

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТОДОЛОГИИ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ

Лукинова Е.А., Котенкова Е.А.,* Полищук Е.К.

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

Ключевые слова: антимикробные вещества, грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии, проточная цитометрия

Аннотация

В данной статье освещена проблема применения химических консервантов в пищевой промышленности, рассмотрены перспективы использования веществ природного происхождения с антимикробной направленностью действия для пролонгирования сроков хранения и улучшения качества пищевой продукции. Предложены способы выделения антимикробных веществ из эпителиальных и слизистых тканей животного происхождения с учетом минимизации потерь их биологической активности в соответствии со строением белково-пептидных молекул. На основании результатов определения антимикробной активности по отношению к *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* с использованием метода проточной цитометрии с красителями Eva Green и PI определено наиболее перспективное сырье и целесообразность применения слабокислотной экстракции с последующим трипсинолизом для высвобождения антимикробных веществ из препробелковых молекул и ультрафильтрации для очистки от высокомолекулярных соединений.

Original scientific paper

INFLUENCE OF APPROACHES TO ISOLATION OF ANIMAL BIOACTIVE SUBSTANCES ON ANTIMICROBIAL ACTION

Ekaterina A. Lukinova, Elena A. Kotenkova,* Ekaterina K. Polischuk

V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Key words: antimicrobial substances, gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, flow cytometry

Abstract

This article highlights the problem of the use of chemical preservatives in the food industry. The prospects of implementation natural substances with an antimicrobial effect for prolonging shelf life and improving the quality of food products are also discussed. Methods for isolating of antimicrobial substances from epithelial and mucous tissues of animal origin are proposed, taking into account the minimization of losses of their biological activity in accordance with the structure of protein-peptide molecules. Based on the results of the determination of antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* using flow cytometry, stains Eva Green and PI, the most promising raw materials were determined and the feasibility of using weakly acid extraction followed by trypsinolysis for releasing antimicrobial substances from preprotein molecules and ultrafiltration for purification from high-molecular compounds were investigated.

Введение

С давних пор люди использовали абсолютно разные способы продления срока годности пищевых продуктов: копчение, вяление, соление, добавление специй, использование сахара, квашение и т.д. На современном этапе развития пищевой промышленности классифицируют физические, химические и биологические методы консервации продуктов питания [1,2]. В настоящее время применяют различные консерванты и антиоксиданты химического синтеза (например, Е-200-Е-399). Добавки используются во всех областях пищевой промышленности, но большинство из них запрещены во многих странах мира, в том числе

и в Российской Федерации, из-за их небезопасности для здоровья человека и побочных эффектов при постоянном употреблении в пищу, ввиду чего особо остро стоит проблема поиска альтернативных природных веществ, продлевающих сроки годности продуктов.

В последнее время увеличивается спрос потребителей на продукты здорового питания, которые в том числе не содержат синтетические пищевые добавки [2]. В настоящее время уже используются такие коммерческие природные консерванты как низин «Nisaplin» (Великобритания), лизоцим «Clerizym Granulate» (Италия), натамицин «Natamycin» (Франция), а также

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Лукинова Е.А., Котенкова Е.А., Полищук Е.К. Изучение антимикробных свойств биологически активных веществ животного происхождения в зависимости от методологии их выделения. *Теория и практика переработки мяса*. 2018;3(3): 27-35. DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-27-35

FOR CITATION: Lukinova E.A., Kotenkova E.A., Polischuk E.K. Influence of approaches to isolation of animal bioactive substances on antimicrobial action. *Theory and practice of meat processing*. 2018;3(3): 27-35. (In Russ.). DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-3-27-35

различные специи, либо выделенные из них антиоксиданты [3].

