

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

"ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет физико-математических Кафедра "Общая биология и
и естественных наук биохимия"

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль Биохимия

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ПЕПТИДОВ
МЕДА»**

Студент Кочеткова Кочеткова Алена Васильевна

Научный руководитель Соловьев Соловьев В.Б.

Нормоконтролёр Кручинина Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 13.06.17 № 14)

Заведующий кафедрой Карпова Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 10.06.17 № 10)

Секретарь ГЭК Кручинина Кручинина А.Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Пептиды и их значение.....	5
1.2 Обмен регуляторных пептидов.....	7
1.3 Методология изучения содержания пептидов в живых объектах...	10
1.4 Химический состав меда.....	14
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	22
2.1 Материалы исследования.....	22
2.2 Методы исследования.....	22
2.2.1 Гель-фильтрация.....	22
2.2.2 Метод ионообменной хроматографии.....	23
2.2.3 Определение белка и пептидов по Лоури и по Бредфорду.....	26
2.2.4 Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	29
3.1 Изучение пептидов меда методом гель-фильтрации и ионообменной хроматографии.....	29
3.2 Изучение пептидов меда методом ультрафильтрации и ВЭЖХ.....	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	43
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	44

ВВЕДЕНИЕ

Мед – уникальный природный дар, который получил широкое признание не только как высококалорийный и максимально сбалансированный по пищевым факторам продукт питания, но и как оздоравливающий фактор применяемый в диетологии, медицине, спорте, косметике [6, 62]. Спектр пищевых продуктов, содержащих мед, а также оздоравливающих препаратов (БАДы) чрезвычайно широк и, по-видимому, в силу повышающего интереса исследователей к физиологически активным регуляторам обмена веществ природного происхождения несомненно будет увеличиваться [20, 21].

Биологическая ценность меда определяется химическим составом его компонентов как растительного, так и животного происхождения, сочетающего в себе не только необходимые вещества для построения органов, систем, организма в целом при развитии, росте подрастающего поколения и поддержания жизнеспособности пчелиной семьи, но и все необходимые вещества, управляющие обменными процессами в организме на всех стадиях существования особей пчел, включая обеспечение защиты от неблагоприятных факторов воздействия. На сегодня в меде идентифицировано свыше 300 компонентов различной химической природы. Многие из них хорошо изучены и по их биологической роли [5].

Остается, однако, много вопросов, касающихся понимания молекулярно-биохимических механизмов, лежащих основе положительного действия меда, роли при этом отдельных компонентов, обуславливающих физиолого-биохимический эффект.

В последние годы в качестве факторов регуляции обмена веществ в организме большая роль отводится веществам пептидной природы [2, 3, 4]. Пептиды обнаруживаются во всех биологических объектах и чрезвычайно разнообразны как по строению, так и по физиолого-биохимическому действию на живые организмы [30]. Они обладают очень высокой

биологической активностью и действуют в чрезвычайно малых концентрациях [30, 63].

Мы предположили, что подобные вещества присутствуют в меде и они ответственны за определенные его физиологические свойства. На сегодня пептиды меда остаются не изученными. В последние несколько лет на кафедре «Общая биология и биохимия» Пензенского государственного университета велись активные исследования по изучению пептидного состава пчелопродуктов, включая пчелиный мёд, а также изучение биологически активных свойств выделенных пептидных фракций.

Цель нашей работы заключается в выделении и изучении химико-физических свойств пептидов мёда двумя подходами – классическим, с применением сочетания методов высаливания, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии и современным, с применением аппаратных методов ультрафильтрации и ВЭЖХ.

В связи с поставленной целью в работе решаются следующие **задачи**:

Изучение и анализ современных литературных данных о методах определения качества и натуральности мёда, его химическом составе, содержании в его составе биологически активных компонентов.

Разработка метода выделения пептидной фракции из мёда.

Изучение физико-химических свойств пептидных фракций мёда методами хроматографии.

Бакалаврская работа изложена на 49 листах, содержит 5 рисунков, и список литературы из 64 источников, 46 на русском и 18 на английском языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Пептиды и их значение

Органические структуры, содержащие от 2 до 61 аминокислотных фрагментов и соединенные между собой амидными связями называются пептидами [3]. К настоящему времени известно 1500 пептидов изучены их свойства и методы синтеза. Благодаря использованию методов синтеза учеными был получен синтетический инсулин и некоторые ферменты. Эмиль Фишер впервые предложил термин «пептиды». В 1953 году ученым В. Дю Виньо был синтезирован первый полипептидный гормон-окситоцин.

Число аминокислот в пептидной молекуле может значительно варьировать. И в соответствии с их числом классифицируют:

Олигопептиды – молекулы которых содержат меньше 10 аминокислотных остатков.

Полипептиды - молекулы, построенные из очень большого числа аминокислотных остатков (обычно до 100, но полипептидами часто называют и крупные белки).

Соединения, которые содержат намного более ста остатков аминокислот обычно называются белками.

Пептиды разделяют на две группы по способу связи аминокислот между собой:

Первые содержат только пептидные связи, а у вторых вместе с пептидным связыванием могут встречаться эфирные, дисульфидные или тиоэфирные связи.

По составу молекулы различают:

Гомомерные (простые) пептиды – молекулы, которые построены только из остатков аминокислот;

Гетеромерные (сложные) пептиды – вещества, в составе которых

присутствуют небелковые компоненты.

Цепь повторяющихся групп атомов является остовом пептидной молекулы: $(-NH-CH-OC-)$. N-концевой остаток аминокислоты имеет несвязанную α -аминогруппу, у C-концевого остатка аминокислоты несвязанной является α -карбоксильный фрагмент. Пептиды различаются не только по аминокислотному составу, но и по количеству, а также по порядку соединения остатков аминокислот в молекулу полипептида [41].

Для биохимических процессов процессов во всех живых организмах постоянно синтезируются пептиды. Набор свойств таких веществ напрямую зависят от того, какова их первичная (изначальная) структура или последовательность набора аминокислот, а также от того, какое строение имеют молекулы, и какова их конфигурация в пространстве (вторичная структура).

Огромную роль играют пептиды животных и растительных ядов и пептидные антибиотики из микроорганизмов. В настоящее время интерес вызывают биологически активные пептиды, воздействующие на центральную нервную систему. Большое внимание уделяется нейропептидам, в особенности нейромедиаторам, модуляторам нервной активности, эндогенным пептидам наркотического действия. Влияние нейропептидов на центральную нервную систему различно. Существуют пептиды, которые контролируют физиологически сон, другие действуют как обезболивающие препараты. В процессах переработки информации важную роль играют нейрогипофизарные гормоны. Современная медицина нашла способ решения проблемы нехватки пептидов при помощи искусственно синтезированных в лаборатории коротких пептидов. Многие пептиды относятся к группе лекарственных веществ [23].

1.2 Обмен регуляторных пептидов

Регуляторные пептиды влияют на деятельность центральной нервной системы и синтезируются во всех органах и тканях организма. Многие регуляторные пептиды вырабатываются как клетками периферических тканей, так и нейронами. В настоящий момент времени описано и известно около сорока семейств регуляторных пептидов.

РП не относят именно к гормонам. Часть регуляторных пептидов является медиаторами или колокализуется в синаптических окончаниях с классическими медиаторами непептидной природы, выбрасываясь в щель как совместно, так и раздельно. Другие являются модуляторами так как воздействуют на определенные группы клеток, расположенные вблизи от места секреции. Третьи — это классические гормоны, регулирующие функции различных систем организма. Примерами являются либерины и статины (регуляция выхода гормонов гипофиза), вазопрессин, окситоцин, адренокортикотропный гормон (АКТГ) [10].

Важной чертой системы регуляторных пептидов является наличие плеiotропии — способности влиять на целый ряд физиологических функций. Пример - окситоцин стимулирует функцию молочных желез, стимулирует сокращение гладкой мускулатуры матки, замедляет выработку условных реакций. Тиреолиберин активирует эмоциональное поведение и уровень бодрствования, вызывает выброс гормонов щитовидной железы. Обнаружено, что ряд РП просматриваются как факторы, регулирующие цикл сон — бодрствование, одни пептиды способствуют засыпанию и увеличивают продолжительность сна, а другие, напротив, поддерживают мозг в активном состоянии. Регуляторные пептиды принимают участие на неблагоприятные воздействия в реакции организма. При стрессе защитным действием обладают эндогенные пептидные опиоиды, к ним относятся пептиды: энкефалины, динарфины, эндорфины. Структура пептид- пептидных опиоидов: взаимодействие с

опиоидными рецепторами различных классов и с рецепторами нейронов. Такие пептиды способствуют созданию положительных эмоций. Связываясь с опиатными рецепторами, опиоидные пептиды вызывают снижение болевых ощущений, что считается важным при воздействии на организм неблагоприятных факторов. Существуют примеры регуляторных пептидов, которые представляют собой медиаторы проведения информации от болевых рецепторов в мозг. Повышенная выработка таких пептидов в организме или их введение в организм извне приводит к усилению болевых ощущений [13].

В организме нейропептиды синтезируются в виде высокомолекулярных предшественников(препропептидов). В состав препропептидов входят аминокислотная последовательность как одного, так и нескольких нейропептидов. Известны белки, содержащие в своей структуре последовательности нейропептидов: препроэнкефалин А, предшественник гонадотропин-рилизинг-фактора, продинорфин (препроэнкефалин В) и проопиомеланокортин [2, 25]. В частности, в состав предшественника гонадотропин-рилизинг-фактора входит ГнРФ и гонадолиберин-ассоциированный пептид.

Препропептиды содержат на N конце сигнальную последовательность из 15–20 остатков гидрофобных аминокислот. Нейропептиды, которые входят в состав предшественника ограничены с С- и N концов парами остатков основных аминокислот – аргинина и лизина [2, 4, 49, 50, 52, 53, 57].

Сигнальная последовательность приходится на взаимодействия с рецепторами эндоплазматического ретикулума и переноса предшественника нейропептида в просвет ретикулума. Под действием сигнальной пептидазы в цистернах эндоплазматического ретикулума осуществляется отщепление сигнальной последовательности, а также N-гликозилирование и формирование для полипептида третичной структуры, которая затрудняет обратный выход белка в цитоплазму.

Посттрансляционная модификация, которая включает гликозилирование, амидирование, ацетилирование или сульфирование, предупреждает образование нетипичных пептидов и нарушение процессинга [2, 9].

Синтез предшественника происходит в рибосомах гранулярного эндоплазматического ретикулума. Как сказано выше, препропептиды не обладают функциональной активностью. Чтобы получить активные формы, полипептиды претерпевают посттрансляционный процессинг, одним из механизмов которого является ограниченный протеолиз [4, 7, 8, 9].

Активные пептиды, которые происходят из одного предшественника, образуют его семейство.

1. Семейство проопиомеланокортина (ПОМК).

