

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

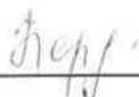
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

«ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДОВ ТРУТНЕВОГО РАСПЛОДА НА
ДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ»

Студент



Бердникова Дарья Тимуровна

Руководитель



Кручинина А.Д.

Нормоконтролер



Клыченков С. В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 14.06.22 № 14)

Заведующий кафедрой



Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой

хорошо

(протокол заседания ГЭК от 23.06.22 № 1)

Секретарь ГЭК



Клыченков С.В.

Пенза, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Физические свойства и способы сохранения трутневого гомогената...	6
1.2 Химический состав трутневого гомогената.....	6
1.3 Применение трутневого гомогената.....	14
1.4 Пептиды, их классификация.....	16
1.5 Дегидрогеназы.....	18
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
2.1 Материал исследования.....	23
2.2 Методы Исследований.....	23
2.2.1. Метод гель-фильтрации.....	23
2.2.2 Определение содержания пептидов методом Лоури	24
2.2.3 Тангенциальное ультрафильтрация.....	25
2.2.4 Культивирование микроорганизмов.....	26
2.2.5 Определение общей дегидрогеназной активности	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	28
3.1 Построение калибровочных кривых по БСА	28
3.2 Получение фракций низкомолекулярных пептидов раствора гомогената трутневого расплода методом гель-фильтрации	28
3.3 Получение чистых культур.....	30
3.4 Определение дегидрогеназной активности микроорганизмов.....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	41
СПИСОК ЛИТЕРАТУРА.....	42

ВВЕДЕНИЕ

Продукты пчеловодства, такие как мед, прополис, маточное молочко, пчелиный хлеб, пыльца, собранная пчелами, пчелиный воск и яд, известны и ценятся людьми на протяжении тысячелетий. В то же время существует большое количество публикаций, посвященных изучению биологической активности продуктов пчеловодства, однако большинство из них сконцентрированы на изучении пчелиного мёда и маточного молочка. Трутневый расплод остаётся слабо изученным с точки зрения причин биологической активности этого продукта пчеловодства.

Трутневый расплод представляет собой личинки, вылупившиеся из неполодотворённых маткой яиц. Гомогенат личинок трутневого расплода широко используется в народной медицине как средство, обладающее ранозаживляющим, адаптогенным, противовоспалительным и иммуномодулирующим эффектами. Гомогенат готовится из личинок трутней различного возраста и может поставляться конечному потребителю в виде различных форм (суспензия, , лиофилизат, адсорбированный на носителе и т. д.)

Благодаря исследованиям, было доказано, что в состав трутневого гомогената входит большое количество пептидов. Известно, что пептиды влияют на многие процессы жизнедеятельности и регулируют деятельность многих систем органов, однако отсутствуют данные о влиянии пептидов трутневого расплода на дегидрогеназную активность микроорганизмов [33].

Дегидрогеназы — это группа ферментов, которые катализируют реакции, связанные с процессами дыхания, гликолиза и брожения. Дегидрогеназы входят в состав всех органов и тканей растений, животных и микроорганизмов. Дегидрогеназы относятся к оксиредуктазам и являются катализаторами при переносе водорода от субстрата, который окисляется (RH_2), на акцепторы (R_1), которые восстанавливаются: $RH_2 + R_1 \rightarrow R + R_1H_2$

Дегидрогеназы играют большую роль в функционировании ферментативных систем организмов. Большую роль играют алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа и др. ферменты, которые участвуют в процессах брожения и гликолиза [7].

Изучение дегидрогеназной активности бактерий и веществ, влияющих на неё, имеет большое практическое значение. Ферменты-дегидрогеназы, такие как, например, ацетальдегид-алкогольдегидрогеназа (adhE), являются ключевым метаболическим ферментом в бактериальной физиологии и патогенности. Они превращают ацетил-КоА в этанол через промежуточное звено ацетальдегида во время ферментации этанола в анаэробной среде. Дополнительно определение дегидрогеназной активности цианобактерий, позволяет определить уровень химического загрязнения среды [19]

Изучение влияния пептидов трутневого расплода на дегидрогеназную активность микроорганизмов позволяет изучить общую биологическую активность данных соединений. Изменение в общей дегидрогеназной активности, которое может наблюдаться у бактериальных культур, подверженных действию пептидов трутневого расплода, свидетельствует о том, что данные пептиды обладают определённой биологической активностью и могут быть использованы для дальнейшего изучения основ проявления таковой, ведь изменение дегидрогеназной активности бактериальной культуры является одним из вариантов ответа клеток на стимулы внешней среды, и наблюдается, например, при стрессовом воздействии на микроорганизмы (загрязнение окружающей среды, воздействие антибиотиков, нефтеродуктов, пестицидов и т. п.)

Цель работы: изучение влияния пептидов трутневого расплода на дегидрогеназную активность микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

Задачи исследования:

1. Фракционировать пептиды трутневого расплода.
2. Подготовить тестовые культуры микроорганизмов.

3. Изучить влияние полученных фракций пептидов трутневого расплода на дегидрогеназную активность тестовых микроорганизмов.

Выпускная квалификационная работа написана на 47 листах, содержит 12 рисунков, 4 таблицы и список цитируемой литературы из 43 источников на русском и английском языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Физические свойства и способы сохранения трутневого гомогената

Гомогенат личинок представляет собой молочную, вязкую субстанцию кремовой консистенции. Его цвет может варьироваться от бледно-серого, белого до желтоватого. Это характеризуется сладким и слегка кисловатым вкусом и характерным запахом, похожим на запах маточного молочка. Он очень чувствителен к действию бактерий, поэтому его следует либо хранить в морозильной камере, либо подвергать лиофилизации. Альтернативным способом сохранения гомогената является его смешивание с медом.

Обычно используется 1,5%-ная концентрация гомогената в меде. Смеси, полученные таким образом, могут храниться при комнатной температуре до 6 месяцев. В коммерческих целях или для продления срока годности гомогената до 2 лет его адсорбируют на высушенной смеси глюкозы и лактозы (1:1) и сушат до достижения влажности 4%. Такой продукт стабилен при температуре 4-8°C. Наиболее стабильные продукты могут быть получены либо в виде лиофилизатов, либо в виде гомогената, адсорбированного на лактозе в соотношении 1:1. Последний используется в производстве различных фармацевтических препаратов.[25]

1.2 Химический состав трутневого гомогената

Химический состав гомогената трутневого расплода аналогичен составу маточного молочка.

Гомогенат трутней характеризуется более высоким содержанием воды, чем маточное молочко, но содержание белка и общее содержание углеводов в нем ниже, чем в маточном молочке. [6, 18]

Содержание основных компонентов и физико-химические характеристики гомогената трутней и маточного молочка (таблице 1) .[11]

Таблица 1. Химический состав трутневого гомогената и маточного молочка

Параметры	Трутневый гомогенат		Маточное молочко	
	Ср. значение	Диапазон	Ср. значение	Диапазон
Вода (%)	70.97±0.72	70.30-72.30	63.39±1.75	61.00-65.20
Белки (%)	9.35±0.63	8.12-10.00	16.73±1.29	14.65-18.33
Фруктоза (%)	0.11±0.11	0.00-0.34	4.88±0.37	4.24-5.35
Глюкоза (%)	6.74±0.65	5.92-7.88	3.46±0.58	2.70-4.15
Сахароза (%)	0.05±0.07	0.00-0.18	1.53±0.55	0.59-2.05
Углеводы (%)	6.92±0.70	6.22-8.22	9.86±0.93	8.47-10.80
pH	6.49±0.14	6.23-6.63	3.95±0.09	3.80-4.02
Общая кислотность, мЛ 0,1 М NaOH/г	0.88±0.15	0.74-1.10	4.07±0.30	3.68-4.42
Электропроводность/мкс/см	161.43±10.67	144.00-178.00	205.14±8.73	194.00-219.00

Содержание белка и жира в гомогенате очень важно для оценки его питательных свойств. Уровень белка в гомогенате личинок пчел составляет 35,3 % сухого вещества/ДМ и выше, чем в свинине (27,2% ДМ).

Было заявлено, что содержание белка увеличивается с развитием насекомого. Куколки форм содержат до 45,9% ДМ, в то время как взрослые пчелы - до 51% ДМ. Исследования состава белка показывают, что белки с

относительно низкой молекулярной массой, представляющие группы глобулина и альбумина, являются преобладающий.

Полученные результаты доказывают, что белковые профили зависят от статуса насекомого и что профили рабочих, трутней и королевы различаются. Белковый профиль личинок маток напоминает белковый состав маточного молочка. Это неудивительно, поскольку личинку королевы на этой стадии развития кормят только маточным молочком.[14]

Практически все незаменимые аминокислоты присутствуют в белках медоносных пчел.

