.п., элюируют (вымывают) разделяемые вещества разбавленными солевыми или буферными растворами. Эффективность Гель-фильтрация определяется размерами пор между гранулами геля и величиной ячеек каждой гранулы: мелкие молекулы вещества (значительно меньше ячейки геля) диффундируют внутрь гранулы и задерживаются при фильтрации через эти своеобразные молекулярные сита, а более крупные молекулы не могут попасть в ячейки и проходят в поры между гранулами. Метод прост в исполнении и проводится в мягких условиях, исключающих денатурацию биологически активных белков, что важно при работе, например, с ферментами.

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 Метод Лоури

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 $CuSO4 \cdot 5H2O$ в 1%-м растворе или цитрата натрия) и реактива А (2%-й раствор $Na2CO3$ 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 $\lambda = 750$ 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 Определение каталазной активности

Каталазная активность была измерена с использованием молибдата аммония. Суть метода заключается в измерении убыли пероксида водорода в пробах с использованием молибдата аммония, который образует окрашенный в синий цвет комплексное соединение с пероксидом водорода.

Для определения каталазной активности к 0,1 мл подготовленного раствора гомогената опытной и контрольной бактериальной культуры добавляли 2 мл 0,03%-го раствора перекиси водорода и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. После инкубации каталазную реакцию разложения пероксида водорода останавливали добавлением 1 мл 4%-го раствора молибдата аммония в 0,1 н растворе серной кислоты и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 410 нм. В качестве контрольной пробы использовали смесь из 2,1 мл дистиллированной воды и 1 мл раствора молибдата аммония. Активность каталазы вычисляли по формуле (1) и выражали в мкат на мкг белка:

$$E = \frac{A_{оп} \cdot V \cdot t \cdot 22{,}2 \cdot 10^3 \text{мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}}{C}, \text{ где}$$

E— активность каталазы, мкат/мкг;

$A_{оп}$— оптическая плотность опытной пробы;

V— объём вносимой пробы, л;

t— время инкубации, с;

C— концентрация белка, мкг/мл.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Построение калибровочных кривых 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).

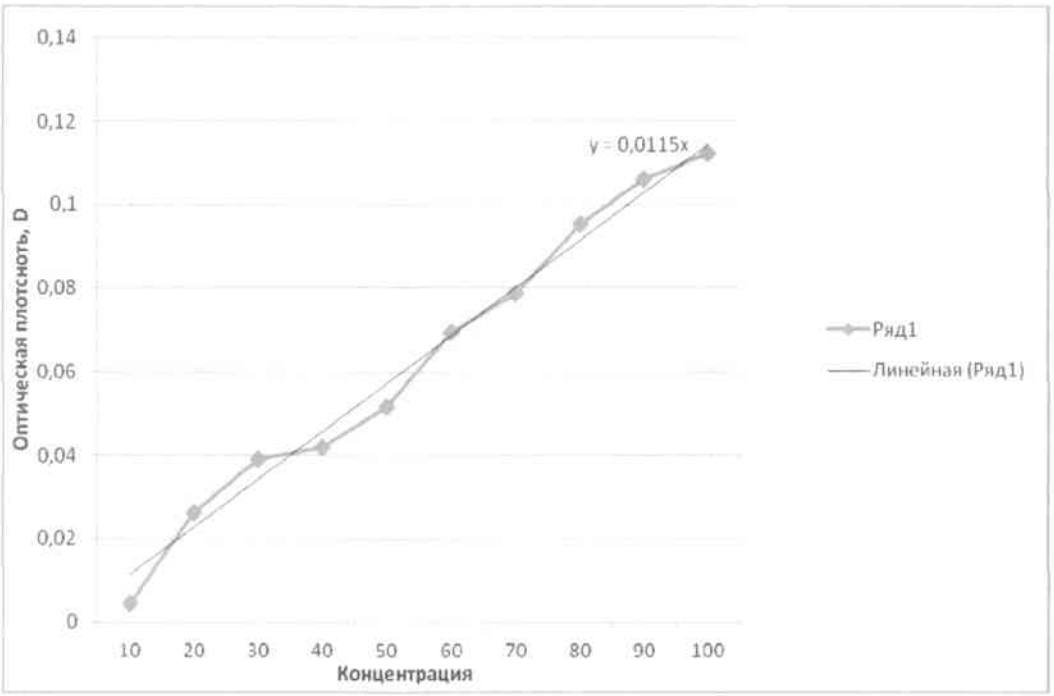

Рисунок 1. Калибровочный график по БСА

3.2 Получение белковых фракций маточного молочка методом гель-фильтрации

Перед разделением белков маточного молочка, полученных после ультрафильтрации, методом гель-фильтрации проводили делипидизацию: к равному объему раствору белков приливали гексан и встряхивали 15 минут,

после чего центрифугировали 15 минут при 5000 оборотов в минуту. Нижний слой жидкости в объеме 500 мкл наносили на колонку TSKgel G3000SW и элюировали 0,9%-ым раствором NaCl (скорость элюции 0,75 мл/мин). Детекцию проводили спектрофотометрически по поглощению излучения на длине волны λ = 220 нм. Фракции собирали с использованием коллектора фракций в объёме 1 мл.

Таким образом разделение фракций проводили несколько раз. Фракции разных разделений № 5 и 6 (фракция 1), 7 и 8 (фракция 2), 9-11 (фракция 3) объединяли в 3 группы.

