

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 Биохимия

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА БАКТЕРИЦИДНОГО ФАКТОРА ИЗ
ПРОДУКТОВ ПЧЕЛОВОДСТВА»**

Студент  Ступина Мария Викторовна

Научный руководитель  Соловьев В.Б.

Нормоконтролёр  Кручинина А. Д.

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

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой _ (протокол заседания ГЭК от 20.06.17 № 14)

Секретарь ГЭК  Кручинина А. Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Виды пчелопродуктов.....	6
1.1.1 Мёд, его химический состав	6
1.1.2 Пыльца (обножка) и перга, их химический состав.....	7
1.1.3 Трутневый расплод, его химический состав	9
1.2 Антибактериальные свойства пчелопродуктов	10
1.2.1 Антибактериальная активность мёда.....	10
1.2.2 Антимикробная активность пыльцы	11
1.2.3 Антибактериальная активность трутневого расплода	133
1.3 Антибактериальные пептиды из продуктов пчеловодства.....	13
1.3.1 Апидаецин, антибактериальный пептид медоносных пчел	14
1.3.2 Структурные свойства и биологическая активность апидаецинов...	155
1.3.3 Характеристика абаецина, основного антибактериального пептида медоносных пчёл (Apis Mellifera).....	177
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	211
2.1 Материалы исследований.....	211
2.2 Методы исследований	211
2.2.1 Методы приготовления исследуемых растворов мёда и перги.....	21
2.2.2 Тангенциальная ультрафильтрация.....	22
2.2.3 Ионообменная хроматография	23
2.2.4 Гель-фильтрация	255
2.2.5 Определение содержания белка методом Лоури.....	25
2.2.6 Метод определения углеводов реакцией Селиванова.....	26
2.2.7 Тестирование препарата на бактерицидность.....	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	29
3.1 Ионообменная хроматография раствора мёда	29
3.1.1 Катионообменная хроматография.....	29

3.2 Катионообменная хроматография раствора перги	32
3.3 Гель-фильтрация раствора трутневого расплода.....	33
3.3.1 Определение свободного и внутреннего объёмов колонки, калибровка колонки.....	33
3.3.2 Получение фракций низкомолекулярных пептидов методом геле-фильтрации	34
3.4 Изучение антибактериальной активности фракций белков и пептидов мёда, перги и трутневого расплода	35
ВЫВОДЫ.....	41
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	43

ВВЕДЕНИЕ

В 1928 году Флеминг открыл пенициллин и прошло уже много времени, за которое было разработано немало антибиотиков [25]. Но окончательно победить патогенные микроорганизмы так и не удалось, так как бактерии достаточно быстро вырабатывают резистентность к почти всем антибиотикам. Необоснованное применение антимикробных средств способствовало увеличению резистентности, и это привело к недостатку эффективных лекарственных препаратов. Следовательно, современной тенденцией в фармакологии стал поиск эффективных и, что немаловажно нетоксичных антибиотических веществ растительного и животного происхождения [23, 38, 42].

Среди антибиотических веществ на первом месте находятся пептиды, благодаря своему избирательному действию на клетки бактерий. Препараты на основе пептидов применяют при лечении ряда заболеваний, они оказывают влияние на многие физиологические функции организма [24]. Действие этих препаратов основано на работе по принципу «своих эндогенных регуляторных молекул», являющихся эндогенными факторами регуляции, в связи с этим у них отсутствуют побочные эффекты и проявляется высокая активность даже в малых концентрациях [17].

Основой таких антибактериальных препаратов пептидов могут стать продукты пчеловодства, которые играют огромную роль среди натуральных средств лечения. В качестве источников регуляторных пептидов может выступать в первую очередь мёд, бактерицидные свойства которого известны издавна, а также перга и другие продукты пчеловодства. Мёд, как известно, может долгое время не портиться даже при комнатной температуре, не зарастая ни грибами, ни какими-либо другими патогенами. Такие свойства мёд проявляет, благодаря своему уникальному составу: большое содержание сахаров (до 80%), низкое значение pH (из-за наличия в составе органических кислот), а главное, благодаря наличию антибактериальных пептидов. За

содержание антибактериальных пептидов в мёде и в других продуктах пчеловодства «ответственна» пчела, так же, как за присутствие гидролитических и других ферментов.

Целью данной работы является выделение и изучение антибактериальных свойств пептидов, полученных из различных продуктов пчеловодства.

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

1. Провести анализ литературных данных на тему исследования.
2. Разработать метод выделения пептидов из пчелопродуктов с параллельным отделением пептидной фракции от общей белковой.
3. Изучить биологические свойства, а именно бактерицидную активность, полученных фракций на разных стадиях выделения и очистки.

Бакалаврская работа написана на 48 листах, содержит 11 рисунков и список литературы на русском и английском языках из 52 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Виды пчелопродуктов

1.1.1 Мёд, его химический состав

Мёд — это натуральное вещество, вырабатываемое медоносными пчелами, *Apis Mellifera*, из нектара цветов или из экссудатов деревьев и растений. Как единственный доступный природный подсластитель, мёд был важной пищей для *Homo sapiens*. Отношения между пчелами и человеком начались еще в каменном веке [27]. Первое письменное упоминание о мёде, начиная с 2100-2000 г. до н.э., говорит о его использовании в качестве лекарственного средства и мази [27]. В большинстве древних культур этот пчелопродукт использовали как для питания, так и для медицинских целей [3].

Убеждение, что мёд является питательным веществом, лекарством и мазью сохранилось до сих пор. Долгое время в истории человечества он был важным источником углеводов и единственным широко доступным подсластителем, пока производство промышленного сахара не стало заменять его [27]. Мёд использовался в человеческой культуре, благодаря своим целебным свойствам, в том числе как средство от ожогов, катаракты, язв и заживления ран, просто потому, что он оказывает успокаивающий эффект при первоначальном применении на открытые раны [30]. С учетом его физических свойств, мед обеспечивает защитный барьер и, вследствие его высокой осмолярности, создает влажную ранозаживляющую среду в виде раствора, который не прилипает к раненым тканям. Эта влажная среда, как полагают, нужна для предотвращения роста бактериальной колонии. Таким образом, мёд уменьшает воспаление, а также уменьшает формирование экссудата более оперативно, чем стандартные методы лечения [30]. Альтернативная ветвь медицины, называемая апитерапией, развивалась в

последние годы, предлагая процедуры на основе мёда и других продуктов пчеловодства для лечения многих заболеваний.

Состав мёда довольно разнообразен и в первую очередь зависит от цветочного источника, однако некоторые внешние факторы такие, как сезонные и экологические, факторы обработки, играют немало важную роль. Мёд содержит не менее 181 вещества [34]; это перенасыщенный раствор сахаров, в основном состоит из фруктозы (38%) и глюкозы (31%), содержащий также минералы, белки, свободные аминокислоты, ферменты и витамины [47]. Также в мёде присутствует широкий ассортимент незначительных составляющих, многие из которых, как известно, обладают антиоксидантными свойствами. Они включают фенольные кислоты и флавоноиды, определенные ферменты (глюкозооксидаза, каталаза, диастаза, инвертаза) и аминокислоты [43]. Вклад мёда в рекомендуемую суточную дозу (RDI) невелик. Однако его значение в отношении питания заключается в многообразии его физиологических эффектов. Состав мёда во многом зависит от его ботанического происхождения, факт, который редко рассматривается в пищевых и физиологических исследованиях.

1.1.2 Пыльца (обножка) и перга, их химический состав

Цветочная пыльца не относится непосредственно к пчелиным продуктам, но её всё же относят к продуктам пчеловодства в силу того, что она играет большую роль для пчелиной семьи из-за ее питательных свойств.

Пыльца, собранная пчелами, называется обножкой, так как пчёлы переносят её в корзинках своих задних ножек. При образовании обножки пчёлы покрывают каждое зерно агглютинирующими веществами [20]. Обножка - это пыльцевые зёрна, смоченные нектаром или мёдом. По химическому составу она представляет собой смесь веществ растительно-животного происхождения.

Для сохранения пыльцы пчёлы складывают её в сотовые ячейки, затем смачивают нектаром и покрывают мёдом. Ферменты слюны и мёда без

доступа воздуха подвергают пыльцу молочнокислому брожению, пыльцевые зёрна прорастают и превращаются в пергу, которая храниться больше года.

Из-за брожения количество белков и липидов в перге снижается, а углеводов и молочной кислоты увеличивается. Именно наличие в перге молочной кислоты препятствует росту и развитию бактерий и плесневых грибов [20].

Химический состав пыльцы и перги очень сложный и многообразный, он постоянно варьирует, зависит от времени и места сбора, вида растения, породы пчелы.

Пыльца состоит из более 250 компонентов: незаменимые аминокислоты, сахара, липиды, минеральные вещества (Si, S, Cu, Co, Na, Fe, Al, Mg, Ca, Mn, P, Ag, Ba, Cr), почти все витамины (A, B, C, D, E), ферменты, фитонциды, фитогормоны, фенольные соединения [15, 20].

Незаменимые аминокислоты занимают около 22-40%: аргинин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин и триптофан. Обножка отличается по своему аминокислотному составу [3].

В пыльце и перге присутствуют и ферменты (до 50), амилаза, инвертаза, фосфатаза, пероксидаза, фосфорилаза, трегалаза и т. д. Они могут замещать друг друга при ферментативных заболеваниях человека [14].

Использование пыльцы и перги в лечебном питании связано с их биологическими свойствами: анаболические (связаны с наличием аминокислот), антиоксидантные (объясняют наличием витамина E, каротиноидов, витамина C), стимулирующие регенерацию (объясняются присутствием витаминов A, B1, E и фолиевой кислоты, которая, в свою очередь, увеличивает синтез нуклеиновых кислот), эритро- и лейкопоэз (связаны с наличием белков, железа, кобальта, меди), иммуностимулирующие (объясняют увеличением фагоцитарной активности нейтрофилов, Т- и В-лимфоцитов, при этом считается, что активность перги в 2 раза выше, чем пыльцы), адаптогенные (определяются, в основном, белковым составом).

1.1.3 Трутневый расплод, его химический состав

Трутневый расплод — это открытый или запечатанный расплод, из которого развиваются трутни. [2].

Трутневый расплод характеризуется похожими с маточным молочком качественным составом и химическими свойствами. Содержание белка, углеводов, микро- и макроэлементов в них практически идентично [7, 16]. В нем содержится 60-70% воды и 30-40% сухих веществ, белков — 10-58%, липидов — 1,5-19%, углеводов — 9-28%, органических кислот и аминокислот — 7-32%, минеральных веществ до 3% [7].

Трутневый расплод отличается от маточного молочка по показателям pH, окисляемости, содержанию воды, уступает по уровню деценовых кислот, однако содержит большое количество сульфгидрильных групп и гормонов (прогестерон, эстрадиол и тестостерон) [6, 16].

В гомогенате личинок трутневого расплода выявлена активность различных АТР-аз. Высокой активностью обладает Mg^{2+} -зависимая аденозин-5-трифосфатаза, активирующаяся ионами K^+ и Na^+ (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} -АТР-аза и -фосфогидролаза) и Mg^{2+} -АТР-азы [4]. Данные АТР-азы интегрированы в липидном матриксе плазмалеммы и обеспечивают поток катионов через неё, что имеет большое физиологическое значение. Высокая активность этих ферментов обеспечивает интенсивный рост и развитие личинок.