Всесторонние исследования доказало, что общее содержание аминокислот в гомогенате расплода составляет 37,57-40,57%, 35,06-38,42% и 35,61-35,71% для личинок трутней, личинок маток и личинок рабочих, соответственно. Их аминокислотный состав характеризуется высоким содержанием аспарагиновой и глутаминовой кислот, валина, лейцина и лейцина. Во время личиночного развития их содержание увеличивается, достигая пика на стадии куколки. Исследование Лазаряна продемонстрировало анализируемое содержание основных аминокислоты должны составлять 15,45%-16,28% для трутней, 18,92-19,01% для матки и 15,92-16,96 для гомогенатов рабочих личинок. Подробные данные по аминокислотному составу представлены в таблице 2.

Таблица 2. Средний аминокислотный состав трутневого гомогената

Аминокислота	Свободная	Всего
Аспарагиновая кислота	0.04	01.03.67
Треонин	0.84	1.62
Серин	0.21	1.74
Глутаминовая кислота	0.97	6.46

Таблица 2. Продолжение.

Пролин	2.15	3.43
Глицин	0.51	1.70
Аланин	0.84	2.11
Цистеин	0.11	0.21
Валин	0.49	2.25
Метионин	0.15	0.74
Изолейцин	0.25	1.45
Лейцин	0.43	3.6
Тирозин	0.32	2.12
Фенилаланин	0.17	1.63
Лизин	0.46	2.85
Гистидин	0.18	0.87
Аргинин	0.42	1.95
Таурин	0.08	-
Фосфосерин	0.12	-
Триптофан	0.02	0.41
Всего (%)	8.76	38.81

Белки пчелиного расплода характеризуются относительно высоким содержанием сульфогидрильных групп (- SH), которые указывают на его высокий антиоксидантный потенциал и наличие цистеина и цистеина – незаменимых для человека аминокислот. Результаты, полученные с

помощью спектрофотометрического анализа, показывают, что личинки трутней составляют 4,08-4,63 М, личинки трутней 4,18-4,63 М, куколки трутней 4,39-4,95 М, личинки пчелиной матки 1,89-2,00 М и рабочие личинок 6,32-6,80 м групп рыб на 105г белков, что в 2-3 раза выше, чем в маточном молочке. Присутствие S-содержащих аминокислот не было подтверждено другими исследователями.[17]

Представленные результаты доказывают, что пчелиный расплод является богатым источником липидов и жирных кислот.

Липидные компоненты включали триацилглицерины, свободные жирные кислоты, стерины, диацилглицерины, фосфолипиды и фосфор липидов. Результаты, полученные Лазаряном (Lazaryan et al., 2004), показывают, что содержание липидов фосфор в различных пчелиных расплодах примерно одинаково и колеблется от 4,9 до $6,7 \times 10,2\%$.[21]

Этот уровень стабилен и не зависит от таких факторов, как географическое происхождение, климатические условия, виды пчел. Было обнаружено, что уровень фосфолипидов колеблется от 1,23 до 1,69% .

Было продемонстрировано, что доля стерина в гомогенате личинок маток значительно отличается от доли стерина в гомогенате трутней. То первый характеризуется довольно высоким содержанием стеролов - 23,29 мг/г липидов, в то время как в гомогенате трутней обнаружены только их следы .

Основными стероидами личинок маток являются кампестерол, β -ситостерин, Δ^5 -авенастерол и 24-метилхолестерин .

Было обнаружено, что уровень жирных кислот составляет 4 г/100 г свежего гомогената . Они состоят в основном из насыщенных жирных кислот (52%), моновенасыщенных (46%) и полиненасыщенных кислот (2%) (Богданов 2015). Преобладают пальмитиновая (16:0), олеиновая (18:1) и стеариновая (16:1) кислоты . Отсутствие 10-гидроксид деценовой кислоты (10-HAD) был обнаружен в гомогенате трутней.[26,31]

Опубликованные данные показывают, что гомогенат трутней является богатым источником углеводов. Эта фракция в основном состоит из глюкозы, трегалозы и гликогена. Их уровень изменчив и зависит от стадии развития.

Уровень гликогена самый высокий у самых молодых личинок ($92,1 \pm 22,3$ мг/г) и снижается на 50% к четвертому дню. После этого он постепенно увеличивается до $117,0 \pm 26,1$ мг/г непосредственно перед закрытием клеток. Уровень гликогена продолжает увеличиваться во время развития закрытых клеток, достигая своего самого высокого уровня у куколок с розовыми глазами ($122,4 \pm 18,4$ мг/г). Затем его концентрация падает до $6,1 \pm 3,9$ мг/г у только что вылупившихся дроны. Изменения в уровнях трегалозы аналогичны. Его концентрация у двухдневных личинок составляет $3,3 \pm 1,0$ мг/г. Он снижается до $1,5 \pm 0,3$ мг/г в течение следующих двух дней, а затем начинает значительно повышаться непосредственно перед тем, как покрытие клеток достигает своего максимального значения ($12,9 \pm 4,1$ мг/г) у девятидневных линяющих личинок. В процессе развития его уровень постепенно снижается, достигая $3,2 \pm 1,8$ мг/г у только что вылупившихся трутней. Уровень глюкозы остается низким в течение всего периода развития и колеблется от $0,3 \pm 0,1$ мг/г (подготовительная стадия) до 3,0 мг/г.[4]

Этот вывод согласуется с данными, предоставленными Barnuti и др. (Барнуги и др., 2013). Согласно их работе, концентрация глюкозы в свежем гомогенате составляет 3,61 г/100 г. Другие моно- и ди-сахариды, такие как β -фруктофураноза, α - и β -глюкопираноза, глюцитол, тураноза и мальтоза были идентифицированы у личинок трутней (незакрытые и закрытые клетки). Состояние здоровья популяции дронов существенно влияет концентрация углеводов в телах личинок. Уровни общего сахара и трегалозы были исследованы у незараженных и зараженных варроа-деструктором трутневых препупов.[19]

Полученные результаты показывают, что общий уровень сахаров значительно ниже в паразитированных популяциях ($7,08 \pm 2,34\%$) по

сравнению со здоровыми препупами ($11,98 \pm 2,16$). То же самое наблюдение было сделано в отношении концентраций трегалозы. Его уровень был продемонстрирован $2,23 \pm 0,39\%$ у личинок здоровых трутней, в то время как только $1,74 \pm 0,46$ у инфицированных субъектов. Помимо основных ингредиентов, гомогенат личинок пчел является богатым источником микроэлементов, таких как витамины и гормоны. Он характеризуется высоким содержанием водорастворимых витаминов, таких как аскорбиновая кислота, тиамин, рибофлавин, ниацин, фолиевая кислота, B5, B6, B12, группы B, холин, биотин и инозитол (таблица 3), в то время как содержание липофильных витаминов довольно низкое.

Гомогенат также является богатым источником минералов, в частности селена. Содержание некоторых микроэлементов показано в таблице 3.

Таблица 3. Содержание витаминов и минералов в трутневом гомогенате.

Компонент	Содержание в свежем гомогенате (мг/100г)
Витамин А (МЕ/кг)	<100
β-каротин	<0.02
Витамин Е (МЕ/кг)	<0.5
α-Токоферол	0.8
Коэнзим Q10	2.0
Витамин D	0.87×10^{-2}
Витамин С	4.02
Тиамин	4.1
Рибофлавин	9.1
Ниацин	36.7

Таблица 3. Продолжение.

Фолиевая кислота	0.93 (порошкообразный)
Пантотеновая кислота	11.9
Пиридоксин	1.2
Витамин В12	<1.2
Биотин	0.23
Холин	1.68
Инозитол	10. 5 (порошкообразный)
Натрий	12.8-30.2*
Калий	269-331*
Магний	21.1-30.8*
Кальций	13.8-16.0*
Железо	1.6-4.2*
Марганец	0.06-0.14*
Медь	0.40-0.43*
Селен	3×10^{-3} * - 6×10^{-3}
Фосфор	179

Анализ липидного профиля, проведенный на личинках маток, показывает, что содержание коэнзима Q10 в их организме очень высокое и составляет $9,38 \pm 0,65$ мг/100 г .

Было заявлено, что личинки пчел, помимо типичных гормонов пчел, таких как проторадиотропный гормон, ювенильный гормон и экдизон, в

изобилии содержат женские половые гормоны, такие как прогестерон (51 нмоль/100 г), пролактин (410 нмоль/100 г) и эстрадиол (678 нмоль/100 г), в то время как были обнаружены только следы тестостерона (0,31 нмоль/100 г).

