



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.112.083

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/10998

Способ выделения и очистки низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства с использованием хроматографических методов

Сергей Викторович Клыченков¹✉, Анастасия Дмитриевна Кручинина¹

¹Пензенский государственный университет, Пенза, Россия, 79048510599@ya.ru[✉]

Аннотация. Изучение биологической активности различных пептидных веществ является одним из актуальных направлений биохимии. За последние несколько десятилетий в научной литературе появилось большое количество сообщений о наличии определённого действия продуктов пчеловодства на различные биологические системы, в то время как количество пептидов, найденных в маточном молочке и трутневом расплоде, растёт с каждым годом. В связи с этим появилась потребность в разработке удобного и производительного метода выделения и очистки пептидной фракции из продуктов пчеловодства, что и является целью данного исследования. В результате был разработан и испытан метод выделения фракции низкомолекулярных пептидов (массой менее 5 кДа) из маточного молочка и трутневого расплода, включающий в себя ультрафильтрацию для разделения молекул раствора по параметру молекулярной массы, ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе для очистки пептидов от низкомолекулярных примесей и гель-фильтрацию на сефадексе G-25 для удаления солей буферных растворов. Предложенный метод выделения и очистки пептидов легко поддаётся масштабированию и автоматизации, что позволяет применять его в промышленных условиях. Контроль пептидного состава в сравнении исходного фильтрата и очищенной фракции был проведён с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. В результате использования данного метода достигается приемлемая степень очистки, а очищенные пептиды находятся в водном растворе, пригодном как для дальнейшей оценки биологической активности, так и для изучения состава различными физико-химическими методами. Также были получены начальные данные о физико-химических свойствах очищенных пептидов: 5 из 9 групп пептидов маточного молочка и 4 из 11 групп пептидов в составе трутневого расплода содержат аминокислоты с ароматическими радикалами; при pH=10 большинство пептидов маточного молочка являются анионными, а большинство пептидов трутневого расплода – катионными.

Ключевые слова: пептиды маточного молочка, пептиды трутневого расплода, пчелопродукты, маточное молочко, трутневый расплод.

Благодарности: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90050

Для цитирования: Клыченков С.В., Кручинина А.Д. Способ выделения и очистки низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства с использованием хроматографических методов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 1. С. 107-115. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/10998>

Original article

Isolation and purification method of low molecular weight peptides from bee products using chromatographic methods

Sergey V. Klychenkov¹✉, Anastasiya D. Kruchinina¹

¹Penza State University, Penza, Russia, 79048510599@ya.ru[✉]



Abstract. The study of the biological activity of various peptide substances is one of the modern research areas of biochemistry. Over the past few decades, a large number of reports in the scientific literature about the presence of a certain effect of bee products on various biological systems were published, while the number of peptides revealed in royal jelly and drone brood is increasing every year. This resulted in the need to develop a convenient and productive method for the isolation and purification of the peptide fraction from bee products, which was the goal of this study. As a result, the method for isolation of the fraction of low molecular weight peptides (with the molecular weight less than 5 kDa) from royal jelly and drone brood was developed and tested. This method includes ultrafiltration for the separation of the solution molecules according to the molecular weight parameter, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose for purification of peptides from low molecular weight impurities and gel filtration on Sephadex G-25 for the removal salts of buffer solutions. The proposed method for the isolation and purification of peptides can be easily scaled and automated, which allows the use of the proposed method under industrial conditions. The control of the peptide composition in comparison of the original filtrate and the purified fraction was carried out using high performance liquid chromatography. As a result of using this method, an acceptable degree of purification is achieved, and the purified peptides were obtained in an aqueous solution suitable both for further assessment of biological activity and for the investigation of the composition by various physicochemical methods. Initial data on the physicochemical properties of purified peptides were also obtained: Five out of nine groups of royal jelly peptides and four out of eleven groups of peptides in the composition of drone brood contained amino acids with aromatic radicals; at pH=10, majority of royal jelly peptides were anionic, and majority of drone brood peptides were cationic.

Keywords: royal jelly peptides, drone brood peptides, bee products, royal jelly, drone brood.