В препаратах гомогената личинок трутневого расплода выявлена высокая активность щелочной и кислой фосфатаз. Причём, активность щелочной фосфатазы в 3 раза больше, чем активность кислой фосфатазы. Высокая активность фермента связана с интенсивным белковым обменом у личинок трутней.

Набор незаменимых аминокислот расплода составляет [9, 16] от 111 до 165% «идеального белка». Значительная часть аминокислот находится в свободном состоянии и в составе транспортных олигопептидов. [9].

В трутневом гомогенате широко представлены растительные стеролы:

бета-ситостерол, сигма-стерин, гидроксиситостерол и кампостерин. Содержание витамина А составляет 119 МЕ/100 г, бета-каротина 0,21 мг/100 г, витамина Е — не обнаружено [16].

1.2 Антибактериальные свойства пчелопродуктов

1.2.1 Антибактериальная активность мёда

Факторы, ответственные за антимикробную активность мёда: высокая осмолярность, кислотность и содержание перекиси водорода, которая формируется в результате окисления глюкозы с помощью фермента глюкозооксидазы во время созревания мёда. Глюкозооксидаза образуется в гипофарингеальных железах медоносных пчёл [48]. Когда перекись водорода удаляют путём добавления каталазы, некоторые сорта мёда все равно показывают значительную антибактериальную активность, и эта деятельность называется непероксидной антибактериальной активностью. К непероксидным факторам мёда относятся флавоноиды, фенольные кислоты и лизоцим [48]. Богданов предположил, что основная часть непероксидной антибактериальной активности может быть животного происхождения, в то время как часть может быть растительного происхождения. Богданов также предположил, что фенольные кислоты и флавоноиды могут быть частью антибактериальной деятельности мёда. Непероксидная антибактериальная активность является более термо- и светонечувствительными, чем пероксид водорода, и остается активной после хранения мёда в течение длительного времени. Поэтому некоторые авторы обнаружили, что непероксидная антибактериальная активность является более важной, чем пероксидная с точки зрения антибактериальных эффектов [48]. Таким образом, для оптимальной антибактериальной активности, мёд следует хранить в прохладном, защищенном от света месте и употреблять в свежем виде. Кроме того сообщается о том, что мёд ингибирует вирус краснухи, три вида *Leishmania* и *Echinococcus* [51].

Тем не менее, существуют различия в антибактериальной активности различных сортов мёда. Следует отметить, что наиболее активен мёд Manuka (*Leptospermum scoparium*), привезённый из Новой Зеландии, особенно из Восточно-Капской области Северного острова. Высокая антибактериальная активность меда Manuka из Новой Зеландии в большинстве случаев полностью обусловлена непероксидными компонентами. Мёд Manuka содержит несколько фенольных соединений, в том числе и метиловый эфир сиринговой и сиреновой кислот [50]. При изучении антимикробной активности против *Staphylococcus aureus* были найдены метиловые эфиры сиреновой кислоты, обладающей значительной антибактериальной активностью. Кроме того, недавно было обнаружено австралийский мёд из очень похожего источника (Тонкосемянник истодолистный), обладающий высоким уровнем непероксидной антибактериальной активности [50], хотя причины такой активности ещё неясны и требуют дальнейших исследований.

1.2.2 Антимикробная активность пыльцы

Пчелиная пыльца используется как апитерапевтическое, питательное и целебное средство. Ароматические и лекарственные растения являются источниками разнообразных питательных и непитательных молекул, многие из которых проявляют антиоксидантные и антимикробные свойства, которые могут защитить человеческий организм как от реакций клеточного окисления, так и от патогенов. Пчелиная пыльца известна своими лечебными свойствами, приписываемыми нескольким соединениям, таким как минералы, витамины, незаменимые аминокислоты, жирные кислоты, каротиноиды, фенольные вещества [29]. Терапевтическое действие этого продукта было связано с несколькими фенольными соединениями, такими как флавонол, гликозидные и гидроксикоричные кислоты [25] с антиоксидантной активностью.

Среди бактерии *E. Coli* наиболее чувствительна к пыльце кизила, *Listeria* — к пыльце горного Рэя. Различная чувствительность к бактериям связана с содержанием различных фенольных соединений в пыльце [25]. В одном исследовании антибактериальную активность экстрактов турецкой пыльцы исследовали против 13 различных видов сельскохозяйственных бактериальных патогенов и зоны ингибирования варьировали в связи с различными концентрациями экстрактов пыльцы [29].

Staphylococcus является самым чувствительным из микроорганизмов к спиртовому экстракту пыльцы. Антимикробная активность пыльцы может быть связана с разным происхождением пыльцы, так как в проводимых ранее исследованиях бактерии были изолированы от биологических жидкостей. Ранее было обнаружено, что грамотрицательные бактерии более устойчивы к действию пыльцы, чем грамположительные бактерии, что может быть связано с дополнительным внешним слоем оболочки, непроницаемой для большинства молекул, которая состоит из фосфолипидов, белков и липополисахаридов. Кроме того, было отмечено, что эталонные штаммы были более чувствительны, чем микроорганизмы, изолированные от биологических жидкостей [45].

Антибактериальной активностью обладает и пыльца растений тыквы обыкновенной, её экстракты *in vitro* действуют против различных грамположительных и грамотрицательных патогенных бактерий, также микроскопических грибов и дрожжей. Для пыльцы растений *Vitis vinifera* (Виноград культурный) также характерна антибактериальная активность *in vitro* против различных грамположительных и грамотрицательных патогенных бактерий. Антимикробная активность пыльцы, собранной с подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*), мака (*Papaver somniferum*) и рапса (*Brassica napus*), схожа между собой. Однако пыльца не имеет противомикробного действия на бактерии и грибы в концентрациях, используемых (0,02% до 2,5%) на следующие бактерии: *Bacillus cereus* и *subtilis*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia*

enterocolitica, *Enterococcus faecalis* и *Listeria monocytogenes*) и некоторые формы дрожжей.

Концентрация этанола может оказать влияние на антибактериальную активность экстракта пыльцы. Исходя из этого, пыльцу лучше использовать в сочетании с антибиотиками, так как есть микроорганизмы, способные приобретать устойчивость к её антимикробной активности.

1.2.3 Антибактериальная активность трутневого расплода

Антимикробные свойства продуктов пчеловодства во многом обеспечивают деценовые кислоты [41]. Поэтому антибактериальная активность гомогената трутневого расплода в отношении золотистого стафилококка, кишечной и слизеобразующей палочки практически отсутствует, в отличие от угнетающего действия маточного молочка. Не исключено, что небольшое содержание деценовых кислот в трутневом расплоде, а также реакция среды с $pH=7$, оказываются допороговыми для антибактериального действия. Это согласуется с исчезновением антибактериального эффекта маточного молочка при нейтрализации его щелочным раствором [7].

Однако, наличие антибактериальных пептидов в продуктах пчеловодства, в том числе и в трутневом гомогенате предопределяет целесообразность дальнейшего исследования биологических свойств данного продукта, а именно его антибактериальной активности, которая на данный момент является недостаточно изученной.

1.3 Антибактериальные пептиды из продуктов пчеловодства

Антибактериальные пептиды (АБП) являются наиболее изученными пептидами на сегодняшний день, и большинство из них представляют собой катионные АБП, которые встраиваются в мембраны бактериальных клеток и вызывают распад липидной бислойной структуры [52]. Большинство из этих

АБП также амфипатичны как с гидрофильными, так и с гидрофобными доменами. Такие структуры обеспечивают способность пептидов связываться с липидными компонентами (гидрофобная область) и фосфолипидными группами (гидрофильная область) [37].

Некоторые АБП при низких концентрациях могут убивать бактерии, не изменяя целостности мембраны. Вместо прямого взаимодействия с мембраной, эти АБП убивают бактерии, ингибируя некоторые важные пути внутри клетки, такие как репликация ДНК и синтез белка. Например, буфорин II может диффундировать в клетки и связываться с ДНК и РНК без повреждения клеточной мембраны [46]. Другими примерами таких АБП являются дрозотин, пиррокорин и апидаецин. Эти АБП содержат 18-20 аминокислотных остатков с активным центром для внутриклеточной мишени [37].

В некоторых случаях было показано, что некоторые АБП убивают устойчивые к антибиотикам бактерии. Например, как низин (АБП), так и ванкомицин (антибиотик) могут блокировать синтез клеточной стенки. Однако устойчивый к метициллину штамм *S. aureus* устойчив к ванкомицину, в то время как он все еще чувствителен к низину.

1.3.1 Апидаецин, антибактериальный пептид медоносных пчел

Насекомые разработали альтернативные механизмы защиты против инфекций. Различные типы пептидов, проявляющих бактерицидную активность, были обнаружены у некоторых видов насекомых. Эти гуморальные факторы индуцируются при инфекции. Это апидаецины, выделенные из лимфатической жидкости пчелы (*Apis mellifera*). Апидаецины представляют собой новое семейство индуцибельных пептидных антибиотиков с базовой структурой: GNNRP (V/I) YTPQPRPPHPR (L/I). Эти термостабильные, неспиральные пептиды активны против широкого спектра растительно-ассоциированных бактерий и некоторых человеческих патогенов, через бактериостатический, а не литический процесс. Химически

синтезированные апидаецины имеют ту же бактерицидную активность, что и их природные аналоги. Хотя активными антибактериальными пептидами являются только пептиды, обнаруживаемые в лимфе у взрослой пчелы, а личинки пчел содержат значительные количества лишь неактивных молекул-предшественников.

1.3.2 Структурные свойства и биологическая активность апидаецинов

Апидаецины являются основными гуморальными компонентами, индуцируемыми бактериальной инфекцией в лимфе пчелы. Индукция является специфической, поскольку она может быть спровоцирована инъекцией латексных частиц и индийских чернил. Были идентифицированы три близкородственных пептида, апидаецин Ia, Ib и II. Эти катионные пептиды являются высокостабильными при низком уровне pH (2) и высокой температуре (100 ° C). Наличие шести пролинов может способствовать этой стабильности. Три апидаецина имеют почти идентичные первичные структуры с различиями только в нескольких остатках. Апидаецины — наименьшие иммунные пептиды, полученные от насекомых. Исключительно высокое содержание пролина (33%) в этих биологически активных пептидах делает их уникальными. Более того, высокое содержание пролина в апидаецине теоретически исключает пептидную, предполагая спиральную структуру. Такая структура существенна для бактериолитической активности цекропинов и нескольких других пептидных антибиотиков [40]. Жизнеспособность клетки *E.coli*, обработанной апидаецином, в условиях ограниченного роста значительно выше.

Апидаецины не нарушают клеточные мембраны. Следовательно, апидаецины могут иметь бактериостатический, а не бактериолитический эффект, как это было предложено для аттацинов [33].

Непосредственное действие апидаецинов контрастирует с довольно медленным действием аттацинов; после добавления последнего снижение

скорости роста культуры *E. coli* обнаруживается только через 1-2 часа [33]. Магаинины [36], цекропины и мелиттины [39] обладают литической активностью и нарушают мембранные структуры клетки.

Апидаецины очень активны против грамположительных бактерий. Все три различных апидаецина показывают сопоставимую активность в отношении бактерий. Предполагают, что пчелы разработали систему защиты, специально нацеленную на микроорганизмы, с которыми они часто сталкиваются.