Достаточно перспективными в этой связи являются антимикробные вещества с выраженным антибактериальным действием. Многочисленные исследования способствовали созданию базы данных The Antimicrobial Peptide Database [4] содержащей систематизированную информацию о 2818 антимикробных пептидах из царств бактерий, грибов, простейших, архей, растений и животных

Наиболее интенсивное исследование АМП наблюдалось в течение последних десяти лет. Одними из первых открытых антимикробных пептидов были α -дефензины и кателицидины [5], с тех пор этот список существенно пополнился и включает в себя магейнины [6], гистатины [7], азуроцирины [8], сфенисцины [9], плероцидины [10], дермасептины [11], цекропины [12], мелиттин [13], а также многие другие.

В России основоположниками изучения антимикробных пептидов были такие ученые как Кокряков В.Н. (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург), Шамова О.В. (Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова, Санкт-Петербург) и Овчинникова Т.В. (Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва) [14,15,16,17].

Известно, что животные ткани содержат огромное количество биоактивных соединений, обладающих различными фармакологическими свойствами [18]. Большинство изученных АМП млекопитающих были выделены из нейтрофильных гранулоцитов, однако они также были обнаружены в тонком кишечнике, языке, миелоидных и эпителиальных клетках, хоть и в меньшем количестве. Это позволяет рассматривать в качестве источника антимикробных веществ не только гранулярный аппарат, но и ткани слизистых оболочек млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных. Данные области, являясь пограничными зонами, постоянно контактирующими с широким спектром разнообразных биологических агентов, в том числе патогенными и условно-патогенными микроорганизмами и вирусами, агентами грибковой природы, потенциально могут содержать набор веществ антимикробной направленностью действия.

Особое внимание следует уделять именно выделению белково-пептидных компонентов ввиду их строения с обязательным учетом сохранения их биологической активности. Для достаточной степени измельчения пограничных зон, целесообразным считается применение технологии криоизмельчения в нескольких повторах. У большинства антимикробных веществ изоэлектрическая точка находится в щелочной среде, что обусловлено их строением, поэтому при их экстракции предпочтительно использование кислотных растворов. Кроме того, при высокой ионной силе они склонны к потере своей биологической

активности, именно поэтому использование солевых растворов нежелательно. Для удаления коллоидной взвеси, образующейся в ходе экстракции за счет присутствия в тканях большого количества соединительнотканых белков (коллаген и эластин), рациональным считается центрифугирование экстрактов [19,20,21]. По данным международной базы UniProt Protein Database, антимикробные пептиды содержатся в живом организме чаще всего в виде препробелка, то есть содержат в себе «проструктурную область», сигнальный пептид и сам зрелый пептид [3,4], поэтому целесообразно применять протеолитические ферменты (например, трипсин, пепсин, эластаза). Для разделения по молекулярным массам белково-пептидных веществ достаточно эффективно применяется ультрафильтрация [22]. Материал для изготовления УФ-фильтров, как правило, инертен к белковым веществам, не вызывает их адгезию и инактивацию, а сам метод быстрый и простой для воспроизведения.

Объекты и методы

Объектами исследования являлись пограничные зоны слизистых оболочек языка, гортани, подчелюстных слюнных желез, подчелюстных лимфатических узлов, носовой и ротовой полостей и прямой кишки говядины. Образцы отбирали на мясокомбинате ООО «КРРОС», Московская обл., Истринский р-н, д. Денежкино. Активность выделенных антимикробных пептидов рассматривали в полученных нативных экстрактах после нейтрализации, в экстрактах после ферментолиза и ультрафильтрациях с молекулярной массой меньше 50 кДа.

Образцы слизистых оболочек экстрагировали раствором 10% уксусной кислоты при гидромодуле 1:5, скорости перемешивания 400 об/мин, в течение 5 часов при (4–5) °С на ЛДУ (Лаботекс, Россия). Затем экстракты центрифугировали (Sigma 3K30, Германия) при 15000 об/мин и 4,0 °С, в течение 5 мин, отбирали надосадочную жидкость. Супернатант нейтрализовали до рН=6 раствором гидроксида натрия с концентрацией 4 моль/л. Далее часть нейтрализованных экстрактов подвергали трипсинолизу (PanReac, активность 328 USP U/mg), часть — ультрафильтрации на центрифужных ультрафильтрах Амикон Ультра- (50КДа, Millipore). Схема выделения наглядно представлена на Рис. 1.