1.3. Применение трутневого гомогената

Несмотря на то, что химический состав и физико-химические свойства гомогената личинок трутней аналогичны свойствам маточного молочка, он рассматривается как отходы и не считается потенциальным источником ценных биологически активных ингредиентов. Тем не менее, как показывают недавние исследования, это ценный продукт, обладающий оздоровительными свойствами, обычно используемый в так называемой альтернативной медицине. В ряде стран Африки, Южной Америки и Азии его рекомендуют в качестве средства от проблем с фертильностью и в качестве либидо усиливающий агент. Исследования на животных показали, что введение лиофилизированного гомогената личинок приводит к снижению уровня холестерина и триглицеридов. Он также проявляет гепатопротекторную активность и стимулирует иммунную систему .[17]

Поскольку гомогенат является богатым источником питательных свойств, он был исследован в качестве потенциального корма для животных. Его вводили самцам-бройлерам , и в этом случае он проявлял главным образом андрогенные эффекты, которые проявлялись в развитие вторичных половых признаков. Другое исследование, касающееся введения трутневого гомогената в качестве добавки в рацион кур-несушек, доказало его благотворное влияние на продуктивные качества птиц. Наблюдалось увеличение производства яиц, а также улучшение их качества.

Эксперименты с молодыми хряками показали, что введение гомогената значительно улучшило их репродуктивные качества . В ходе исследования наблюдалось увеличение массы семенных желез на 20,1-21,9% и увеличение придатка яичка на 21,8-25,8 %. Одновременно наблюдалась

высокая скорость восстановления половой функции у хряков (83,3%). Было отмечено значительное улучшение качества параметров спермы, таких как объем эякуляции, плотность половых клеток, выживаемость и подвижность. Аналогичные результаты были получены, когда племенных баранов обрабатывали гомогенат трутневого расплода .[32]

Наблюдалась репродуктивная функция, а также выход потомства. Полученные результаты доказывают, что гомогенат трутневого расплода может быть использован в качестве естественного стимулятора эндокринной системы животных. Это свойство легло в основу приготовления диетической добавки, предназначенной для восстановления и повышения мужского полового влечения. Другая добавка, содержащая гомогенат трутневого расплода и выбранные соединения кальция, была использована для нормализуют активность андрогенов у женщин .

Доказано благотворное действие гомогената трутней в случае анемии.

Введение Апиларнила (препарата из гомогената трутней) мутантным мышам с наследственной гемолитической анемией привело к значительному увеличению их выживаемости с 2 недель до 7 месяцев для 50% изученных животных.[1,15]

Эксперименты на животных с участием крыс, подвергнутых физической нагрузке (плаванию), доказали сильное влияние Апиларнила (препарата из гомогената трутней) на выработку энергии. Это было наблюдалось, что животные, которых кормили препаратом из гомогената трутней, проявляли большую устойчивость к усталости и улучшали жизненно важные показатели по сравнению с контрольной группой. Было установлено, что Апиларнил вызывал увеличение истощения гликогена, усиливал энергетические процессы и синтез глюкокортикоидных гормонов. Полученные результаты привели к выводу, что Апиларнил действует как сильный стимулятор, оказывая интенсивное катаболическое воздействие, стимулируя окислительные процессы, которые стимулируют выработку энергии .

1.4 Пептиды, их классификация.

Пептиды - это соединения природного или синтетического происхождения, состоящие из остатков аминокислот, соединенных между собой пептидными связями CO-NH. Пептиды делятся на моно-, ди-, три-, тетра- и т.д. пептиды, в зависимости от количества аминокислотных остатков, образующих пептид. Если в состав входит до 10 аминокислотных остатков, то такие пептиды называют олигопептидами, если более 10 аминокислотных остатков – полипептидами. А природные полипептиды с молекулярной массой более шести тысяч называют белками. [7,9]

Э.Фишер ввел термин «пептиды» и в 1905 году разработал первый общий метод синтеза пептидов. Первый синтетический пептид получил в 1881 году Т.Курциус.

Большой вклад в развитие химии пептидов внесли Г. Лейке, М. Бергман и Э. Абдергальден. Новый этап в развитии синтеза пептидов начался в 1932 г, когда М. Бергман и Л. Зервас использовали в синтезе пептидов карбобензоксигруппу для защиты α-аминогрупп аминокислот. Полученные таким образом N-защищенные аминокислоты использовали для получения разных пептидов, которые применяли для изучения ключевых вопросов химии и биохимии этих веществ. С применением N-защищенных аминокислот впервые синтезировали природные пептиды: карнозин, глутатион и др..

Олигопептиды по свойствам схожи с аминокислотами, полипептиды – с белками. Олигопептиды – это кристаллические вещества, которые разлагаются при температуре 200-300 °С, хорошо растворяются в воде, кислотах, щелочах и почти не растворяются в органических растворителях (исключение: олигопептиды из остатков гидрофобных аминокислот)

Олигопептиды, как и аминокислоты обладают амфотерными свойствами, поэтому они могут существовать в виде анионов, катионов и

цвиттер-ионов, в зависимости от кислотности среды. Функциональные группы и пептидная связь определяют химические свойства олигопептидов.

Пептиды делятся на гомомерные и гетеромерные. Первые гидролизуются только на аминокислоты, а вторые - на аминокислоты и другие классы органических веществ. Гетеромерные, в свою очередь делятся на фосфо-, липо-, глико-, нуклеопептиды. [22]

Пептиды могут иметь линейное или циклическое строение.

Пептиды регулируют различные процессы жизнедеятельности. В зависимости от действия на организм, они делятся на группы:

- пептиды, обладающие гормональной активностью (вазопрессин, окситоцин и др.)
- пептиды, регулирующие процесс пищеварения (гастрин)
- пептиды с обезболивающим эффектом (опиоидные)
- пептиды, регулирующие аппетит (лептин, эндорфины)
- пептиды, регулирующие тонус сосудов и артериальное давление (брадикинин, ангиотензин II)
- пептиды, регулирующие высшую нервную деятельность, механизмы памяти, обучения.

Это деление условно, так как один пептид может регулировать различные процессы жизнедеятельности. [15]

Среди пептидов большую группу составляют гормоны – вазопрессин, гастрин, окситоцин, меланоцитостимулирующих гормон, адрепокортикотропин, опиоидные и другие.

К пептидам – регуляторам иммунитета относятся гормоны тимуса, пептидный антибиотик циклоспорин А, тетрапептид тафтсин, являющийся фрагментом домена C_{H2} иммуноглобулина G.

Также известны пептиды, которые являются токсическими веществами – токсины яда пчел и ос, пептиды бледной поганки (фаллоидин), нейротоксины яда змей.

Глутатион, ансерин, карнозин – относятся к биологически активным пептидам, т.к. участвуют в биохимических реакциях в тканях животных

Основными заболеваниями, при которых в современной медицине используются пептидные препараты, являются сахарный диабет 2 типа, ожирение, онкологические заболевания. [15]

1.5 Дегидрогеназы

Дегидрогеназы — это группа ферментов, которые катализируют реакции, связанные с процессами дыхания, гликолиза и брожения. Дегидрогеназы входят в состав всех органов и тканей растений, животных и микроорганизмов. Дегидрогеназы относятся к оксиредуктазам и являются катализаторами при переносе водорода от субстрата, который окисляется (RH_2) на акцепторы ($R1$), которые восстанавливаются: $RH_2 + R1 \rightarrow R + R1H_2$. Данные реакции обратимы.

Дегидрогеназы катализируют окислительно-восстановительную реакцию с помощью кофермента, такого как $NAD^+/NADP^+$ или флавина, такого как FAD, FMN в качестве акцептора электронов. Алкогольдегидрогеназа катализирует превращение спирта в альдегид / кетон с восстановлением $NAD(P)^+$ в $NAD(P)H$ (Pelmont et al., 1989). Другими дегидрогеназами, о которых сообщается при ароматической деградации, являются нафталинд-гидродиолдегидрогеназа, бензиловый спиртдегидрогеназа.[20]

Дегидрогеназы – специфичны и катализируют только определенные реакции окисления определенного субстрата.

Дегидрогеназы играют большую роль в жизни животных и человека. Например, алкогольдегидрогеназа и лактатдегидрогеназа участвуют в процессах брожения и гликолиза.

Ферменты ацетальдегид-алкогольдегидрогеназы (*adhE*) являются ключевым метаболическим ферментом в бактериальной физиологии и патогенности. Они превращают ацетил-КоА в этанол через промежуточное звено ацетальдегида во время ферментации этанола в анаэробной среде. Эта двухэтапная реакция связана с NAD^+ регенерация, необходимая для гликолиза. Бифункциональный фермент *adhE* сохраняется во всех бактериальных царствах, но также и в более филогенетически отдаленных микроорганизмах, таких как зеленые микроводоросли. В синтетической биологии и биотехнологии, из-за своей центральной роли в бактериальной алкогольной ферментации, *adhE* привлек много внимания в качестве ключевого фермента для получения этанола из бактериальных культур.

adhE обычно встречается в виде олигомерной формы, называемой спиросомами. В то время как эти спиральные макромолекулярные сборки сохраняются, их функция остается неуловимой.

