

### ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПЕПТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ *M. DOMESTICA*, И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

**Ларионова Ольга Сергеевна**, доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой «Микробиология и биотехнологии»

**Крылова Любовь Сергеевна**, аспирант кафедры «Микробиология и биотехнологии»

**Древко Ярослав Борисович**, кандидат химических наук, доцент кафедры «Микробиология и биотехнологии»

**Смирнова Ксения Юрьевна**, ассистент кафедры «Микробиология и биотехнологии»

ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ»

410012 Россия, Саратов, Театральная пл.1, +7-962-622-33-76, [larianova1@mail.ru](mailto:larianova1@mail.ru)

**Ключевые слова:** водорастворимые пептиды, штаммы, антимикробная активность, острая токсичность.

В статье получены данные по оптимизации способа получения фракций водорастворимых пептидов методом холодной экстракции из биомассы личинок *Musca domestica*, разделению их с использованием диализных мембран размером менее 3,5 кДа, 3,5-7кДа, 7-14 кДа, более 14 кДа с последующим исследованием методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено время удерживания и хроматографический выход, содержание белка, антимикробные свойства, острая токсичность белковой фракции 2 (БФ2), являющейся фракцией выделенной при использовании мембран 3,5 - 7 кДа. Следовательно, данная фракция имеет массу белков в интервале от 3,5 кДа до 7 кДа. Получены результаты антимикробной активности анализируемой белковой фракции 2 к следующим штаммам: *V. cereus* 8035, *E. aerogenes* ATCC-13048, *E. coli* Мордовия 21. Выявлено, что белковая фракция 2 в концентрации 10 мг/мл, 5 мг/мл, 2,5 мг/мл обладала антимикробной активностью по отношению к *E. aerogenes* ATCC-13048, *E. coli* Мордовия 21. Проведена оценка острой токсичности данной фракции на лабораторных мышах при однократном внутрижелудочном и парентеральном введении. Среднесмертельную дозу при внутрижелудочном и парентеральном введении для 20% раствора белковой фракции 2 установить не удалось, так как максимально возможные дозы для данных типов введения не привели к гибели ни одного животного. Установлено, что 20% раствор белковой фракции 2 относится к 4 классу опасности (вещества малоопасные) согласно общепринятой гигиенической классификации.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-00167, <https://rscf.ru/project/22-26-00167/>

#### Введение

Антимикробные пептиды (АМП), представляющие собой молекулы, состоящие из 10-100 аминокислот, продуцируются всеми живыми организмами и играют важную роль во врожденном иммунитете [1, 2]. Они обладают широким спектром активности в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов и некоторых вирусов [3]. Помимо этого, имеются сведения, что они также могут

оказывать цитотоксическое действие в отношении раковых клеток [4].

Актуальность данного исследования обусловлена тем, что антимикробные пептиды имеют большой потенциал в качестве противомикробных агентов с новыми механизмами действия и могут быть востребованы в медицине и ветеринарии.

#### Материалы и методы исследований

Целью исследования являлась оптимизация

Таблица 1

**Хроматографический выход фракций водорастворимых пептидов при использовании в качестве элюента фосфатно-солевого буфера**

Показатель	Фракции водорастворимых пептидов							
	Образец 1		Образец 2		Образец 3		Среднее	
	Пик 1	Пик 2	Пик 1	Пик 2	Пик 1	Пик 2	Пик 1	Пик 2
Площадь	142,86	120,27	142,16	116,85	128,75	103,03	137,92+/-9	113,38+/-10,33
Процент,%	54	46	55	45	56	44	55+/-1,13	45+/-1,13