Более низкий уровень зрелых апидаецинов, вместе с наличием не полностью обработанных неактивных преапидоецинов в лимфа пчелиных личинок ясно указывает на более низкий уровень дипептидиламинопептидазы в личиночной лимфе. Различия между иммунным ответом имагинального и преимагинального этапа могут быть связаны с социальным поведением, позволяющим личинкам пчел, в отличие от личинок одиночных насекомых, вырастать в более защищенной среде.

Более низкая концентрация активных антибактериальных факторов в лимфе личинок пчёл может нарушить эффективность их иммунной системы. Однако личинок кормят рабочие пчелы, последние фильтруют пищу в провисекулусе [44] и тем самым снижают риск инфицирования преимагинальных стадий.

Сильное антибактериальное действие апидаецинов и их кажущаяся нетоксичность по отношению к эукариотическим клеткам может быть применена в качестве антибиотиков в лечении бактериальных инфекций животных или человека.

Выделение и характеристика апидаецинов теперь позволяет синтезировать гены, кодирующие эти пептиды. Передача и экспрессия таких генов в растениях может привести к получению трансгенных сортов сельскохозяйственных культур, которые устойчивы к болезнетворным бактериям.

1.3.3 Характеристика абаецина, основного антибактериального пептида медоносных пчёл (*Apis Mellifera*)

Количество термостабильных антибактериальных факторов максимально индуцируется у медоносной пчелы (*Apis mellifera*) при инфицировании живыми клетками *E. coli*. Подобный гуморальный иммунитет имеют и другие насекомые, такие как *Hydrophora sescrobia* и некоторые родственные моли [32], а также мухи *Surcophaga peregrina* [32] и *Phormiu terranova* [36]. По крайней мере три или пока неизвестное количество индуцированных антибактериальных веществ медоносных пчел должно быть отнесено к семейству апидаецинов. Ранее сообщалось об изоляции и свойствах этих молекул [31]. Они структурно уникальны среди всех известных пептидных антибиотиков беспозвоночных и позвоночных.

Был идентифицирован четвертый индуцибельный антибактериальный фактор медоносных пчел. С помощью химического анализа установили довольно уникальную его структуру, для этого фактора было предложено название абаецин. Другой антибактериальный пептид был также выделен из пчел, но еще не охарактеризован.

Абаецин представляет собой пептид из 34 аминокислотных остатков. Он содержит 10 остатков пролина (29%), в нём нет кислотных остатков и нет цистеинов. Суммарный заряд 4+ сгруппирован в положениях 12, 13, 27 и 29. Пролин равномерно распределен по всей длине, исключая возможность того, что пептид образует α -спиральную конформацию [28]. Более того, эти пролины повторяются, что может быть выровнено внутри.

Поиск в базе данных NBRF последовательности белков (Washington, DC) не выявил никакой идентичности с известными белками. Поиски с низкой требовательностью показали сходство с богатыми пролином белками, такими как коллаген. Тщательный контроль этих совпадений показал, что они носят случайный характер. Были выявлены поразительные сходства с последовательностями других антибактериальных пептидов, таких как абаецин, апидаецин и диптерицин А [31]. Соответствующие структуры

пролина и гидрофобных аминокислот присутствуют в первых 18 или 19 остатках каждого из трех пептидов. Остальная часть последовательности абаецина также показывает значительные сходства с диптерицином А. Однако диптерицин был получен от личинок *Phormia*, а другие-от взрослых пчел. Остается возможность, что диптерицин А, хотя и является бактерицидным, представляет собой молекулу предшественника, полученную от взрослой мухи с более коротким циклом.

Основные дипептидные последовательности являются хорошо изученными участками нескольких препропептидов, включая маганины [31]. Последовательность Arg-Lys (27-28) в диптерицине А является таким потенциальным сайтом. Нет сходства между абаецином и секропинами/саркотоксинами, аттацинами, сапецинами/дефензинами, лизоцимами насекомых и антибактериальными пептидами, такими как магаинины, тахиплезины, гистатины и яичный лизоцим [49].

Несмотря на то, что абаецин, апидаецин и диптерецин А четко объединяют определенные последовательности, по крайней мере одна структурная и одна физиологическая разница была обнаружена. Во-первых, диптерицин А значительно длиннее других (82 против 34 и 18). Во-вторых, непосредственное действие апидаецина контрастирует с задержанным действием абаецина и диптерицина [31].

Учитывая сходство последовательностей между абаецином и апидаецином, можно утверждать, что абаецин принадлежит к последнему пептиду. Однако на основе шести важных различий в биологических свойствах, считается, что это не так. Во-первых, апидаецины являются селективно бактерицидными для грамотрицательных бактерий; абаецины-умеренно бактерицидными, но одинаково активными против большинства грамотрицательных и грамположительных бактерий. Во-вторых, апидаецины обычно в 200 раз более активны против *Agrobacterium*, *Erwinia* и *E. coli*. В-третьих, мутант *E. Coli* с более высокой устойчивостью к апидаецину, чем его родительский штамм, не имеет высокой устойчивости к абаецину по

сравнению с апидаецином. В-четвертых, активность, наблюдаемая у абаецина, была направлена против *Xunthomonus Cumpestris*, устойчивому к апидаецину. В-пятых, активность абаецина не была обнаружена в питательных бульонах, забуференных фосфатно-солевым раствором, но была обнаружена существенная бактериальная активность, когда вода была заменена фосфатно-буферным солевым раствором. Ранее было показано, что апидаецины очень активны в таких забуференных средах. Абаецин обладает значительно замедленной антибактериальной активностью в отличие от быстродействующего апидаецина. Все эти отличия указывают на особый способ действия. Учитывая их неаллергическую структуру и относительную неважность осмотического стресса для их деятельности, маловероятно, что либо апидаецин, либо абаецин являются литическими пептидами, которые разрушают клеточные стенки. Кроме того, каталитическая активность гликозидгидролазы лизоцима была присуждена Glu и Asp остаткам, присутствующим в каталитическом сайте [35], оба из которых отсутствуют в последовательностях апидаецина и абаецина.

Еще одна загадочная особенность абаецина заключается в близкой к потере бактерицидной активности в присутствии фосфатно-буферных солевых или разведенной пчелиной лимфе, средах, которые очень напоминают ее физиологическую среду. Таким образом, несмотря на то, что абаецин несомненно связан с антимикробной активностью пчел, его вклад *in vivo* в антибактериальную защиту не понятен. Некоторые взгляды требуют дальнейшего изучения. Абаецин может быть обработан до более короткого, похожего на апидаецин пептида. Он может действовать синергически с одним или несколькими другими основными антибактериальными факторами пчел и/или проявлять бактерицидную активность против мутантов, которые приобрели повышенную устойчивость к этим и другим факторам.

Наконец, еще многие бактериальные роды нуждаются в тестировании на чувствительность к абеацину. Химический синтез абаецина обеспечит нас материалом, необходимым для этих исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы исследований

В качестве материала для исследования использовали образец мёда, собранный не более года назад. Образец хранился в плотно закрытой таре, в темноте, при комнатной температуре.

Образец пчелиной перги был тщательно высушен и хранился в замороженном виде.

Образец личинок трутневого расплода также хранился в замороженном виде.

2.2 Методы исследований

2.2.1 Методы приготовления исследуемых растворов мёда, перги и трутневого расплода

Исследуемый раствор мёда — это водный раствор биологически активных веществ (пептиды, белки, углеводы) с молекулярной массой до 10 кДа, которые были получены следующим образом: 75% раствор меда (375 г меда растворяли в воде и доводили в колбе до объема 0,5 л) фильтровали на установке, состоящей из воронки Бюхнера, колбы Бунзена и водоструйного насоса. В воронку Бюхнера поместили фильтр «красная лента», чтобы удалить крупные механические частицы. Этот фильтр имеет размер пор 8-12 мкм. Далее провели тангенциальную ультрафильтрацию раствора для отделения фракции с молекулярной массой биологически активных веществ до 10 кДа.

Исследуемый раствор перги — это водный раствор биологически активных веществ (пептиды, белки, углеводы) молекулярной массой до 10 кДа, которые были получены следующим образом: для приготовления 75% экстракта на лабораторных аналитических весах взвесили навеску перги

массой 375 г, растворили её в воде и довели до метки 0,5 л. Далее использовали метод замораживания и оттаивания, в результате которого, кристаллы льда разрушают субклеточные структуры. Потом полученную суспензию отфильтровывали через фильтровальную бумагу. Нерастворимые части осаждали центрифугированием на рефрижераторной центрифуге при температуре 4°C со скоростью 8000 об/мин в течение 40 мин. После этого осадок удаляли, а супернатант отфильтровывали через фильтр «красная лента». Полученный экстракт хранился при -40° С.

Исследуемый раствор личинок трутневого расплода — это 20% водный экстракт белков и пептидов. Для его получения 10 г личинок гомогенизировали в 50 мл воды. Далее использовали метод замораживания и оттаивания, чтобы образующиеся кристаллы льда разрушили субклеточные структуры. Затем проводили центрифугирование в течение 30 минут при 10000 об/мин для отделения оставшихся неразрушенных клеток и субклеточных структур. Пептиды получали путем осаждения белков 10% ТХУ с последующим центрифугированием 4000 об/мин в течение 20 минут. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость использовали как источник пептидов, хранили при -40° С.

2.2.2 Тангенциальная ультрафильтрация

Ультрафильтрация — это метода мембранного разделения жидкости через полупроницаемую мембрану под давлением. [5]

Этот процесс осуществляют на установке Vivaflow, которая позволяет ультрафильтровать пробы в тангенциальном потоке. В результате происходит очистка от белков и других биологически активных высокомолекулярных соединений (ДНК, РНК) и их концентрирование.

Установка позволяет отфильтровать водные растворы объемом от 100 мл до 5 л.

Перед началом работы необходимо очистить поверхность мембраны от возможных остатков предыдущих фильтраций, для этого в резервуар

заливали дистиллированную воду и запускали перистальтический насос. После это производили смену раствора для промывания на 0,5 н NaOH (тоже примерно три четверти объёма) для омыления трудноотмываемых частиц. Затем снова промывали мембрану и трубки дистиллированной водой, чтобы избавиться от любых посторонних примесей.

После очистки в резервуар заливается достаточный объём 75%-го раствора (в нашем случае это мёд и перга), закрываются все клапаны на крышке и включается перистальтический насос. Количество оборотов ротора в минуту нужно отрегулировать так, чтобы давление в мембране не превышало 3 Бар, но и не было слишком низким, чтобы процесс фильтрации не занял большее время. После уменьшения объёма начального раствора до 50-70 мл необходимо прекратить фильтрацию, а мембрану промыть так же, как указано в предыдущем абзаце.

2.2.3 Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография — это широко применяемый метод разделения и очистки белков из экстрактов и гомогенатов клеток животных и растений [18].

В основе метода лежит способность молекул вещества диссоциировать в растворе на катионы и анионы, которые при продвижении через сорбент разделяются за счет разной скорости обмена с ионными группами сорбента. Это разделение происходит за счет взаимодействия зарядов разделяемого вещества с заряженными группами поверхности носителя [22].

Перед началом проведения анализа подбирают ионообменник (катионит или анионит) — это полимерные органические вещества, которые несут положительные или отрицательные функциональные группы, а также необходимо подобрать и буферные растворы. При выборе ионообменника руководствуются изоэлектрической точкой белка pI , при которой значения pH буфера $< pI$, белок становится положительно заряженным и адсорбируется на катионообменнике и наоборот. pI пептидов и белков,

выделенных из мёда, неизвестна, так как в их составе имеются многочисленные функциональные группы, поэтому разделение осуществляется в соответствии с их суммарным зарядом [1].