Факультативные анаэробные бактерии, такие как *Escherichia coli*, метаболически универсальны и способны расти в широком диапазоне концентраций кислорода, от анаэробных условий в кишечнике до аэробных условий. Эта метаболическая адаптивность жизненно важна для приспособленности и выживания комменсальных и патогенных бактерий. При отсутствии или низкой концентрации кислорода бактерии используют ферментацию, чтобы выжить. Бифункциональный фермент алкоголь-ацетальдегиддегидрогеназы (*adhE*) является ключевым метаболическим ферментом пути алкогольной ферментации. [22]

Этот фермент состоит из N-концевого домена ацетальдегиддегидрогеназы (*AlDH*) и C-концевого железозависимого домена алкогольдегидрогеназы (*ADH*). *adhE* превращает ацетил-кофермент А в ацетальдегид, а затем в этанол, в двухступенчатой реакции, которая связана с окислением двух молекул NADH в NAD^+ . [23,24]

Уксуснокислые бактерии (AAB) являются грамотрицательными, эллипсоидальными или палочковидными ацидофильными бактериями и

являются облигатными аэробами. Эти бактерии могут встречаться в сладких природных средах, таких как фрукты, медоносные пчелы или цветы, а также в искусственных и искусственных средах, таких как безалкогольные напитки, сидр, пиво, вино или уксус. ААВ хорошо известны быстрым и неполным окислением широкого спектра сахаров, сахарных спиртов и сахарных кислот (таких как D-глюкоза, глицерин, D-сорбит, этанол или D-глюконовая кислота), приводящая к накоплению большого количества окисленных продуктов в культуральной среде. Эта способность позволяет использовать ААБ для различных биотехнологических процессов, в которых они осуществляют окислительную ферментацию для получения нескольких полезных соединений, которые трудно получить химическими процессами или получить с высокими выходами. Некоторыми примерами этого метаболизма являются получение уксусной кислоты из этанола или D-глюконовой кислоты (GA) из D-глюкозы. Большинство этих окислительных реакций катализируется мембраносвязанными дегидрогеназами с реактивными центрами, ориентированными в периплазматическое пространство. Это означает, что транспорт субстратов внутри клетки не требуется, а накопление окисленных продуктов в среде происходит быстро и почти количественно.

Некоторые дегидрогеназы нашли применение в качестве биосенсоров (например, глюкозодегидрогеназа термофильных бактерий – для определения глюкозы крови). Кроме этого, определение активности дегидрогеназ в сыворотке крови, позволяет определить ряд заболеваний. Ряд дегидрогеназ используются в диагностике различных заболеваний человека (например, при инфаркте миокарда в сыворотке крови повышается содержание некоторых изоформ лактатдегидрогеназы). [16]

Для определения количественной дегидрогеназной активности бактерий в качестве акцептора водорода используют метиловый синий, а активность определяют по скорости изменения концентрации метилового

синего в линейной фазе реакции. Данное определение активности предусматривает контакт бактерий с субстратом. [17]

Дегидрогеназы можно использовать для определения функционального состояния бактериальных клеток.

Антибактериальные и химиотерапевтические препараты угнетают активность окислительно-восстановительных ферментов, к которым относится дегидрогеназа.

Как показали исследования, проведенные Л.М. Шмутер, грамицидин С в очень малых концентрациях, сильно угнетает активность дегидрогеназ *Cl.perfringens*. Синтомицин, при таких же концентрациях угнетает активность дегидрогеназ в меньшей степени, а пенициллин и стрептомицин угнетали активность дегидрогеназ *CL.perfringens* в незначительной степени. Сильнее всего угнеталась дегидрогеназа глюкозы, затем янтарной кислоты и этилового спирта

Е.Л.Лейбфред, изучая действие хлортетрациклина и стрептомицина на активность дегидрогеназ кишечной палочки, показал, что антибиотики сильно угнетают активность дегидрогеназ глюкозы, лактозы и галактозы.

А.Н.Апоян доказал снижение активности дегидрогеназ у штаммов *B.Breslau*, выделенных от больных, устойчивых к хлороамфениколу и стрептомицину. [18]

Изучение дегидрогеназной активности бактерий имеет большое практическое значение.

Определение дегидрогеназной активности цианобактерий, позволяет определить уровень химического загрязнения среды. Это было доказано исследованиями, проведенными в Вятской сельскохозяйственной академии.[19]

Также с помощью определения дегидрогеназной активности можно контролировать уровень очистки почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Для этих целей используют углеводородокисляющие

микроорганизмы, которые разлагают углеводороды, использующие в качестве катализатора дегидрогеназу. [20]

Измерение активности микроорганизмов позволяет судить об общем состоянии окружающей среды и может быть использовано для оценки воздействия нарушения на микроорганизменное сообщество.[21]

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материал исследования

В качестве исходного материала для получения пептидов продуктов пчеловодства с целью определения дегидрогеназной активности микроорганизмов был использован гомогенат трутневого расплода.

Работы по выделению пептидных фракций из гомогената трутневого расплода и определение дегидрогеназной активности микроорганизмов проводились в Пензенском государственном университете в лабораториях кафедры «Общая биология и биохимия».

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

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

2.2 Методы исследований

2.2.1. Метод гель-фильтрации

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

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

Для разделения пептидов трутневого расплода соответствующие растворы наносили в объёме 0,25 мл на колонку и собирали фракции объёмом по 2 мл, используя сефадекс G-25 и ручную колонку. 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.

2.2.2 Определение содержания пептидов методом Лоури

Для определения пептидов во фракциях использовали метод Лоури, так как он достоверный и один из наиболее легких и быстрых методов.

Метод основан на способности пептидов окрашиваться раствором Фолина. Интенсивность окраски измерялась при длине волны с максимум поглощения 750 нм, на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете с длиной

оптического пути 10 мм. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин (БСА).

2.2.3 Тангенциальное ультрафильтрация

Тангенциальная ультрафильтрация – это метод разделения мелких частиц (молекул) в растворах или коллоидных системах с помощью полупроницаемой мембраны под давлением.

Ультрафильтрацию проводили на оборудование Vivaflow, на данной установке ультрафильтрация пробы в тангенциальном потоке, объемом от 100 мл до 5 л. В результате аминокислоты и пептиды очищаются от белков и других биологически активных высокомолекулярных соединений (ДНК, РНК) и их концентрирование.

Перед ультрафильтрацией надо обязательно промыть поверхность мембраны от прошлой фильтрации, так как могли остаться посторонние примеси. В резервуар заливаем примерно на $\frac{3}{4}$ дистиллированную воду и запускаем перистальтический насос. После этого вместо дистиллированной воды заливаем 0,5н NaOH для омыления трудноотмываемых частиц. В завершение опять промываем трубки и мембрану дистиллированной водой.

Когда провели очистки мембраны в резервуар заливаем достаточный объем 30% - го трупного гомогената на крышке резервуара закрываем все клапаны и включаем перистальтический насос, должны следить за тем, чтобы давление на мембране было не больше 2,5 Бар. После того как объем гомогената уменьшится до 50 мл необходимо прекратить фильтрацию. После ультрафильтрации мембрану промываем так же, как и перед началом работы.

2.2.4 Культивирование микроорганизмов

Культивирование — это выращивание микроорганизмов на питательной среде.

Культивирование микроорганизмов *Azotobacter* проводили на питательной среде Эшби. В состав среды входит: маннит или сахароза или глюкоза (20 гр), K_2HPO_4 (0,2 гр), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 гр), NaCl (0,2 гр), KH_2PO_4 (0,1 гр), $CaCO_3$ (5 гр), агар-агар (20 гр). Приготовленную питательную среду стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин. и разливают в стерильные чашки Петри, после ее застывания пинцетом выкладывали мельчайшие частички почвы. Фильтровальную бумагу смачивали водой и накрывали чашки для прорастания. Далее чашки Петри заложили в термостат на неделю. В течение недели следили, чтобы фильтровальная бумага не высохла. После того как культура выросла ее пересаживаем в чистую среду.

МПА применяют для выращивания неприхотливых микроорганизмов и как основу для приготовления плотных специальных сред для культивирования более требовательных микробов (*Clostridium*, *Bacillus subtilis*). В состав среды МПА входит: пептон (10 гр), NaCl (5 гр), вода мясная (1000 мл), агар-агар (10-20 гр). Смесь кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения добавленных ингредиентов. Бульон фильтруют, устанавливают pH= 7,3 и добавляют измельченный агар (в зависимости от качества агара и назначения среды). После добавления агара среду кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара. Приготовленную среду разливают в пробирки или флаконы, стерилизуют в автоклаве при 121 °C в течение 20 мин.

Культивирование микроорганизмов *Clostridium* выращивали в пробирках. Не очищенный картофель нарезают мелкими кубиками, далее

закладывали их в пробирки и заливали водой. Пробки закрывали пробкой и помещали в термостат на неделю. После того как культура выросла ее пересаживаем в чистую среду.

Культивирование микроорганизмов *Bacillus subtilis* выращивали в конических колбах. Сено поместили в колбу и залили водой, также закрыли пробкой и поместили в термостат на неделю. После того как культура выросла ее пересаживаем в чистую среду.