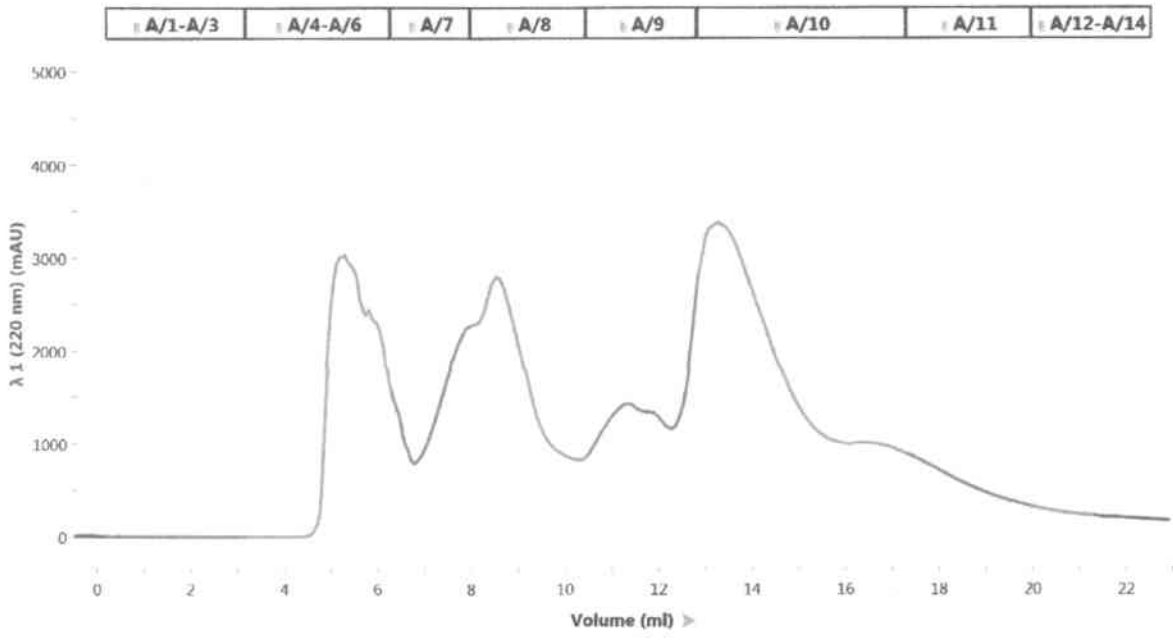

Рисунок 2. Профиль элюции белков раствора маточного молочка

В полученных растворах определяли концентрацию белка методом Лоури. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. – Концентрация полученных фракций

Название фракции	№ фракции	Концентрация в мкг/мл
Белки маточного молочка	1	141,913044
	2	196,695652
	3	144,130435

Анализируя типичный профиль элюции белков маточного молочка можно сказать, что в исходном продукте содержится как минимум 4 группы разных белков, которые могут обладать определённой биологической активностью.

3.3 Получение тестовых культур микроорганизмов и контроль их качества

Для исследования влияния полученных фракций белков маточного молочка на каталазную активность микроорганизмов 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. 3-5 представлены фотографии полученных накопительных культур.