Acknowledgments: the reported study was funded by RFBR according to the research project No. 20-34-90050

For citation: Klychenkov S.V., Kruchinina A.D. Isolation and purification method of low molecular weight peptides from bee products using chromatographic methods. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(1): 107-115. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/10998>

Введение

Изучение различных классов биологически активных веществ, получаемых из растительного, животного или другого сырья природного происхождения, сопряжено с большим количеством трудностей, одной из которых является подбор метода выделения и очистки требуемых биомолекул. В силу большого разнообразия молекул в составе маточного молочка и гомогената трутневого расплода достаточно сложно подобрать метод для успешного выделения и очистки различных классов биомолекул, в особенности пептидов, из этих продуктов пчеловодства. Маточное молочко по сравнению с самым широко известным продуктом пчеловодства - пчелиным мёдом, является более перспективным источником низкомолекулярных пептидов в силу высокой общей концентрации белков и сравнительно небольшой в процентных соотношениях концентрации углеводов, что облегчает задачу выделения пептидов. Трутневый расплод, являясь исход-

ным сырьём клеточного состава, добавляет определённую специфику в алгоритм работы.

Все типы перечисленных пчелопродуктов оказывают широкий спектр биологических эффектов, таких как антиоксидантный [1], иммуностимулирующий и ранозаживляющий [2], противоопухолевый [3] и т.д. За последние десятилетия появились публикации, показывающие связь наблюдаемых эффектов с наличием в составе этих пчелопродуктов различных белковых компонентов, в том числе и пептидов. Например, установлена связь между наличием антибактериальных пептидов в составе пчелиного мёда (в форме экзосом) [4] и маточного молочка [5], также пептиды и белки маточного молочка проявляют антиоксидантную [6], нейропротекторную [7] и регуляторную [8] активность, а неочищенные пептиды трутневого расплода имеют анаболический эффект и влияют на поведение лабораторных животных [9].

Не смотря на высокий интерес к изучению связи биологической активности



продуктов пчеловодства и пептидных молекул в их составе, количество публикаций на данную тему мало, т. к. большинство оригинальных статей фокусируются на изучении биологической активности именно белков, но не пептидов, что несомненно связано со сравнительной простотой выделения и очистки высокомолекулярных соединений. Однако с каждым годом находится всё больше подтверждений того, что низкомолекулярные пептиды выполняют одновременно несколько функций и задействованы в тонкой регуляции физиологических процессов [10, 11], что обуславливает перспективность изучения пептидов массой менее 5 кДа, выделенных из маточного молочка и трутневого расплода.

Необходимость детального изучения низкомолекулярных пептидов продуктов пчеловодства требует разработки эффективного подхода к выделению пептидной фракции этих пчелопродуктов с учётом специфики их химического состава. Целью данной работы является разработка такого подхода, который с использованием комбинации простых и доступных методов биохимии и биотехнологии позволил бы получить в относительно чистом виде фракцию низкомолекулярных пептидов трутневого расплода и маточного молочка массой до 5 кДа, пригодную для дальнейшего изучения.

Экспериментальная часть

Исходное сырьё. В качестве исходного сырья для выделения пептидной фракции использовалось маточное молочко летнего сбора и трутневый расплод возрастом 5 суток (Пензенская область, Пензенский р-н, СНТ «Лесная поляна», сбор 2021 г.). Маточное молочко было получено в охлаждённом виде в стерильных картриджах объёмом 1 см³ каждый и хранилось при -20°C в морозильной камере. Трутневый расплод был получен в виде сот с личинками трутней в ячейках и в таком виде хранился в пластиковых контейнерах при -20°C.

Определение концентрации белковых продуктов и углеводов по кетозам. Для определения концентрации белковых продуктов — пептидов или высокомолекулярных белков — использовался метод Лоури [12]. Количественно пептиды и белки были определены с использованием метода калибровочной прямой, построенной по разведениям БСА с концентрацией от 10 до 100 мкг/см³.