Для определения антимикробной активности нейтрализованных нативных образцов и образцов после обработки трипсином по отношению к *Listeria monocytogenes* с использованием Eva Green 50 мкл образца смешивали с 50 мкл культуры (106 кл/мл), инкубировали ночь в термостате при 37 °С. К 20 мкл смеси добавляли 5 мкл Eva Green, добавляли 365 мкл деионизированной воды и 10 мкл DMSO (чтобы убрать фоновую красную флуоресценцию), инкубировали в темноте 10–15 мин, измеряли живые и мер-

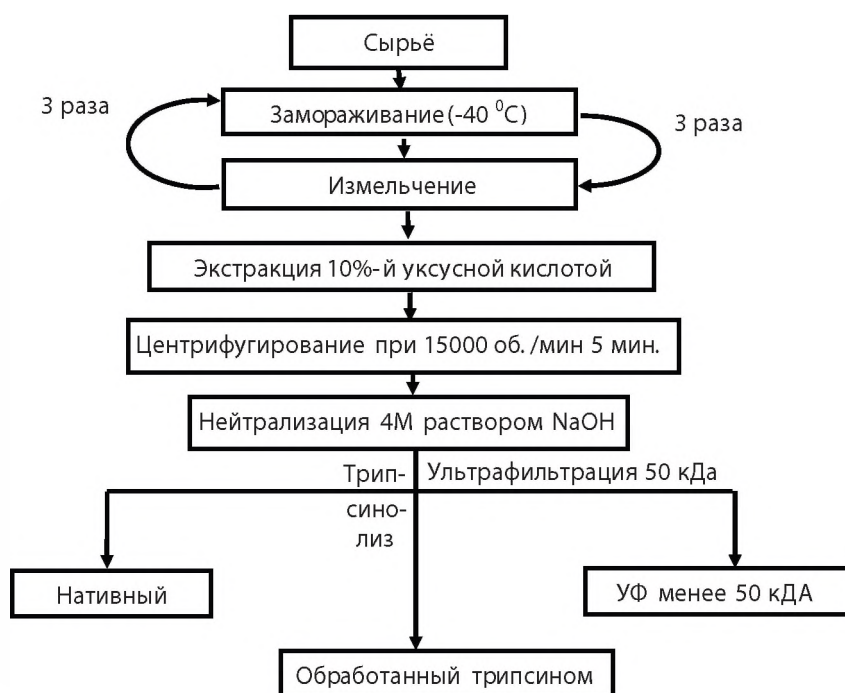


Рис. 1. Схема выделения антимикробных пептидов из животного сырья

твые клетки на проточном цитометре Guava EasyCyte (MerkMillipore).

Для определения антимикробной активности по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* нейтрализованных нативных образцов и образцов после ультрафильтрации (Мм менее 50 кДа) с использованием Eva Green и PI 10 мкл образца смешивали с 90 мкл культуры (106 кл/мл), инкубировали ночь в термостате при 37 °С. К 20 мкл смеси добавляли 5 мкл Eva Green, добавляли 365 мкл деионизированной воды и 10 мкл DMSO (чтобы убрать фоновую красную флуоресценцию), инкубировали в темноте 10–15 мин, измеряли живые клетки на проточном цитометре Guava EasyCyte (MerkMillipore). К 20 мкл смеси добавляли 3 мкл PI, добавляли 377 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида, инкубировали в темноте 10–15 мин, измеряли мертвые клетки на проточном цитометре Guava EasyCyte (MerkMillipore).

Результаты и обсуждение

Определение антимикробной активности по отношению к *Listeria monocytogenes* нативных образцов и обработанных трипсином методом проточной цитометрии с использованием красителя Eva Green представлено в Табл. 1.