ция способа получения водорастворимых пептидов, обладающих антимикробной активностью, для дальнейшего масштабирования процесса, направленного на разработку препаратов на их основе. Для выделения водорастворимых пептидов из биомассы личинок *M. domestica* использовали метод холодной экстракции, для этого проводили гомогенизацию биомассы личинок. Фракции, полученные данным способом, разделяли методом диализа, используя диализные мембраны менее 3,5 кДа, 3,5-7кДа, 7-14 кДа, более 14 кДа. Таким образом, было получено 4 образца, которые затем исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В данной статье представлены хроматограммы образца 2, полученного в результате диализа через диализную мембрану 3,5-7 кДа. Хроматографический анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Стайер Аквилон с использованием хроматографической колонки Phenomenex BioSep-SEC-S-2000, длина волны 214 нм и скорости потока 0,5 мл/мин, при использовании в качестве элюента – воды, при этом наблюдали один пик со временем удерживания 5-6 мин. При использовании в качестве элюента фосфатно-солевого буфера (ФСБ) установлено два пика. Раствор ФСБ готовили следующим образом: 8,00 г NaCl, 0,20 г KCl, 1,44 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 г KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> растворяли в 800 мл дистиллированной воды и доводили pH до 7,4 соляной кислотой или гидроксидом натрия, далее доводили водой до общего объема 1 литр.

Концентрацию белка полученных фракций определяли методом Лоури на спектрофотометре «ShimadzuUV-1280» при длине волны 450 нм [5].

Антимикробную активность белковой фракции 2 определяли методом диффузии препарата в агар, руководствуясь методическими указаниями ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков [6]. В исследовании использовали следующие культуры микроорганизмов: *B. cereus* 8035 предоставлена Ульяновской ГСХА, *E. aerogenes* ATCC-13048 по-

лучена из государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, *E. coli* Мордовия 21 предоставлена ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Для оценки общетоксического действия раствора белковой фракции 2 на лабораторных животных использовали «Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [7]. Оценку острой токсичности проводили на мышах при однократном внутривенном и парентеральном введении.

#### Результаты исследований

Для экстракции водорастворимых пептидов из биомассы личинок *M. domestica* использовали вышеуказанную методику. Для анализа полученных фракций применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, в качестве элюента использовали дистиллированную воду и фосфатно-солевой буфер.

Таким образом, в результате эксперимента разделением на диализных мембранах были получены 4 белковые фракции, которые в дальнейшем были исследованы на антимикробную активность и установлено, что фракция пептидов 2 с массой от 3,5 до 7 кДа является наиболее перспективной. При анализе методом ВЭЖХ с УФ детектором было установлено, что при использовании в качестве элюента дистиллированной воды наблюдался только один пик, а при использовании фосфатно-солевого буфера установлено два пика с близким временем удерживания, что свидетельствует о наличии в данной фракции как минимум двух разных пептидов. Все хроматограммы записывались в трех повторностях для достоверности исследования и исключения ошибок в анализе (табл. 1, Рис. 1-4).

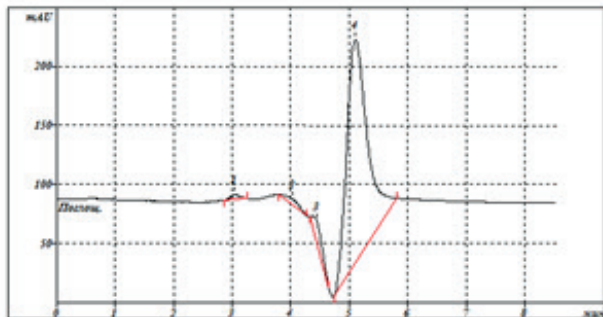
Для определения антимикробной активности белковой фракции 2 (Рис. 5-7) по отношению к штаммам *B. cereus* 8035, *E. aerogenes* ATCC-13048, *E. coli* Мордовия 21 применяли метод диффузии в агар. По результатам исследований белковая фракция 2 обладала выраженной антибактериальной активностью по отношению к грамотрицательным микроорганизмам,

Дата: 16/06/2022 11:29:00  
 Авто отчеты: 11  
 Хроматограмма: Образец 3.5 - 7 мПа - 1  
 Дата запуска: 14/06/2022 15:40:10  
 Файл: c:\Ярослав\ВЭХ\Белок\Розовый белок\220614154010  
 Дата записи: 14/06/2022 15:49:17 Изменен!  
 Метод: UV-104 ДАФС-  
 Дата записи: 14/06/2022 15:37:21  
 Скорость анализа: 11  
 Номер анализа: 2921