Маркером наличия примесей в пробах с выделяемыми пептидами служили кетозы, так как фруктоза и другие углеводы этого класса являются основным низкомолекулярным компонентом маточного молочка, а также присутствуют в трутневом расплоде. Для определения фруктозы был использован метод, основанный на образовании окрашенного продукта при взаимодействии кетоз с резорцином в кислой среде: к аликвоте объёмом 0.5 см³ добавляли равный объём 0.1%-го спиртового раствора резорцина и 1.5 см³ 30%-го раствора HCl, после чего смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 8 минут и измеряли оптическую плотность на длине волны 490 нм. В качестве контрольной пробы использовали смесь реагентов и 0.5 см³ дистиллированной воды, калибровочную прямую строили по серии разведений фруктозы в пределах концентрации 0.1-1 мг/см³. Измерения концентрации белков, пептидов и кетоз проводились в трёх повторностях, данные использовались для дальнейшей статистической обработки.

Приготовление исходных растворов. Для выделения низкомолекулярных пептидов маточное молочко и трутневый расплод использовались в виде водных растворов различной концентрации. Раствор маточного молочка (10%) после полного растворения пчелопродукта был профильтрован через бумажный фильтр «красная лента» для удаления грубых загрязнений. Для приготовления 10%-го раствора гомогената трутневого расплода навеску личинок трутней массой 10 г го-

могенизировали в гомогенизаторе Поттера с небольшим количеством дистиллированной воды до получения однообразной кашицы, объём довели до 100 см³ дистиллированной водой и смесь центрифугировали в течение 20 минут при 3000 g для удаления клеточного дебриса. Поверхность супернатанта промакивалась фильтровальной бумагой для удаления липидных загрязнений, образовавшихся на поверхности жидкости, а надосадочная жидкость в дальнейшем и использовалась в качестве раствора для выделения пептидов трутневого расплода.

Ультрафильтрация. Для разделения молекул по параметру молекулярной массы был использован метод ультрафильтрации. В качестве мембраны использовался блок для ультрафильтрации Vivaflow 200 с порогом молекулярной массы 5 кДа, фильтруемая жидкость подавалась перистальтическим насосом MasterFlex. В результате фильтрации всех трёх исходных растворов были получены соответствующие фракции, содержащие молекулы массой менее 5 кДа, используемые для дальнейших манипуляций.

Очистка ионообменной хроматографией и гель-фильтрацией. Для выделения пептидной фракции из полученных после ультрафильтрации растворов трутневого расплода и маточного молочка использовался метод ионообменной хроматографии. Ионообменником служила микрокристаллическая DEAE-целлюлоза (Reanal). Элюция осуществлялась ступенчатым градиентом, в качестве начального буферного раствора использовали 0.2 М ТРИС-HCl (pH=10), в качестве конечного – 0.2 М Na-цитратный (pH=6). Размер колонки составлял 6×1.5 см, объём наносимой пробы во всех случаях 0.5 см³, скорость элюции до 30 см³/час. Объём собираемых фракций составлял 0.5 см³, смена буферного раствора производилась после начала сбора седьмой фракции.

Для построения профиля элюции во всех фракциях была определена концентрация пептидов, содержание низкомолекулярных примесей контролировалось по концентрации кетоз. Фракции, содержащие максимальное количество десорбированных пептидов, очищенных от низкомолекулярных примесей, объединялись и концентрировались в ротационном испарителе, после чего очищались от солей буферного раствора методом гель-фильтрации на колонке, заполненной сефадексом G-25 (Sigma Aldrich). Элюция велась дистиллированной водой, фракции собирались объёмом 2 см³, размер колонки составил 15×2 см, скорость элюции – не более 30 см³/час. Концентрация пептидов в собираемых фракциях определялась спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм. Фракции с пиковыми концентрациями пептидов объединялись в одну и использовались для дальнейшего анализа с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Разнообразие пептидов в полученных фракциях трутневого расплода и маточного молочка было изучено с помощью ВЭЖХ. Использовалась хроматографическая система NGC Quest 10 Plus со спектрофотометрическим детектором, колонка SUPELCOSIL LC-18-T 250x4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Перед анализом пробы подвергались делипидизации путём смешивания в течение 15 минут с равным объёмом гексана и последующим центрифугированием в течение 10 минут при 2000 g. Нижний слой жидкости фильтровался через стерильный мембранный фильтр 0,22 мкм и использовался для анализа. Разделение выполнялось с градиентной элюцией от буфера А — водный 0.1%-й раствор трифторуксусной кислоты, до буфера В – 0.1%-й раствор трифторуксусной кислоты в 50%-м ацетонитриле. Детекция велась по поглощению на длинах волн 220 и 280 нм. Анализ хроматограмм проводился в ПО ChromLab.