2.2.5 Определение общей дегидрогеназной активности

Общая дегидрогеназная активность была определена с использованием 2,3,5-трифенилтетразолиума хлорида. Метод основан на превращении 2,3,5-трифенилтетразолиума хлорида — бесцветной формы редокс-красителя — в 1,3,5-трифенилформазан, имеющий красно-розовый цвет

В условиях живых клеток или сред, содержащих активные дегидрогеназы, генерируются переносчики электронов, прежде всего восстановленный NAD, который является донором электронов для молекул красителя.

К 1 мл подготовленного супернатанта 30%-го гомогената личинок трутневого расплода приливали 0,02 мл 3%-го водного раствора 2,3,5-трифенилтетразолиума хлорида, перемешивали и инкубировали 12 часов при комнатной температуре. После инкубации смешивали с равным объёмом гексана для экстракции образовавшегося формазана и измеряли интенсивность поглощения экстрагированной фазы на спектрофотометре при длине волны 485 нм (длина оптического пути 1 см, контроль — чистый гексан). Полученные результаты оптической плотности пересчитывали на мг белка в пробе по формуле:

$$\text{Активность} = \frac{\text{оптическая плотность, ед}}{\text{концентрация белка, мг/мл}} \cdot 1000.$$

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Построение калибровочных кривых по БСА

Для определения количественного содержания 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).

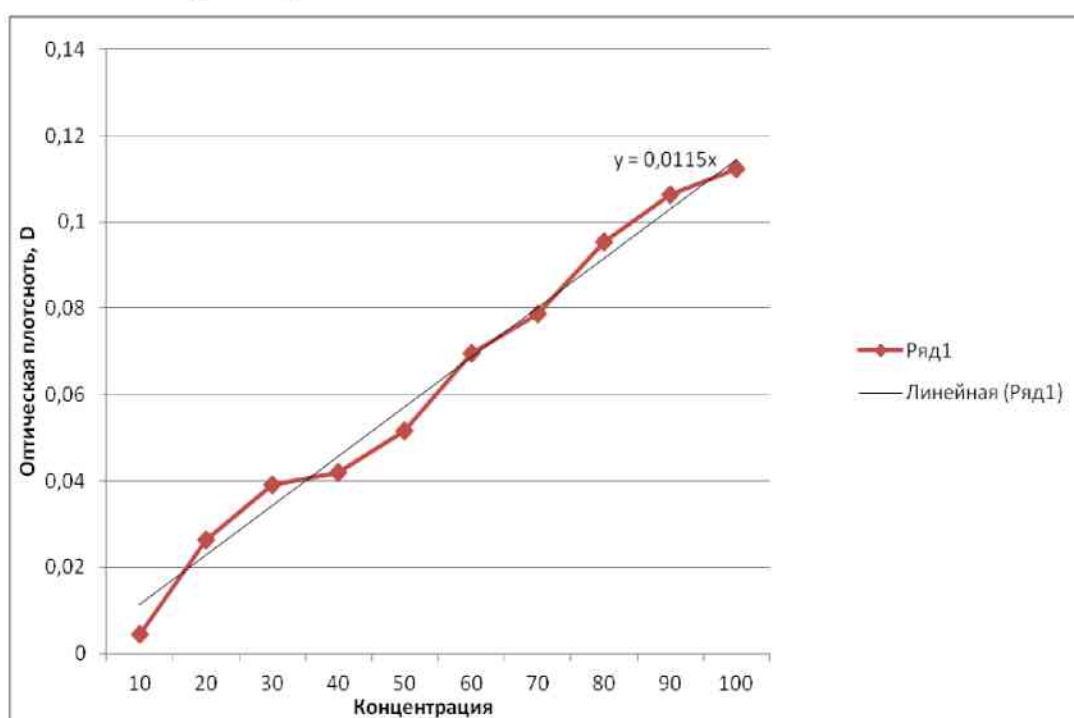


Рисунок 1. Калибровочный график по БСА

3.2 Получение фракций пептидов раствора гомогената трутневого расплода методом гель-фильтрации

После разделения приготовленных растворов гомогената трутневого расплода на соответствующие белки и пептиды методом ультрафильтрации, полученный раствор был подвергнут разделению методом гель-фильтрации. Для этого на заполненную сефадексом G-25 ручную хроматографическую

колонку наносили разделяемый фильтрат гомогената трутневого расплода, содержащий молекулы с массой более 10 кДа и проводили фракционирование. Элюция велась с использованием 0,9%-го раствора NaCl, скорость элюции равнялась 30 мл/мин. Объем собираемых фракций — 2 мл, общее число собираемых фракций — 40. Затем в каждой фракции с использованием метода Лоури было определено содержание пептидов, по полученным данным был построен график, отражающий профиль элюции пептидов трутневого расплода (рис. 2).

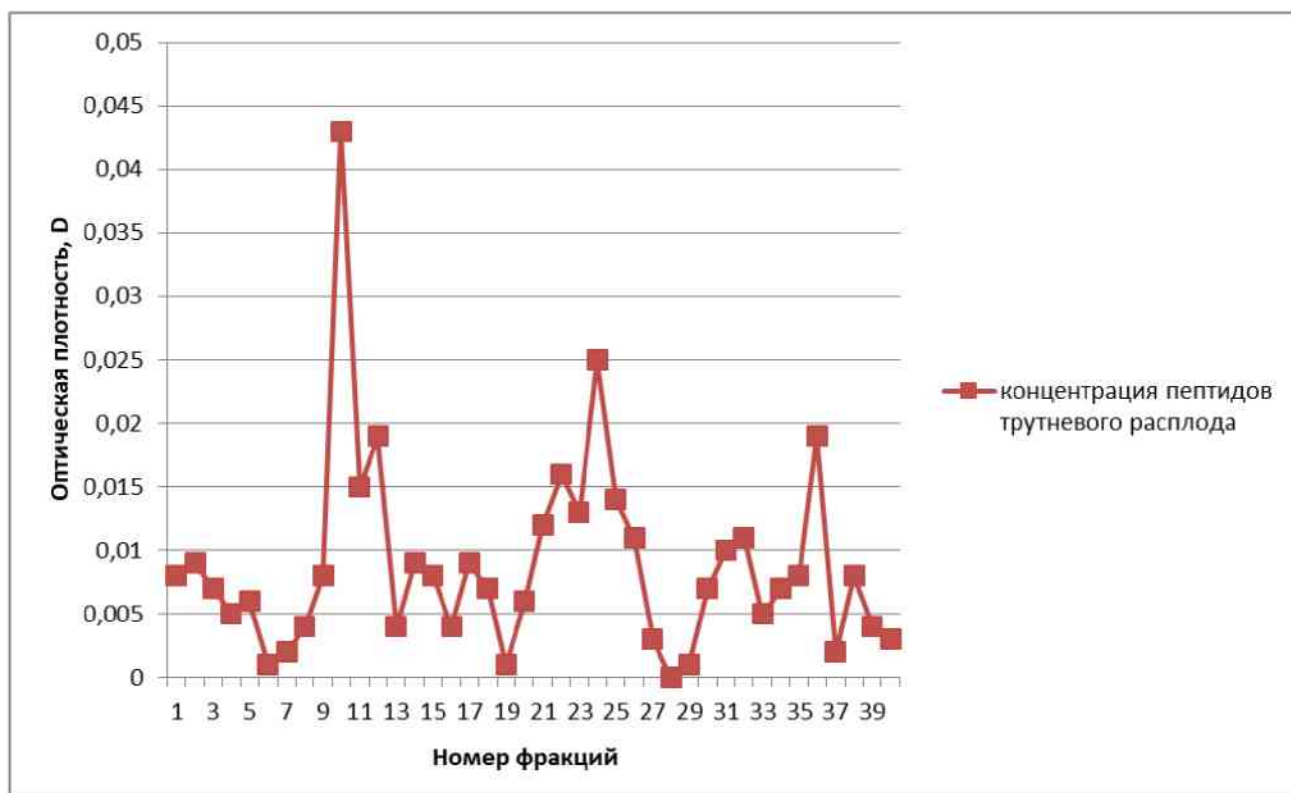


Рисунок 2. Профиль элюции пептидов 30% раствора трутневого гомогената

Как следует из рис. 2, гомогенат трутневого расплода содержит большое количество разнообразных пептидов (как минимум 5 групп). Путём многократного разделения раствора трутневого расплода с молекулами массой менее 10 кДа было получено несколько повторностей фракций. Фракции, содержащие одни и те же группы пептидов были объединены в одну и методом выпаривания в суховоздушном термостате при 45° С из полученных фракций была удалена вода. Получившийся белый порошок,

содержащий кристаллы NaCl и сухую массу пептидов, был перерастворён в 1 мл дистиллированной воды и затем обессолен методом гель-фильтрации на сефадексе G-25 (элюция велась дистиллированной водой). Полученные фракции, содержащие очищенные от NaCl пептиды были объединены в одну и снова упарены в термостате до сухого состояния, после чего перерастворены в 1 мл дистиллированной воды. В получившемся конечном растворе пептидов была определена концентрация белковых продуктов методом Лоури, эти же 5 фракций были использованы в дальнейшем для определения влияния пептидов трутневого расплода на общую дегидрогеназную активность тестовых микроорганизмов (табл. 4).