ПРОБА: петля 71,2  
 214 нм поток 0,5 мл/мин  
 Пробитка №: 1  
 Объем: 5652,0 мкл  
 Разведение: 1,00  
 Количество: 1,00

КОЛОНКА: BioSeo SEC S-2000 75x7,5  
 Размер: 2.0x100 мм

ПОЛВЕННАЯ ФАЗА А: вода  
 Скорость подачи: 0.50 мл/мин  
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА  
 Метод расчета: Абсолютная концентрация  
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь мAU*сек	Площадь %	Название
1	3.037	44.38	0.89	
2	4.034	89.96	1.82	
3	4.454	195.09	3.95	
4	5.099	4611.19	93.34	
4	8.552	4940.42	100.00	

Отчет выдан программой Мультискан  
 © 1993-2008 ЗАО Америксид

Рис. 1. - (Слева) Хроматограмма белковой фракции 2 с использованием в качестве элюента дистиллированной воды.

в концентрации 10 мг/мл, 5 мг/мл, 2.5 мг/мл - по отношению к *E. aerogenes* ATCC-13048, *E. coli* Мордовия 21, при этом наиболее эффективной концентрацией по отношению к *E. aerogenes* ATCC-13048 была 10 мг/мл, при этом отмечали максимальную зону задержки роста бактерий. При оценке влияния белковой фракции 2 на рост *B. cereus* 8035 изначально было отмечено антимикробное действие, однако в дальнейшем отмечали вторичный рост исследуемого микроорганизма (Рис. 5-7, Табл. 2).

Острую токсичность белковой фракции 2 определяли в экспериментах на лабораторных животных (Табл. 3).

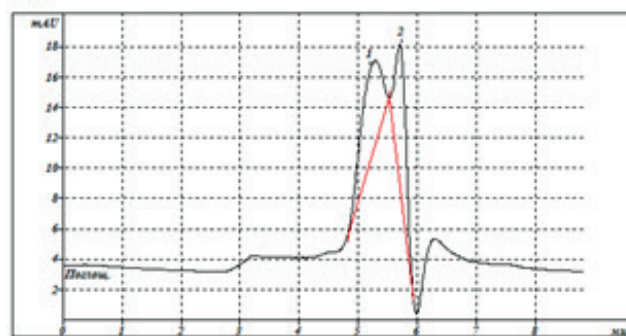
Для испытаний использовали 20% раствор белковой фракции 2, выбор данной концентрации был обусловлен тем, что изучаемая фракция обладала антимикробной активностью в концентрации менее 20%. Перед введением для получения 20% раствора навеску БФ2 массой 5 г помещали в аналитическую колбу объемом 25 мл и доводили до метки физиологи-

Дата: 16/06/2022 11:40:10  
 Авто отчеты: 11  
 Хроматограмма: Менее 3.5 - 7 мПа (ФСБ) - 1  
 Дата запуска: 15/06/2022 15:29:04  
 Файл: c:\Ярослав\ВЭХ\Белок\Розовый белок\220615152904  
 Дата записи: 15/06/2022 15:37:58 Изменен!  
 Метод: UV-104 ДАФС-  
 Дата записи: 14/06/2022 16:44:31  
 Скорость анализа: 11  
 Номер анализа: 2953

ПРОБА: петля 71,2  
 214 нм поток 0,5 мл/мин  
 Пробитка №: 1  
 Объем: 5652,0 мкл  
 Разведение: 1,00  
 Количество: 1,00

КОЛОНКА: BioSeo SEC S-4000 75x7,5  
 Размер: 2.0x100 мм

ПОЛВЕННАЯ ФАЗА А: вода  
 Скорость подачи: 0.50 мл/мин  
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА  
 Метод расчета: Абсолютная концентрация  
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь мAU*сек	Площадь %	Название
1	5.209	142.86	54.29	
2	5.723	120.27	45.71	
2	8.822	263.13	100.00	

Отчет выдан программой Мультискан  
 © 1993-2008 ЗАО Америксид

Рис.2. - (Справа) Хроматограмма белковой фракции 2 с использованием в качестве элюента фосфатно-солевого буфера (Образец 2.1).