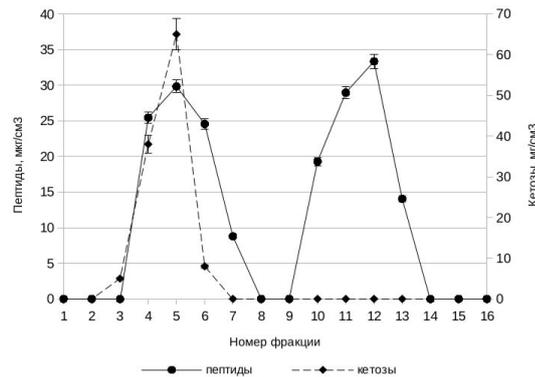


Рис. 1. Типичный профиль разделения пептидов продуктов пчеловодства на примере пептидов трутневого расплода

Fig. 1. Typical separation profile of bee products peptides based on the example of drone brood peptides

Статистическая обработка данных.

Данные, полученные при измерении концентрации белков, пептидов и кетоз в повторностях различных проб, использовались для вычисления среднеквадратичного отклонения в ПО LibreOffice Calc.

Обсуждение результатов

Типичный профиль элюции раствора пептидов изученных продуктов пчеловодства при хроматографировании на колонке с DEAE-целлюлозой на примере разделения пептидов трутневого расплода представлен на рис. 1. Для разделения фильтрата растворов всех изученных продуктов пчеловодства на DEAE-целлюлозе характерно наличие двух групп фракций Лоури-положительных продуктов и одной группы фракций, содержащих кетозы. Первая группа Лоури-положительных веществ выходит с колонки в свободном объеме вместе с кетозами, то есть не очищается от низкомолекулярных примесей, вторая группа – пептиды – выходит в других фракциях при смене элюента на десорбирующий, при этом кетозы в данных фракциях отсутствовали. Несмотря на то, что от низкомолекулярных примесей очищается только часть пептидов, применение ионообменной хроматографии позволяет получить пептиды, очищенные не только от углеводов, как основного «балластного» вещества в составе продуктов пчеловодства, но и от

фенольных соединений, присутствие которых влияет на точность определения концентрации белковых веществ методом Лоури (отсутствие фенольных соединений во фракциях очищенных пептидов показано с помощью FeCl_3). Различия в профилях элюции при разделении растворов продуктов пчеловодства определяются, несомненно, исходным составом того или иного раствора:

1) При разделении фильтрата раствора трутневого расплода пиковая концентрация во фракциях очищенных пептидов незначительно превышает таковую во фракциях, вышедших в свободном объеме колонки (сравнительные данные о концентрации пептидов в различных растворах представлены в табл. 1).

2) При разделении фильтрата раствора маточного молочка пиковая концентрация во фракциях очищенных пептидов ниже, чем в аналогичных «не очищенных» фракциях.

После разделения всех трёх растворов методом ионообменной хроматографии фракции, содержащие максимальное количество очищенных от низкомолекулярных примесей пептидов, были использованы для анализа методом ВЭЖХ; соответствующие хроматограммы представлены на рис. 2.

Анализируя полученные хроматограммы можно сказать, что в случае с

Таблица 1. Сравнительные данные о концентрации пептидов в изученных растворах продуктов пчеловодства

Table 1. Comparative data on the concentration of peptides in the studied solutions of bee products

Раствор	Фильтрат <5 кДа, мкг/см ³	C _{max} в свободном объёме, мкг/см ³	C _{max} в очищенной фракции, мкг/см ³
Трутневый расплод	464±4	29±2	33±3
Маточное молочко	148±3	48±4	39±3