Выбор носителя зависит от различных параметров, от вида разделяемых веществ, от типа элюента [21].

Получение фракций белков и пептидов мёда на КМ-целлюлозе

Сбор фракций пептидов проводили на стеклянной колонке размером 1,6×8 см с отрицательно-заряженным катионообменником, КМ-целлюлозой (V носителя = 5 мл). У ионообменников на основе целлюлозы количество связавшегося белка прямо пропорционально размеру белковых молекул, следовательно, чем меньше молекулы белка, тем больше происходит их адсорбция.

На хроматографическую колонку нанесли 0,2 мл раствора мёда до 10 кДа, предварительно очищенный методом ультрафильтрации, и собирали фракции объемом 1,5 мл (скорость элюции 1,5 мл/мин).

После всех подготовительных операций проводилось элюирование с использованием следующих буферных растворов со ступенчатым градиентом pH:

- 0,2 М Na-ацетатный (pH=4,2), 0,2 М Na-цитратный (pH = 6) и 0,2 М трис-HCl (pH 9) в случае катионообменной хроматографии.

После того, как были собраны 8 фракций ($V=12$ мл) элюцию останавливали, верхний слой начального буферного раствора (0,2 М Na-ацетатный, pH 4,2) аккуратно удаляли и обеспечивали приток Na-цитратного буферного раствора (собирали 3 фракции), а в конце элюировали десорбирующим буферным раствором (0,2 М трис-HCl, pH 9) и при тех же условиях собирали еще 10 фракций. Так, происходило ступенчатое элюирование на КМ-целлюлозе.

Получение фракций белков и пептидов перги на КМ-целлюлозе (аналогично сбору фракции белков и пептидов мёда).

2.2.4 Гель-фильтрация

Подготовка колонки для гель-фильтрации

Сефадекс G-25 суспендируют в 5-10 кратном объеме дистиллированной воды и оставляют набухать в течение 3 часов. После перемешивают до образования однородной массы и дают отстояться. Как только основная масса геля осядет, надосадочную жидкость с неосевшими обломками гранул аккуратно декантируют. Суспендирование с декантацией проводят 3-4 раза.

Колонку закрепляют вертикально, закрывают нижний конец пробкой с фитингом, помещают в основание колонки кружок фильтровальной бумаги, её размер должен строго соответствовать внутреннему размеру колонки. Заливают около 2 мл воды, как только фитинг заполнится, через воронку по стенке колонки заливают суспензию геля. Открывают зажим колонки и дают раствору свободно вытечь, следя за тем, чтобы колонка не высохла. Суспензию геля прибавляют, пока его высота в колонке не достигнет необходимого нам уровня, стартовая зона геля должна быть обязательно горизонтальна. Потом на поверхность геля помещают кружок фильтровальной бумаги. Колонку, забитую гелем, промывают дистиллированной водой.

Получение фракций пептидов трутневого расплода на сефадексе G-25

1,5 мл 20% прозрачного раствора трутневого расплода (10г трутневого расплода в 50мл дистиллированной воды при пересчёте на сухую массу) нанесли на стеклянную колонку размером 1,8×23,0см с Сефадексом G-25 с рабочим объемом 33 мл. Элюирование производили дистиллированной водой. Собирали 25 фракций объемом 1,5 мл, концентрацию белковой и пептидной фракции определяли методом Лоури (КФК-3, 750 нм) [21].

2.2.5 Определение содержания белка методом Лоури

Количественное содержание белка во фракциях после ионообменной хроматографии и гель-фильтрации определяли методом Лоури, который

основан на реакции ионов меди Cu^{2+} с пептидной связью. Медь переходит в Cu^+ и реагирует с реактивом Фолина-Чокальтеу (фосфомолибденовая кислота и фенол), образуя нестойкий продукт, переходящий в молибденовую синь, максимальная абсорбция которой наблюдается при $\lambda = 750$ нм. При такой длине волны показатели оптической плотности линейно зависят от концентрации белка. Чувствительность метода очень высока (максимально адекватные значения наблюдаются при концентрации белка от 10 до 100 мкг/мл) [8].

Для определения содержания пептидов в фракциях из каждой отбирали аликвоту объёмом 0,5 мл, к которой прибавляли реактив С объёмом 1 мл (реактив С — это 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), пробирки тщательно перемешивали и смесь инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Затем добавляли реактив Фолина-Чокальтеу объёмом 100 мкл, после смесь снова интенсивно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 40 минут. Оптическую плотность измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостой пробы при длине волны $\lambda = 750$ нм. По получившимся значениям оптической плотности определили концентрацию белка в каждой из проб с помощью градуировочного графика, построенного с использованием БСА.

2.2.6 Метод определения углеводов реакцией Селиванова

Реакция Селиванова — это качественная реакция для фруктозы или других кетоз (скорость реакции альдоз ниже, чем с кетозами), которые служат своеобразными маркёрами наличия углеводов в пробе. Реакция основана на образовании фруктозы с соляной (или другой минеральной) кислотой оксиметилфурфурола, который с резорцином образует вишнёво-красную окраску[19].

Из каждой фракции после ионообменной хроматографии и гель-фильтрации отбирали аликвоту объёмом 0,5 мл, к которой добавляли 0,1%-й спиртовой раствор резорцина объёмом 0,5 мл и 1,5 мл 30% HCl, после чего смесь ставили на кипящую водяную баню на 8 минут. Интенсивность окраски измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостой пробы при длине волны $\lambda = 490$ нм. По полученным значениям адсорбции построили график.

2.2.7 Тестирование препарата на бактерицидность

Приготовление препарата

Растворы пептидов для тестирования на бактерицидность — фракции с пептидами, неоднократно собранные после ионообменной хроматографии и гель-фильтрации и соответственно слитые вместе. Конечная концентрация пептидов в этом растворе оказалась низкой — 57,4 мкг/мл для мёда, 53,5 мкг/мл для трутневого расплода и перги. Такая концентрация не позволит определить возможную терапевтическую и летальную дозы, поэтому раствор лиофилизировали до образования сухого остатка с использованием лиофильной сушки VaCo 2. В ходе этого процесса образцы замораживались при -80°C 24 часа, сама сушка происходила в течение 12 часов в вакуумной камере. После концентрирования содержание пептидов в растворе стало равняться 398,3 мкг/мл для мёда, 371,2 мкг/мл для трутневого расплода и перги, которое позволяет провести исследование.

Микробиологический метод исследования

Подготовку образцов к исследованию бактерицидного действия проводили в соответствии с частью 1 ГФ XII [10]. В основе антибактериального действия лежит угнетение роста микроорганизмов действующим веществом лекарственного средства.

Работа с тест-микроорганизмами

Для определения антибактериального действия воспользовались тест-микроорганизмами: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.

Лиофилизированные культуры бактерий вскрывают в асептических условиях и добавляют к ним по 0,5 мл питательной среды. Получившуюся взвесь переносят в пробирки с этими же питательными средами и инкубируют 24 часа. После нескольких пересадок с бульона на бульон культуру микроорганизмов пересевают на питательный агар в чашки Петри для получения отдельных колоний. Выросшие культуры проверяют визуально на чистоту роста. Схожие колонии пересевают в пробирки со скошенным агаром того же состава и инкубируют. Тест-штаммы бактерий хранят в лиофилизированном состоянии или под слоем вазелинового масла при температуре 5°C [10].

Приготовление инокулянта

24-часовые бульонные культуры разводят стерильным изотоническим 0,9% раствором хлорида натрия до концентрации 100000 КОЕ/мл для *E. coli* и *B. subtilis* [10].

Поверхностный метод

Для выращивания культуры микроорганизмов используют агаризованные питательные среды: соево-казеиновый агар или среду №1 [11, 12, 18]. Для этого сначала расплавленные, а затем охлажденные до 42,5°C питательные агаровые среды с бактериальными клетками (5×10^7 клеток/мл) вносят в стерильные чашки Петри в количестве 7,5 мл и оставляют до застывания. Исследуемые образцы наносят на поверхность агаровых сред. Отрицательным контролем служит бычий сывороточный альбумин, положительным – ампициллин. Чашки Петри термостатируют в течение 24 ч при 35-37°C.

По размерам зон задержки роста бактерий, то есть по наличию точечных колоний, или их полному отсутствию в области нанесенных проб определяют антибактериальную активность.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Ионообменная хроматография раствора мёда

3.1.1 Катионообменная хроматография

Подбор оптимальной дозы наносимого раствора мёда на колонку

Проводилось последовательное разделение пептидов при одинаковых условиях методом катионообменной хроматографии с нанесением разного объема раствора мёда. Выяснили, что при нанесении большого объёма, увеличение выхода пептидов не происходит, а даже наоборот, произошло его уменьшение.

Это объясняется тем, что углеводы, содержащиеся в концентрированном растворе, мешают сорбции пептидов на гранулах ионообменника, что доказывает уменьшение выхода катионных пептидов при нанесении объёма материала в 0,4 мл (Рисунок 1) по сравнению с 0,2 мл. Содержание углеводов также может повлиять и на определение содержания анионных и катионных пептидов. Правильное его определение можно достичь только уменьшив наносимую дозу раствора для того, чтобы пептиды сорбировались наиболее полно, без стороннего влияния углеводов (как при объёме 0,2 мл) (Рисунок 2).

При проведении катионообменной хроматографии был выбран наиболее оптимальный объём 0,2 мл, именно при таком объёме удаётся получить наиболее выраженные пики пептидов без стороннего влияния углеводов.