Таблица 4 – Концентрация фракций

Название фракций	Номер фракции	Концентрация в мкг/мл
Пептиды трутневого расплода	1	32
	2	46
	3	38
	4	38
	5	348

3.3 Получение тестовых культур микроорганизмов и контроль их качества

Для исследования влияния полученных фракций пептидов трутневого расплода на общую дегидрогеназную 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.

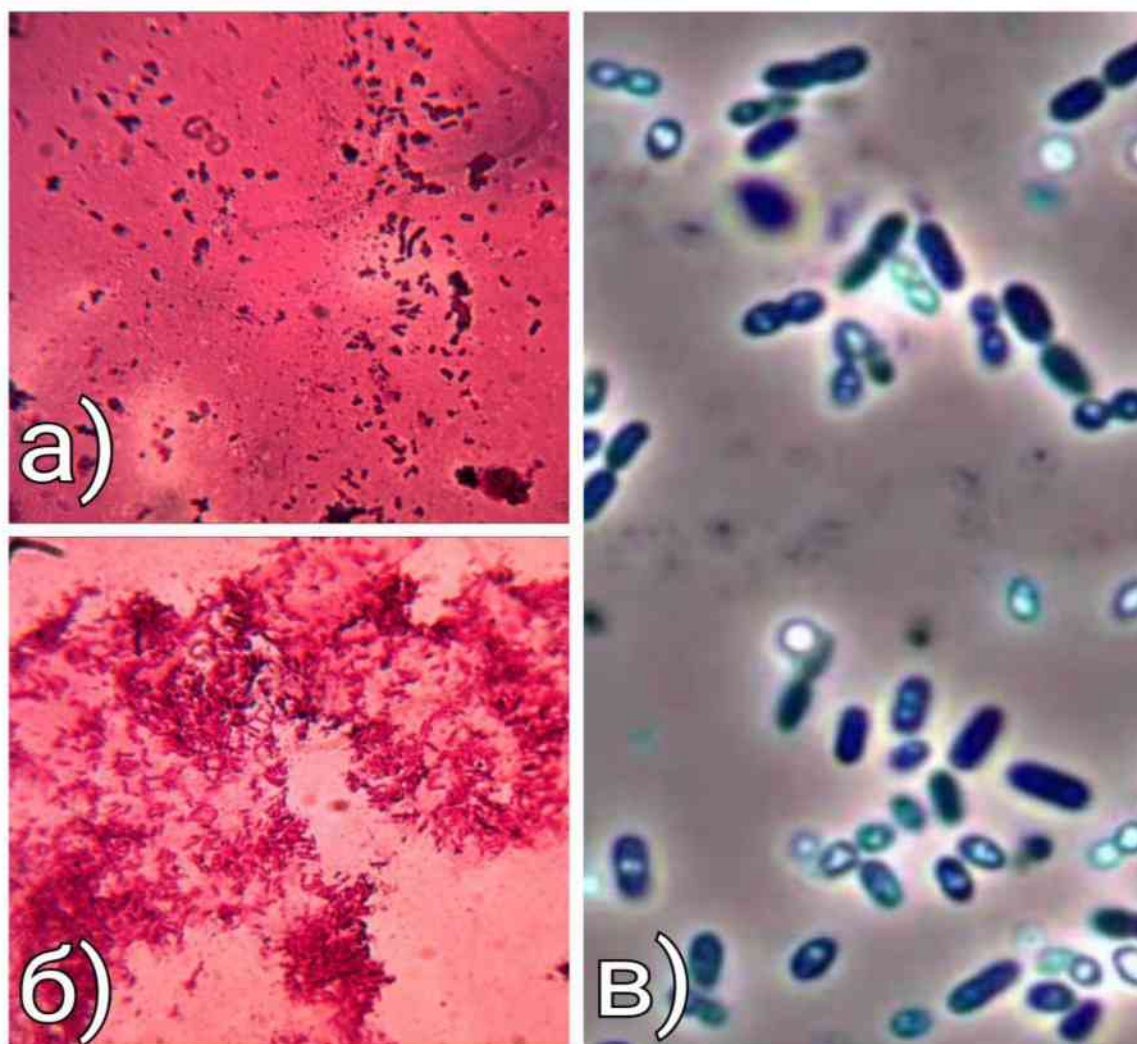


Рисунок 6. Микроскопия накопительных культур: а) Сенная палочка (*Bacillus subtilis*); б) Клостридиум (*Clostridium*); в) Азотобактер (*Azotobacter*)

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.

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.



7. Рисунок Косой агар с *Azotobacter*



Рисунок 8. Косой агар с B. subtilis



Рисунок 9. Косой агар с Clostridium

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 дегидрогеназной 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 пептидов трутневого расплода. 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. В супернатант добавляли по 20 мкл 3%-го раствора 2,3,5-трифенилтетразолиума хлорида и оставляли на 12 часов для инкубации при комнатной температуре. По прошествии 12 часов во все пробирки добавляли равный объём гексана для экстракции образовавшегося окрашенного соединения, встряхивали в течение 15 минут и центрифугировали на 5000 об/мин в течение 5 минут. Верхний слой гексана отбирали и измеряли оптическую плотность на длине волны 485 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против чистого гексана. Полученные данные по измерению оптической плотности использовали для расчёта удельной общей дегидрогеназной активности бактериальной культуры по формуле:

$$A = \frac{\text{оптическая плотность}}{\text{концентрация белка, мкг/мл}} \cdot 1000$$

По полученным значениям были построены графики сравнения изменения общей дегидрогеназной активности той или иной тестовой культуры в зависимости от номера пептидной фракции (рис. 10-12).