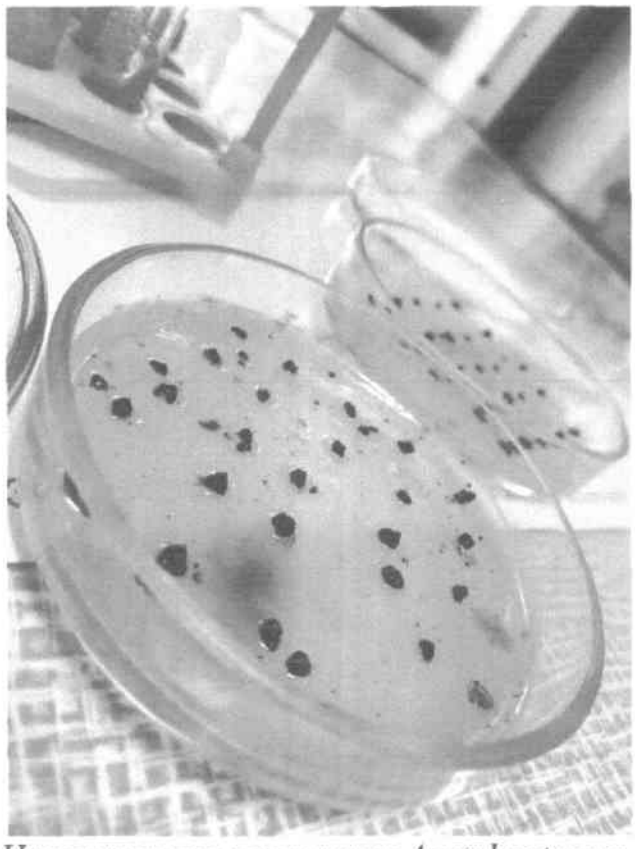

Рисунок 3. Накопительная культура Azotobacter на среде Эшби

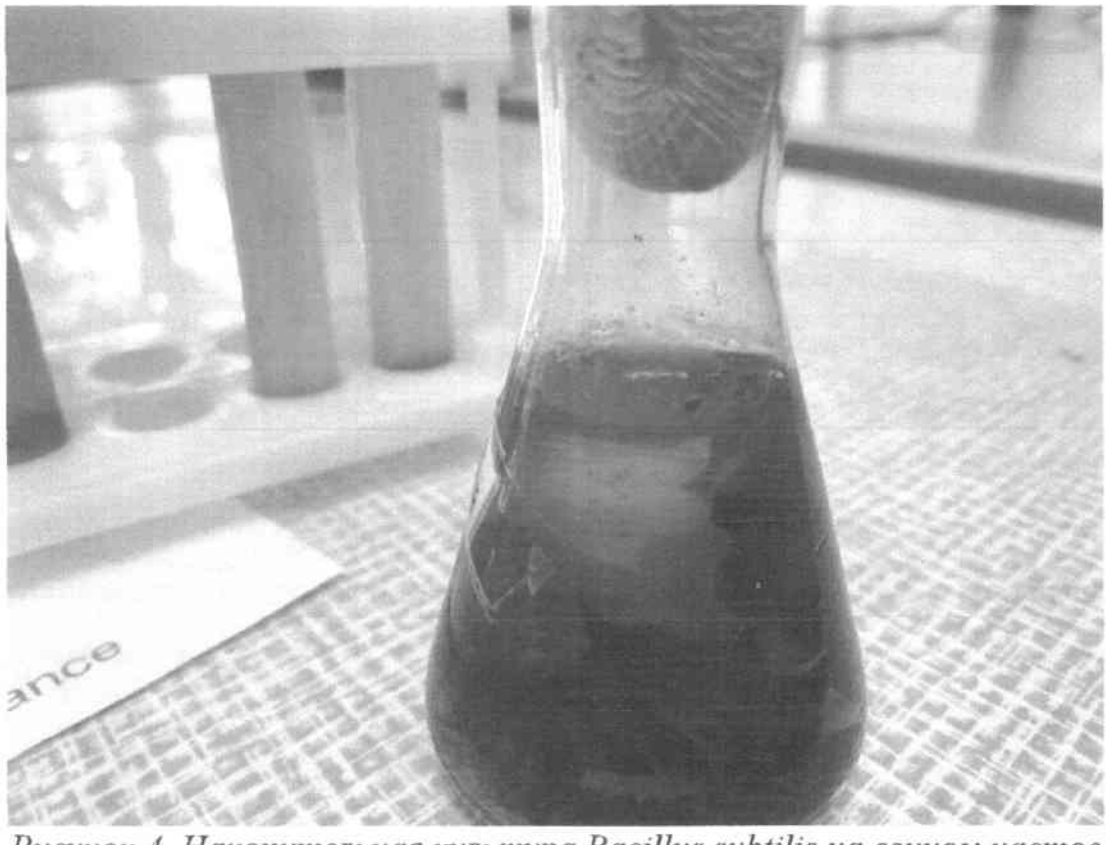

Рисунок 4. Накопительная культура Bacillus subtilis на сенном настое

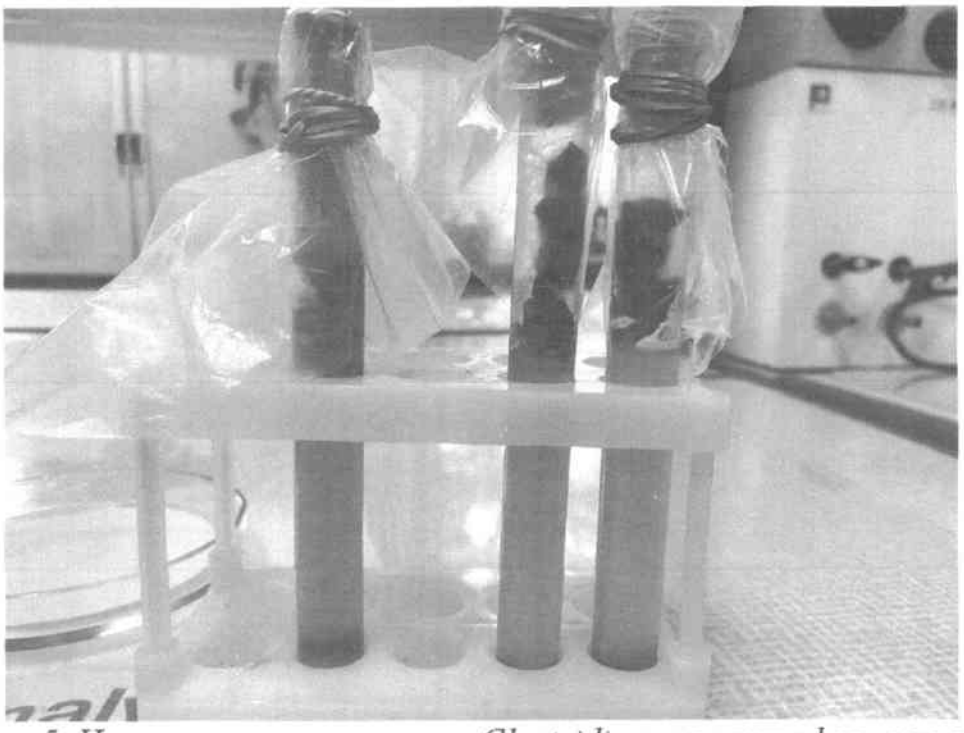

Рисунок 5. Накопительная культура Clostridium на картофельном отваре

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.

На фотографии видны скопления клеток микроорганизмов палочковидной формы, при более детальном рассмотрении клетки имеют вид тонких нитевидных образований. В мазке бациллы располагаются по-разному — одиночно, скоплениями или длинными цепочками. Бактериальная клетка имеет толстую клеточную стенку, состоящую из пептидогликана. От поверхности клеток в некоторых случаях вытягиваются выпячивания, жгутики, что способствует мобильности клетки.