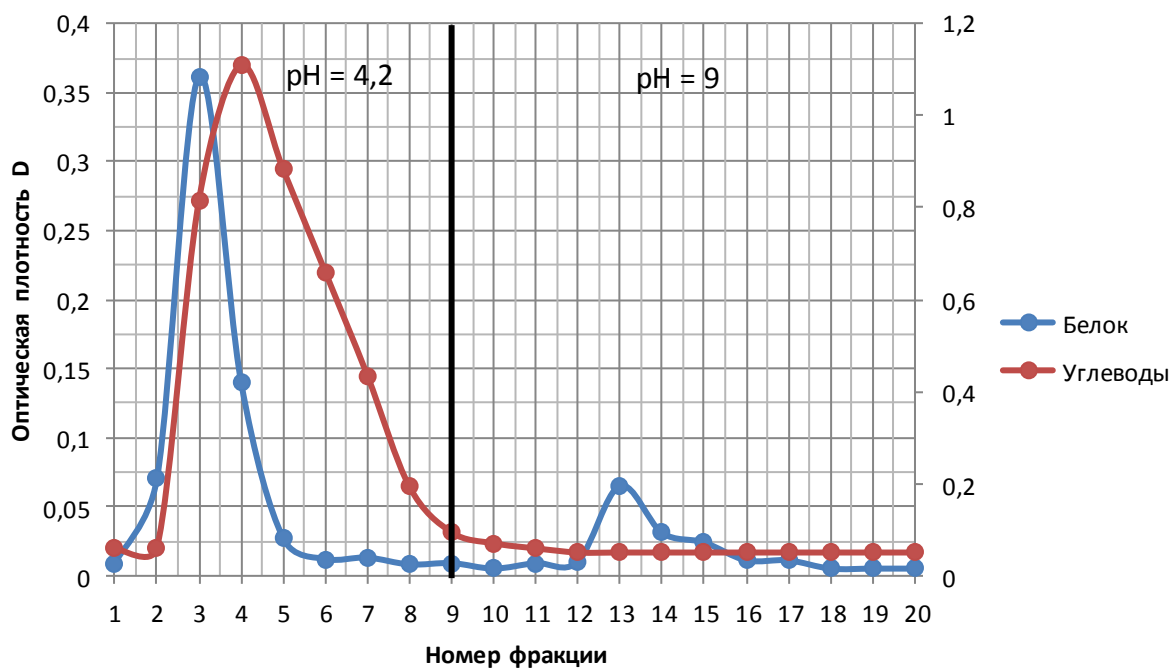


Рис. 1. Профиль элюции пептидов на КМ-целлюлозе, объём пробы 400 мкл

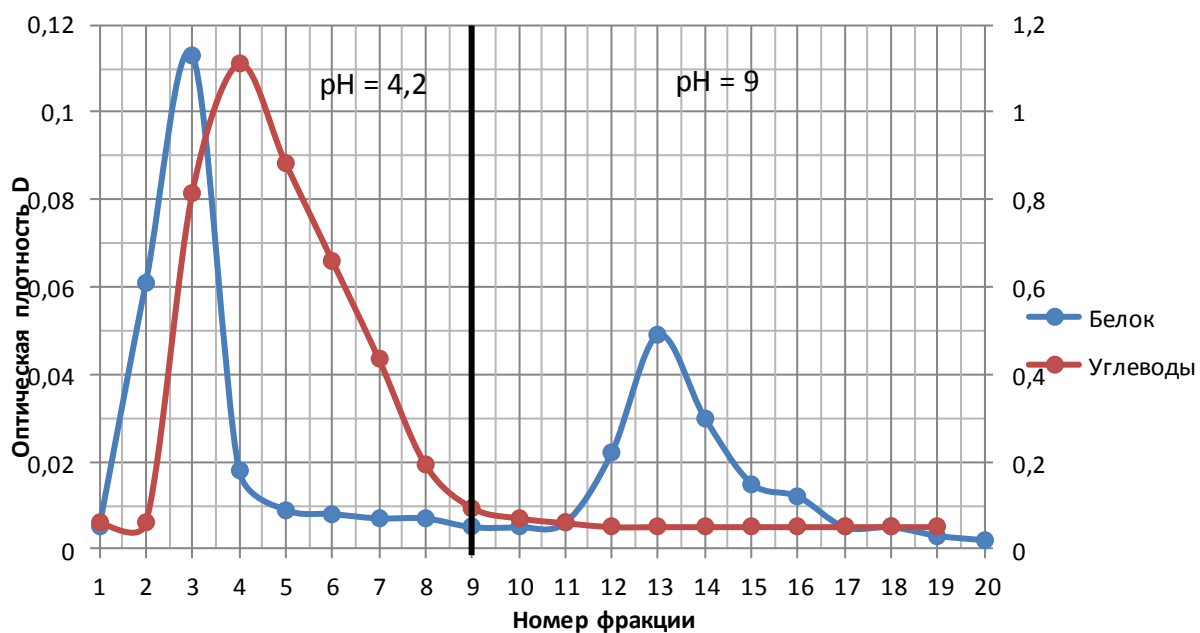


Рис. 2. Профиль элюции пептидов на КМ-целлюлозе, объём пробы 200 мкл

Далее многократно проводили катионообменную хроматографию при неизменных параметрах для того, чтобы получить сравнительно большое количество маточного раствора катионных пептидов.

Ход хроматографического разделения

На колонку наносили изначально профильтрованный через фильтр «красная лента» концентрированный раствор мёда (смесь углеводов мёда, пептидов, пигментов и других молекул с массой меньше 10 кДа), в объёме 0,2 мл микродозатором под столб начального элюента, чтобы исключить перемешивание (разделяемая смесь оставалась внизу из-за разницы плотностей). Затем обеспечивали равномерный приток начального буферного раствора и собирали фракции по 2 мл, скорость элюции — 2 мл/м.

При катионной хроматографии после того, как были собраны семь фракций, элюцию останавливали, верхний слой начального буферного раствора (Na-ацетатный буферный раствор с концентрацией 0,2 М и pH = 4,2) аккуратно удаляли. После проводили смену элюента (на Na-цитратный буферный раствор с концентрацией 0,2 М и pH = 6), в третий раз смену проводили после сбора четырнадцатой фракции на 0,2 М трис-HCl буферный раствор (pH = 9). Использование двух буферных растворов для десорбции катионных пептидов вместо одного объясняется более эффективным разделением катионных пептидов в зависимости от их заряда.

Профиль элюции при катионной хроматографии имеет 2 пика, вместо трёх. При изменении pH = 4,2 на pH = 6, путем замены Na-ацетатного буферного раствора на Na-цитратный, не произошло обмена ионными группировками между элюентом и носителем, и связанные с матрицей пептиды не элюировались, что может свидетельствовать о нецелесообразности использования цитратного буферного раствора для отмывки пептидов. При таком разделении пептидов сорбция углеводов не происходит, и они выходят в свободном объёме колонки с несвязавшимися пептидами. После смены буферного раствора чётко виден 1 пик,

свидетельствующий о том, что в мёде содержится катионная группа пептидов.

Таким образом, с помощью метода ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе, нам удалось выделить положительно заряженные группы пептидов до 10 кДа, очищенные от углеводного компонента, которые не сорбировались на колонке и вышли в свободном объёме.

3.2 Катионообменная хроматография раствора перги

На колонку наносили профильтрованный через фильтр «красная лента» концентрированный раствор перги (смесь белков, пептидов, углеводов и других молекул с массой меньше 10 кДа), в объёме 0,150 мл микродозатором под столб начального элюента, Na-ацетатного буферного раствора с $\text{pH} = 4,2$, чтобы избежать перемешивания. После обеспечивали равномерный приток элюента и собирали фракции по 1,5 мл, скорость элюции — 1,5 мл/м. Смену элюента (на 0,2 М трис-HCl буферный раствор ($\text{pH} = 9$)) проводили после сбора девятой фракции.

Профиль элюции при катионной хроматографии раствора перги имеет также 2 пика, как и при хроматографии раствора мёда, поэтому нецелесообразно использование цитратного буферного раствора для отмывки пептидов. Что касается углеводов, они не сорбируются и выходят в свободном объёме колонки с несвязавшимися пептидами.

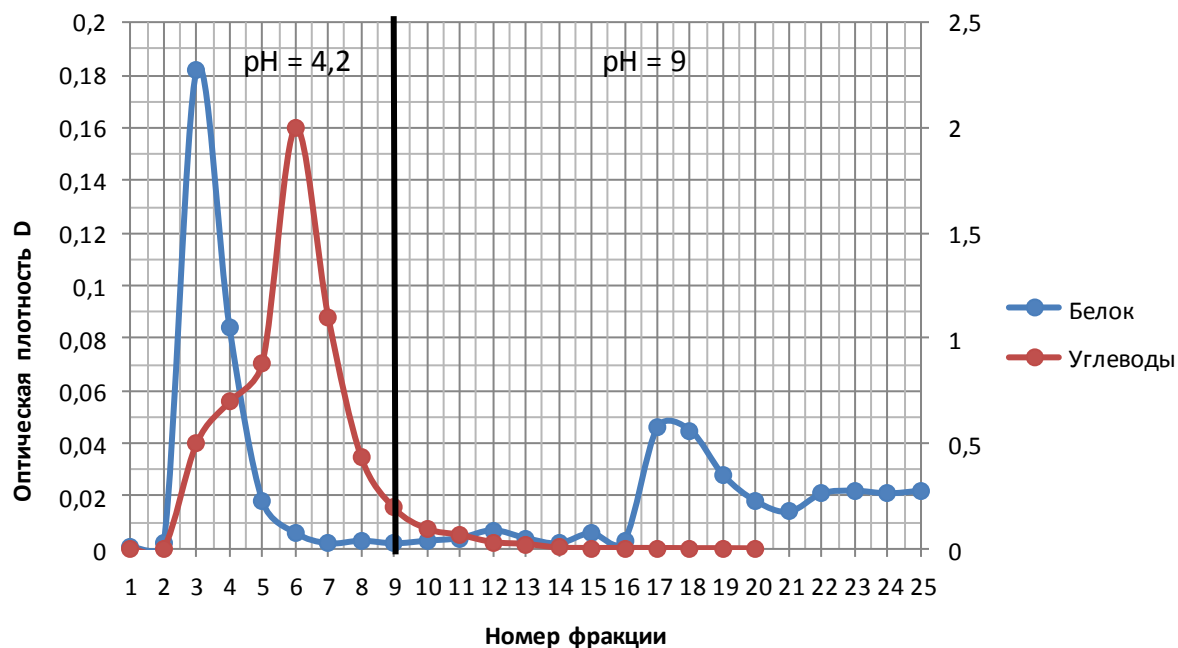


Рис. 3. Профиль элюции пептидов раствора перги на КМ-целлюлозе

Таким образом, была выделена фракция катионных пептидов раствора перги с молекулярной массой до 10 кДа, очищенных от углеводного компонента.

3.3 Гель-фильтрация раствора трутневого расплода

3.3.1 Определение свободного и внутреннего объёмов колонки, калибровка колонки

Для того, чтобы определить свободный и внутренний объем колонки, через нее пропустили 0,2%-ный растворы голубого декстрана и рибофлавина объемом 0,5 мл, а также раствор трипсин-ингибитора с концентрацией в 1 мг/мл, собирали фракции объемом 1 мл. В качестве элюирующего раствора использовали дистиллированную воду. Затем измерили величину оптической плотности собранных фракций на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кювете с длиной оптического пути 1 см при длинах волн $\lambda = 750$ нм (максимум поглощения голубого декстрана), $\lambda = 445$ нм (максимум поглощения рибофлавина), содержание ингибитора трипсина в фракциях определяли

спектрофотометрическим методом. По полученным результатам были построены графики элюции, которые отображены на рисунке 4.

Складывая объёмы всех фракций голубого декстрана, которые вышли до максимума поглощения при 750 нм, нашли свободный объём колонки, равный 11 мл. Внутренний объём колонки вычисляли как разность между объёмом элюции рибофлавина и свободным объёмом по формуле:

$$V_{\text{внутр.}} = V_{\text{эл. (рибофл.)}} - V_{\text{своб.}}$$

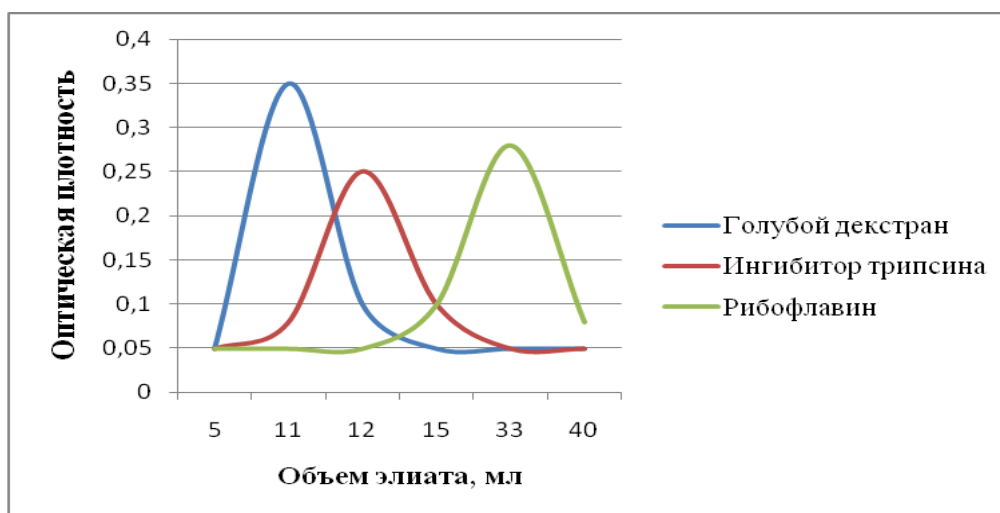


Рис. 4. Профиль элюции раствора голубого декстрана, рибофлавина и ингибитора трипсина

По результатам калибровки колонки получили уравнение прямой $Y(x) = -0.0809524 \cdot x + 5.2714286$, которая отображает зависимость логарифма молекулярной массы исследуемого вещества от номера фракции, в которой и вышло это вещество.