Таблица 2  
 Зоны задержки роста микроорганизмов, мм

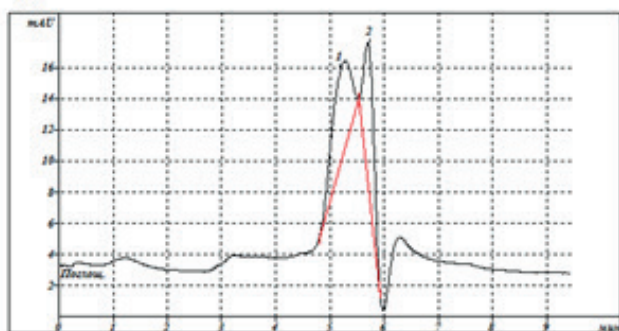
Концентрация	<i>B. cereus</i> 8035	<i>E. aerogenes</i> ATCC-13048	<i>E. coli</i> Мордовия 21
10 мг/мл	23*	26	23
5 мг/мл	17*	21	16
2.5 мг/мл	-	16	14
1.25 мг/мл	-	-	-
0.625 мг/мл	-	-	-

\*- Вторичный рост

ческим раствором, который затем вводили животным в соответствующих объемах. Вводимая доза 0,2 мл для животных массой 20 г - 2000 мг/кг, 0,5 мл - 5000 мг/кг и 0,7 мл - 7000 мг/кг. Среднесмертельную дозу при внутрижелудочном и парентеральном введении для 20% раствора белковой фракции 2 установить не удалось, так как максимально возможные дозы для данных типов введения не привели к гибели ни одного животного.

Таким образом, согласно общепринятой

Дата: 16/06/2022 11:40:33  
 Автор отчета: 11  
 Хроматограмма: Менее 3.5 - 7 кДа (ФСБ) - 2  
 Дата запуска: 15/06/2022 15:38:17  
 Файл: c:\Ярослав\ВЗХХ\Белки\Розовый белок\220615153817  
 Метод: Дата записи: 15/06/2022 15:48:02 Изменен!  
 UV-104 ДАФС-  
 Дата записи: 14/06/2022 16:44:31  
 Скорость анализа: 11  
 Номер анализа: 2954  
 ПРОВБА: петля 71.2  
 214 мм поток 0,5 мл/мин  
 Пробитка В: 1  
 Объем: 5652.0 мкл  
 Разведение: 1.00  
 Количество: 1.00  
 КОЛОНКА: BioSep SEC S-4000 75x7,5  
 Размер: 2.0x100 мм  
 ПОДСИВНАЯ ФАЗА А: вода  
 Скорость подачи: 0.50 мл/мин  
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

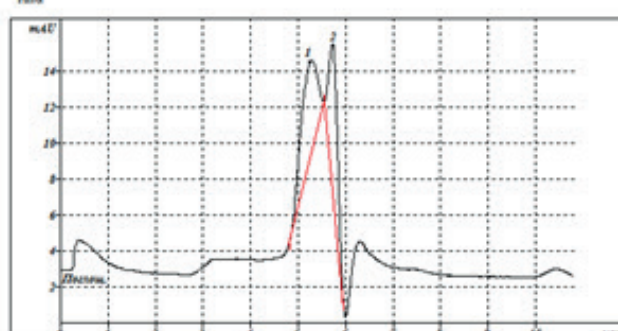
Метод расчета: Абсолютная концентрация  
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь мAU*сек	Площадь %	Название
1	5.197	142.73	54.99	
2	5.729	116.85	45.01	
2	9.465	259.58	100.00	

Отчет выдан программой Мультихром  
 © 1993-2008 ЗАО Асперсенд

Рис. 3. - (Слева) Хроматограмма белковой фракции 2 с использованием в качестве элюента фосфатно-солевого буфера (Образец 2.2).