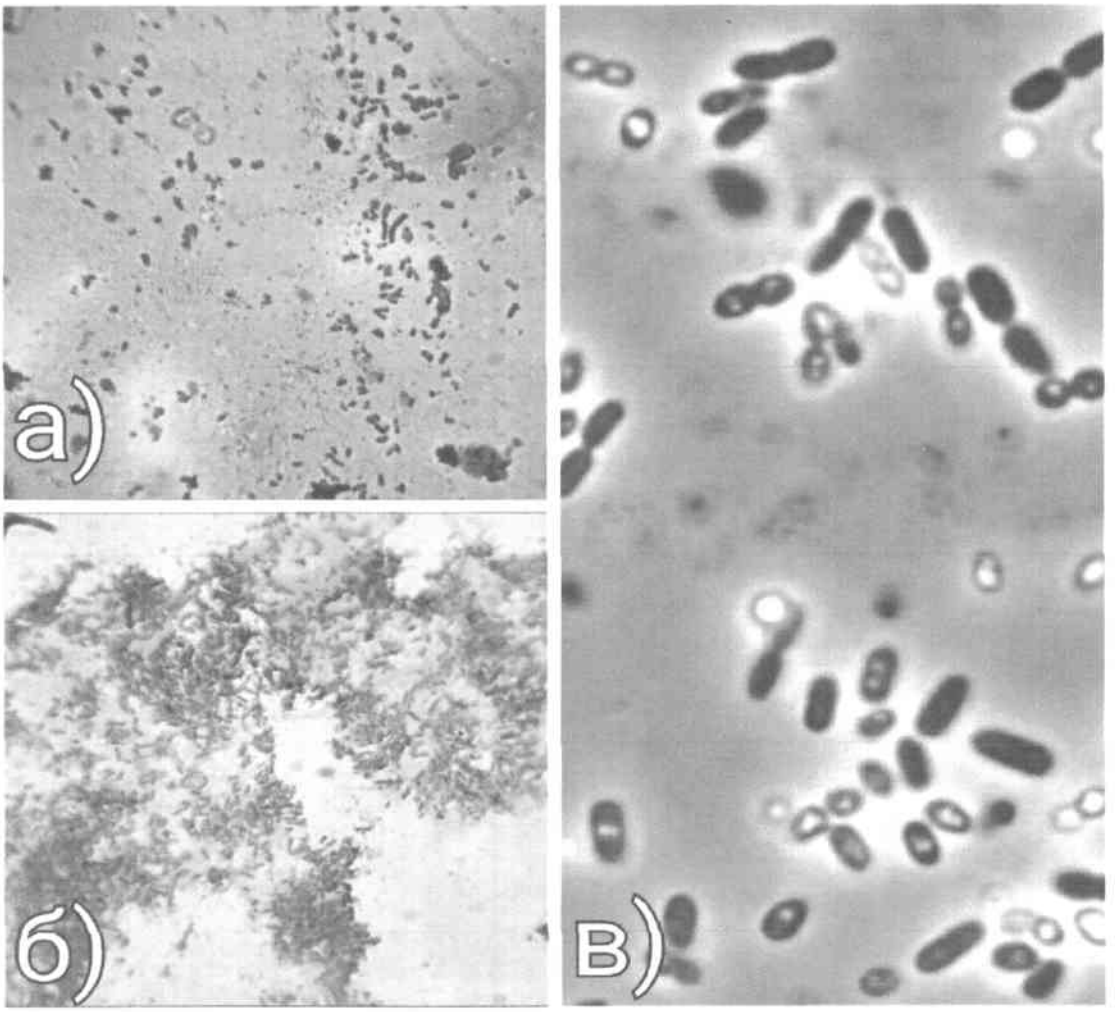

Рисунок 6. Микроскопия накопительных культур: а) Сенная палочка (Bacillus subtilis); б) Клостридии (Clostridium); в) Азотобактер (Azotobacter)

При окраске мазка культуры клостридий видны палочковидные клетки бактерий, окрашенные в синий цвет, расположенные попарно или короткими цепочками. Некоторые клетки имеют веретенообразную форму из-за расположенной в центре эндоспоры, что является характерным признаком клостридиальных клеток.

При рассмотрении окрашенного тушью мазка Азотобактера видны характерные крупные неокрашенные клетки. Тушь не проникает в неокрашенные клетки из-за наличия вокруг Азотобактера слизистой капсулы, что и является дифференцирующим признаком для идентификации бактерий данного рода.

После созревания накопительных культур микробиологической петлёй были произведены посевы на плотные питательные среды на косой агар в пробирки (МПА для клостридий и *B. subtilis*, Эшби для Азотобактера). После инокуляции косого агара пробирки были закрыты стерильными ватно-марлевыми пробками и убраны в суховоздушный термостат на сутки при 37° С для роста бактерий.