Тела нейронов, в которых находится этот крупный белок, локализируются в аркуатном ядре гипоталамуса. В отношении от набора ферментов из ПОМК образуются: в передней доле гипофиза – преимущественно адренотропный гормон, Р-эндорфин, Р-липотропин, в промежуточной – β -эндорфин, α -меланостимулирующий гормон.

2. Семейство церулеина: гастрин, холецистокинин.

3. Семейство вазоактивного интестинального пептида (ВИП): секретин, глюкагон. ВИП содержится в высоких концентрациях в коре головного мозга. Характеризуется способностью снижать тонус гладкой мускулатуры сосудов, мозга и бронхов.

4. Семейство аргинил-вазопрессина: вазопрессин, окситоцин.

При транспортировке молекул предшественников пептидов по цистернам зернистого эндоплазматического ретикулума, комплексу Гольджи и в секреторных пузырьках осуществляется процессинг физиологически активных пептидов [56]. Секреторные пузырьки содержат полный набор протеаз и прочих ферментов (как правило трансфераз), необходимых для процессинга, а также специальные системы поддержания

pH внутри везикул [11].

В основе процессинга регуляторных пептидов внутри секреторных пузырьков лежат экзо- и эндопротеолитические реакции. Внутримолекулярный протеолиз реализуется при действии трипсиноподобных ферментов (проопиомеланокортин-превращающего фермента [58, 59], продинорфин-превращающего фермента [51, 55], тиоловой прогормонконвертазы [47, 48], эндопептидаз семейства фурина, PC1, PC2, PC3 и PC4 [60]. В результате осуществляется расщепление предшественников пептидов по дуплексам остатков положительно заряженных аминокислот [11, 63].

Конечный продукт, который образуется в результате работы эндопептидаз, в последствии подвергается экзопротеолизу с участием аминопептидазо-В- и/или карбоксипептидазо-В-подобных пептидгидролаз. В итоге происходит удаление «лишних» N- и / или C-концевых остатков основных аминокислот.

Различные нейропептиды формируются в различных тканях из одного белкового предшественника [2,25]. Например, из проопиомеланокортина в аденогипофизе образуются преимущественно АКТГ, β -эндорфин и β -липотропин. Они проходят дальнейшее расщепление с образованием α -меланоцитстимулирующего гормона и фрагментов β -эндорфина в промежуточной доле гипофиза [2].

Как увеличение, так и уменьшение выброса регуляторных пептидов может лежать в основе целого ряда патологических состояний, в том числе связанных с нарушениями функций мозга. Например, тиреолиберин — антидепрессант, но в больших количествах он может привести к возникновению маниакальных состояний. Мелатонин как фактор, способствующий возникновению депрессии [15, 34].

1.3 Методология изучения содержания пептидов в живых объектах

Количественное содержание суммарного белка в исследуемых образцах растительного сырья, определяют методом Кьельдаля.

На начальном этапе анализа проводят экстракции катионных пептидных молекул из биологического материала различными минеральными и органическими кислотами, 60 % водным ацетоном, буферами с различной ионной силой или сульфатом аммония разной степени насыщения.

Как следует из результатов большинства исследований, аминокислотный состав пептидных экстрактов представлен всеми незаменимыми аминокислотами, в различном количественном соотношении и отличается сбалансированностью по заменимым аминокислотам. Количественное определение пептидов в анализируемых образцах сырья проводят спектрофотометрическим методом (метод Каар-Каля).

Таблица 1

Содержание белка в тканях и органах [29, 30].

Органы и ткани	Содержание белков, % (от массы сухой ткани)	Содержание белков, %(от общего белка тела)
Мозг и нервная ткань	45	2,0
Кости (твердые ткани)	20	18,7
Зубы (твердые ткани)	18	0,1
Жировая ткань	14	6,4
Кожа	63	11,5
Поперечнополосатые мышцы	80	34,7

Печень	57	3,6
Сердце	60	0,7
Легкие	82	3,7
Селезенка	84	0,2
Почки	72	0,5
Остальные жидкие ткани	85	1,4
Остальные плотные ткани	54	14,6

«Таблица 1(окончание)»

Как правило, далее диализованные экстракты пептидных комплексов исследуют методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) для определения гомогенности и молекулярных масс пептидов. Полученные активные пептидные фракции после диализа лиофильно высушивают и используют для дальнейшего анализа методом гель-электрофореза в ПААГ и ВЭЖХ.

Полученные фракции далее, как правило исследуют методами гель-электрофореза и ВЭЖХ

Молекулярно-массовое распределение пептидных композиций определяют методом гельпроникающей хроматографии [16]. Содержание свободных аминокислот определяют методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией, а общее содержание аминокислот – тем же методом после предварительного гидролиза пептидных композиций 6М соляной кислотой при 110°C в течение 23 ч. Общее содержание триптофана определяют спектрофотометрическим методом согласно [54].

Анализ пептидного спектра

Анализ пептидного спектра в настоящее время чаще всего проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией ионно-циклотронного резонанса. Пептидные композиции фракционируют на колонке. Полученные фракции разделяют на субфракции на капиллярной колонке. Масс-спектрометрический анализ полученных субфракций проводят на масс-спектрометре [30].

Хроматографический анализ пептидных экстрактов

ВЭЖХ в обращенной фазе проводят на хроматографе. Пептидный экстракт эпифиза (1 мг) растворяли в 10 мкл 0.1% ТБА и наносят на колонку, уравновешенную 0.1 % TFA (буфер 1). Пептиды элюируют линейным градиентом буфера 2 (60% CH₃CN в буфере 1) от 0 до 80%. Детекция при 226 нм [44].

Ионообменную ВЭЖХ проводят на аминокислотном анализаторе.

Препарат пептидов, полученный способом А или Б растворяют в 20-60 мкл буфера, содержащего в 1 л 0.82 г ацетата натрия, 75.0 мл метанола, 0.5 мл ледяной уксусной кислоты, 10 0 мкл каприловой кислоты и 10 % муравьиной кислоты, так чтобы концентрация пептидов составляла 1 0 - 1 0 0 мг/мл, и наносят на колонку 1 x 125 мм со смолой ВТ-2410, уравновешенную буфером А. Пептиды элюируют последовательно буфером А (30.5 мин при 40°C), Б (7.5 мин при 60°C), В (12 мин при 60°C) и Г (27 мин при 60°C). Для визуализации используют раствор нингидрина, содержащий 20 г нингидрина, 0.6 г гидриндантина, 50 мл фенола, 550 мл монометилового эфира этиленгликоля и 400 мл 4 М ацетата натрия (рН 5.5). Детекцию проводят при 440 и 570 нм [14].

В работе используют нуклеопротеиновый комплекс – тимусамин, полученный из тимуса телят по запатентованному методу [27]. Концентрацию низкомолекулярных пептидов и аминокислот оценивают с помощью нингидринового реактива по Муру и Штейну с калибровкой по лейцину; оптическую плотность измеряют при длине волны 570 нм. Для селективной сорбции пептидов используют сильнокислотный катионит в водородной форме. Десорбцию пептидных компонентов проводят 0,5М раствором аммиака. Для оценки молекулярных масс разделяемых компонентов использовали метод гель-хроматографии на сефадексах G-25 и G-50. Для сравнения компонентного состава пептидного препарата из тимусамина и тималина используют метод высоко эффективной тонкослойной хроматографии на пластинках, подвижная фаза:

изопропанол/этилацетат/аммиак/вода [39]. Биологическую активность полученного препарата пептидов, выделенных из нуклеопротеинового комплекса, оценивают по реакции торможения миграции лейкоцитов. В качестве стандартных препаратов применяют тималин, конканавалин А и фитогемагглютинин пшеницы. Концентрации белка в растворах перечисленных препаратов определяют по методу Лоури [28].

1.4 Химический состав меда

Мед – продукт переработки нектара медоносными пчелами. С давних пор служит лекарством и пищей для человека. Это ароматная различным образом окрашенная (с окраской – от желтых до бурых тонов) сиропообразная или закристаллизовавшаяся масса. Натуральный мед представляет собой сильное биологически активное средство, которое способно помочь в борьбе со многими болезнями. Различают несколько типов натурального меда: падевый и цветочный [33]. В качестве лекарственного средства мед применяется очень широко. Пчелиный мед обладает противомикробными свойствами, усиливает обмен веществ, благоприятно влияет на сердечно-сосудистую и нервную системы, оказывает тонизирующее и противовоспалительное действие [62]. Как биологически активный продукт питания мед традиционно применяют с горячим питьем как средство от простудных заболеваний и симптомов, их сопровождающих, как жаропонижающее, потогонное, восстанавливающее силы средство. Биологически активные свойства меда характеризуются наличием в нем свободной глюкозы, которая благодаря высокой питательности повышает защитную функцию печени, увеличивает сопротивляемость организма различным инфекциям. Если в меде обнаружены какие-то примеси его лечебные свойства снижаются. Мед является незаменимым продуктом для здоровья человека, т.к. содержит от 100 до 455 различных жизненно необходимых веществ и соединений [6].

Минеральные вещества, входящие в состав мёда разнообразны. К ним относятся: кобальт, медь, калий, цинк, марганец, железо, а также йод, натрий, магний, хлор, кальций, фосфор иногда присутствует радий [43].

Немало важно, что количество многих минеральных веществ в меде схожее как в крови человека. Сходство минерального состава цельной крови и пчелиного мёда обуславливает быстрое усваивание меда, его пищевые, лечебные и диетические свойства. За счет присутствия минеральных компонентов мёд является хорошим питательным продуктом с потенциальной щелочностью. Тёмные сорта, обогащенные минеральными веществами, обладают большей потенциальной щелочностью. Этим в значительной степени объясняется положительное воздействие меда, оказываемое на желудочно-кишечный тракт. Соединения способствуют поддержанию оптимального осмотического давления в клетках в процессе обмена веществ (натрий, калий), образованию специфических пищеварительных соков (хлор), построению опорных тканей скелета (кальций, фосфор, магний).

Мед содержит и микроэлементы: марганец, кремний, алюминий, бор, хром, медь, литий, никель. Они играют важную роль в обеспечении деятельности жизненно важных органов и систем, в нормальном протекании обмена веществ [45].

Состав и количество минеральных веществ в меде зависят от их содержания в нектаре или от ботанического происхождения меда. Считается, что чем темнее мед, тем более насыщен его минеральный состав. Например, у медов светлоокрашенных (с белой акации, донника, малины) зольность ниже по сравнению с темноокрашенными видами меда (с вереска, гречихи). Среди медов светлой окраски сравнительно высокая зольность присутствует в липовом меде (0,36%). Высоким содержанием зольных веществ характеризуется падевый мед (до 1,6 %).

Минеральные соединения уменьшают кислотность меда, что изменяет его вкусовые свойства [42].

Красящие вещества представлены каротином, хлорофиллом, ксантофиллом. Они придают меду различные оттенки цвета: от золотисто-янтарного до коричневого или темного. Осенний мед темнее, весенний обычно светлее. Влияют на цвет меда также меланоидины, которые накапливаются при нагревании и длительном хранении меда, придающие ему тёмно-коричневую окраску. Самыми светлыми сортами считаются кипрейный, акациевый и хлопчатниковый, которые при затвердевании становятся белыми [20].