Наибольшей активностью обладали образцы слизистых прямой кишки и ротовой полости, доля живых клеток снижалась до 2,7 %, обработка трипсином в отношении слизистых оболочек языка, подчелюстных слюнных желез и лимфатических узлов приводила к увеличению активности, в случае слизистых оболочек гортани, носовой полости и прямой кишки — не оказывала влияние на активность, а в отношении слизистой оболочки ротовой полости — напротив, снижала.

Таблица 1. Результаты определения антимикробной активности по отношению к *Listeria monocytogenes* нативных образцов и обработанных трипсином методом проточной цитометрии с использованием красителя Eva Green

Образец	% живых клеток	
	Нативные	Обработанные трипсином
Контроль (положительный)	92,3 %	
Контроль (отрицательный)	4,1 %	
Слизистая языка	81,9 %	36,2 %
Слизистая гортани	98,8 %	100,0 %
Подчелюстные слюнные железы	82,3 %	11,1 %
Подчелюстные лимфатические узлы	62,5 %	44,4 %
Слизистая носовой полости	100,0 %	100,0 %
Слизистая прямой кишки	20,8 %	96,4 %
Слизистая ротовой полости	2,7 %	6,0 %

Определение антимикробной активности по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* нативных образцов и образцов после УФ (Мм менее 50 кДа) методом проточной цитометрии с использованием красителя Eva Green и PI представлено в Табл. 2.

Наибольшей активностью обладали слизистые оболочки языка и носовой полости, доля выживших клеток снижалась до 22,0 %, увеличение количества клеток в некоторых случаях практически в 2 раза наблюдалось при добавлении к культуре экстрактов лимфатических узлов, слизистых оболочек ротовой полости и прямой кишки, однако в этих же образцах отмечалось наличие сохранившихся мертвых клеток (прокрашивались PI), величина которых достигала 51,6 % от всех клеток. Предположительно, это наблюдение связано с тем, что АМП «упакованы» в белковую молекулу, которая может использоваться микроорганизмами изначально

Таблица 2. Результаты определения антимикробной активности по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* нативных образцов и образцов после УФ (Мм менее 50 кДа) методом проточной цитометрии с использованием красителей Eva Green и PI

Образец	Нативные		после УФ (Мм менее 50 кДа)	
	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвых клеток (по отношению к сохранившимся клеткам)	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвые клетки (по отношению к сохранившимся клеткам)
Слизистая языка	22,0%	5,6%	49,9%	8,6%
Слизистая гортани	77,1%	1,1%	59,3%	5,2%
Подчелюстные слюнные железы	85,1%	1,6%	157,3%	8,4%
Подчелюстные лимфатические узлы	147,5%	51,6%	142,1%	4,1%
Слизистая носовой полости	40,5%	4,7%	44,4%	9,2%
Слизистая прямой кишки	144,3%	10,2%	49,5%	9,7%
Слизистая ротовой полости	166,2%	38,0%	44,8%	6,2%

Таблица 3. Результаты определения антимикробной активности по отношению к *Staphylococcus aureus* нативных образцов и образцов после УФ (Мм менее 50 кДа) методом проточной цитометрии с использованием красителей Eva Green и PI.

Образец	Нативные		после УФ (Мм менее 50 кДа)	
	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвых клеток (по отношению к сохранившимся клеткам)	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвые клетки (по отношению к сохранившимся клеткам)
Слизистая языка	32,1%	29,3%	62,1%	10,8%
Слизистая гортани	22,1%	34,0%	49,0%	25,8%
Подчелюстные слюнные железы	9,2%	66,8%	17,8%	18,5%
Подчелюстные лимфатические узлы	18,4%	77,3%	39,1%	38,7%
Слизистая носовой полости	7,0%	12,2%	24,2%	14,9%
Слизистая прямой кишки	21,8%	69,1%	31,9%	30,3%
Слизистая ротовой полости	76,1%	54,6%	83,3%	7,3%

как субстрат, а при высвобождении оказывать антимикробное действие. Отмеченное наблюдение подтверждалось тем, что в ультрафильтрах такого эффекта не наблюдалось. Кроме того, в некоторых УФ при удалении высокомолекулярных веществ антимикробная активность возрастала. Нативные экстракты слизистой оболочки гортани и подчелюстных слюнных желез не оказывали существенного антимикробного действия на культуру. УФ в отношении экстрактов слизистых оболочек гортани, ротовой полости и прямой кишки приводили к увеличению активности, в случае лимфатических узлов — не оказывала влияние на активность, а в отношении слизистой оболочки языка и подчелюстных слюнных желез — напротив, снижала.