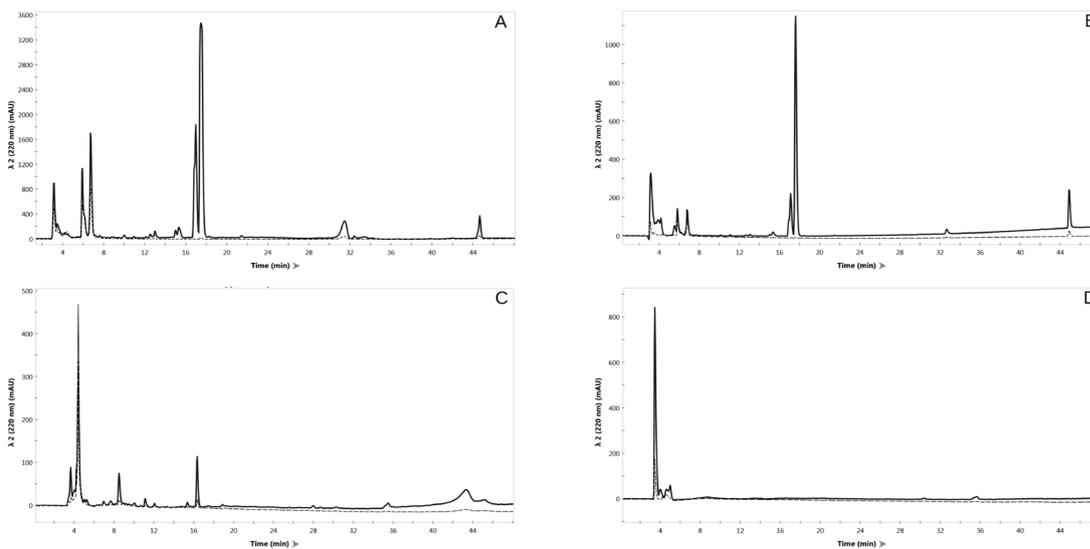


Рис. 2. Хроматограммы разделения фильтратов и очищенных пептидных фракций маточного молочка (А, В соответственно) и трутневого расплода (С, D соответственно).

Чёрная сплошная линия – поглощение на длине волны 220 нм, пунктирная – 280 нм

Fig. 2. Separation chromatograms of filtrates and purified peptide fractions of royal jelly (A, B, respectively) and drone brood (C, D, respectively). Black solid line – absorption at a wavelength of 220 nm, dotted line – absorption at a wavelength of 280 nm

пептидами маточного молочка комбинация методов ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации показала высокую эффективность, т. к. изменения в спектре пептидов исходного фильтрата и очищенной фракции минимальны и относятся только к изменениям количественных характеристик той или иной группы пептидов (высота и абсолютная площадь пика), входящих в состав исследуемого раствора, тогда как в случае трутневого расплода наблюдаются существенные качественные изменения в спектре пептидов данного раствора – разнообразие пептидов значительно снижается (количество пиков на хроматограмме после очистки ионообменной хроматографией уменьшается). Используя данные хроматограммы,

также можно сделать некоторые выводы о физико-химических свойствах пептидов, входящих в состав маточного молочка и трутневого расплода:

1) при сравнении хроматограмм раствора маточного молочка, фильтрованного через мембрану с порогом молекулярной массы 5 кДа, и очищенной фракции пептидов, выделенных из того же раствора, можно сказать, что при данных условиях хроматографирования смесь удаётся разделить на 9 отдельных групп пептидов, причём часть из них содержит ароматические аминокислоты, что следует из присутствия одного и того же пика при измерении оптической плотности на обеих длинах волн – 220 и 280 нм [13]; также можно заключить, что



при $pH=10$ большинство пептидов смеси имеет отрицательный заряд, т. к. изменения после очистки фильтрата носят количественный характер (на соответствующей хроматограмме – рис. 2В – не изменяется количество пиков по сравнению с хроматограммой фильтрата – рис. 2А, изменяются только их абсолютные площади), т. е. сорбируются на DEAE-целлюлозе.

2) в изученном растворе трутневого расплода удалось идентифицировать 11 групп различных пептидов, часть из них так же содержит аминокислоты с ароматическими радикалами (4 группы), а часть не содержит таких вовсе; большинство групп пептидов трутневого расплода (9 из 11) при $pH = 10$ заряжены положительно, т. к. не сорбируются на ионообменнике, и имеют гидрофильный характер, потому что элюируются с колонки в начальных объёмах.

