

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСТРАКЦИИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ТКАНЕЙ *BOS TAURUS*

Лукинова Е.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова», г. Москва

Аннотация. Были подобраны оптимальные режимы экстракции слизистых оболочек пограничных зон тканей *Bos taurus* с целью выделения антимикробных пептидов. Для тканей носовой полости оптимальный режим соответствовал скорости оборотов мешалки 400 об/мин в течение 90 минут (выход целевых веществ – 14,03 г белка/л), для тканей ротовой полости – 60 минут при 800 об/мин с итоговым выходом 26,95 г белка/л.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, резистентность, антибиотики, экстракция, хранение мяса.

В связи с участвовавшими случаями проявления резистентности микроорганизмов к антибиотикам, а также трофическим накоплением антибиотических веществ, в мире остро стоит проблема поиска альтернативных прогрессивных технологий комплексной обработки мяса и мясных продуктов без указанных негативных эффектов [1].

На основе научных изысканий было выдвинуто предположение о присутствии антимикробных пептидов в слизистых оболочках пограничных зон тканей животных, ввиду их интенсивного контакта в процессе жизнедеятельности с патогенами различной природы, находящихся в окружающей среде [2].

Последние литературные данные свидетельствуют о наличии антимикробных пептидов, в частности, дефензинов практически во всех видах организмов: в яде скорпиона (*Buthus martensii*, *Hadogenes*) [3], ячмене (*Hordeum vulgare*) [4], кожных покровах атлантической трески (*Gadus morhua*), [5] осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) [6], слизи устрицы (*Crassostrea virginica*) [7], кожных покровах саламандры (*Andrias davidianus*) [8], лягушки (*Rana phaeocephala*, *Ascaphidae*, *Dicroglossidae*, *Ranidae*, *Laevis Xenopus*, *Sphaenorhynchus chuslacteus* (*Hylidae*)) [9, 10]; тромбоцитах курицы домашней (*Gallus gallus*) [11], лейкоцитах козы (*Capra Hircus*) [12], в слюне и сыворотке крови крупного рогатого скота [13].

На базе Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова» ведется поиск альтернативных противомикробных веществ, предположительно присутствующих в слизистых оболочках пограничных зон тканей сельскохозяйственных животных.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись водно-солевые экстракты ротовой и носовой полостей *Bos taurus*.

Для получения экстрактов сырье измельчали на мясорубке с диаметром отверстий 3-5 мм (KENWOOD, Англия). Затем проводили экстракцию на лабораторной диспергирующей установке (ЛДУ, Россия), в качестве экстрагента использовали 0,9% раствор натрия хлорида, соотношение 1:2, при температуре 4-5°C. Скорость перемешивания варьировали (400, 600 и 800 об/мин). Пробы отбирали каждые 5 минут в течение первых 30 минут, далее каждые 30 минут в течение 1 часа, затем каждый час.

Отобранные пробы центрифугировали на центрифуге 6М («ELMI», Латвия) в течение 8 мин при 3500 об/мин, отбирали надосадочную жидкость и проводили измерение белка биуретовым методом на фотометре BioChem SA (HTI, США).

Результаты

При проведении экстракции тканей носовой полости производили варьирование скорости перемешивания (рис. 1). Было отмечено, что при 400 об/мин в начальной точке концентрация белка в жидкой фазе составила 3,9 г/л, максимальный выход белково-пептидных веществ наблюдался по истечении 90 минут (14,03 г/л) с выходом на стабильное плато. При 600 об/мин в начальной точке концентрация белка равнялась 3,03 г/л, затем наблюдалось резкое увеличение концентрации белка до 12,15 г/л (30 мин.), с последующим снижением до 10,5 г/л на 4 час экстракции. При 800 об/мин в начальной точке концентрация белка составила 4,4 г/л, затем наблюдалось постепенное увеличение до 10,4 г/л (30 минут), далее, напротив, снижение до 9,7 г/л на 3 час процесса. Опытным путем было определен оптимальный режим экстракции ткани носовой полости *Bos taurus* 90 минут при 400 об/мин, где выход целевых веществ составил 14,03г/л.