3.3.2 Получение фракций низкомолекулярных пептидов методом гель-фильтрации

Для получения фракции низкомолекулярных пептидов, 0,5 мл исследуемого материала, предварительно осажденного 10% раствором ТХУ, нанесли на колонку, заполненную сефадексом G-25. Элюирование пептидов с колонки проводили дистиллированной водой. Собирали фракции объемом

1,5 мл, а затем определяли оптическую плотность фракций на фотоэлектроколориметре КФК-3 при длине волны $\lambda = 750$ нм.

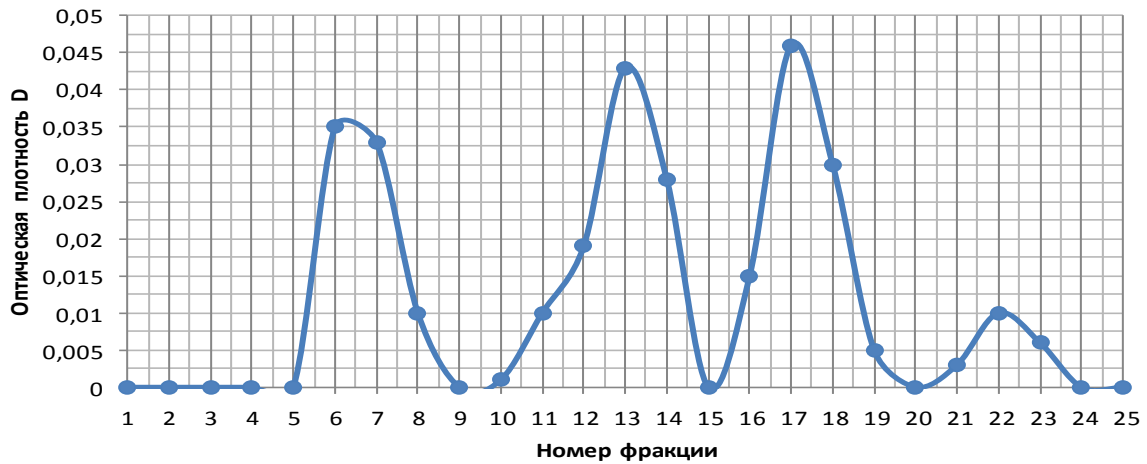


Рис. 5. Профиль элюции пептидов 20% раствора трутневого расплода

Первый пик представлен пептидами, вышедшими в свободном объеме, с молекулярной массой 4786 Да, второй и третий пики содержат пептиды с молекулярными массами 3895-4219 Да, а четвертый пик представлен пептидами с молекулярной массой 3491 Да.

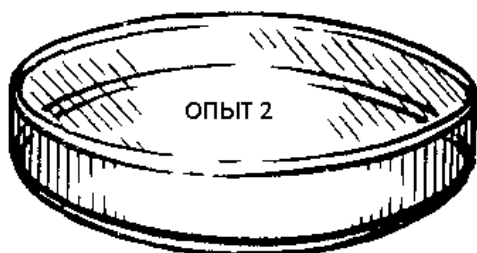
3.4 Изучение антибактериальной активности фракций белков и пептидов мёда, перги и трутневого расплода

На первом этапе нами были изучены антибактериальные свойства фракций белков и пептидов до 10 кДа мёда и перги до и после ультрафильтрации, а также катионные фракции пептидов после ионообменной хроматографии, фракции пептидов трутневого расплода после гель-фильтрации в испытаниях на микробиологическую чистоту. В качестве отрицательного контроля выступал бычий сывороточный альбумин, а в качестве положительного — ампициллин. Схема эксперимента представлена на рисунках 6, 7.



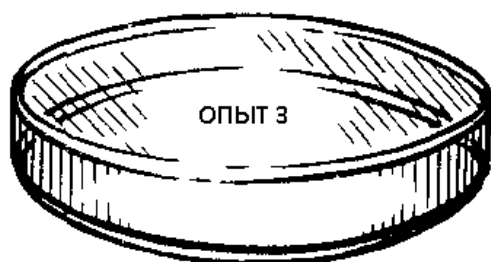
+ 20%, 15%, 10% растворы мёда/перги
(наносимый объем 10мкл)

Питательная среда + 7,5 мл *E. Coli*,
концентрацией 5×10^7 млн/клеток



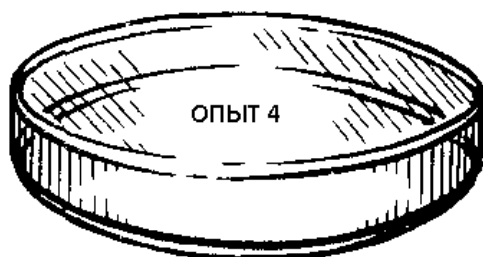
+ 20%, 15%, 10% растворы мёда/перги
после ультрафильтрации (м.м. до 10 кДа)
(наносимый объем 10мкл)

Питательная среда + 7,5 мл *E. Coli*,
концентрацией 5×10^7 млн/клеток



+ катионные пептиды из мёда/перги
после ИОХ, концентрация 10; 5; 2,5
мкг/10 мкл

Питательная среда + 7,5 мл *E. Coli*,
концентрацией 5×10^7 млн/клеток



+ ампициллин с концентрацией 10; 5;
2,5 мкг/10 мкл

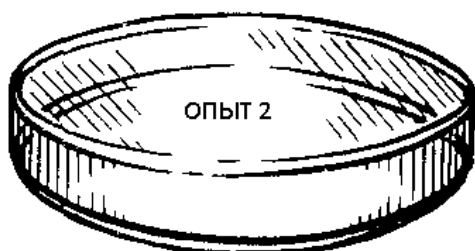
Питательная среда + 7,5 мл *E. Coli*,
концентрацией 5×10^7 млн/клеток

*Рис. 6. Схема проведения исследования антибактериальной активности исследуемых биопрепаратов на культуре грамотрицательной бактерии *E. Coli* чашечным агаровым поверхностным методом*



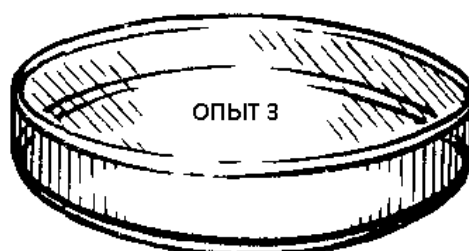
+ 20%, 15%, 10% растворы мёда/перги
(наносимый объем 10мкл)

Питательная среда +7,5 мл *B. Subtilis*,
концентрацией 5×10^7 млн/клеток



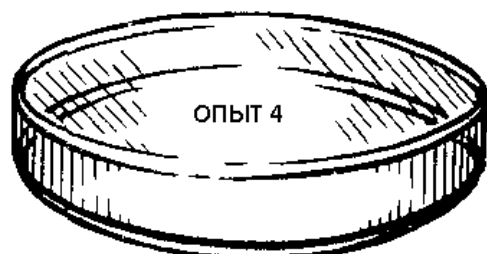
+ 20%, 15%, 10% растворы мёда/перги
после ультрафильтрации (м.м. до 10 кДа)
(наносимый объем 10мкл)

Питательная среда +7,5 мл *B. Subtilis*,
концентрацией 5×10^7 млн/клеток



+ катионные пептиды из мёда/перги
после ИОХ, концентрация 10; 5; 2,5
мкг/10 мкл

Питательная среда +7,5 мл *B. Subtilis*,
концентрацией 5×10^7 млн/клеток



+ ампициллин с концентрацией 10; 5; 2,5
мкг/10 мкл

Питательная среда +7,5 мл *B. Subtilis*,
концентрацией 5×10^7 млн/клеток

*Рис. 7. Схема проведения исследования антибактериальной активности исследуемых биопрепаратов на культуре грамположительной бактерии *B. Subtilis* чашечным агаровым поверхностным методом*

Для исследований на чашках Петри с питательной средой на основе агара использовали растворы белков и пептидов мёда, перги и трутневого расплода.

Для этого агаровые питательные среды, содержащие грамположительные и грамположительные спорообразующие бактерии, вносят в количестве 7,5 мл в каждую стерильную чашку Петри с диаметром 90 мм и оставляют для застывания. Затем вносят на твердую агаровую среду в лунки исследуемые образцы: растворы мёда, перги различной концентрации до и после ультрафильтрации, фракции пептидов мёда, перги до 10 кДа; катионные пептиды мёда и перги, фракции пептидов трутневого расплода после гель-фильтрации, отрицательный контроль – бычий сывороточный альбумин, положительный контроль – ампициллин. Чашки Петри термостатируют при $t = 35-37^{\circ}\text{C}$ в течение суток. Антибактериальную активность определяют по размерам зон задержки роста бактерий. Результаты размера зон ограниченного роста бактерий обрабатывали статистически методом многофакторного дисперсионного анализа с использованием программы Statistica 6.0. Результаты приведены на рисунках 8-11.

В чашках Петри после инкубации из-за появления видимых колоний бактерий *E. coli* и *B. subtilis* среда стала непрозрачной, за исключением области, где были нанесены исследуемые образцы мёда и перги. В этих областях отсутствует рост микроорганизмов, вызванный подавлением их роста антибактериальными веществами. В чашках Петри, в которые были нанесены образцы трутневого расплода, наблюдался интенсивный рост данных микроорганизмов, следовательно, не выявлена антибактериальная активность пептидов трутневого расплода.