Дата: 16/06/2022 11:40:56  
 Автор отчета: 11  
 Хроматограмма: Менее 3.5 - 7 кДа (ФСБ) - 3  
 Дата запуска: 15/06/2022 15:48:08  
 Файл: c:\Ярослав\ВЗХХ\Белки\Розовый белок\220615154808  
 Метод: Дата записи: 15/06/2022 15:59:01 Изменен!  
 UV-104 ДАФС-  
 Дата записи: 14/06/2022 16:44:31  
 Скорость анализа: 11  
 Номер анализа: 2955  
 ПРОВБА: петля 71.2  
 214 мм поток 0,5 мл/мин  
 Пробитка В: 1  
 Объем: 5652.0 мкл  
 Разведение: 1.00  
 Количество: 1.00  
 КОЛОНКА: BioSep SEC S-4000 75x7,5  
 Размер: 2.0x100 мм  
 ПОДСИВНАЯ ФАЗА А: вода  
 Скорость подачи: 0.50 мл/мин  
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Абсолютная концентрация  
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь мAU*сек	Площадь %	Название
1	5.214	128.75	55.55	
2	5.75	103.03	44.45	
2	10.83	231.78	100.00	

Отчет выдан программой Мультихром  
 © 1993-2008 ЗАО Асперсенд

Рис. 4. - (Справа) Хроматограмма белковой фракции 2 с использованием в качестве элюента фосфатно-солевого буфера (Образец 2.3).

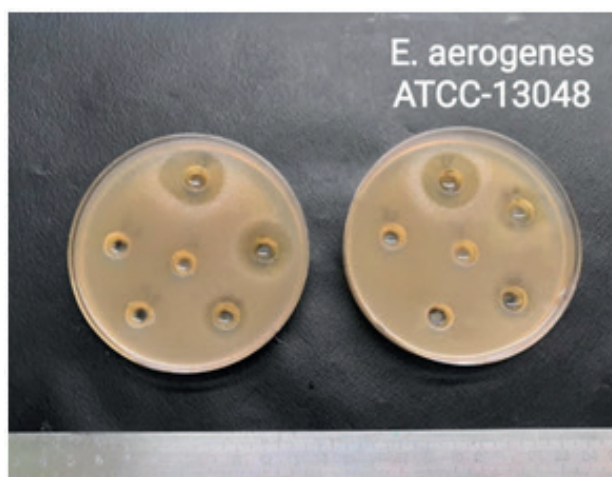


Рис. 5. - (Слева) Изучение антибактериальной активности белковой фракции 2 по отношению к *E. aerogenes* ATCC-13048.



Рис. 6. - (Справа) Изучение антибактериальной активности белковой фракции 2 по отношению к *E. coli* Мордовия 21.

Дизайн опыта по проведению острой токсичности

Группа	Вид, пол животных	Кол-во животных в группе	Препарат (вариант опыта)	Доза, мг/кг	Объем раствора для введения, мл/животное	Режим введения
1	Мыши-самцы массой 18-20 г	0	БФ2 (испытуемый препарат)	2000	0,18-0,2	в/б, однократно
2	Мыши-самцы массой 18-20 г	0	БФ2 (испытуемый препарат)	5000	0,45-0,5	в/б, однократно
3	Мыши-самцы массой 18-20 г	0	БФ2 (испытуемый препарат)	7000	0,63-0,7	в/б, однократно
4	Мыши-самцы массой 18-20 г	0	Вода для инъекций (контроль)		1	в/б, однократно
5	Мыши-самцы массой 18-20 г	6	БФ2 (испытуемый препарат)	2000	0,18-0,2	Внутрижелудочно, однократно
6	Мыши-самцы массой 18-20 г	6	БФ2 (испытуемый препарат)	5000	0,45-0,5	Внутрижелудочно, однократно
7	Мыши-самцы массой 18-20 г	6	БФ2 (испытуемый препарат)	7000	0,63-0,7	Внутрижелудочно, однократно
8	Мыши-самцы массой 18-20 г	6	Вода для инъекций (контроль)		1	Внутрижелудочно, однократно