Рисунок 7. Косой агар с Azotobacter

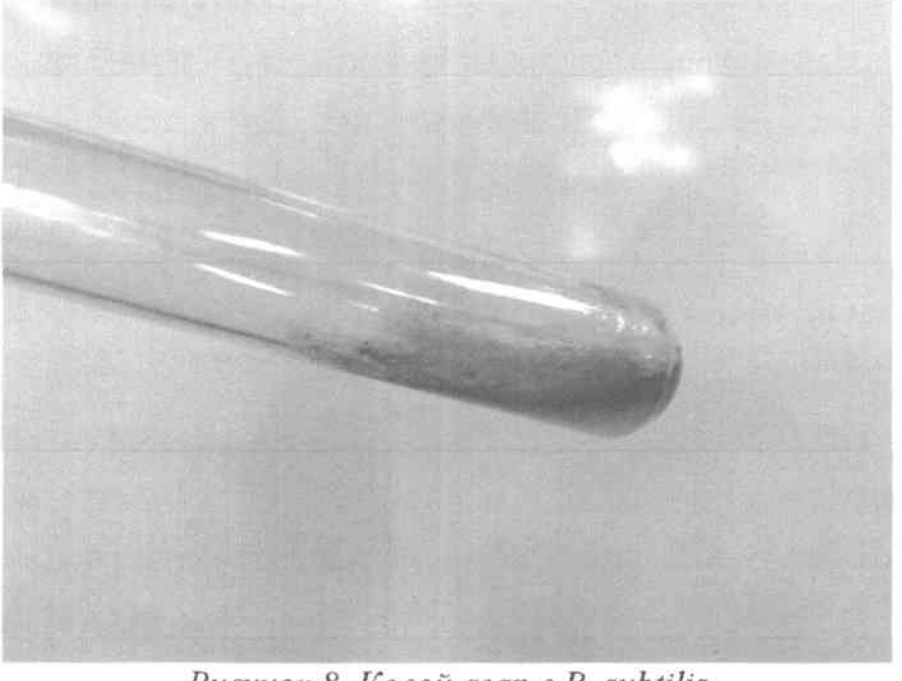

Рисунок 8. Косой агар с B. subtilis

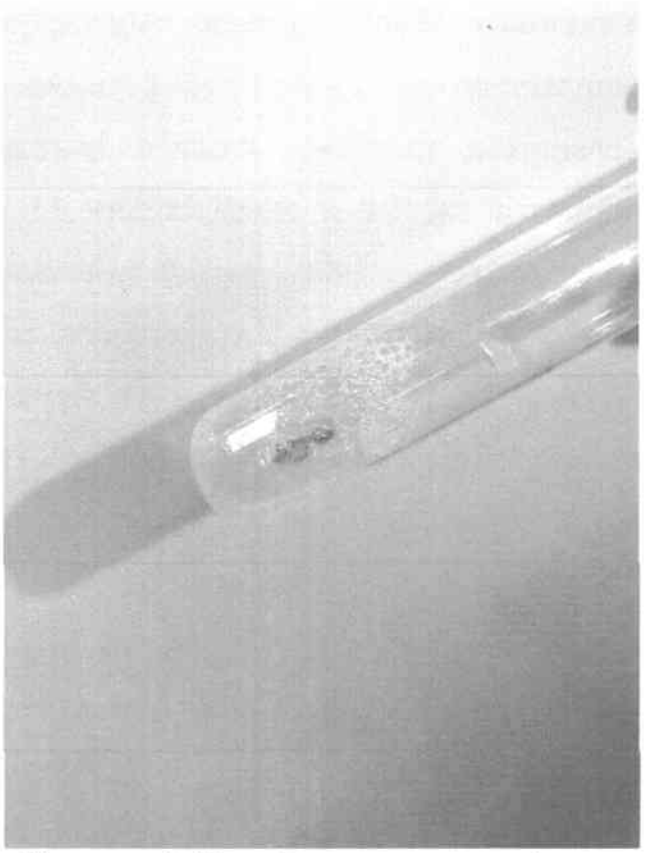

Рисунок 9. Косой агар с клостридиями

По прошествии суток пробирки с косым агаром были исследованы на предмет роста соответствующих культур (рис. 7-9). Подтверждение развития культуры в пробирках было основано на визуальных признаках: изменение цветности, плотности и прозрачности агара, появление цветных включений или глянцевого налёта.

3.4 Определение каталазной активности микроорганизмов

После готовности тестовых культур, культивированных на косом агаре, на каждую из культур в трёх повторностях добавили по 40 мкл одной из пяти тестируемых фракций белков маточного молочка. В качестве контроля на культуры добавляли по 40 мкл 0,9%-го раствора NaCl.

После суток инкубации при 37° С содержимое пробирок гомогенизировали с 1 мл воды и 100 мкл 0,02%-го раствора тритон х-100 для

разрушения бактериальных клеток. После гомогенизации содержимое пробирок инкубировалось 2 часа при 4°С для экстракции внутриклеточного содержимого в раствор, а затем гомогенат центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 минут. Далее к 0,1 мл супернатанта, содержащего содержимое разрушенных бактериальных клеток, добавляли 2 мл 0,03% раствора пероксида водорода и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. После инкубации к пробе добавляли 1 мл 4%-го раствора молибдата аммония в 0,1 н серной кислоте и измеряли оптическую плотность на длине волны 410 нм против контрольной пробы, содержащей 0,1 мл дистиллированной воды и без инкубации.

По полученным данным были построены диаграммы, отражающие изменение каталазной активности тестовых микроорганизмов под действием исследуемых белковых фракций маточного молочка в сравнении с контрольными культурами (рис. 10-12).

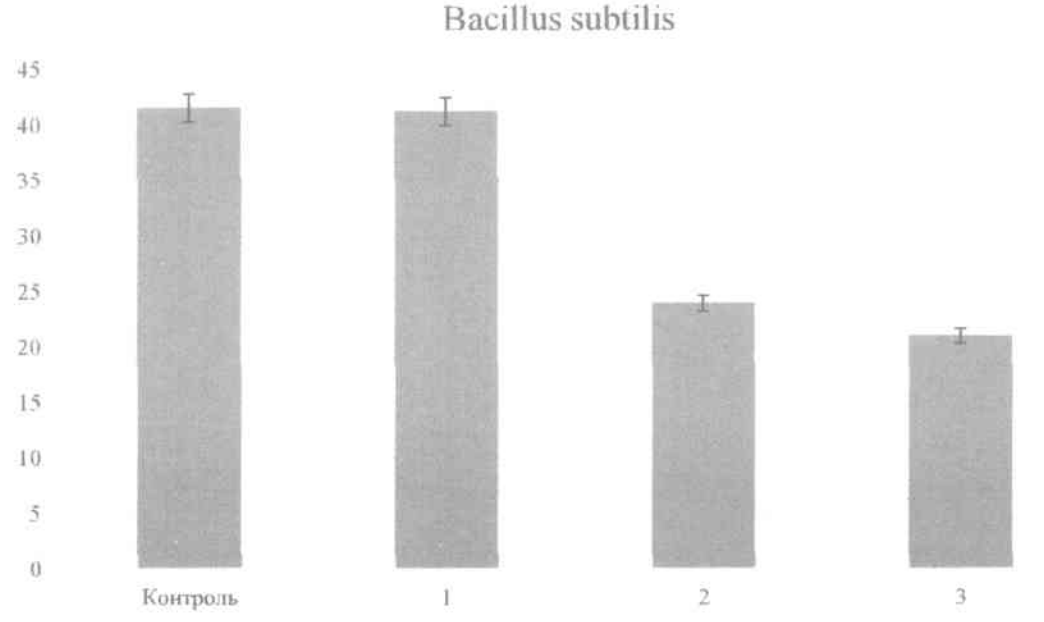

Рисунок 10. Изменение каталазной активности микроорганизмов культуры Bacillus subtilis под действием белков маточного молочка