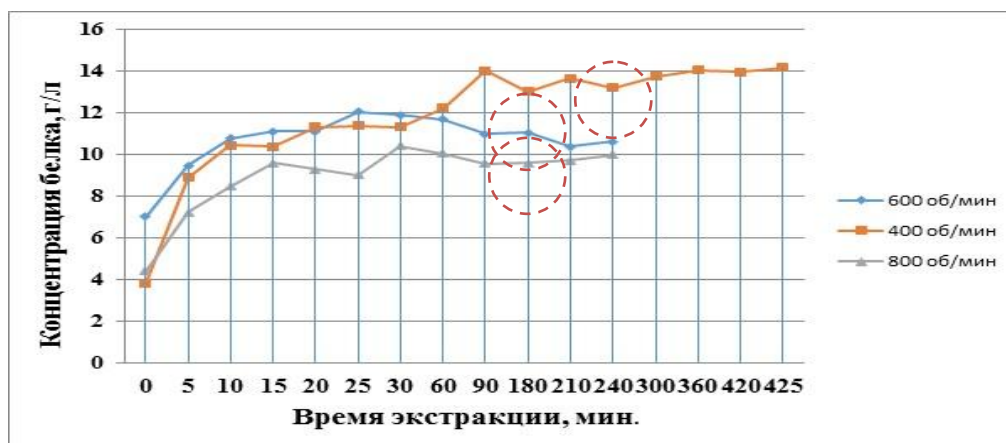


Рис. 1. Оптимизация режимов экстракции носовой полости *Bos taurus*.

При проведении экстракции тканей ротовой полости также производили варьирование скорости перемешивания (рис. 2). Наблюдалось, что при 400 об/мин в начальной точке концентрация белка составила 4,43 г/л, затем было отмечено постепенное увеличение содержания белково-пептидных веществ до 22,68 г/л на 4 час процесса с последующим резким увеличением до 31,15 г/л на 6 час экстракции. При 600 об/мин в начальной

точке концентрация белка равнялась 1,86 г/л, затем наблюдался скачок до 21,73 г/л на 60 минуте экстракции с последующим резким снижением до 14,85 г/л, после 90 минут экстракции отмечалась стабилизация концентрации целевых веществ в экстрагенте в диапазоне 15,83 — 16,48 г/л . При 800 об/мин в начальной точке концентрация белка составила 2,87 г/л, с дальнейшим увеличением на 30 минуте экстракции до 26,95 г/л, затем постепенно снижалась до 19,55 г/л (3 часа). Оптимальный режим экстракции ткани ротовой полости *Bos taurus* время экстракции составило 30 минут, скорость оборотов мешалки – 800 об/мин, выход белково-пептидных веществ равнялся 26,95 г/л.



Рис. 2. Оптимизация режимов экстракции ротовой полости *Bos taurus*.

Выводы

Полученные данные позволили определить оптимальные режимы экстракции целевых веществ белково-пептидной природы из тканей ротовой и носовой полостей *Bos taurus*. Для тканей носовой полости этот режим соответствовал скорости оборотов мешалки 400 об/мин в течение 90 минут (выход целевых веществ – 14,03 г/л), для тканей ротовой полости 60 минут при 800 об/мин с итоговым выходом равным 26,95 г/л.