Комплекс ароматических веществ у разных сортов меда различен, поэтому и аромат у них неодинаковый, специфичный. Эти вещества попадают в нектар, так как вырабатываются клетками желез, находящихся в цветках рядом с нектарниками цветов. Формирование специфического аромата меда происходит в результате ферментативных превращений сахаров, аминокислот, витаминов и других веществ во время его созревания. В настоящее время в мёде определено около 200 ароматических веществ. Эти соединения представлены: альдегидами, кетонами, спиртами, кислотами и эфирами спиртов с органическими кислотами. Ароматические вещества мёда придают ему приятный аромат, который зависит от вида медоноса. Спустя некоторое время, при нагревании меда или при хранении его в помещении с высокой температурой, ароматические вещества испаряются, при этом аромат меда слабеет или заменяется неприятным запахом (перебродившего меда) [35].

Мёд содержит 13—22 % воды. Влажность мёда зависит от его зрелости, условий хранения, времени сбора нектара, климатических и географических условий в сезон медосбора, соотношения сахаров и вида тары. В мёде с повышенной влажностью создаются благоприятные условия для брожения, что влечет порчу мёда. Поэтому влажность мёда — один из главных показателей его качества [40].

Мед включает ряд органических кислот: яблочную, винную, лимонную, молочную, щавелевую. Они находятся связанными в виде

солей. Определяют неоощуаемую на вкус кислотность меда, препятствует развитию микроорганизмов в нем. Совместно с находящимися в меде ароматическими веществами, оказывающими благоприятное влияние на самочувствие человека, эти кислоты придают меду оригинальный букет, чем повышается аппетит и стимулируют секретную деятельность пищеварительных желез, способствуют пищеварению и усвоению пищи. При грубом нагревании меда часть фруктозы распадается и при этом образуется муравьиная и леулиновая кислоты, которые увеличивают его кислотность. Муравьиная кислота не содержится в меде, а встречается в нем тогда, когда он уже начинает портиться. Кислотность меда равна 3,78 меняется в зависимости от сорта меда, качества и продолжительности его сохранения. Совместно с другими качествами указывает на фальсификацию или на натуральность меда [12].

1.4.1 Белковые вещества мёда

Основную часть белковых соединений в составе меда составляют ферменты: каталаза, инвертаза, глюкозооксидаза, кислая фосфатаза, гликогеназа, диастаза и пероксидаза. Это те органические вещества, которые даже в малых количествах значительно ускоряют реакции обмена веществ, протекающие в человеческом организме. В составе меда выявлено более 15 ферментов.

Инвертаза расщепляет сахарозу на моносахариды - глюкозу и фруктозу. В небольшом количестве поступает с нектаром, но в основном образуется слюнными железами пчёл.

Диастаза (амилаза) катализирует расщепление крахмала до дисахарида мальтозы. Содержание диастазы в меде зависит от его ботанического происхождения, интенсивности медосбора, степени зрелости откачиваемого меда, способов товарной переработки, сроков его хранения. Количество диастазы в меде является важным показателем качества меда и оценивается диастазным числом. Диастазное число равно

количеству миллилитров 1% раствора крахмала, разлагаемого за 1 час диастазой. Оно измеряется в единицах Готе. Шалфейный и белоакациевый характеризуются низкой диастазной активностью (от 0 до 10 ед. Готе). При нагревании меда свыше 60-80° С диастазное число снижается или полностью утрачивается. Количество диастазы может значительно повышаться при порче меда в результате деятельности дрожжей.

Каталаза – является важным ферментом, присутствует во всех живых клетках организма животных и разделяет возникающий в процессе обмена веществ клеточный яд – перекись водорода на воду и кислород; высвобожденный кислород принимает участие и в антибактериальном действии меда; хотя это действие у сортов меда, содержащих малое количество каталазы или совсем ее не содержащих, выражено еще ярче, т.е. может быть обусловлено не только действием кислорода. Высокая активность фермента каталазы характерна для падевого мёда [42].

Фосфатазы– расщепляют соединения фосфорной кислоты и играют важную роль в обмене веществ человека и в формировании костей; в организме они находятся в основном в сыворотке крови, костях, слизистой оболочке кишечника, почках и предстательной железе; есть кислотные и щелочные фосфатазы, которые могут быть активными только в кислотной или в щелочной среде; как и инвертаза, они относятся к гидролазам. Фосфотаза содержится почти во всех органах и тканях человека, особенно в клетках крови, предстательной железе, печени, почках, слизистой оболочке кишечника, костях [21].

Глюкозооксидаза – катализирует превращение глюкозы через глюконолактон в глюконовую кислоту, и при этом выделяется небольшое количество перекиси водорода. Такой процесс происходит только при контакте с кислородом, т.е. на поверхности меда. В результате формируется дезинфицирующая пленка на меде. Глюзооксидаза чувствительна к воздействию света, поэтому необходимо держать мёд в

темноте [46].

Содержащиеся в меде азотистые соединения, представлены белковыми и небелковыми компонентами. Они попадают в мед из растений вместе с нектаром, пыльцой, а также из организма пчел.

В мёде выявлено 27 аминокислот, в том числе все незаменимые. К ним относят фенилаланин, лизин, тирозин, глицин, аланин, пролин, тирозин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты). Они поступают прямо в кровь и расходуются при построении тканей тела. При неправильном и продолжительном хранении меда их количество уменьшается. Секреты желез пчел и нектар являются источниками аминокислот. Они сильно влияют на лечебные свойства мёда. Благодаря способности соединяться с сахарами меда аминокислоты образуют темнокрашенные соединения, называемые меланоидами. При высокой температуре образование меланоидинов происходит гораздо быстрее. Потемнение мёда при нагревании частично объясняется присутствием в нем аминокислот и родственных им соединений.

К азотсодержащим веществам относятся алкалоиды. Отмечаются в различных частях растений, а также в нектаре цветков, например, табака. Возможно, некоторые лечебные свойства мёда обусловлены наличием в нём алкалоидов [40].

Физиологически наиболее значимые углеводы мёда представлены моносахаридами: глюкозой и фруктозой. Кроме того, в мёде обнаружено 25 различных олигосахаридов. Среди олигосахаридов имеются как дисахариды (трегалоза, сахароза, тураноза и мальтоза), а также некоторые так называемые нутриенты, такие как паноза, 1- и 6-кетоза, палатиноза. Более высоким содержанием олигосахаридов отличается падевый мед с характерными для него мелицитозой и раффинозой.

- сахарозы: до 4%;
- мальтозы: до 6%;
- восстанавливающих дисахаридов: до 15%;

- фруктозы: до 50%;
- глюкозы: до 45%;
- высших олигос: до 12%;
- мелицитозы: до 3%;
- раффинозы: до 3%.

В падевых сортах обычно присутствует примерно 5% трегалозы, которая характерна исключительно для них.

Например, в акациевом меду глюкозы содержится 35,98%, фруктозы – 35%, в гречишном – 35% глюкозы, 40,29% фруктозы. В липовом меду содержится 36,05% глюкозы и 39,27% фруктозы, а в хлопковом – 40,1% глюкозы и 39,40% фруктозы. В меду содержится около 3% сахарозы. В нектаре растений данного дисахарида содержится гораздо больше (20%) [5].

В процессе превращения нектара в мед под влиянием некоторых ферментов происходит расщепление сложного углевода сахарозы в более простые углеводы глюкозы и фруктозы. Фруктоза накапливается в печени в виде гликогена, из которого при необходимости также образуется глюкоза. Гликоген является запасным источником энергии при недостатке глюкозы и запасается в виде гранул в цитоплазме клеток организма. Печень частично трансформирует фруктозу в глюкозу, являющуюся основным источником энергии в общем обмене веществ [36]. В то время как глюкоза легко кристаллизуется, фруктоза едва ли обладает таким свойством. По этой причине в меде можно найти кристаллы глюкозы, окруженные жидким плодовым сахаром.

При засахаривании меда и фруктоза не выкристаллизовывается совсем, а обволакивает кристаллы виноградного сахара. Плодовый сахар гигроскопичен, поэтому засахарившийся мед не удастся получить сухим, не клеящимся. Его температура плавления составляет 95° С. Он первым из сахаров карамелизуется при кипячении меда, поэтому кипяченый мед не пригоден для зимовки пчел.

Смесь виноградного и плодового сахаров называют инвертным сахаром. Выделившаяся при инверсии фруктоза задерживает кристаллизацию глюкозы. Инверсия может произойти не только под влиянием кислот, но и под действием фермента инвертазы, который находится в организме пчелы. В натуральном пчелином меде содержится около 75% инвертного сахара.

Из дисахаров, кроме сахарозы, в пчелином меде содержится еще мальтоза. Цветочный мед содержит мальтозы 5—10% от количества всех сахаров, а в падевом - до 10%. В зрелом меде она практически не сохраняется, это выражается процессом инверсии, который продолжается и после запечатывания ячеек с медом. В процессе созревания меда образуется мальтоза. Ее количество зависит от ботанического происхождения меда.

Например, для липового меда свойственно высокое содержание мальтозы (5-8 %), белоакациевого - среднее (2,5-7,5 %), подсолнечникового - низкое (0,8-2,9%) [18, 24].

Ферменты сохраняют свою активность и процент сахарозы постепенно снижается при хранении мёда не подвергавшегося тепловой обработке. На недоброкачественность мёда указывает повышенный процент сахарозы. Это является причиной того, что мёд получен от пчёл, подкармливаемых сахарным сиропом или фальсифицирован неинвертированным или искусственным инвертированным сахаром. В таком мёде недостаточно ферментов, необходимых для расщепления сахарозы, вследствие чего он содержит много сахарозы, иногда даже больше 25%. Когда у пчёл нарушается способность ферментной переработки из-за большого взятка нектара или пади, процент сахарозы усиливается при большом медосборе [19].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы исследования

Объектом исследования являлся натуральный мёд, собранный на различных пасеках Пензенской области. До исследования мёд хранили по ГОСТу в светонепроницаемых плотных контейнерах. Перед исследованиями готовились водные растворы мёда разных концентраций путем размешивания с последующей фильтрацией для отделения нерастворенных компонентов.