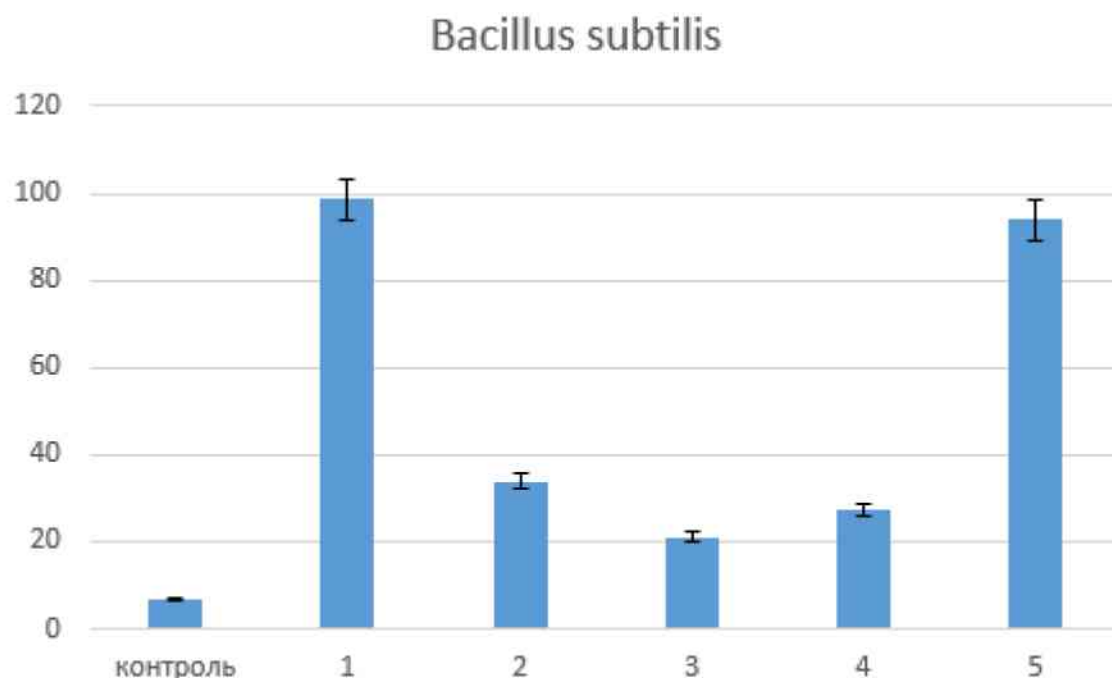


Рисунок 10. Изменение дегидрогеназной активности культур сенной палочки

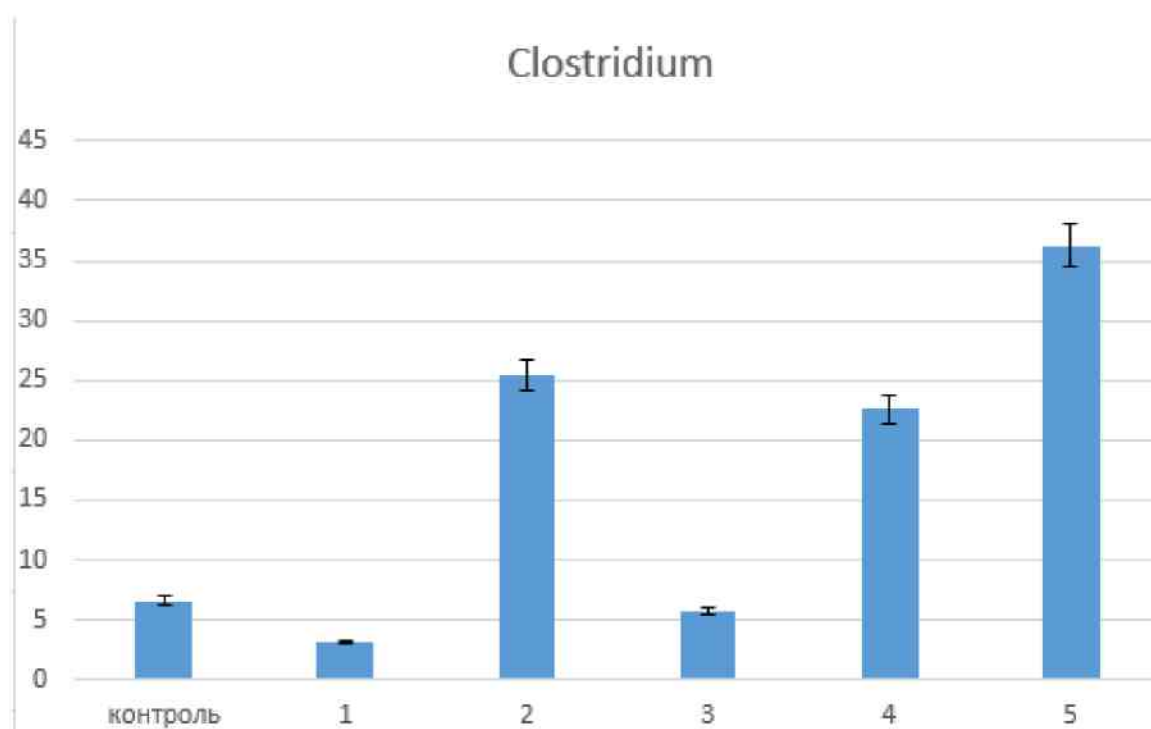


Рисунок 11. Изменение дегидрогеназной активности культур клостридий

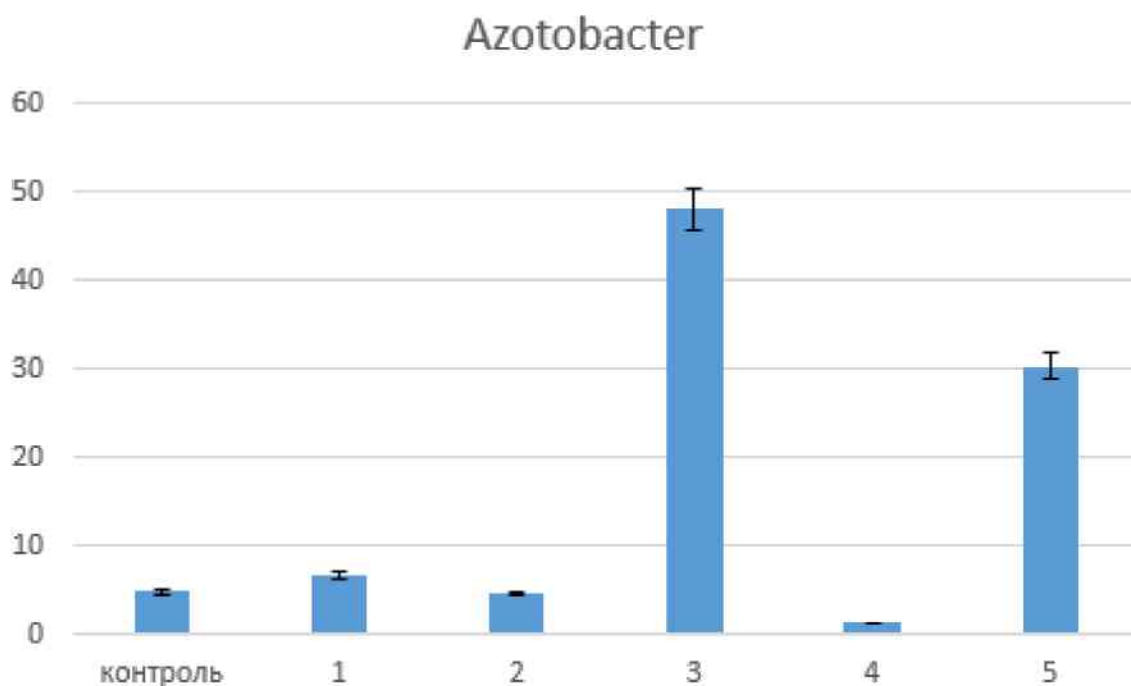


Рисунок 12. Изменение дегидрогеназной активности культур азотобактера

Анализируя полученные результаты можно сказать, что все изученные пептидные фракции трутневого расплода изменяют дегидрогеназную активность в случае культуры сенной палочки и клостридий и азотобактера, за исключением фракций №1 и 2 в случае азотобактера. Необходимо отметить, что положительная динамика изменения активности наблюдается не во всех фракциях: фракции №1 и 3 в культуре клостридий и фракции №1 и 4 в культурах азотобактера наоборот понижали общую дегидрогеназную активность, тогда как фракции с 1 по 5 в случае сенной палочки, 2, 4 и 5 в случае клостридий и 3 и 5 фракции в случае азотобактера увеличивали дегидрогеназную активность по сравнению с контрольными культурами.

Активность дегидрогеназ тесно связан с жизнедеятельностью микроорганизмов. Данные ферменты не накапливаются вне бактериальных клеток и выполняют различные функциональные нагрузки, связанные с базовыми путями метаболизма, функционированием защитных и синтетическим систем клетки. Дегидрогеназная активность достаточно полно отражает функциональное состояние бактериальной культуры. Сами по себе дегидрогеназы, катализирующие реакции дегидрирования различных

субстратов высокочувствительны к действию биологических ядов и токсинов, поэтому зачастую увеличение общей дегидрогеназной активности свидетельствует о напряжении метаболических процессов, характерных для ответной реакции на стрессовое воздействие на бактериальную клетку.

В целом суммарная или общая дегидрогеназная активность бактериальной культуры считается общим показателем биологической активности культуры, отражает влияние различных веществ на жизнедеятельность бактерий. Повышение дегидрогеназной активности не всегда может быть вызвано стрессовыми воздействиями на клетки бактерий и может отражать положительное влияние того или иного вещества на микробную культуру. Многие дегидрогеназы катализируют энергетические метаболические пути (например, гликолиз, цикл трикарбоновых кислот), и повышение активности дегидрогеназ, задействованных в данных метаболических путях, может свидетельствовать об увеличенной продукции макроэргических соединений за счёт активации метаболических путей. Увеличенная потребность бактериальной клетки в энергетических ресурсах может свидетельствовать об интенсификации процессов размножения и роста, что является положительным эффектом того или иного вещества на бактериальную клетку.

Напротив, уменьшение активности дегидрогеназ может также свидетельствовать о том, что культура бактерий, демонстрирующая данное явление, находится в стрессовых условиях и существует необходимость «замедлить» метаболические пути как ответ на стрессовые факторы, роль которых играют те или иные химические вещества. Возможен также и другой вариант, когда те или иные химические вещества уменьшают дегидрогеназную активность по причине ингибирования тех или иных ферментов-дегидрогеназ. Например, воздействие пестицидов, антибактериальных веществ, солей тяжёлых металлов приводит к уменьшению дегидрогеназной активности.

Отсутствие выраженного влияния на дегидрогеназную активность фракций №1 и 2 в случае действия на культуру *Azotobacter* может свидетельствовать либо о том, что данные пептиды, содержащиеся в тех фракциях, не оказывают никакого действия на дегидрогеназы этого рода бактерий, но что более вероятно, не могут проникнуть сквозь бактериальную полисахаридную капсулу клеток азотобактера, ведь в противном случае пептиды фракций №1 и 2 не оказывали бы никакого влияния на дегидрогеназную активность и в культурах других тестовых микроорганизмов, тогда как в варианте сенной палочки обе фракции повышают активность дегидрогеназ, а в варианте клостридий повышает только фракция №2, а фракция №1 снижает таковую.