гигиенической классификации ГОСТ 12.1.007-76, в результате проведенных исследований было выявлено, что 20% раствор белковой фракции 2 относится к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

#### Обсуждение

Антимикробные пептиды являются важным звеном врождённого и приобретенного иммунитета макроорганизма, их способны синтезировать практически все живые организмы. Вследствие эволюционного процесса снижения чувствительности микроорганизмов к антимикробным средствам происходит адаптация патогенов к непрерывному контакту с антибиотиками. Тенденция повсеместного нерегламентированного использования антибиотиков приводит к селекции антибиотикорезистентных штаммов [1, 8- 10]. Таким образом, исследования новых перспективных антибактериальных биологических агентов могут стать предпосылкой к разработке высокоэффективных антимикробных препаратов, способных прийти на смену традиционным антибактериальным препаратам [11].

Отличительной особенностью антимикробных пептидов от классических антибиотиков является низкая вероятность развития антибиотикорезистентности, кроме того АМП обладают противовоспалительными свойствами и противомикробной активностью по отношению к широкому спектру бактерий, грибов и вирусов, вызывая их гибель [12-15].

Проведенные нами исследования позволили выявить антимикробную активность белковой фракции 2, полученной из биомассы личинок *Musca domestica*. Белковая фракция 2 в концентрации 10мг/мл, 5 мг/мл, 2.5мг/мл обладала антимикробной активностью по отношению к *E. aerogenes* ATCC-13048, *E. coli* Мордовия 21. В результате изучения острой токсичности согласно общепринятой гигиенической классификации ГОСТ 12.1.007-76 было показано, что изучаемые БФ2 относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные). Примечательным является антимикробное действие анализируемой белковой фракции по отношению к полево-му штамму *E. coli* Мордовия 21. Следовательно, пептиды, выделенные из биомассы *M. Domes-*



Рис. 7. - Изучение антибактериальной активности белковой фракции 2 по отношению к *B. cereus* 8035.

*tica*, могут быть использованы для разработки антибактериальных препаратов эффективных, в том числе при заболеваниях, вызываемых данными этиологическими агентами.

## Закключение

В результате проведенных нами исследований был оптимизирован способ получения водорастворимых пептидов биомассы личинок *Musca domestica*. Изучена антимикробная активность выделенных белковых фракций, а именно белковая фракция 2 в концентрации 10 мг/мл, 5 мг/мл, 2.5 мг/мл обладала антимикробной активностью по отношению к *E. aerogenes* ATCC-13048, *E. coli* Мордовия 21. Среднесмертельную дозу при внутрижелудочном и парентеральном введении для 20% раствора БФ2 установить не удалось, так как максимально возможные дозы для данных типов введения не привели к гибели ни одного животного. Согласно общепринятой гигиенической классификации ГОСТ 12.1.007-76 была изучена острая токсичность 20% раствора антимикробных пептидов, установлено, что белковая фракция 2 относится к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