2.1 Методы исследования

2.2.1 Гель-фильтрация

Гель-фильтрация (синоним гель-хроматография) — метод разделения смеси веществ с различными молекулярными массами путем фильтрации через различные так называемые ячеистые гели. Метод широко применяется для определения величин молекулярных масс, обессоливания растворов нативных белков, концентрирования растворов полимеров [37]. Для гель-фильтрации используют предпочтительно хроматографические колонки. Наполнителем служит гранулированный гель, для исследования смеси растворенных в воде соединений используют гидрофильные гели (гели сефадексов — декстранов, биогели), фракционирование гидрофобных полимеров проводят с помощью фильтрации через липофильные гели. Эффективность гель-фильтрации зависит от размера 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. Колонка с гелем,

набухшим в соответствующем растворителе, имеет два вида объемов этого растворителя: внутренний и наружный. Коэффициент распределения (K_r) растворенного вещества между внутренним и внешним объемами определяется из уравнения $K_r = (V_{\text{э}} - V_{\text{н}})/V_{\text{в}}$, где $V_{\text{э}}$ —объем жидкости, вытекающий из колонки с момента нанесения на нее исследуемого раствора до появления фракции с максимальной концентрацией вещества, интересующего экспериментатора; $V_{\text{в}}$ —объем растворителя, находящийся внутри гранул геля, а $V_{\text{н}}$ —объем растворителя вне гранул геля. Если K_r равно 0, то вещество не может проникать внутрь гранул. При $K_r = 1$ вещество распределяется равномерно между внешним и внутренним объемами.

2.2.2 Метод ионообменной хроматографии

Называемый вид хроматографии дает возможность разделять ионы и полярные молекулы, на основании зарядов разделяемых молекул. Ионнообменная хроматография используется для разделения любых заряженных молекул, таких как крупные белки, небольшие нуклеотиды, аминокислоты [26]. В зависимости от вида ионообменной хроматографии руководствуются изоэлектрической точкой белка pI (если она известна), при значении pH выше pI белок приобретает отрицательный заряд, если ниже то положительный. На обратимом кулоновском взаимодействии лежит взаимодействие образца и сорбента.

Разделение веществ с помощью ионообменной хроматографии обычно проводят на колонках, заполненных специальной ионообменной смолой. Выделяют несколько типов ионообменных смол — катионообменники и анионообменники.

Катионообменные смолы включают отрицательно заряженные группы, которые притягивают положительно заряженные молекулы. Эти смолы называют также кислотными ионообменниками, так как отрицательные заряды возникают на них в результате протолиза

кислотных групп. Анионообменные смолы содержат положительно заряженные группы, притягивающие отрицательно заряженные молекулы. Их называют иногда основными ионообменниками, так как положительные заряды возникают, как правило, в результате связывания протонов с фиксированными основными группами. Катионообменные и анионообменные носители можно разделить в зависимости от силы их кислых и основных групп. В качестве полярных групп в катионообменниках выступают либо SO_3H группы (сильнокислые), либо CO_2H группы (слабокислые). Полярными группами в анионообменниках являются третичные или четвертичные аммонийные группы CH_2NR_2 (слабоосновные) или $\text{CH}_2\text{N}^+\text{R}_3$ (сильноосновные).

В качестве сорбентов используют иониты, которые обладают высокой степенью гидрофильности при работе с белками. Белки могут быть разделены как на катионитах, так и на анионитах. Выбор типа ионита определяется изоэлектрическими точками хроматографируемого материала и устойчивостью белка в определенной зоне значения pH .

Эффективная сорбция белков происходит при значениях pH , отстоящих не менее чем на 1 от pI . В области $\text{pH} < \text{pI} - 1$ белки можно хроматографировать на катионитах, а в области $\text{pH} > \text{pI} + 1$ – на анионитах. Изменение pH в направлении к изоэлектрической точке (ИЭТ) способствует десорбции белков. При работе с белками используют буферные растворы с низкой ионной силой, но более чем на 0,3 - 0,5 единиц pH .

Хроматографию на анионитах ведут в таких системах, где диссоциируемым компонентом является катион (буферы: трис, пиридин, имидазол и др.), а для катионитов диссоциируемым компонентом является анион (ацетатный, фосфатный, бикарбонатный и др.).

При ИОХ смесь белков сорбируется в верхней части колонки и затем вытесняется веществами, уменьшающими их сорбцию на ионите. Понижение сорбции осуществляют повышением ионной силы раствора и

(или) изменением его р. Изменение рН и ионной силы элюирующего буферного раствора можно проводить путём создания ступенчатой или градиентной элюции.

Использование ионитов для хроматографического разделения белков предшествует их предварительная обработка. Иониты промышленного изготовления после набухания, во - первых, фракционируют по размеру частиц (однородность частиц сорбентов по размеру – одно из важных условий успешной хроматографии) и, во-вторых, подвергают «циклизации» - переводу их из одной формы в другую. Катиониты переводят из Na^+ - формы в H^+ - форму или наоборот, а аниониты - Cl^- - формы в OH^- - форму или наоборот. В процессе такой обработки стабилизируется структура ионита, функциональные группы становятся более доступными. Одновременно ионит освобождается от примесей.

Навеску порошка сорбента суспендируют в 50-кратном и более объеме, перемешивают и оставляют набухать на ночь. Слой жидкости над ионообменником декантируют, снова заливают дистиллированной водой, перемешивают и через 2 – 2,5 часа верхний слой жидкости декантируют вместе с неосевшими мелкими частицами. К оставшемуся осадку приливают 50 – кратный объем 0,5н. NaOH , тщательно перемешивают и через час ионит фильтруют через воронку Бухнера. Осадок на воронке промывают водой до $\text{pH}=7,0$. Затем ионит перемешивают в 50 – кратном объеме 0,5н. HCl и через 30-60 мин (время обработки ионита кислотой не должно быть большим) отмывают дистиллированной водой примерно до $\text{pH}=5,0$. На следующем этапе в случае анионитов, например, ДЭАЭ – целлюлозы, сорбент повторной обработкой щелочью переводят в OH^- - форму. Для этого его суспендируют в 50-кратном объеме 0,5н. NaOH , перемешивают и через час отмывают дистиллированной водой до рН воды. В случае катионитов, например, КМ – целлюлозы, сорбент повторной обработкой кислотой переводят в H^+ форму. Для этого его суспендируют в 50 – кратном избытке 0,5 н раствора HCl в течение 30-60 мин. После

фильтрации сорбент отмывают дистиллированной водой до тех пор, пока рН промывной жидкости не достигнет рН воды.

Для освобождения от мелких и крупных части ионит суспендируют в цилиндре на 1 л, перемешивают, отстаивают 20-30 мин и верхний слой жидкости с неосевшими мелкими частицами декантируют. Эту операцию повторяют не менее трех раз, пока жидкость над осадком будет свободной от мелкой взвеси. Чтобы освободиться от крупных частиц, ионит суспендируют в воде, перемешивают и через минуту суспензию сливают в другой цилиндр.

Колонку заполняют суспензией ионита в элюирующем буферном растворе. Заполнение колонки можно проводить и суспензией ионита в воде и лишь после уплотнения слоя сорбента уравнивать колонку элюирующим буферным раствором. Над верхним слоем сорбента всегда должен оставаться слой жидкости не менее 2 см [31].

2.2.3 Определение белка и пептидов по Лоури и по Бредфорду

Метод Лоури основан на биуретовой реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении реагента Folin-Ciocalteu комплексом восстановленной меди с амидными связями, а также аминокислотными остатками. На развитие окраски оказывает влияние множество веществ: компоненты буферных систем (трис-буфер в концентрации 0,2 мМ, глицилглицин), восстановители (цистеин, дитиотреитол в концентрации 0,01—0,4 мМ, аскорбиновая кислота), комплексоны (ЭДТА в концентрации 0,5 мМ), детергенты (тритон X-100 в концентрации 0,1—0,2% обуславливает выпадение осадка), серноокислый аммоний в концентрации 0,15%, сахара в концентрации 10% и др [29].

Из каждой фракции отбиралась аликвота объемом 0,5 мл, которой прибавляется 1 мл реактива С в количестве 1 мл. Реактив С представляет собой смесь реактива В (0,5%-й раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-м растворе

тартрата или цитрата натрия) и А (2%-й раствор Na_2CO_3 в 0,1 М NaOH) в соотношении 50:1), пробирка перемешивалась и смесь инкубировалась в течение 10 минут при комнатной температуре. Далее добавлялся реактив Фолина-Чокальтеу в количестве 100 мкл, после чего смесь снова интенсивно перемешивалась и далее инкубировалась при комнатной температуре в течение 40 минут. По полученным значениям оптической плотности была определена концентрация белка в каждой пробе с помощью градуировочного графика, построенного с использованием БСА.

Метод Бредфорда — один из колориметрических методов количественного определения белков в растворе. Метод основан на реакции красителя кумасси (coomassie) с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками. Связанная форма имеет голубую окраску с максимумом поглощения при 595 нм. Таким образом увеличение адсорбции раствора при длине волны, равной 595 нм, пропорционально количеству белка в растворе.

Метод даёт хорошее значение концентрации белка в пределах от 2 мкг/мл до 120 мкг/мл (в этих границах соблюдается линейная зависимость увеличения адсорбции от концентрации, в целом чувствительность метода зависит от соотношения концентраций определяемого белка и красителя: чем больше красителя, тем чувствительней метод).

Приготовление реактива Бредфорд:

100 мг Coomassie Brilliant Blue G-250 растворить в 50 мл 96% этилового спирта и добавить 100 мл 85% ортофосфорной кислоты, довести до 1 л водой и профильтровать через бумажный фильтр.

Приготовить калибровочные растворы БСА 10-500 мкг/мл.

Измерения проводят при 595 нм на КФК-3, используя кюветы с длиной оптического пути 5 мм [37].

2.2.4 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Разделение фракции пептидов с молекулярной массой до 5 кДа, полученной после ультрафильтрации осуществляли на хроматографической системе BIO-RAD.

Для разделения пептидов используют самую распространенную разновидность данного метода - обращенно-фазовую хроматографию (ОФ ВЭЖХ), в которой подвижная фаза является полярной (смеси воды и полярных органических растворителей: метанол, ацетонитрил), а I неподвижная — неполярной (гидрофобные силикагели с привитыми алкильными группами C4, C8, C18 и др.) [64].

Для удерживания этих аминокислот была выбрана добавка трифторуксусная кислота (ТФУ), хорошо растворяющая пептиды и легко удаляющаяся из растворов обычным выпариванием. рН элюента должен находиться в сильно кислой среде (2-3), так как при таких значениях карбоксильные группы кислых аминокислот практически не диссоциируют.

В качестве неподвижной фазы для разделения низко- и среднемолекулярных пептидов преимущественно используют обращенные фазы с углеродными цепями C8(н-октил)-C18(н-октадецил), Они не изменяют свой объем в органических растворителях, и обладают высокой прочностью. Также для этих целей рекомендуют использовать сорбенты с диаметром частиц 5 мкм.

Для анализа пептидов используют обычно УФ-детектор, обладающий высокой чувствительностью и позволяющий детектировать пептиды в области 200-300 нм, в которой поглощаются пептидные связи, остатки ароматических аминокислот, метионина, аргинина [22].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения содержания концентрации пептидов в меде готовили 2 % раствор меда (2 г образца в 100 мл воды). Из приготовленного раствора отобрали аликвоту 1 мл. Добавили к ней 1 мл 10% раствора ТХУ и оставили на 15 минут при комнатной температуре, предварительно перемешав. Затем центрифугировали образцы при 5000 об/мин при комнатной температуре 20 мин. для осаждения крупномолекулярных белков. После центрифугирования отобрали 3 аликвоты по 0,5 мл и провели реакцию Лоури, как указано выше. Концентрацию пептидов определяли по калибровочному графику, построенному по БСА.