Суммируя вышесказанное можно заключить, что различные пептидные фракции трутневого расплода оказывают разнообразное действие на дегидрогеназную активность бактерий родов *Azotobacter* и *Clostridium*, вида *B. subtilis*, что является важным доводом в пользу дальнейшего изучения их биологической активности. Возможно, данные пептиды в составе различных препаратов будут востребованы в микробиологии и экологии как модуляторы роста и метаболической активности бактериальных культур (например, активного ила или почвенных бактерий). Различия, наблюдаемые в воздействии изученных пептидных фракций на тестовые культуры, требуют более детального изучения причин их возникновения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время продукты пчеловодства очень эффективно используются в современной медицине в качестве лечебных и профилактических средств. Большой интерес представляет трутневый расплод. Он по сведениям многих пчеловодов, очень близок по составу и характеристикам с маточным молочком и в активный период сезона в большом количестве имеется во всех пчелиных семьях.

Исследования последних лет показало, что в гомогенате личинок трутневого расплода пчёл в достаточном количестве содержатся пептиды. Но изучено и охарактеризовано было небольшое количество индивидуальных пептидов. Так как биологически активные пептиды влияют на многие процессы жизнедеятельности и регулируют многие системы органов, очень перспективным направлением является изучение пептидов трутневого расплода для создания в будущем лекарственных препаратов и биологически активных добавок.

В ходе исследования было изучено влияние пептидов трутневого расплода на дегидрогеназную активность микроорганизмов .

По результатам исследования можно сделать следующие выводы:

1. В состав трутневого расплода входят пептиды, которые можно выделить и фракционировать методом гель-фильтрации
2. Полученные фракции пептидов изменяют дегидрогеназную активность микроорганизмов рода *Azotobacter*, *Clostridium* и вида *Bacillus subtilis*
3. Дегидрогеназная активность микроорганизмов вида *Bacillus subtilis* увеличивается при действии пептидов различной концентрации.
4. Не выявлена закономерность влияния пептидов разной концентрации на дегидрогеназную активность микроорганизмов рода *Clostridium*, *Azotobacter*, Дегидрогеназная активность данных микроорганизмов может как повышаться, так и понижаться .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

4. Бабина С.А., Желтышева А.Ю., Шуклин Г.О., Шуклина А.А., Япаров А.Э. Лекарственные средства на основе пептидов. Применение, технологии получения // Международный студенческий научный вестник. 2019. № 3. С. 28.
5. . Бабина Н. В. Пчеловодство / Н. В. Бабина. – По материалам зарубежной печати. Мн., 1996. С. 448
6. Будникова Н. В. Биологически активные соединения в трутневом расплоде.// Пчеловодство. 2009;(6): 52-53 с.
7. Бурмистрова, Л. А. Физико-химический анализ и биохимическая оценка биологической активности трутневого расплода / Л. А. Бурмистрова // Апитерапия сегодня: Сб. 7 Материалы VII научно-практической конференции по апитерапии. Рязань, НИИ пчеловодства, 1999. С. 123-124.
8. Вахонина Т. В. Пчелиная аптека. СПб.: Лениздат, 1992. 190 с.
9. Вахонина Т.В., Бурмистрова Л.А., Бондарева Е.М. Биологически активные вещества в маточном молочке и цветочной пыльце: Материалы научно – практической конференции Рыбное, НИИ пчеловодства, 2004. С.85
- 10.Галлиновский С. П. Антиоксидантная терапия продуктами пчеловодства /С. П. Галлиновский // Апитерапия сегодня: Сб. Рыбное, 2000. С. 79-82.
- 11.Гомазков О.А. Функциональная биохимия регуляторных пептидов. М: Наука, 1993. 35 с.
- 12.Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Ашихмина Т.Я., Огородникова С.Ю., Олькова А.С., Фокина А.И. Применение тетразольно-топографического метода определения дегидрогеназной активности цианобактерий в загрязнённых средах // Теоретическая и прикладная экология, 2008. № 2. С. 23-28.
- 13.Доусон Р. Справочник биохимика / Р. Доусон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. М.: Мир, 1991. 544 с.

14. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки, Пер. с англ. канд. мед. наук А. Н. Маца ; Под ред. и с предисл. д-ра биол. наук Р. С. Незлина. Москва : Мир, 1976. 364 с.
15. Илиешиу Н.В. Апиларнил – новый естественный продукт пчеловодства личиночного происхождения //XXIX Международный конгресс по пчеловодству. Бухарест: Апимондия, 1983. С. 398.
16. Исмагилова А. Ф., Шарипов А. А., Герасюта О. Н., Харисов Р. Я., Ишмуратова Н. М., Ишмуратов Г. Ю., Толстиков Г. А. Синтез и фармакологические свойства 9-оксо-2Е-деценной кислоты.// Химико-фармацевтический журнал. 2003; №6 :С.31-35.
17. Иойриш Н.П. Продукты пчеловодства и их использование / Н. П. Иойриш. М.: Россельхозиздат, 1976. 176 с.
18. Киселева В.А. Биохимическая характеристика действия некоторых пищевых добавок, содержащих маточное молочко и другие биологически активные продукты пчеловодства// автореферат дис. кандидата медицинских наук Рязанский гос. мед. ун-т. Рязань: 1998. С. 22.
19. Лазарян Д. С., Сотникова Е. М. Определение содержания липидного фосфора и фосфолипидов в расплоде пчёл// Химико-фармацевтический журнал. 2005. № 39(12). С.32-34.
20. Лазарян Д. С., Сотникова Е. М. Определение содержания сульфгидрильных групп в белке расплода пчёл// Химико-фармацевтический журнал. 2003. №37(12). С. 55-56.
21. Лебедев В.И., Легович М.А. Заготовка личинок трутней – это выгодно // журнал Пчеловодство. № 6. 2003. С. 15.
22. Ленинджер А. Основы биохимии: учебник/ под ред. В. А. Энгельгардта, Я. М. Варшавского Москва: Мир, 1985. 365 с
23. Лудянский Э.А. Апитерапия. Вологда: 1994. 459. с.
24. Лудянский Э. А. Руководство по апитерапии (лечение пчелиным ядом, мёдом, прополисом, цветочной пылью и другими продуктами

- пчеловодства) для врачей, студентов медицинских вузов и пчеловодов / Э. А. Лудянский. Полиграфист. Вологда, 1994. 462с.
25. Люсов В.А., Горин В.В. Влияние пчелиного маточного молочка, меда и цветочной пыльцы на переносимость физической нагрузки, липидный обмен и реологические свойства крови у больных ИБС //Кардиология. 1992. Т.32. №7,8. С. 45-48
26. 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
27. Макарова В.Г., Семенченко М.В., Якушева Е.Н. Иммунобиологическое действие меда, пыльцы и прополиса //Пчеловодство. 1998. №5. С. 52-53
28. Орлов Б.Н. Проблемы апитерапии // Пчеловодство. 1993. №4. С.19-20
29. Омаров Ш. М. Апитерапия: продукты пчеловодства в мире медицины. / Омаров Ш.М. Ростов н/Д: Феникс. 2009. 351с.
30. Прохода И.А. Биологическая активность трутневого гомогената // Пчеловодство 1996. №7 С. 28-29.
31. Прохода И.А. Малоизвестный продукт пчеловодства гомогенат трутневых личинок и контроль его качества // Апитерапия сегодня: Тез. докл. V науч.-практ. Конф. по апитерапии. Рыбное, 1997. С.54-55
32. Радченко В.Г., Песенко В.А. «Биология пчелы» Спб, 1994. 147-151 с.
33. Руанет В.В. Теория и техника лабораторных работ / В. В. Руанет. М.: ВУНМЦ Росздрава, 2007. 176 с.
34. Северин С. Е. Практикум по биохимии. М., 1991. 120 – 122. с.
35. Тыщенко В.П. Физиология насекомых.: учебник. Москва: Высшая школа, 1988. 175-178 с.
36. Хисматуллина Н.З. Апитерапия. Пермь: Мобиле, 2005. 296с.
- 37.. Шеметков М. Ф. Советы пчеловоду / М. Ф. Шеметков, В. И. Головнев, М. М. Кочевой. Минск: Ураджай, 1991. 398 с.
38. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки / Под ред. Ю. В. Митина. Москва : Мир, 1985. 255-259 с.

39. Arregui A., Iversen L.L. Beta-lipotropin potently inhibits purified angiotensin-converting enzyme from human brain // *Biochem. Pharmacol.* 2013.v.28.P.2693-2696.
40. Bilikova K., Hanes J., Nordhoff E., Saenger W., Kludiny J., Simuth J. Apisimin, a new serine valin-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS Letters* 528, 125-129, 2012. P. 89-109.
41. Gainer H., Russel J.T., Loh Y.P. The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: the secretory vesicle hypothesis // *Neuroendocrinology*. - 1985. 40, N 1. P. 171-184.
42. Pan Jian-Guo. Study on the content of sex hormone in royal jelly // *Bee products: Properties, applications and apitherapy /Program & Abstracts International Conference. Israel, 2016. - P. 95.*
43. Mbaya J. S. K. Usages of bee products in folk medicine in Kenya // *Bee products: Properties, applications and apitherapy /Program & Abstracts International Conference. Israel, 2016. P. 98.*