## Библиографический список

1. Insect cecropins, antimicrobial peptides with potential therapeutic applications / D. Brady, A. Grapputo, O. Romoli, F. Sandrelli // International Journal of Molecular Sciences. - 2019. - Vol. 20. - P. 5862. – URL: <https://doi.org/10.3390/ijms20235862>
2. Chen, C. H. Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications / C. H. Chen, T. K. Lu // Antibiotics. - 2020. - № 9. – P. 1–20. – URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024>
3. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides / E. Mylonakis, L. Podsiadlowski, M. Muhammed [et al.] // Philosophical Transactions of the Royal Society B. – 2016. – 371. – P. 20150290.
4. Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities / M. R. Felício, O. N. Silva, S. Gonçalves, N. C. Santos, O. L. Franco // Frontiers in Chemistry. – 2017. - № 5. – P. 5.
5. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Vol. 193, № 1. - P. 265-275.
6. ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар : методические указания. – Введ. - Министерство здравоохранения Российской Федерации.
7. Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. - Москва, 2005.
8. Synergistic efficacy of *Aedes aegypti* antimicrobial peptide cecropin A2 and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa* / Z. Zheng, N. Tharmalingam, Q. Liu, E. Jayamani, W. Kim, B. V. Fuchs, R. Zhang, A. Vilcinskis, E. Mylonakis // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2017. - № 61. – P. 7. – URL: <https://doi.org/10.1128/AAC.00686-17>.
9. Antimicrobial and Antibiofilm Peptides / A. Di Somma, A. Moretta, C. Canè, A. Cirillo, A. Duilio // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, № 4. – P. 652.
10. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms / M. Zasloff // Nature. – 2002. - Vol. 415. - P. 389.
11. Parachin, Nádia S. New edge of antibiotic development: antimicrobial peptides and corresponding resistance / Nádia S. Parachin, O. L. Franco // Frontiers in Microbiology. – 2014. - P. 1–145.
12. Proteomic analysis of bacteriophage PR – 6 UGSHA / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, A.V. Mastilenko, E.V. Suldina, S.N. Zolotukhin, A.L. Toigildin, I.A. Toigildina, A.V. Dozorov, V.A. Isaichev, A.A. Nafeev, I.L. Obuhov, B.I. Shmorgun // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. - 2019. - T. 10. - № 2. - С. 1580-1587.
13. Development of PCR detection system of bacteriophages PR4 UGSHA, E7 ULSAU and YE5 ULSAU / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, A.V. Mastilenko, E.V. Suldina, E.N. Mallyamova, A.A. Nafeev, A.L. Toigildin, I.A. Toigildina, I.L. Obukhov, B.I. Shmorgun // Ambient Science. - 2019. - T. 6. - № 2. - С. 26-30.
14. Анализ протеома бактериофага *Bacillus cereus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Р.З. Юсупова // Материалы XIV Международной научно-практической конференции «Научно-технический прогресс в сельскохозяйственном производстве». – Великие Луки, 2019. – С. 153-158.
15. Antimicrobial peptide gene induction, involvement of Toll and IMD pathways and defense against bacteria in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* / K. Yokoi, H. Koyama, C. Minakuchi, T. Tanaka, K. Miura // Results Immunology - 2012. – Vol. 2. - P. 72–82. - URL: <https://doi.org/10.1016/j.rinim.2012.03.002>.

## IMPROVEMENT OF THE METHOD OF OBTAINING WATER-SOLUBLE PEPTIDES ISOLATED FROM *M. DOMESTICA* AND STUDY OF THEIR PROPERTIES

Larionova O. S., Krylova L. S., Drevko Ya. B., Smirnova K. Yu.  
FSBEI HE Saratov State Agrarian University

410012 Russia, Saratov, Teatralnaya sq. 1, +7-962-622-33-76, larionova1@mail.ru

**Key words:** water-soluble peptides, strains, antimicrobial activity, acute toxicity.

The article presents data on improvement of the method of obtaining fractions of water-soluble peptides by cold extraction from the biomass of *Musca domestica* larvae, their separation using dialysis membranes with sizes less than 3.5 kDa, 3.5-7 kDa, 7-14 kDa, more than 14 kDa, followed by a study by means of highly effective liquid chromatography. Retention time and chromatographic yield, protein content, antimicrobial properties, acute toxicity of 2 (BP2) protein fraction, which is the fraction isolated when using membranes of 3.5 - 7 kDa, were established. Therefore, this fraction has a mass of proteins in the range from 3.5 kDa to 7 kDa. The results of the antimicrobial activity of the analyzed protein fraction 2 to the following strains were obtained: *B. cereus* 8035, *E. aerogenes* ATCC-13048, *E. coli* Mordovia 21. It was found that the protein fraction 2 at a concentration of 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml had antimicrobial activity against *E. aerogenes* ATCC-13048, *E. coli* Mordovia 21. Acute toxicity of this fraction was assessed on laboratory mice after a single intragastric and parenteral administration. The average lethal dose for intragastric and parenteral administration for 20% solution of protein fraction 2 could not be established, since the maximum possible doses for these types of administration did not lead to death of any animal. It was established that 20% solution of protein fraction 2 belongs to the 4th hazard class (substances of low hazard) according to the generally accepted hygienic classification.