Результаты исследования показали, что среднее содержание пептидов в меде составляет 0,4% от сухой массы, что составляет около 50% от содержания белковых веществ. Данные показатели характерны для натурального мёда, и могут использоваться для определения качества и натуральности мёда.

3.1 Изучение пептидов меда методом гель-фильтрации и ионообменной хроматографии

Сефадекс G-25 суспендируют в 5-10 кратном объеме дистиллированной воды и оставляют для набухания на 3 часа. Затем перемешивают до однородной массы, дают отстояться. После оседания основной массы геля осторожно декантируют надосадочную жидкость, с неосевшими обломками гранул. Суспендирование и последующую декантацию повторяют 3-4 раза.

Колонку закрепляют в вертикальном положении, закрывают нижний конец пробкой со вставленным фитингом, помещают в основание колонки

кружок фильтровальной бумаги, размер которого должен точно соответствовать внутреннему размеру колонки. Заливают примерно 2 мл раствора NaCl, дают заполниться фитингу и через воронку по стенке заливают густую суспензию геля. Открывают зажим колонки и дают раствору свободно вытекать, следя за тем, чтобы над гелем оставался слой раствора NaCl. Суспензию геля прибавляют до тех пор, пока его высота в колонке не достигнет нужного уровня, верхняя поверхность геля (стартовая зона) должна быть строго горизонтальной. После на поверхность геля помещают кружок фильтровальной бумаги, не допуская образования воздушных пузырей. Колонку промывают (уравновешивают) 1 объёмом NaCl.

25% раствор мёда (31,25г мёда образец №68 в 100мл 0,9% NaCl при пересчёте на сухую массу) фильтровали через бумажный обеззоленный фильтр «красная лента» ГОСТ 12026-76.

1 мл раствора нанесли на колонку с Сефадексом G-25 с рабочим объёмом 33 мл. Элюирование производили 0,9% NaCl. Собирали фракции объёмом 2 мл, концентрацию белковой и пептидной фракции определяли спектрофотометрическим методом (СФ-2000, 280 нм), методом Брэдфорда (КФК-3, 595 нм), методом Лоури (КФК-3, 750 нм).

Первый пик представлен белками и пептидами, вышедшими в свободном объёме, с молекулярными массами >5000Да, второй пик содержит пептиды с молекулярными массами 300-5000 Да. Мы предположили, что именно в этой фракции содержатся пептиды, обладающие выраженным биологическим действием.

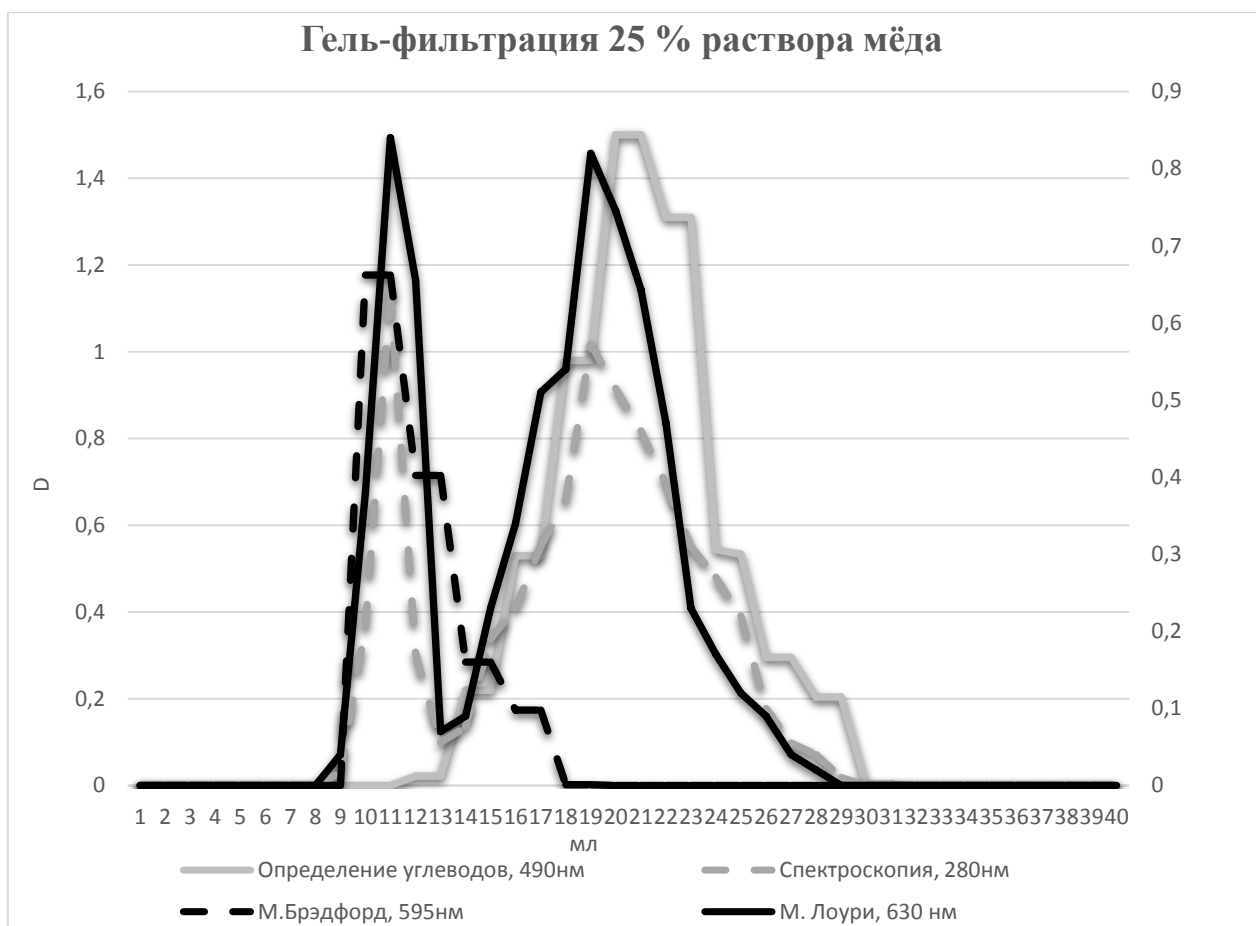


Рис.1 Профиль элюции белков и пептидов 25% раствора мёда.

После осаждения белковой фракции 5% раствором ТХУ снова провели Гель-фильтрацию мёда.

Как видно на графике, метод М.Брэдфорд не подходит для определения концентрации пептидов, так как не дает фиксируемого окрашивания при работе с низкомолекулярными пептидами.

Исследование пептидного спектра методом гель-фильтрации показало, что при использовании в качестве осадителя 5% раствора ТХУ, в осадок выпадают практически все крупномолекулярные белковые вещества.

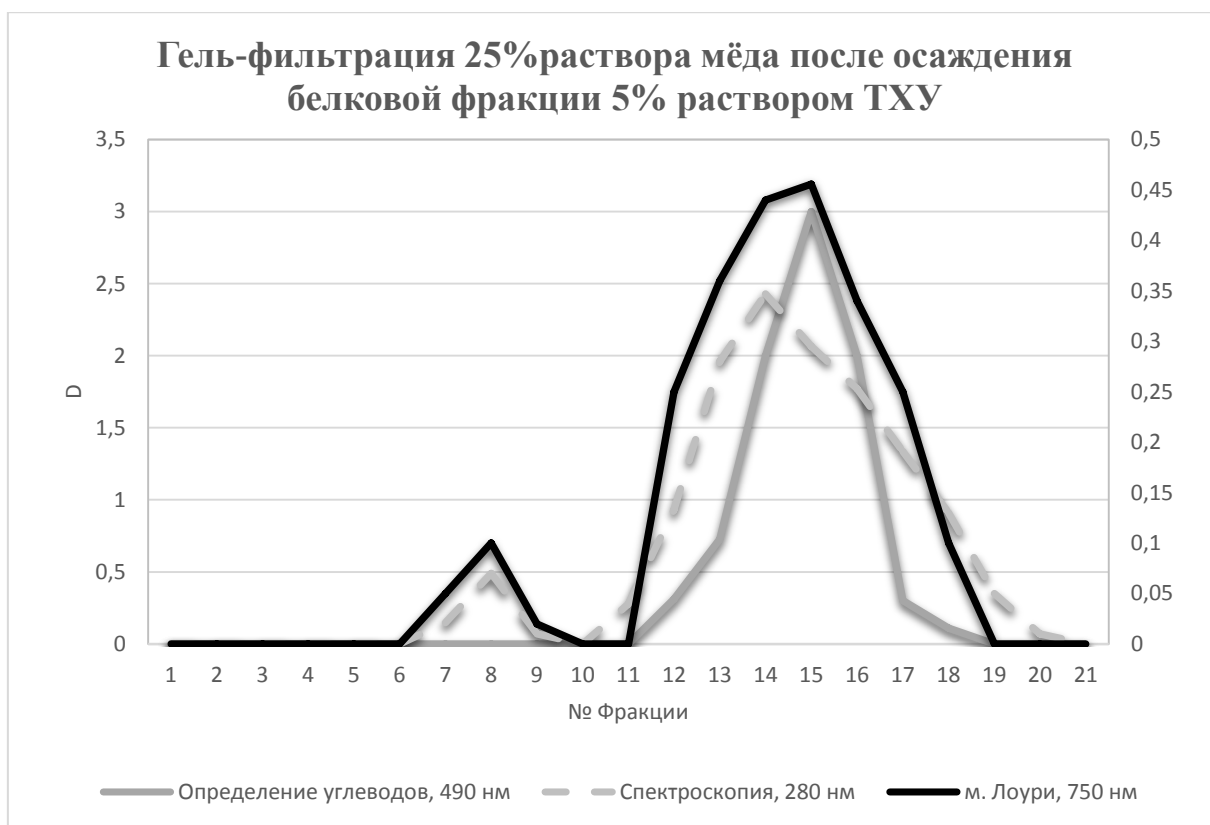


Рис.2 Профиль элюции пептидов 25% раствора мёда.

Однако, при помощи данного метода невозможно избавиться от углеводного пула, т.к. фракция углеводов выходит во время элюции в одно время с пептидной фракцией.

Для устранения углеводного пула из раствора мёда мы использовали метод ионообменной хроматографии на разных типах ионообменников.