Литература

1. Кашинова Э.Б. Оптимизация технологических режимов выделения биологически активных веществ из сырья животного происхождения / Э.Б. Кашинова, Е.А. Котенкова, Е.А. Ертикеева, А.Г. Ахремко // Актуальная биотехнология. – 2016. – №1 (16). – С. 17–22.
2. Котенкова Е.А. Изучение тканей *Sus Scrofa* как перспективных источников веществ белково-пептидной природы с определенной биологической активностью / Е.А. Котенкова, Э.Б. Кашинова, Е.А. Ертикеева // Актуальная биотехнология. - 2016. - №3 (18). - С.139-143.
3. Zhong J. Transcriptomic analysis of the venom glands from the scorpion *Nadogenes troglodytes* revealed unique and extremely high diversity of

- the venom peptides / J. Zhong, X.-C. Zeng, X. Zeng, Y. Nie, L. Zhang, S. Wu, A. Bao // *Journal of Proteomics*.—2017.—V.150. —P. 40–62.
4. Bamdad F. Preparation and characterization of antimicrobial cationized peptides from barley (*Hordeum vulgare* L.) proteins /F. Bamdad, X. Sun, L.L. Guan, L. Chen // *LWT - Food Science and Technology*.— 2015. — V.63. —I.1. —P. 29–36.
 5. McDonald M. Structure–function relationships in histidine-rich antimicrobial peptides from Atlantic cod *Biochimica et Biophysica Acta* / M. McDonald, M. Mannion. D. Pike, K. Lewis, A. Flynn, A. M. Brannan, M.J. Browne, D. Jackman, L. Madera. M. R. Power Coombs, D. W. Hoskin, M. L. Rise, V. Booth // (*BBA*) - *Biomembranes*.— 2015.— V.1848. — I.7. — P.1451–1461.
 6. Шамова О. В. Аципенсины – новые антимикробные пептиды из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* / О.В. Шамова, Д.С. Орлов, С.В. Баландин, Е.И. Шрамова, Е.В. Цветкова, П.В. Пантелеев, Ю.Ф. Леонова, А.А. Тагаев, В.Н. Кокряков, Т.В. Овчинникова // *Acta naturae*. – 2014. –Т. 6, № 4 (23).—С.105–115.
 7. Espinosa E. P. Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* / E.P. Espinosa, A. Koller, B. Allam // *Journal of Proteomics*. —2016.—V. 132. —P.63–76.
 8. Geng X. Proteomic analysis of the skin of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) / X. Geng, H. Wei, H. Shang, M. Zhou // *Journal of Proteomics*. —2015.—V.119. —P.196–208.
 9. Conlon J. M. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents / J.M. Conlon, M. Mechkarska, M.L. Lukic, P.R. Flatt // *Peptides*. —2014.—V.57. — P.67–77.
 10. Conlon J.M. A family of antimicrobial and immunomodulatory peptides related to the frenatins from skin secretions of the Orinoco lime frog *Sphaenorhynchus lacteus* (Hylidae) / J.M. Conlon, M. Mechkarska, G. Radosavljevic, S. Attoub, J.D. King, M.L. Lukic, S. McClean // *Peptides*. —2014.—V. 56. —P. 132–140.
 11. Сычева М.В. Применение электроаналитических и сепарационных методов исследования для оценки механизма биологической активности антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней / М.В. Сычева, А.С. Васильченко, А.А. Кульсарин, Е.А. Рогожин, Ю.И. Пешкова, О.Л. Карташова // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. —2016. —№ 1. — С.1–8.
 12. Шамова О.В. Мини-бактенецины ChVac7.5N α i и ChVac7.5N β – антимикробные пептиды из лейкоцитов козы *Capra hircus* / О.В. Шамова, Д.С. Орлов, М.С. Жаркова, С.В. Баландин, Е.В. Ямщикова, Д. Кнаппе, Р. Хоффманн, В.Н. Кокряков, Т.В. Овчинникова // *Acta naturae*. — 2016.—Т. 8, № 3 (30). —С. 147-157.
 13. Wan J. Recombinant plectasin elicits similar improvements in the performance and intestinal mucosa growth and activity in weaned pigs as an an-

tibiotic / J.Wan, Y. Li, D. Chen, B. Yu, G. Chen, P. Zheng, X. Mao, J. Yu, J. He // *Animal Feed Science and Technology*. –2016.–V. 211.–P. 216–226.