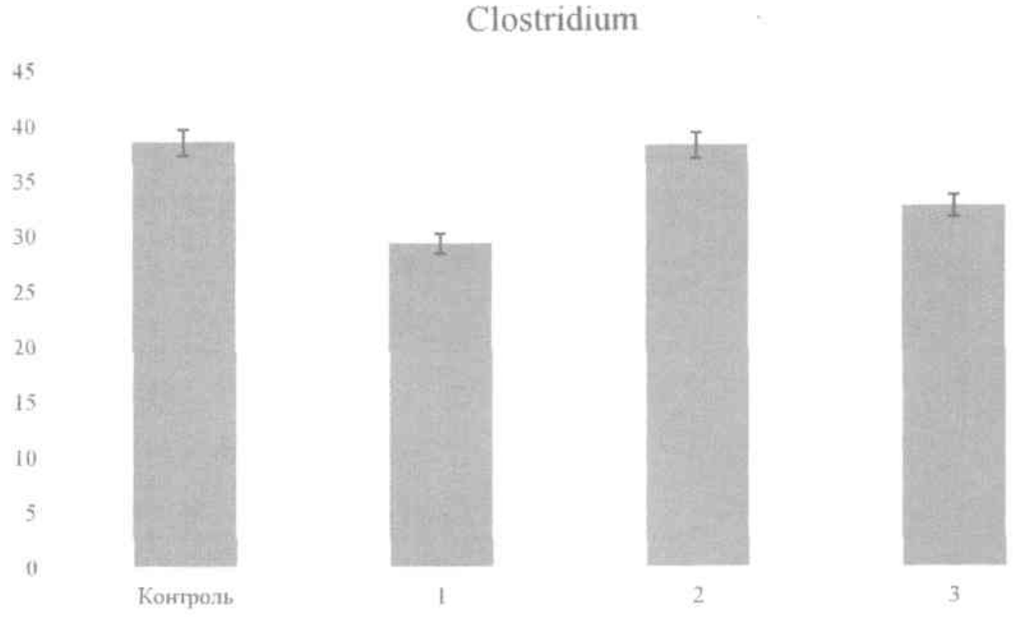

Рисунок 11. Изменение каталазной активности микроорганизмов культуры Clostridium под действием белков маточного молочка

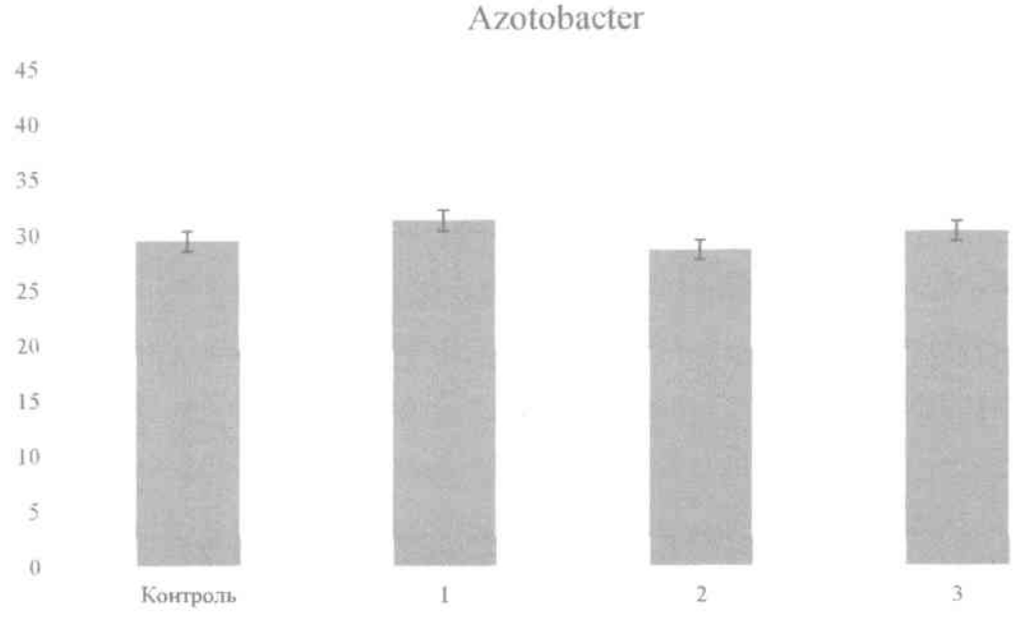

Рисунок 12. Изменение каталазной активности микроорганизмов культуры Azotobacter под действием белков маточного молочка

Результаты по измерению общей каталазной активности модельных организмов свидетельствуют о том, что разные фракции белков маточного молочка по-разному влияют на каталазную активность микроорганизмов.

В случае тестовой культуры сенной палочки *Bacillus subtilis* изменение каталазной активности наблюдается только под воздействием фракций №2 и 3, фракция №1 не влияет на активность каталазы. Под действием фракций №1 и 3 происходит снижение активности каталазы в случае бактерий рода *Clostridium*, у тестовой культуры бактерий рода Azotobacter не происходит изменения в активности каталазы вовсе.