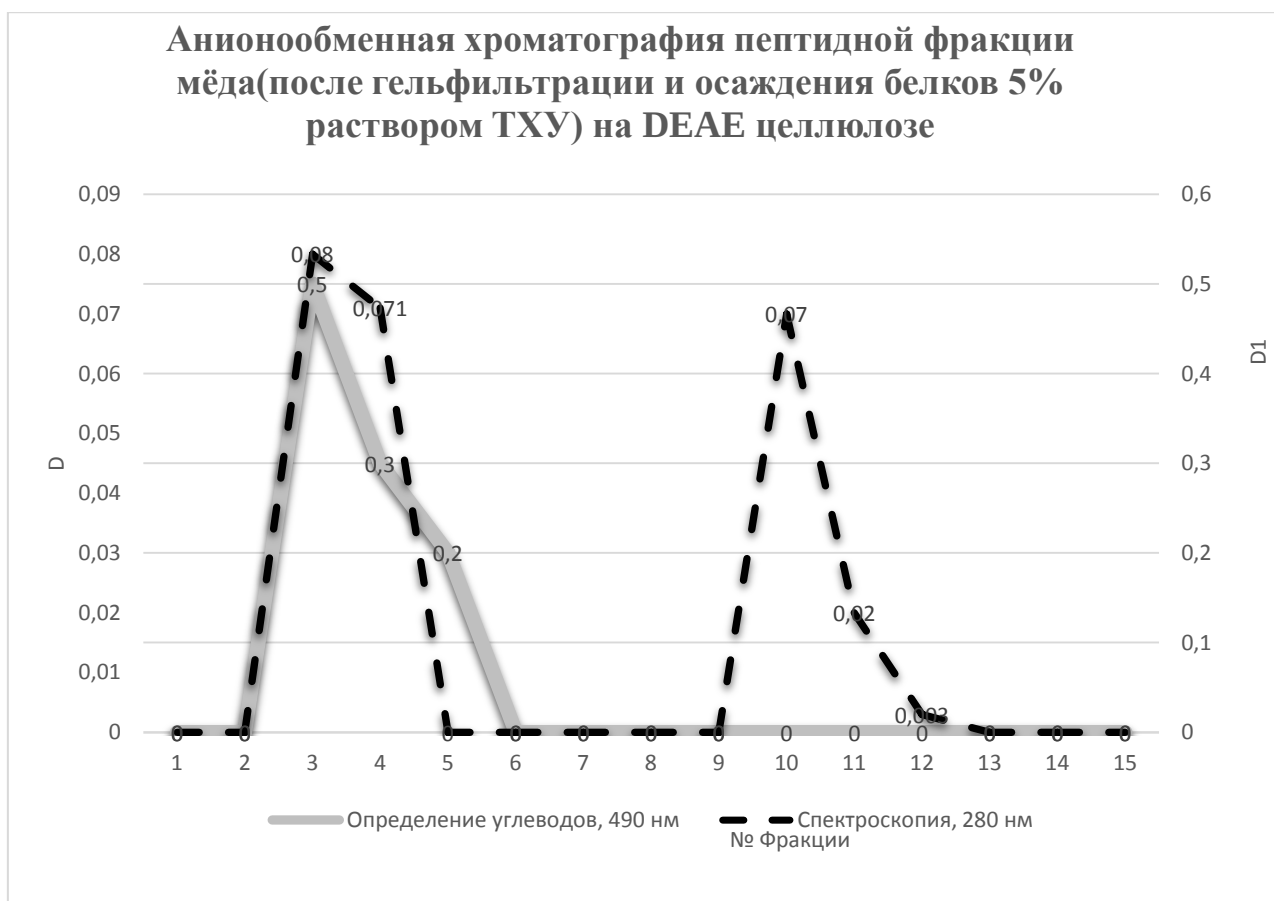


Рис.3 Анионообменная хроматография пептидной фракции мёда.

Первый пик представлен положительно заряженной группой пептидов, которая не сорбировалась на анионообменном носителе, а также углеводами, молекулы которых также не сорбируются на носителе при ионообменной хроматографии. Второй пик представлен отрицательно заряженной группой пептидов, которая сорбировалась на анионообменном носителе, и была отделена от него при изменении pH элюирующего буфера в более кислую область.



Рис.4 Катионообменная хроматография пептидной фракции мёда.

Первый пик представлен отрицательно заряженной группой пептидов, которая не сорбировалась на катионообменном носителе, а также углеводами, молекулы которых также не сорбируются на носителе при ионообменной хроматографии. Второй пик представлен положительно заряженной группой пептидов, которая сорбировалась на катионообменном носителе, и была отделена от него при изменении pH элюирующего буфера в более щелочную область.

Таким образом, используя метод ионообменной хроматографии на разных носителях, нам удалось очистить пептидные фракции от углеводного пула.

Также можно отметить, что согласно результатам опыта, содержание в мёде положительно и отрицательно заряженных групп пептидов примерно одинаково.

Но данный метод выделения пептидной фракции из мёда имеет один

существенный недостаток. Выделенные фракции пептидов имеют настолько малую концентрацию (30-50мкг/мл), что их невозможно использовать далее для определения их биологической активности или более подробного анализа их физико-химических свойств.

3.2 Изучение пептидов меда методом ультрафильтрации и ВЭЖХ

Для анализа пептидных компонентов мёда проведена ВЭЖХ, которая позволила обнаружить большее количество и увеличить спектр изучаемых пептидов (рис. 5).

Фракцию пептидов меда с молекулярной массой до 5кДа, полученную после отделения пептидов на ультрафильтрационной установке Viva Flow подвергли далее анализу на хроматографической системе Bio RAD NGC Quest TM 100 с коллектором фракций BioFrac TM с колонкой Discovery BIO Wide Pore C18 (15см x 4.6 мм, 5мкм) фирмы «Sigma-Aldrich». Исходя из литературных данных, по изучению пептидов методом ОФ ВЭЖХ хроматографирование проводили при следующих условиях:

- элюент в растворе «А» - 0,1М трифторуксусная кислота;
- элюент в растворе «В» - 50% раствор аценитонитрила;
- скорость потока (расход элюента) - 0,25мл/мин;
- температура термостата колонки - 25°C;
- длина волны детектора - 216, 226, 230, 280 нм.

Прибору задавали следующую программу градиента: 0-20 мин. - 7-100% р-ра В, 20-30 мин. - 100% р-ра В, 30-35мин. - 100-7% р-ра В..

Результаты исследований спектра пептидов меда с молекулярной массой до 5 кДа представлены на рис. 5.

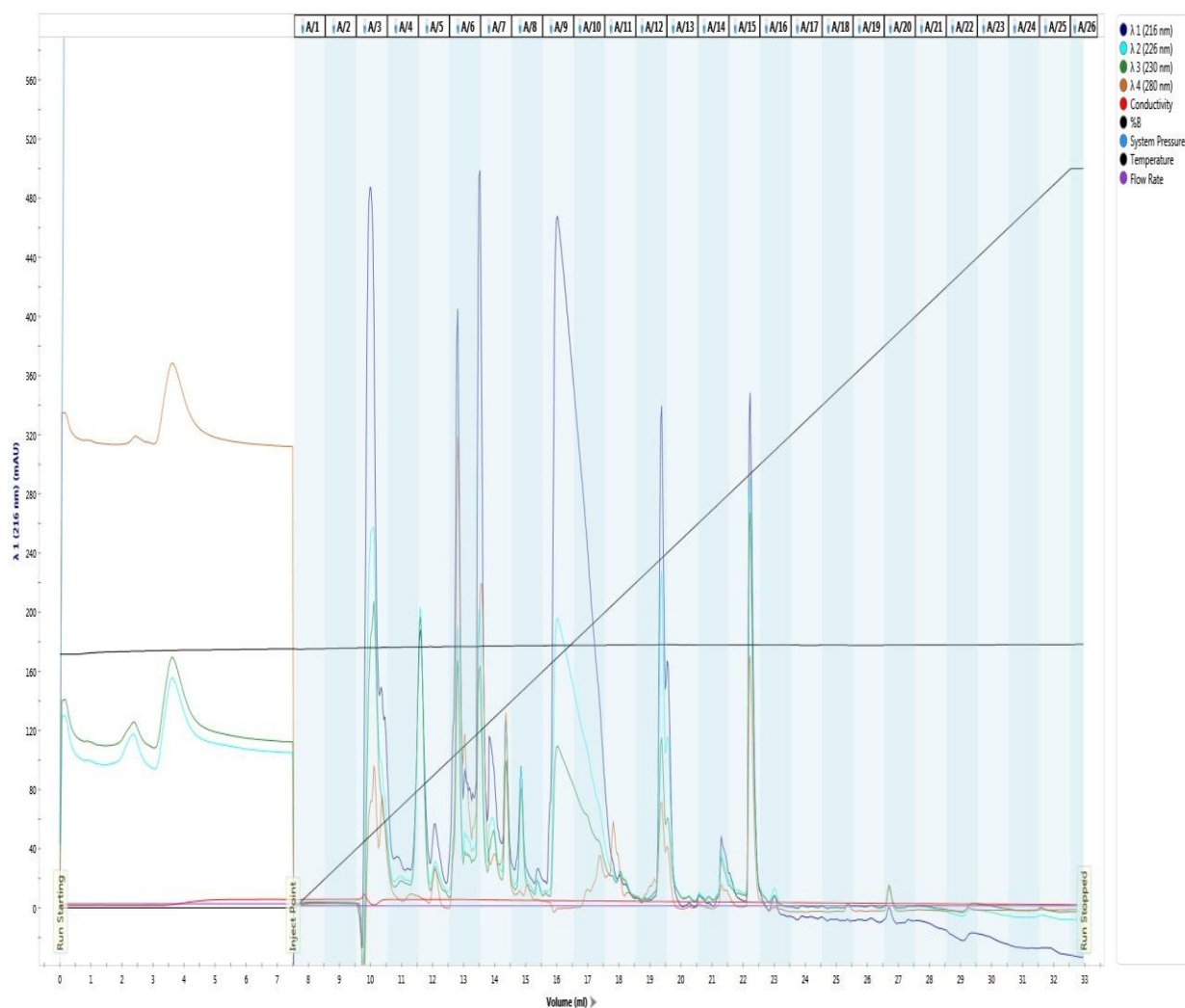


Рис.5 Профиль элюции пептидов мёда 50% ацетонитрилом, ВЭЖХ.

Разделение пептидов зависит от выбора подвижной и неподвижной фазы. В качестве подвижной фазы нами был выбран органический растворитель ацетонитрил, который прозрачен в УФ-области, обладает низкой вязкостью, легколетуч и его легко удалить из собранных фракции элюата. Концентрация ацетонитрила, как правило, не должна превышать 50-60%, кроме того для разделения сложных смесей пептидов, как в нашем случае, рекомендуют проводить хроматографирование в градиентном режиме в связи с разной полярностью пептидов, входящих в состав смеси [1]. В состав подвижной фазы также добавляют модификаторы, позволяющие удерживать положительно заряженные боковые группы аминокислот, входящих в состав пептидов. Это играет важную роль, так

как при $pH < 3$ разделения пептидов аргинин, лизин и гистидин плохо удерживаются.

Видно, что в подобранных нами условиях хроматографирования пептиды меда с молекулярной массой до 5 кДа представлены группой из 10-11 индивидуальных пептидов.