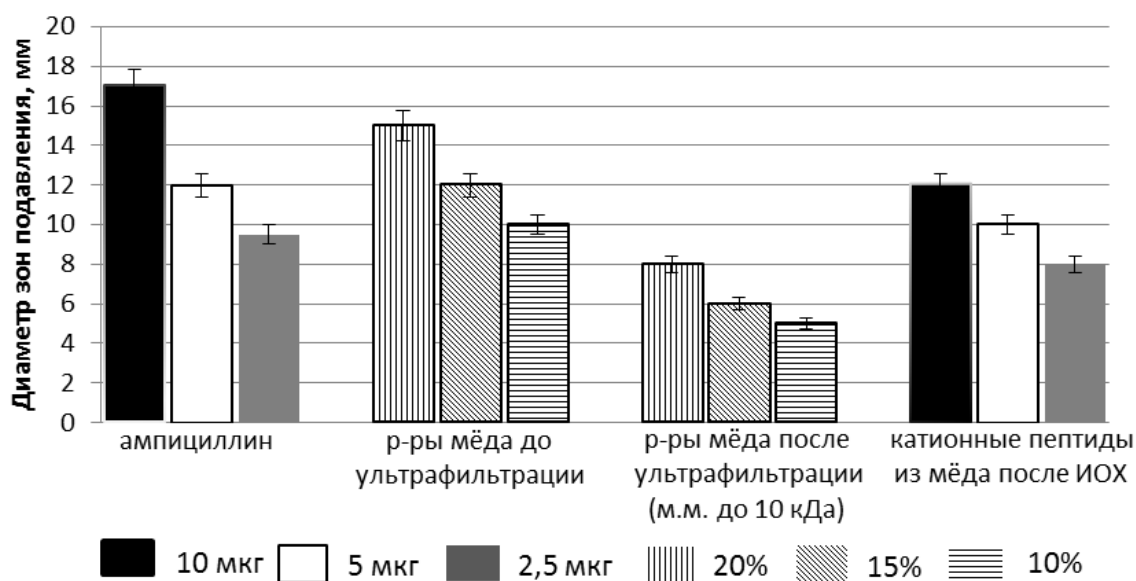


Рис. 8. Исследование антибактериальной активности раствора мёда до и после ультрафильтрации, катионных пептидов мёда чашечным агаровым методом на культуре бактерий *E. coli*

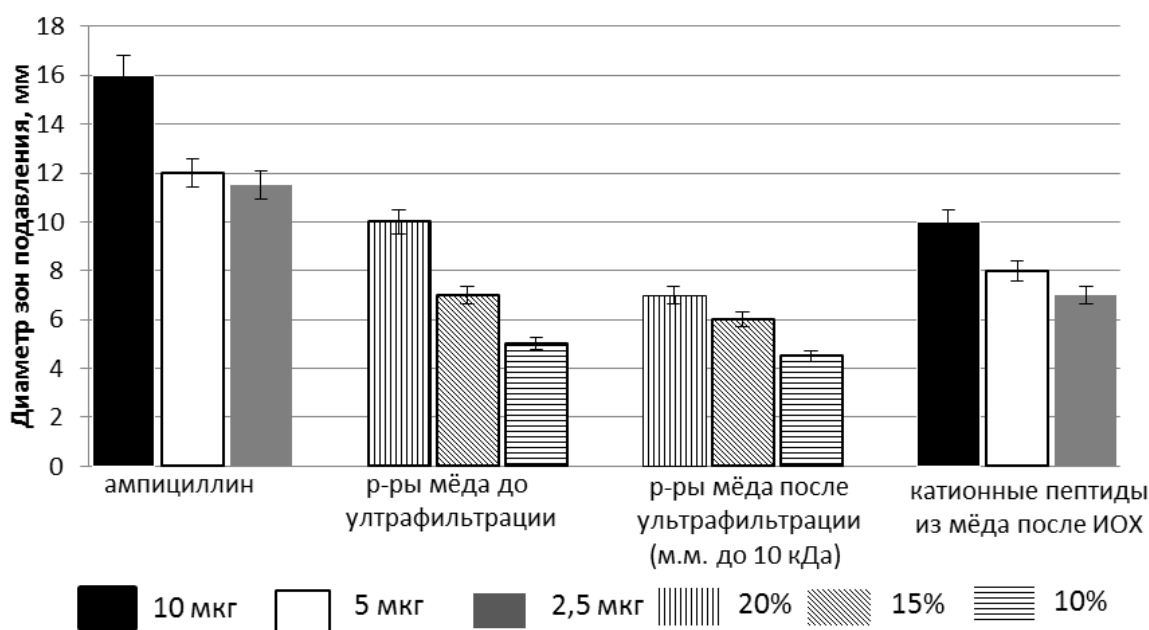


Рис. 9. Исследование антибактериальной активности раствора мёда до и после ультрафильтрации, катионных пептидов мёда чашечным агаровым методом на культуре бактерий *B. subtilis*

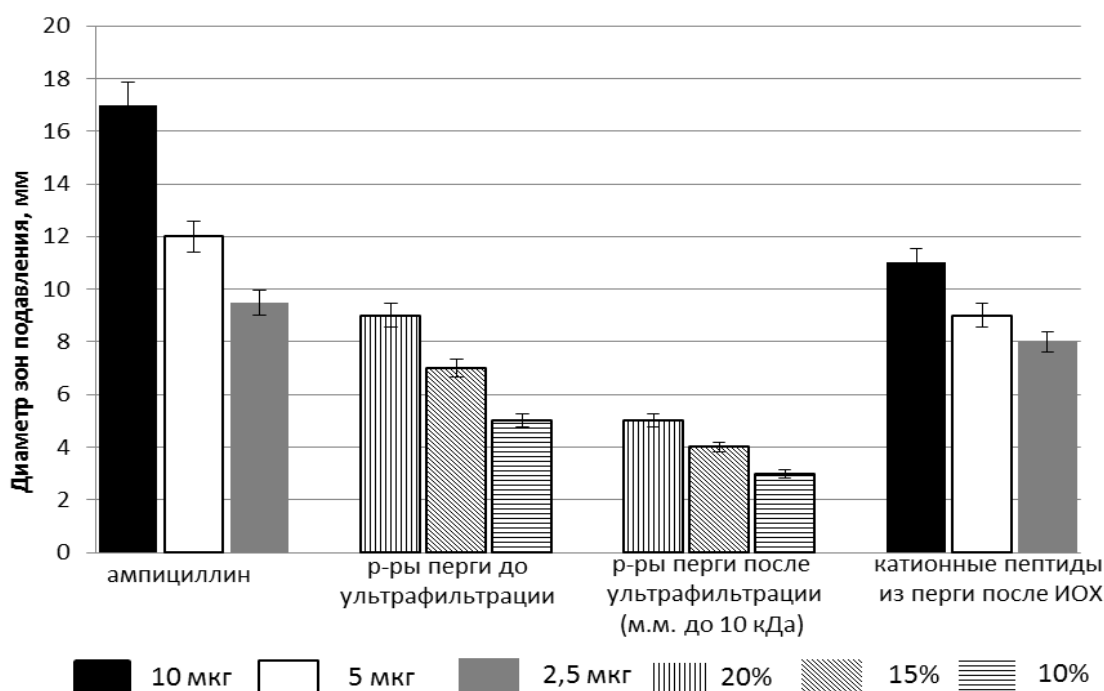


Рис. 10. Исследование антибактериальной активности раствора перги до и после ультрафильтрации, катионных пептидов перги чашечным агаровым методом на культуре бактерий *E. coli*

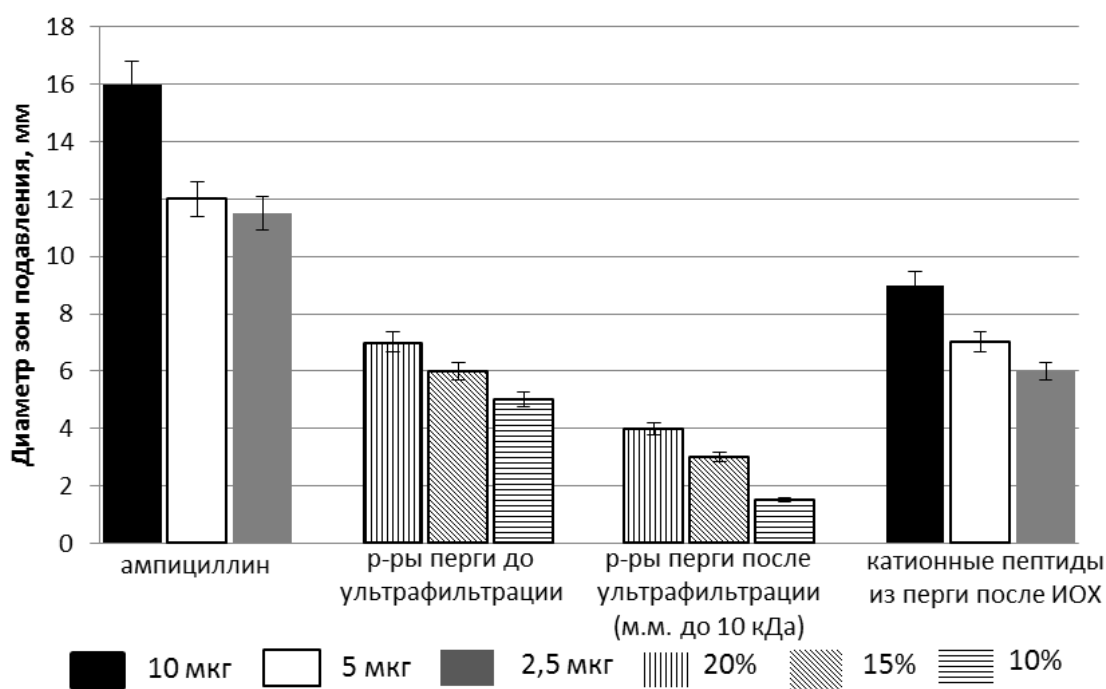


Рис. 11. Исследование антибактериальной активности раствора перги до и после ультрафильтрации, катионных пептидов перги чашечным агаровым методом на культуре бактерий *B. subtilis*

Из диаграмм видно, что при тестировании фракций пептидов на культурах *E. coli* и *B. subtilis* наибольшая антибактериальная активность (причем близкая к действию антибактериального препарата — ампициллина) обнаружена в растворах мёда и перги до ультрафильтрации, а также после ионообменной хроматографии и концентрирования полученных катионных пептидов. Это связано с тем, что мёд и перга содержат различные компоненты, обладающие антибактериальными свойствами. Кроме того антибактериальная активность перги почти такая же, как и у мёда, что обусловлено внесением мёда в пергу при её образовании. Наличие высоких зон задержки роста микроорганизмов, в чашках Петри, куда были нанесены катионные пептиды мёда и перги после концентрирования, говорит об бактерицидных свойствах данной группы пептидов.

Самый низкий уровень зон задержки роста *E. coli* и *B. subtilis* обнаружен в чашках Петри с пептидами с м.м. до 10 кДа после ультрафильтрации, это связано с концентрированием растворов мёда и перги, содержащих углеводный компонент, который способствует росту микроорганизмов. Помимо этого отмечена такая закономерность, чем больше концентрация исследуемых растворов мёда и перги, тем больше зоны задержки роста микроорганизмов. Штамм *E. coli* оказался наиболее чувствителен к растворам мёда и перги, чем *B. subtilis*. Что касается раствора пептидов трутневого расплода, то он не показал никаких антибактериальных свойств.

Таким образом, нами был разработан способ получения пептидов с антибактериальным действием из таких пчелопродуктов, как мёд и перга.