Биологическая роль каталазы состоит в разрушении перекиси водорода, образующейся в клетках в результате действия ряда флавопротеиновых оксидаз (ксантиноксидазы, глюкозооксидазы, моноаминоксидазы и др.) в норме и при оксидативном стрессе. Присутствие каталазы обеспечивает эффективную защиту клеточных структур от деградации под действием перекиси водорода.

Каталаза широко распространена в тканях животных и растений и в микроорганизмах. Содержание каталаз в печени и эритроцитах млекопитающих составляет 0,1–0,2%, в отдельных штаммах микроорганизмов — до 5% сухого веса.

Каталаза разлагает перекись водорода с исключительно высокой скоростью и широко считается идеальным ферментом. При стандартных условиях одна молекула каталазы разлагает в секунду до 105 молекул пероксида водорода. [1] Оптимальное значение pH для каталазы лежит в интервале 6,0–8,0. Общепринятый механизм действия каталазы предполагает образование промежуточного комплекса фермента с H2O2, который взаимодействует затем со второй молекулой перекиси водорода.

Активность каталазы ингибируется цианидом, фторидом, азидом, сульфидом, ацетатом, 3-амино-1,2,3-триазолом и его аналогами. Каталаза быстро инактивируется в растворе при pH больше 10,0 и меньше 4,0 и в присутствии высоких концентраций мочевины или других вызывающих разрыв водородных связей агентов[20]. Инактивация фермента связана с образованием каталитически неактивных субъединиц.

Каталаза играет решающую роль в адаптивном ответе на H_2O_2 и работает в комплексе с глутатионпероксидазой. Эти ферменты находятся на втором уровне защиты против активных форм кислорода, поэтому изменения в активности каталазы свидетельствуют об изменении оксидативного статуса клетки.

Изменение активности каталазы в опытных культурах под действием тех или иных фракций белков маточного молочка может свидетельствовать о том, что стресс, вызванный образованием активных форм кислорода в норме или при повышении скорости метаболизма по тем или иным причинам, уменьшается, т. к. бактериальным клеткам, живущим в условиях дефицита питательных веществ и экономии энергетических ресурсов не выгодно постоянно поддерживать повышенный уровень экспрессии ферментов без большой на то необходимости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Продукты пчеловодства пользуются большой популярностью в качестве исходного сырья для производства биологически активных добавок. Однако существует достаточно мало исследований на тему изучения механизмов проявления биологической активности маточного молочка, трутневого расплода, перги и т.д. Одним из перспективных направлений исследований в данной области является изучение белково-пептидного состава продуктов пчеловодства.

В данной работе была изучена биологическая активность белковых фракций маточного молочка: влияние на каталазную активность бактерий рода рода Clostridium, Azotobacter и вида Bacillus subtilis.

В ходе исследования было изучено влияние белков маточного молочка на каталазную активность микроорганизмов.

По результатам исследования можно сделать следующие выводы:

1. В состав маточного молочка входят белки, которые можно выделить и фракционировать методом гель-фильтрации.

2. Полученные в результате исследования фракции белков изменяют каталазную активность микроорганизмов рода Clostridium и вида Bacillus subtilis.

3. Каталазная активность микроорганизмов Azotobacter остается неизменной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белик Э.В. Большой современный справочник пчеловода – Донецк, 2004.

2. Бердышев Г.Д., Жданов Г. Продукты пчеловодства в биологии и медицине /Деп. в ВИНИТИ 01.08.91 №3328-139 // Пермь: Перм. Госмедин-т., 1991. 1963 с.

3. Бондаренко И.Ф. Биологически активные продукты пчеловодства и их использование // Горький, 1990. С.102-104.

4. Бондарчук Л. И., Кожура И.М., Рябуха В.Н., Противоопухолевые свойства маточного молочка //Апитерапия сегодня: Тез. докл. V науч.- практ. конф. по апитерапии. Рыбное, 1997. С. 93-94.

5. Брагин Е.О. Нейрохимические механизмы регуляции болевой чувствительности // М.- Издательство университета дружбы народов. 1991. – С. 248.

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

7. Вахонина Т. В., Кривцов Н. И., Бурмистрова Л.А, Агафонов А.В. Маточное молочко: химический состав, свойства, хранение // Современные технологии в пчеловодстве: Материалы научно-практической конференции – Рыбное, НИИ пчеловодства, 2004.

8. Вахонина Т.В. Биологически активные продукты пчеловодства // Т.В. Вахонина – Рязань, 1993. С. 20-23.

9. Вахонина Т.В., Покровский С.А. Природный пчелиный продукт маточное молочко и его биологически активные вещества //XXXI Международный конгресс по пчеловодству Апимодии, Варшава, Польша. – Бухарест: Апимондия, 1987.С.511.

10. Габитова Д. М., Рыжикова В. О., Рыжикова М. А. Антиоксидантная защитная система организма // Башкирский химический журнал. 2006. Т. 13. № 2. С. 94-96

11. Дубцова Е.А. Состав, биологические свойства меда, пыльцы и маточного молочка и возможность их применения в лечебном питании // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2009. №3 С.36-41.

12. Кривцов Н.И., Лебедев В.И. Получение и использование продуктов пчеловодства. - М.: Нива России, 1993.285 с.

13. Кривцов Н.И., Лебедев В.И. Продукты пчеловодства/ 2-е изд. – М.: Нива Росеи, 1995.254 с.

14. Кривцов НИ., Лебедев В.И. Продукты пчеловодства/2-е изд. – М.: Нива Росеи, 1995.25 с.

15. Лудянский Э.А. Апитерапия. – Вологда: Полиграфист, 1994.458 с.