Для анализа на ВЭЖХ использовались фракции, в которых была выявлена концентрация искомых пептидов, слитые в одну. Соответственно, для анионных пептидов это были фракции под номером 13, 14 и 15, а для анализа пептидов после катионообменной фракции под номером 12, 13 и 14. Предварительно подготовленные образцы анализируемых растворов пропускались через хроматограф с целью дополнительно разделить общие группы анионных и нейтральных пептидов. Для каждого чётко выраженного пика на хроматограмме определялись параметры, характеризующие каждое вещество (или группы веществ), на которое этот пик указывает: Время удерживания (время от момента ввода анализируемой пробы до момента максимума хроматографического пика) и относительная площадь пика от суммы площадей всех пиков. Качественной характеристикой вещества является время удерживания, а последний параметр позволяет дать примерную характеристику между концентрациями схожих пиков. Для полноты информации в таблицу были добавлены также и дополнительные параметры, такие как: объём подвижной фазы (объём в миллилитрах, который затрачивается на элюцию вещества от начала его выхода до максимума) и высота пика (в единицах оптической плотности).

Благодаря тому, что известна исходная концентрация пептидов вводимой пробе, а также относительная площадь каждого пика, простейший математический расчёт позволяет узнать абсолютную концентрацию каждого пика:

$$x = (a/100) \cdot RA,$$

где x — искомая абсолютная концентрация, a — исходная концентрация в образце, RA — относительная площадь пика (*Relative Area*).

Все выше обозначенные параметры пиков после хроматографии пептидов, разделённых методом анионной хроматографии, занесены в таблицу №2. В таблицу №3 занесены те же параметры, но характеризующие хроматографическое разделение пептидов после катионообменной хроматографии. На хроматограмме анионных пептидов можно с уверенностью выделить три чётких пика. На хроматограмме разделения катионных пептидов видны три чётких пика №3, 4, 5 и 7, также к ним можно добавить минорный пик под номером 6.

Таблица 2.

Качественные и количественные характеристики анионных пептидов после ВЭЖХ (исходная концентрация 398,3 мкг/мл)

Номер пика	Время удерживания (TR), мин	Объём подвижной фазы (RV), мл	Высота пика, mAU	Относительная площадь пика (RA), %	Абсолютная концентрация, мкг/мл
5	9,94	2,49	1331	33,38	133,42
6	19,68	4,92	148	4,45	17,79
9	32,12	8,03	239	2,83	11,31

Таблица 3.

Качественные и количественные характеристики катионных пептидов после ВЭЖХ (исходная концентрация 57,4 мкг/мл)

Номер	Время удерживания	Объём подвижно	Высота пика,	Относительная площадь пика	Абсолютная концентрация
-------	-------------------	----------------	--------------	----------------------------	-------------------------

пика	ия (TR), мин	й фазы (RV), мл	mAU	(RA), %	ия, мкг/мл
3	9,74	2,43	825	2,57	11,27
5	19,68	4,92	85	7,03	4,05
7	32,12	8,09	338	15,84	9,12
4	12,43	3,11	28	7,93	4,57
6	27,91	6,98	19	2,62	1,51

Попарное сравнение качественных параметров пиков 5, 6, 9 и 3, 5, 7 (анионные и пептиды после катионообменной хроматографии соответственно) показывает, что это одни и те же вещества, только находящиеся в разной концентрации. Вне зависимости от того, что абсолютная исходная концентрация в первом случае практически в семь раз больше, чем во втором, относительная площадь пика даёт возможность сравнить их содержание в образце.

Полученные данные прежде всего представляют интерес для понимания биологической роли пептидов меда в пчелиной семье и их изучение позволит на наш взгляд подойти также к решению проблемы раскрытия молекулярно-биохимических основ при его применении как в питании, так и в качестве лекарственного компонента. Количественная оценка пептидов в меде может также служить тестом в экспертизе меда на его качество и натуральность.

Для оценки возможности применения метода анализа пептидов как методику контроля качества определяли содержание белков и пептидов в 37 образцах различных сортов меда, полученных с пасек Пензенской области.

Содержание белков, пептидов и пептидно-белковый индекс образцов меда.

№ п/п	Медонос	Содержание общего белка, мг/100 г меда	Содержание белка в осадке, мг/100 г меда	Содержание пептидов, мг/100 г меда	Пептидо-белковый индекс, I _{pe/pro} (GMT), %
1	разнотравье	335	110	225	67
2	донник	330	155	175	53
3	разнотравье +подсолнеч ник	265	65	200	75
4	разнотравье	465	205	260	55
5	разнотравье	1115	780	335	30
6	разнотравье	320	65	225	70
7	разнотравье	390	175	215	55
8	разнотравье	400	220	180	45
9	разнотравье +степные злаки	500	170	330	66
10	подсолнечн ик+разнотр авье	570	325	245	43
11	разнотравье	715	490	225	31
12	разнотравье	650	400	250	38
13	разнотравье	665	370	295	44
14	разнотравье	620	320	300	48

15	разнотравье	605	380	225	37
16	смешанный цветочный, неклен, малина	600	350	260	43
17	липа	585	230	355	61
18	смешанный цветочный	595	395	200	34
19	кипрей+син як	620	345	275	44
20	гречиха	1060	680	380	36
21	разнотравье	550	285	265	48
22	кипрей, синяк, пустырник, подсолнух	610	360	250	41
23	липа, донник, гречиха	475	275	200	42
24	малина,син як, липа, кипрей	550	280	270	49
25	гречиха	1170	670	500	42
26	гречиха	710	415	295	46
27	разнотравье	500	225	275	55
28	разнотравье	595	350	245	41
29	разнотравье	615	250	365	59
30	разнотравье	635	285	350	55

31	разнотравье	640	315	325	51
32	разнотравье	585	335	250	43
33	разнотравье	635	385	250	39
34	борец	600	335	265	44
35	разнотравье	565	370	195	34
36	разнотравье	725	440	285	39
37	разнотравье	550	330	220	40

Ipe/pro (GMT) – количественно характеризует присутствие в образцах мёда Лоури+ веществ – в т.ч. пептидов и высокомолекулярных соединений белковой природы, а также их соотношение.

Например, в образце под №1 содержание пептидной фракции, не осаждаемой 5% раствором ТХУ=0,41г в 100г мёда. Следовательно, содержание других веществ белковой природы в данном образце $0,81 - 0,41 = 0,4$ г. Таким образом, индекс Ipe/pro (GMT) записывается для данного образца мёда таким образом: $10,41/0,81 = 51\%$

Таким образом, в разных сортах меда присутствуют как высокомолекулярные белки, так и низкомолекулярные пептиды. Методом гель-фильтрации установлено присутствие фракций белков молекулярной массой до 5000 Да. Исследование большой группы сортов меда показало, что соотношение белков и пептидов в меде составляет примерно 1 (с колебаниями от 0,5 до 1,2). Полученные данные позволяют разработанный метод рекомендовать для оценки качества и натуральности меда, поскольку только натуральный мед содержит пептиды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы было разработано несколько методик анализа пептидных компонентов мёда, включающих в себя определения белка методом Лоури, Бредфорда, гель-фильтрацию и ионообменную хроматографию. Второй подход основан на применении аппаратных методик – ультрафильтрации и ВЭЖХ. Учитывая природные факторы ранее исследованных сортов мёда, можно предположить, что описанные нами виды могут использоваться в качестве фармакологических препаратов.

Таким образом из проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. Показано, что среднее содержание пептидов в мёде составляет 0,4% от сухой массы, что составляет около 50% от общего содержания лоури-положительных компонентов. Данные показатели характерны для натурального мёда, и могут использоваться для определения качества и натуральности мёда.

2. Методами гель-фильтрации и ионообменной хроматографии было установлено, что содержание положительно и отрицательно заряженных групп пептидов мёда примерно одинаково. При этом спектр пептидов достаточно широк – от молекулярной массы 300 до 10000 Да.

3. Методом ВЭЖХ после ультрафильтрации было установлено, что в подобранных нами условиях хроматографирования пептиды меда с молекулярной массой до 5000 Да представлены группой из как минимум 11 индивидуальных пептидов.

4. Наиболее подходящим методом экспресс-анализа качества мёда на основе определения пептидных компонентов является высокоэффективная жидкостная хроматография, которая позволяет не только оценить общее количество пептидов, но и идентифицировать их спектр.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алленмарк, С. Хроматографическое разделение энантиомеров / С. Алленмарк. — М.: Мир, 1991. — 268 с.
2. Ашмарин, И. П. Нейропептиды в симпатической передаче / И. П. Ашмарин, М. А. Каменская // Итоги науки и техники. Сер. "Физиология человека и животных". — 1988. — Т. 34, № 6. — С. 183.
3. Ашмарин, И. П. Нейропептиды / И. П. Ашмарин, Е. П. Каразеева. — М.: Издательство института биомедицинской химии РАМН. — 1996. — 296-333 с.
4. Бабичев, В. Н. Нейропептиды мозга и их нейроэндокринные эффекты / В. Н. Бабичев, С. Ф. Миронов // Пробл. эндокринол. — 1981. — № 3. — С. 78–85.
5. Богданов, С. Пищевые и функциональные свойства меда / С. Богданов // Вопросы питания. — 2010. — Т. 79, № 6. — С. 4 — 13.
6. Борисова, М. Лечение медом / М. Борисова — М.: Издательский дом "Литера", 2005. — 60 с.
7. Вернигора, А. Н. Механизм регуляции активности и биологическая роль карбоксипептидазы Н – фермента процессинга нейропептидов / А. Н. Вернигора, М. Т. Генгин // Биохимия — 1995. — № 12. — С. 1491-1497.
8. Гомазков, О. А. Функциональная биохимия регуляторных пептидов / О. А. Гомазков. — М.: Наука. 1993. — 160 с.
9. Гомазков, О. А. Регуляция биосинтеза энкефалинов: биохимические и физиологические аспекты / О. А. Гомазков, О. О. Григорьянц // Успехи совр. биол. — 1989. — № 1. — С. 109 - 124.
10. Гомазков, О. А. Физиологически активные пептиды / О. А. Гомазков. — М.: Изд-во Инст. Биомед. Химии РАМН, 1995. — 43 с.
11. Гомазков, О. А. Нейротрофическая регуляция и стволовые клетки мозга / О. А. Гомазков — М.: НИИ Биомедицинской химии РАМН, 2004. — 311 с.