Заключение

В настоящее время изучение биологической активности разнообразных групп пептидов является одним из актуальных направлений развития биохимии и биотехнологии. При достоверном присутствии биологической активности той или иной пептидной группы при разработке

Список литературы

1. Nagai T., Inoue R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly // *Food Chemistry*. 2004. Vol. 84. P. 181-186.
2. Cianciosi D., Yuliett Forbes-Hernández T., Afrin S., Gasparrini M., Reboredo-Rodriguez P., Pia Manna P., Zhang J., Bravo Lamas L., Martínez Flórez S., Agudo Toyos P., Quiles J. L., Giampieri F., Battino M. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review // *Molecules*. 2018. no 23(9). 2322.
3. Chan-Zapata I., Segura-Campos M. R. Honey and its protein components: Effects in the cancer immunology // *Journal of Food Biochemistry*. 2021. Vol. 45, Issue 5. e13613.

применения данных пептидов в качестве биологически активной добавки или лекарственного средства большое значение имеет доступность исходного сырья и лёгкость выделения из него пептидов. Предложенный метод выделения низкомолекулярных пептидов из маточного молочка и трутневого расплода обладает преимуществами как для применения в исследовательских целях, так и для коммерческого использования, т. к. методы ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации имеют высокую производительность, поддаются масштабированию и автоматизации, в то время как ВЭЖХ как метод контроля уже давно превратился в рутинный анализ, широко применяемый во многих сферах промышленности. Гибкость данного подхода объясняется широким ассортиментом коммерческих мембран для ультрафильтрации и носителей для ионообменной хроматографии.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

4. Leiva-Sabadini C., Alvarez S., P Barreira N., M. A. P. Schuh C., Sebastian Aguayo. Antibacterial Effect of Honey-Derived Exosomes Containing Antimicrobial Peptides Against Oral Streptococci // *International Journal of Nanomedicine*. 2021. Vol. 2021, no. 16. P. 4891-4900.

5. Bílikova K., Huang S.-C., Lin, I.-P., Šimůth J., Peng C.-C. Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of *Apis mellifera* // *Peptides*. 2015. Vol. 68. P. 190-196.

6. Nagai T., Inoue R., Suzuki N., Nagashima T. Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly // *Journal of Medicinal Food*. 2006. Vol. 9, no 3. P. 363-367.