16. Магдалска 3. Попытка лечения расстройств системы свертывания крови и аплазии при помощи маточного молочка //XXXI Международный конгресс по пчеловодству. Бухарест: Апимондия, 1987. С. 497.

17. Макарова В.Г., Рябков А.Н. Узбекова Д.Г и др Изучение кардиопротекторного действия продуктов пчеловодства. // Апитерапия сегодня: Тез. Докл. III науч.- практ. Конф. Рыбное, 1994.С. 7-9

18. Макарова В.Г., Сауткин М.Ф., Узбекова Д.Г. Влияние некоторых композиций продуктов пчеловодства на физическое состояние человека // Апитерапия сегодня: (сб. 10): материалы междунар. науч-практ. конф. По апитерапии. – Рыбное: НИИП, 2002.С. 16 – 189

19. Неделька А.Ф. Маточное молочко как биогенный стимулятор в комплексном лечении дистрофии сетчатки и зрительного нерва // Продукты пчеловодства в сельском хозяйстве и медицине: Тез. докл. обл. конф. – Вологда, 1987.С. 58-59.

20. Рязанцева Л. Т. Ферменты-антиоксиданты: структурно-функциональные свойства и роль в регулировании метаболических процессов // Вестн. Воронежского гос. техн. ун-та. 2011. Т. 7. № 2. С. 126-129

21. Симакова В.М., Алексеева В.А., Исаева И.В., Плетень А.П. Исследование состава маточного молочка // Фармация. М.: 1995.244 – 307 с.

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

23. Такенака Т., Протеины, пептиды и аминокислоты, содержащиеся в маточном молочке. // 29-Международный конгресс по пчеловодству, 1983, Будапешт, Венгрия. Бухарест:Изд-во Апимондии. С.185

24. Хисматулина Н.З. Апитерапия.- Пермь: Мобиле, 2005 – 296

25. Чудаков В.Г. Технология продуктов пчеловодства. М.: Колос, 1979-160 с.

26. Чулошникова И. А., Иващенко М.Н. Влияние молочка пчелиного маточного на некоторые биохимические показатели крови // Апитерапия сегодня: (сб. 10): материалы международной научно-практической конференции по апитерапии. – Рыбное: НИИП, 2002.С.107 – 109

27. Шимут Я., Биликова К., Ковачкова Е. Содержащиеся в маточном молочке белки как средство разработки необходимых для здоровья средств. Laboretory of Genetic Enginering, Institute of Chemistry // Bratislava: 2009

28. Bilikova K., Hanes J., Nordhoff E., Saenger W., Klaudiny J., Simuth J. Apisimin, a new valin-rich peptide from honeybee (Apis mellefera L.) royal jelly: purification and molecular characterization. FEBS Letters 528: 2002.P. 125 – 129

29. Brouwers E.V.M. Measurement of hypopharyngeal gland activity in the honeybee. J. Apic. Res. 21: 1982.P. 193-198.

30. Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T. And Kobayshi K. A protent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination og the primary structure of royalisin. J. Biol. Chem.: 1990 P. 265

31. Gontarski H. Uber die Vertikalorientierung der Bienenbeim Bau der Waben und bei der Anlage des Brutnestes. Z. vergl. Physiol. 31: P. 652 – 670

32. Halberstadt K. Ein Beitrag zur Ultrastruktur und zum Funktionszyklus der Pharynxdruse der Honigbiene (Apis mellifera L.) Cytobiology 2: 1970 P. 341-358.

33. Halberstadt K. Elekrophoretische Untersuchungen zur Sekretionstatigkeit der Hypopharynxdruse der Honigbiene (Apis mellifera L.). Insectes Sociaux 27: 1980 P. 61-77

34. Hanes J., Simuth J. Indentification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (Apis mellifera L.). J. Apic. Res. 31: 1992 P. 22 – 26

35. Kamakura, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. Nature 473: 2011 P. 245 – 250

36. Kimura Y., Kajiyama S., Kanaeda J., Izukawa T. and Yonekura M. N-linked sugar chain of 55-kDa royal jelly glycoprotein. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 1996 P. 2099 – 2102

37. Kramer K. J., Childs C. N., Spiers R. D, and Jacobs R. M. Purification of insulin-like peptides from insect haemolyph and royal jelly. Insect. Biochem. 12: 1982 P. 91 – 98.

38. Kramer K. J., Tager H. S. and Childs C.N. Insulinlike and glucagon-like peptides in insect hemoglymph. Insect Biochem. 10: 1980 – P. 179 – 182

39. Kratky E. Morphologie und Physiologie der Drusem im Kopf und Thorax der Honigbiene. Z. wiss. Zool. 139: 1931 P. 120 – 201

40. Schmitzová J., Klaudiny J., Albert S. et al. A family of major royal jelly proteins of the honeybee Apis mellifera L. Cellular and Molecular Life Sciences. 1998 P/ 102-103

41. Simuth J. Some properties of the main protein honeybee (Apis mellifera L.) royal jelly. Apidologie 32: 2001 P. 69-80

42. Thien F.C.K., Leung R., Baldo B.A., Weiner J. A., Plomley R. and Czarny D. Asthma and anaphylaxis induced by royal jelly. Clin. Exp. Allergy 26: 1996 P. 216 – 222

43. Tonks A., Cooper R. A., Price P. C., Molan P.C., Jones K. P. Stimulation of TNFa-release in monocytes by honey. Cytocine 14: 2001 P. 240 – 242

44. Vittek J. and Janci J. Vcelia materska kasicka, SVPL, Bratislava: 1966 P. 45 – 47

45. Yatsunami K., Echigo T/ Antibacterial action of honey and royal jelly //Honeybee Science, 1985. V. 5, №3. P. 125-130.