12. Гранцон, М. Э. Что мы знаем о меде / М. Э. Гранцон. — Новосибирск: Новосибирск, книж. изд-во, 1991. — 112 с.
13. Дубынин, В. А. Регуляторные системы организма человека / В. А. Дубынин. — М.: Дрофа, 2003. — 368 с.
14. Демушкин, В. П. Способ хроматографического разделения пептидов / В. П. Демушкин, Т. А. Малыгина, В. М. Зотов // Известия ТИНРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра). — 1986. — № 35. — С. 2-4.
15. Ерошенко, Т. М. Каскадные эффекты регуляторных пептидов / Т. М. Ерошенко, С. А. Титов, Л. Л. Лукьянова // Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных. — 1991. — Т. 46. — С. 65-67.
16. Еремеев, Н. Л. Ферментативный гидролиз кератинсодержащего сырья для получения белковых гидролизатов / Н. Л. Еремеев, И. В. Николаев, И. Д. Керученко, Е. В. Степанова // Прикладная биохимия и микробиология. — 2009. — Т. 45, № 6. — С. 717 - 725
17. Жебентяев, А. И. Аналитическая химия. Хроматографические методы анализа / А. И. Жебентяев. Учебное пособие. — Витебск: ВГМУ, 2011. — 220 с.
18. Иойриш, Н. П. 'Пчелы - крылатые фармацевты' / Н. П. Иойриш. — Москва: Наука, 1966. — 204 с.
19. Иойриш, Н. П. Продукты пчеловодства и их использование / Н. П. Иойриш. — М.: Россельхозиздат, 1976. — 100 с.
20. Каблуков, И. А. О меде, воске, пчелином клее и их подмесах / И. А. Каблуков. — Москва: Сельхозгиз, 1941. — 176 с.
21. Кузьмина, К.А. Лечение пчелиным мёдом и ядом / К.А. Кузьмина. — Издательство: Издательство Саратовского университета, 1988. — 96 с.
22. Крылов, В. А. Введение в хроматографические методы анализа / В. А. Крылов, Г. М. Сергеев, Е. В. Елипашева. — Н.: Нижний Новгород, 2010. — 91 с.
23. Лудянский, Э. А. Апитерапия / Э. А. Лудянский. — Вологда, 1994. —

459 с.

24. Младенов, С. Мед и медолечение / С. Младенов. — София: Земиздат, 1969. — 222 с.

25. Марри, Р. Биохимия человека / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. Пер. с англ. / Под ред. Л.М. Гиномана. — М.: Мир, 1993. — 300 с.

26. Мархол, М. Ионобменники в аналитической химии: пер. с англ. / М. Мархол. — М.: Мир, 1985. — 264 с.

27. Морозов, В. Г. Способ получения белковой пищевой добавки / В. Г. Морозов, В. Х. Хавинсон // Клиника Института биорегуляции и геронтологии — 1996. — № 9. — С. 761-762.

28. Меньшиков, В. В Лабораторные методы исследования в клинике / В.В Меньшиков. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.

29. Невмержицкая, Ю. Ю. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты) / Ю. Ю. Невмержицкая, О. А. Тимофеева. — Казань: Казанский университет, 2012. — 33с.

30. Николаев, И. В. Антиоксидантные свойства белковых гидролизатов животного происхождения / И. В. Николаев, Е. В. Степанова, Е. О. Ландесман, О. В. Королева. Мясная индустрия, 2008. — 39 с.

31. Новиков, Д. А. Выделение и очистка продуктов биотехнологии. Методическое пособие к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов / Д. А. Новиков. — Минск.: БГУ, 2014. — 70 с.

31. Ощепкова, Ю. И. Выделение липидпереносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной / Ю. И. Ощепкова // Биоорганическая химия. — 2009. — Т.35, № 3. — С. 344-349.

32. Орловская, Т. В. Исследование биоактивных пептидов из некоторых видов растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Т. В. Орловская — Пятигорск, 2010. — 276-277 с.

33. Полищук, В. П. Пчеловодство / В. П. Полищук, А. Г. Мегедь. — К.:

Выща шк. Головное изд-во, 1990. — 325 с.

34. Покровский, В. М. Физиология человека / В. М. Покровский, Г. Ф. Коротко. — М.: Медицина, 1997. — 368 с.

35. Рут, А. И. Энциклопедия пчеловодства / А. И. Рут. — Художественная литература: Москва, 1993. — 200 с.

36. Северин, Е. С. Биохимия / Е.С. Северин. — Издательство: ГЭОТАР–МЕД 2004. — 779 с.

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

38. Столяров, Б. В. Практическая газовая и жидкостная хроматография / Б. В. Столяров, И. М. Савинов, А. Г. Витенберг, А. А. Карцова. — СПб.: Изд-во С.–Петербург. Ун–та, 1998. — 610 с.

39. Селеменев, В. Ф. Хроматография низкого давления физиологически активных веществ / В. Ф. Селеменев, Д. Л. Котова, Г. Ю. Орос, А. А. Загородний. — М.: Наука, 2003. — 740 с.

40. Темнов, В. А. Технология продуктов пчеловодства / В. А. Темнов. — М.: Колос, 1967. — 192 с.

41. Хельмут, Х. пер с нем. М. Беяева. Лекарства из улья: мёд, пыльца, маточное молочко, пчелиный воск, прополис, пчелиный яд / Хорн Хельмут, Гехард Лейбольд. — М.: АСТРЕЛЬ, 2006. — 238 с.

42. Хисматуллина, Н.З. Апитерапия / Н.З. Хисматуллина. — Пермь: Мобиле, 2005. — 296 с.

43. Харчук, Ю. Мед и продукты пчеловодства / Ю. Харчук. — Издательство: Феникс, 2007 г. — 85 с.

44. Хефтман, Э. Хроматография: практическое приложение метода / Э. Хефтман. — М.: Мир, 1986. — 760 с.

45. Черевко, Ю. А. Значение минеральных элементов меда / Ю. А. Черевко, П. Б. Носовицкий // Пчеловодство — 2000. — № 3. — С. 20-25.

46. Шкендеров, С. Пчелиные продукты (пер. с болгарского) / С. Шкендеров, Ц. Иванов. — София: Земиздат, 1985. — 193 с.

47. Azaryan, A. V. Distinct properties of prohormone thiol protease (Ptp) compared to cathepsin B, cathepsin L, and cathepsin H - evidence for Ptp as a novel cysteine protease / A. V. Azaryan // Arch. Biochem. Biophys. — 1994. — N 1. — P. 171-177.
48. Azaryan, A. V. Unique cleavage specificity of prohormone thiol protease related to proenkephalin processing / A. V. Azaryan // FEBS Lett. — 1994. — N 2-3. — P. 197-202.
49. Birch, N. P. Distribution of carboxypeptidase H messenger RNA in rat brain using in situ hybridization histochemistry: implications for neuropeptide biosynthesis / N. P. Birch, C. Rodriguez, J.E. Dixon, E. Mezey // Brain Res. Mol. Brain Res. — 1990. — N 1. — P. 53-59.
50. Chesselet, M. F. Carboxypeptidase H-like immunoreactivity in the striatum of cats and monkeys / M. F. Chesselet, V. Y. Hook // Regul. Pept. — 1988. — N 2. — P. 151– 159.
51. Devi, L. Tissue distribution of a dynorphin-processing endopeptidase / L. Devi // Endocrinology. — 1993. — N 3. — P. 1139-1144.
52. Fricker, L. D. Activation and membrane binding of carboxypeptidase E / L. D. Fricker // J. Cell. Biochem. — 1988. — N 3. — P. 279-289.
53. Fricker, L. D. Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenal chromaffin granules / L. D. Fricker, T. H. Plummer, S. H. Snyder // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1982. — N 2. — P. 3886-3890.
54. Fletouris, D. J. Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and Capillary Gas Chromatography / D. J. Fletouris // J. Dairy Sci. — 1993. — N 3. — P. 2834-2840.
55. Greco, L. Dynorphin-processing endopeptidase in the rat anterior pituitary lactotrophic cell-line, Gh4C1 / L. Greco, L. Daly, S. Kim, L. Devi // Neuroendocrinology. — 1992. — N 3. — P. 351-356.
56. Gainer, H. The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: the secretory vesicle hypothesis / H. Gainer, J. T. Russell,

- Y. P. Loh // *Neuroendocrinology*. — 1985. — N 1. — P. 171-184.
57. Hook, V. Y. Carboxypeptidase B-like activity for the processing of enkephalin precursors in the membrane component of bovine adrenomedullary chromaffin granules / V. Y. Hook, Y. P. Loh // *Neuropeptides*. — 1984. — N 2. — P. 117-126.
58. Loh, Y. P. Purification and characterization of a paired basic residue-specific pro-opiomelanocortin converting enzyme from bovine pituitary intermediate lobe secretory vesicles / Y. P. Loh, D. C. Parish, R. Tuteja // *J. Biol. Chem.* — 1985. — N 12. — P. 7194-7205.
59. Loh, Y. P. Pro-opiomelanocortin and pro-vasopressin converting enzyme in pituitary secretory vesicles / Y. P. Loh, N. P. Birch, M. G. Castro // *Biochimie*. — 1988. — N 1. — P. 11-16.
60. Seidah, N. G. Proprotein and prohormone convertases of the subtilisin family - recent developments and future perspectives / N. G. Seidah, M. Chretien // *Trends Endocrinol. Met.* — 1992. — N 4. — P. 133-140.
61. Smyth, D. G. Catalysis of slow C terminal processing reactions by carboxypeptidase H / D. G. Smyth, K. Maruthainar, N. J. Darby, L. D. Fricker // *J. Neurochem.* — 1989. — N 2. — P. 489-493.
62. Soni, N. E. Effects of honey in the management of alveolar osteitis: A study / N. E. Soni // *Natl J Maxillofac Surg.* — 2016. — N 7. — P. 136-147.
63. Steiner, D. F. The biosynthesis of biologically active peptides: a perspective / D. F. Steiner // *Peptide Biosynthesis and Processing* (Fricker L.D., ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. — 1991. — N 26. — P. 1-16.
64. Zheng, X. Development and validation of a general derivatization HPLC method for the trace analysis of acyl chlorides in lipophilic drug substances / X. Zheng // *J Pharm Biomed Anal.* — 2017. — N 140. — P. 327-333.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ 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»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
Карпова Г.А. Карпова

« 2 » 11 2016 г.

Задание

По ВКР студента Кочетковой Алены Васильевны

Тема работы «Количественный и качественный анализ пептидов меда»

Утверждена приказом по Университету от « 6 » декабря 2016 г. № 11919/0

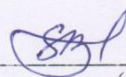
Срок сдачи студентом законченной работы « 26 » мая 2017 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Поиск и исследование литературы по теме дипломной работы	ноябрь 2016-март 2017	Выполнено
2	Написание введения, глав обзора литературы («Пептиды и их значение», «Обмен регуляторных пептидов», «Методология изучения содержания пептидов в живых объектах», «Химический состав меда», «Белковые вещества мёда»)	ноябрь 2016-январь 2017	Выполнено
3	Статистическая обработка результатов исследования, анализ полученных данных	март 2017-апрель 2017	Выполнено
4	Написание главы «Материалы и методы исследования»	февраль 2017-март 2017	Выполнено
5	Написание глав «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение»	апрель 2017-май 2017	Выполнено
6	Подготовка доклада и презентации дипломной работы	май 2017	Выполнено

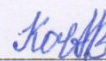
Дата выдачи задания « 2 » 11 2016г.

Руководитель _____



(подпись)

Задание принял к исполнению _____



(подпись)