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология выделения пептидов из различных продуктов пчеловодства, основанная на ультрафильтрации, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии водных растворов мёда, перги, трутневого расплода.
2. Выявлена антибактериальная активность растворов мёда и перги в отношении культур грамотрицательных бактерий *E. coli* и грамположительных бактерий *B. subtilis*, в то время как раствор трутневого расплода не проявляет антибактериальный эффект.
3. Установлено, что катионные пептиды мёда и перги обладают выраженным бактерицидным действием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айвазов, Б. В. Практическое руководство по хроматографии / Б. В. Айвазов. — М.: Высшая школа, 1968. — 279 с.
2. Белик, Э.В. Большой современный справочник пчеловода / Э. В. Белик. — Донецк, 2004. — 512 с.
3. Бози, Г. Количество определенных аминокислот в некоторых сортах пыльцы, собранных медоносной пчелой / Г. Бози, Д. Ричардент, Д. Альбарс // Материалы XXV Международного конгресса по пчеловодству в Гренобле. — Бухарест: Апимондия, 1975. — С. 466-471.
4. Бондарчук, Л. И. АТР-азная и фосфатазная активность трутневого расплода / Л. И. Бондарчук, О. С. Стахман // Укр. биохим. журн. — 2004. — Т. 76, №6. — С. 123-126.
5. Брок, Т. Мембранная фильтрация: пер. с англ. / Т. Брок. — М.: Мир, 1987. — 464 с.
6. Бурмистрова, Л. А. Метаболическая оценка гонадотропного эффекта трутневого расплода / Л. А. Бурмистрова, В. Г. Макарова, А. И. Рябков, К. В. Савилов // Апитерапия сегодня: Сб. 7 Материалы VII научно-практической конференции по апитерапии (Рязань, 3-5 октября, 1999). — Рыбное, НИИ пчеловодства, 2000. — С. 95-97.
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. 100-103.
8. Доусон, Р. Справочник биохимика / Р. Доусон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. — М.: Мир, 1991. — 544 с.
9. Илиешиу, Н. В. Апиларнил новый естественный продукт пчеловодства личиночного происхождения / Н. В. Илиешиу // XXIX

Международный конгресс по пчеловодству. — Бухарест: Апимондия, 1983. — С. 398.

10. Ильясов, Р. А. Дефенсины в противои инфекционной защите медоносной пчелы / Р. А. Ильясов, Л. Р. Гайфуллина, Е. С. Салтыкова, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 2012. — Т. 48. — №5.

11. Ильясов, Р. А. Роль антимикробного пептида дефенсина в иммунитете пчелиной семьи / Р. А. Ильясов, Л. Р. Гайфуллина, Е. С. Салтыкова, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Пчеловодство. — 2014. — №1.

12. Кокряков, В. Н. Антибиотические пептиды как эффекторные и регуляторные факторы врожденного иммунитета / В. Н. Кокряков, Г. М. Алёшина, О. В. Шамова, Т. В. Овчинникова // Тезисы докладов объединенного иммунологического форума. — Екатеринбург, 2004. — Т. 9, №1. — С. 73.

13. Кривцов, Н.И. Продукты пчеловодства и их композиции в апитерапии. Апитерапия сегодня (сборник II) / Н.И. Кривцов // Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции «Апитерапия-XXI век». —Рыбное, 2004. — С. 3-8.

14. Монахова, В. Г. Некоторые вопросы получения, хранения и использования пыльцы / В. Г. Монахова // Биологически активные продукты пчеловодства и их использование. — Горький, 1990. — С.90 – 96.

15. Наумкин, В. П. Сравнительная оценка аминокислотного состава цветочной пыльцы / В. П. Наумкин // Биологически активные продукты пчеловодства и их использование. — Горький, 1990. — С. 97-101.

16. Неделька, В. И. Аминокислотный состав трутневого молочка / В. И. Неделька, А. Ф. Неделька, В. В. Петренко // Апитерапия сегодня: Мат. конф. по апитерапии. — Рыбное, 1994. — С. 32-33.

17. Овчинникова, Т. В. Структурно-функциональное исследование природных пептидных антибиотиков / Т. В. Овчинникова. — автореф. дис. д-ра хим. наук. — М., 2011. — 77 с.
18. Остерман, Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. — М.: Наука, 1985. — 536 с.
19. Резяпкин, В. И. Лабораторный практикум по биохимии и биофизике [Электронный ресурс] / В. И. Резяпкин, В. С. Слышенков, И. Б. Заводник, В. Н. Бурдь, Л. И. Сушко и др. — Гродно: ГрГУ им. Я. Купалы, 2009. — Режим доступа: http://ebooks.grsu.by/lab_pr_bio/index.htm
20. Сельцовский, А. П. Лечение медом, другими продуктами пчеловодства и лекарственными травами / А. П. Сельцовский, Л. Б. Лазебник, В. И. Касьяненко и др. — М.: Анахарсис, 2007. — 238 с.
21. Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. — М.: Мир, 1985. — 358 с.
22. Фритц, Дж. Ионная хроматография: Пер с англ. / Дж. Фритц, Д. Гьерде, К.Поланд. — М.: Мир, 1984. — 224с.
23. Шишкова, Ю. С. Изучение антимикробной активности некоторых двухосновных карбоновых кислот в сочетании с прополисом / Ю. С. Шишкова, Е. В. Симонян, О. С. Абрамовских и др. — Медицинский альманах, 2014. — №1 (31). — 101 с.
24. Шульгина, М. В. Разработка принципов изучения антибактериального действия веществ на доклиническом этапе создания лекарственных средств / М. В. Шульгина. — автореферат дисс. докт. биол. Наук. — Москва.: ММА им. И. П. Сеченова, 1999. — 47 с.
25. Allen, H. K. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals / H. K. Allen, U. Y. Levine, T. Looft, M. Bandrick, T. A. Casey // Trends Microbiol. — 2012. — P. 114–119.
26. Almeida-Murailan, L.B. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee-pollen pellets / L. B. Almeida-Murailan, L. C. Pamplona,

S. Coimbra, O. Barth // *Journal of Food Composition and Analysis*. — 2005. — №18. — P. 105-111.

27. Alvarez-Suarez, J. M. Contribution of honey in nutrition and human health / J. M. Alvarez-Suarez, S. Tulipani, S. Romandini, E. Bertoli, M. Battino // *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*. — 2010. — №3. — P. 15–23.

28. Ando, K. *Biochemistry* / K. Ando, S. Natori. — 1988. — 1721 p.

29. Basim, E. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens / E. Basim, H. Basim, M. Ozcan // *Journal of Food Engineering*. — 2006. — №77. — P. 992-996.

30. Bogdanov, S. Honey for nutrition and health / S. Bogdanov, T. Jurendic, R. Sieber et al // *Am J Coll Nutr*. — 2008. — №27. — P. 677–689.

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

32. Casteels, P. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis Mellifera*) / P. Casteels, C. Ampe, J. van Damme, C. Elicone, M. Fleming, F. Jacobs, P. Tempst // *Eur. J. Biochem*. — 1990. — №187. — P. 381-386.

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

34. Chow, J. Probiotics and prebiotics: a brief overview / J. Chow // *J Ren Nutr*. — 2002. — №12. — P. 76–86.

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

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

37. Jenssen, H. W. Peptide antimicrobial agents / H. W. Jenssen, P. Hamill, R. E. Hancock // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2006. — №19. — P. 491–511.
38. Kris, De Smet. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins / De S. Kris, C. Roland // *Biotechnology Letters.* — 2005. — V. 27, №13. — P. 1337–1347.
39. Lai, Y. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defence / Y. Lai, R. L. Gallo // *Trends in Immunology.* — 2009. — vol. 30, Issue 3. — P. 131-141.
40. Lee, S. *Biochim. Biophys. Acta* / S. Lee, H. Mihara, H. Aoyagi, T. Kato, N. Izumiya and N. Yamasaki. — 1986. — 862 p.
41. Lees, P. Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans / P. Lees, Shojaee Aliabadi F // *International Journal of Antimicrobial Agents.* — 2002. — №19. — P. 269-284.
42. Louis, A. C. *Antimicrobial Resistance and Food Safety Methods and Techniques* / A. C. Louis. — 2015. — 323 p.
43. Martos, I. Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia / I. Martos, F. Ferreres, L. Yao et al // *J Agric Food Chem.* — 2000. — №48. P. 4744–4748.
44. Monisha, G. Scott. The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses / M. G. Scott, D. J. Davidson, M. R. Gold, D. Bowdish, R. E. W. Hancock // *The Journal of Immunology.* — 2002. — Vol. 169, №7. — P. 3883-3891.
45. Morais, M. Honeybee-collected pollen from five portuguese natural parks: palynological origin phenolic content antioxidant properties and antimicrobial activity / M. Morais, L. Moreira, X. Feas, L. M. Estevinho // *Food and Chemical Toxicology.* — 2011. — №49. — P. 1096-1101.
46. Park, C.B. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin ii: Buforin ii kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions / C. B. Park, H. S. Kim, S. C. Kim // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1998. — №244. — P. 253–257.

47. Pérez, R.A. Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry / R. A. Pérez // *J Agric Food Chem.* — 2002. — №50. — P. 2633–2637.
48. Taormina, P. J. Inhibitory activity of honey against food-borne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power / P. J. Taormina, B. A. Niemira, Beuchat L. R. // *Int J Food Microbiol.* — 2001. — №69. — P. 217–225.
49. Wei-Fen, Li. Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure-function relationships and mode of action / Wei-Fen Li, Guo-Xia Ma, Xu-Xia Zhou // *Peptides.* — 2006. — Vol. 27, Issue 9. — P. 2350-2359.
50. Weston, R. J. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys / R. J. Weston, L. K. Brocklebank, Y. Lu // *J Food Chem.* — 2000. — №70. — P. 427–435.
51. Zeina, B. The effects of honey on Leishmania parasites: an in vitro study / B. Zeina, B.I. Zohra, al S. Assad // *J Trop Doct.* — 1997. — №27 (1). — P. 36–38.
52. Zhang, L. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes / L. Zhang, A. Rozek, R. E. Hancock // *J. Biol. Chem.* — 2001. — №276. — P. 35714–35722.

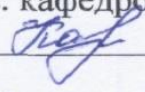
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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
 Г.А. Карпова
« 2 » 11 2016 г.

Задание

По ВКР студента Ступиной Марии Викторовны

Тема работы: «Выделение, очистка бактерицидного фактора из продуктов пчеловодства».

Утверждена приказом по Университету от « 6 » декабря 201 6 г. № 11919/0

Срок сдачи студентом законченной работы « 26 » март 201 7 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Анализ литературы по теме исследования, написание введения, глав обзора литературы («Виды пчелопродуктов»; «Мёд, пыльца (обножка) и перга, трутневый расплод, их химический состав»; «Антибактериальные свойства мёда, пыльцы и трутневого расплода»; «Антибактериальные пептиды из продуктов пчеловодства»; «Апидаецин, антибактериальный пептид медоносных пчел»; «Структурные свойства и биологическая активность апидаецинов»; «Характеристика абаецина, основного антибактериального пептида медоносных пчёл (<i>Apis Mellifera</i>)»)	ноябрь 2016-апрель 2017	Выполнено
2	Методы приготовления исследуемых растворов мёда, перги и личинок трутневого расплода	ноябрь-декабрь 2016	Выполнено
3	Тангенциальная ультрафильтрация, ионообменная хроматография раствора мёда и перги гель-фильтрация трутневого расплода	декабрь 2016-январь 2017	Выполнено
4	Определение содержания белка методом Лоури, метод определения углеводов реакцией Селиванова	декабрь 2016-январь 2017	Выполнено
5	Тестирование препарата на бактерицидность	декабрь 2016-февраль 2017	Выполнено
6	Статистическая обработка результатов исследования, анализ полученных данных	март-апрель 2017	Выполнено
7	Написание глав «Материалы методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение»	февраль-май 2017	Выполнено

Дата выдачи задания «2» ноябре 2016 г.

Руководитель Степанов / М.Т. Георгиев

Задание принял к исполнению С