7. Zhang X., Yu Y., Fan Z., Zhang W., Feng C. Royal jelly peptides: potential inhibitors of β -secretase in N2a/APP695swe cells // *Scientific Reports*. 2019. no 9. Article number: 168.
8. Minegaki N., Koshizuka T., Nishina S., Kondo H., Takahashi K., Sugiyama T., Inoue I. The Carboxyl-Terminal Penta-Peptide Repeats of Major Royal Jelly Protein 3 Enhance Cell Proliferation // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2020. Vol. 43, Issue 12. P. 1911-1916.
9. Патент № 2287334 С2 Российская Федерация, МПК А61К 35/64, А61Р 21/06, А61Р 25/00. Субстанции трутневого расплода, обладающие анаболическим и актопротекторным действием: № 2002118584/15: заявл. 09.07.2002: опубл. 20.11.2006 / Д.С. Лазарян, Е.М. Сотникова; заявитель Пятигорская государственная фармацевтическая академия
10. Katsumi Matsuzaki. Antimicrobial Peptides. Springer Singapore. 2019. 304 p.
11. Apostolopoulos V, Bojarska J., Chai T.-T., Elnagdy S., Kaczmarek K., Matsoukas J., New R., Parang K., Paredes Lopez O., Parhiz H., Perera C. O., Pickholz M., Remko M., Saviano M., Skwarczynski M., Tang Y., Wolf W. M., Yoshiya T., Zabrocki J., Zielenkiewicz P., AlKhazindar M., Barriga V., Kelaidonis K., Mousavinezhad Sarasia E., Toth I. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives // *Molecules*. 2021. Vol. 2, no 26. AN. 430.
12. Lowry O. H., Rosebrought N. J., Farr A. G., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, no 1. P. 265-275.
13. Noble J.E., Bailey M.J.A. Quantitation of protein // *Methods in Enzymology*. 2009. Vol. 463. P. 73-95.
- References**
1. Nagai T., Inoue R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry*. 2004; 84; 181–186.
2. Cianciosi D., Yuliett Forbes-Hernández T., Afrin S., Gasparri M., Reboredo-Rodriguez P., Pia Manna P., Zhang J., Bravo Lamas L., Martínez Flórez S., Agudo Toyos P., Quiles J. L., Giampieri F., Battino M. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*. 2018; 23(9): 2322.
3. Chan-Zapata I., Segura-Campos M. R. Honey and its protein components: Effects in the cancer immunology. *Journal of Food Biochemistry*. 2021; 45(5): e13613.
4. Leiva-Sabadini C., Alvarez S., P Barrera N., M. A. P. Schuh C., Sebastian Aguayo. Antibacterial Effect of Honey-Derived Exosomes Containing Antimicrobial Peptides Against Oral Streptococci. *International Journal of Nanomedicine*. 2021; 16: 4891-4900.
5. Bilikova K., Huang S.-C., Lin, I.-P., Šimuth J., Peng C.-C. Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of *Apis mellifera*. *Peptides*. 2015; 68; 190-196.
6. Nagai T., Inoue R., Suzuki N., Nagashima T. Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly. *Journal of Medicinal Food*. 2006; 9(3); 363-367.
7. Zhang X., Yu Y., Fan Z., Zhang W., Feng C. Royal jelly peptides: potential inhibitors of β -secretase in N2a/APP695swe cells. *Scientific Reports*. 2019; 9: 168.
8. Minegaki N., Koshizuka T., Nishina S., Kondo H., Takahashi K., Sugiyama T., Inoue I. The Carboxyl-Terminal Penta-Peptide Repeats of Major Royal Jelly Protein 3 Enhance Cell Proliferation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2020; 43(12): 1911-1916.
9. Patent № 2287334 С2 Russian Federation, МПК А61К 35/64, А61Р 21/06, А61Р 25/00. Drone brood substances with anabolic and actoprotective effects: № 2002118584/15: submitted. 09.07.2002: published. 20.11.2006 / Lazaryan D. S., Sotnikova E. M.; applicant Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy. (In Russ.)
10. Katsumi Matsuzaki. Antimicrobial Peptides. Springer Singapore. 2019, 304 p.



11. Apostolopoulos V, Bojarska J., Chai T.-T., Elnagdy S., Kaczmarek K., Matsoukas J., New R., Parang K., Paredes Lopez O., Parhiz H., Perera C. O., Pickholz M., Remko M., Saviano M., Skwarczynski M., Tang Y., Wolf W. M., Yoshiya T., Zabrocki J., Zielenkiewicz P., AlKhazindar M., Barriga V., Kelaidonis K., Mousavinezhad Sarasia E., Toth I. A Global Review on Short

Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules*. 2021; 2(26): 430.

12. Lowry O.H., Rosebrought N.J., Farr A.G., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1); 265-275.

13. Noble J.E., Bailey M.J.A. Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*. 2009; 463: 73-95.

Информация об авторах / Information about the authors

С.В. Клыченков – старший преподаватель кафедры «Общая биология и биохимия», Пензенский государственный университет, Педагогический институт им. В. Г. Белинского, Пенза, Россия

А.Д. Кручинина – к.б.н., доцент кафедры «Общая биология и биохимия», Пензенский государственный университет, Педагогический институт им. В. Г. Белинского, Пенза, Россия

S.V. Klychenkov – senior lecturer, dep. of General Biology and Biochemistry, Penza State University, Pedagogical Institute named after V. G. Belinsky, Penza, Russia, e-mail 79048510599@ya.ru, ORCID: 0000-0003-4748-1334

A.D. Kruchinina – Associate Professor, Department of General Biology and Biochemistry, Ph.D., Penza State University, Pedagogical Institute named after V. G. Belinsky, Penza, Russia, e-mail a.d.kruchinina@mail.ru, ORCID ID 0000-0002-2620-527X

Статья поступила в редакцию 20.09.2022; одобрена после рецензирования 31.10.2022; принята к публикации 9.11.2022.

The article was submitted 20.09.2022; approved after reviewing 31.10.2022; accepted for publication 9.11.2022.