### Bibliography:

1. Insect cecropins, antimicrobial peptides with potential therapeutic applications / D. Brady, A. Grapputo, O. Romoli, F. Sandrelli // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2019. - Vol. 20. - P. 5862. - URL: <https://doi.org/10.3390/ijms20235862>
2. Chen, C. H. Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications / C. H. Chen, T. K. Lu // *Antibiotics*. - 2020. - № 9. - P. 1–20. – URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024>
3. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides / E. Mylonakis, L. Podsiadlowski, M. Muhammed [et al.] // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. - 2016. - 371. - P. 20150290.
4. Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities / M. R. Felício, O. N. Silva, S. Gonçalves, N. C. Santos, O. L. Franco // *Frontiers in Chemistry*. - 2017. - № 5. - P. 5.
5. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. - 1951. - Vol. 193, № 1. - P. 265-275.
6. General pharmacopoeial monograph.1.2.4.0010.15 Specification of antimicrobial activity of antibiotics by agar diffusion method: instructional guidelines. – Ministry of Health of the Russian Federation.
7. Khabriev, R. U. Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Guidelines for study of the general toxic effect of pharmacological substances / R. U. Khabriev. - Moscow, 2005. - 832 p.
8. Synergistic efficacy of *Aedes aegypti* antimicrobial peptide cecropin A2 and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa* / Z. Zheng, N. Tharmalingam, Q. Liu, E. Jayamani, W. Kim, B. B. Fuchs, R. Zhang, A. Vilcinskas, E. Mylonakis // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2017. - № 61. - P. 7. - URL: <https://doi.org/10.1128/AAC.00686-17>.
9. Antimicrobial and Antibiofilm Peptides / A. Di Somma, A. Moretta, C. Canè, A. Cirillo, A. Duilio // *Biomolecules*. - 2020. - Vol. 10, № 4. - P. 652.
10. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms / M. Zasloff // *Nature*. - 2002. - Vol. 415. - P. 389.
11. Parachin, Nádia S. New edge of antibiotic development: antimicrobial peptides and corresponding resistance / Nádia S. Parachin, O. L. Franco // *Frontiers in Microbiology*. - 2014. - P. 1–145.
12. Proteomic analysis of bacteriophage PR - 6 UGSHA / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, A.V. Mastilenko, E.V. Suldina, S.N. Zolotukhin, A.L. Toigildin, I.A. Toigildina, A.V. Dozorov, V.A. Isaichev, A.A. Nafeev, I.L. Obuhov, B.I. Shmorgun // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. - 2019. - T. 10. - № 2. - P. 1580-1587.
13. Development of PCR detection system of bacteriophages PR4 UGSHA, E7 ULSAU and YE5 ULSAU / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, A.V. Mastilenko, E.V. Suldina, E.N. Mallyamova, A.A. Nafeev, A.L. Toigildin, I.A. Toigildina, I.L. Obukhov, B.I. Shmorgun // *Ambient Science*. - 2019. - V. 6. - № 2. - P. 26-30.
14. Analysis of proteome of *Bacillus cereus* bacteriophage / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, A.V. Mastilenko, R.Z. Yusupova // *Materials of the XIV International Scientific and Practical Conference "Scientific and Technological Progress in Agricultural Production"*. –VelikieLuki, 2019. - P. 153-158.
15. Antimicrobial peptide gene induction, involvement of Toll and IMD pathways and defense against bacteria in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* / K. Yokoi, H. Koyama, C. Minakuchi, T. Tanaka, K. Miura // *Results Immunology* - 2012. - Vol. 2.-P. 72–82. - URL: <https://doi.org/10.1016/j.rinim.2012.03.002>.