Определение антимикробной активности по отношению к *Staphylococcus aureus* нативных образцов и образцов после УФ (Мм менее 50 кДа) методом проточной цитометрии с использованием красителя Eva Green и PI представлено в Табл. 3.

Активностью обладали практически все нативные образцы, наибольшее антимикробное действие было отмечено у экстрактов слизистой оболочки носовой полости, доля выживших клеток не превышала 7,0%. Стоит отметить, что доля сохранившихся мертвых клеток во всех образцах была значительно выше,

чем в эксперименте по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*, что свидетельствует о более высокой активности образцов относительно грамположительных бактерий. УФ в отношении большинства образцов не приводила к увеличению активности.

Заключение

Проведенное исследование антимикробной активности пограничных тканей слизистых оболочек говядины в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий методом проточной цитометрии свидетельствуют, что экстракты слизистых оболочек языка, ротовой и носовой полостей являются наиболее перспективными. Интересным также является наблюдения, обнаруженные в отношении подчелюстных лимфатических узлов и слизистой ротовой. Также в ходе работы была установлена целесообразность применения ферментативной обработки для высвобождения АМП из препробелковых молекул и ультрафильтрации для очистки от менее эффективных высокомолекулярных соединений.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-76-10033).

Introduction

Since ancient times, people have used completely different ways for extending the shelf life of food products: smoking, drying, salting, adding spices, using sugar, fermentation, *etc.* At present methods of food preservation are classified into physical, chemical and biological [1,2]. Currently, various chemically synthesized preservatives and antioxidants are used (for example, E-200-E-399). Additives are used in all areas of the food industry, but most of them are banned in many countries, including the Russian Federation, because of their insecurity for human health and side effects as a result of constant consumption. Therefore, the problem of finding alternative natural substances for prolonging the shelf life of products is particularly acute.

Recently, the demand of consumers for healthy food products, including those that do not contain synthetic food additives, has been increasing [2]. Currently, commercial natural preservatives such as nisin «Nisaptin» (UK), lysozyme «Clerizym Granulate» (Italy), natamycin «Natamycin» (France), as well as various spices or certain antioxidants are already used [3].

In this regards, natural antimicrobial substances are reasonable perspective. Numerous studies have contributed to the creation of the Antimicrobial Peptide Database [4] containing systematic information about 2818 antimicrobial peptides from the kingdoms of bacteria, fungi, protozoa, archaea, plants and animals.

The most intensive antimicrobial peptides (AMP) study has been observed over the last ten years. α -defensins and cathelicidins were one of the first opened antimicrobial peptides [5], since this list was substantially enlarged and includes magainins [6], histatins [7], azurocicrins [8], spheniscins [9], pleurocidins [10], dermaseptins [11], cecropins [12], melittins [13], and many others.

In Russia, the founders of the study of antimicrobial peptides were such scientists as V. N. Kokryakov. (Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg), O.V. Shamonova (All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine of A. M. Nikiforov, Saint Petersburg) and T.V. Ovchinnikova (Institute of Bioorganic Chemistry. Akademy of M. M. Shemyakina and Y. A. Ovchinnikova RAS, Moscow) [14,15,16,17].

It is known that animal tissues contain a huge number of bioactive compounds with different pharmacological properties [18]. Most of the studied mammalian antimicrobial peptides (AMP) were isolated from neutrophil granulocytes, but they were also found in the small intestine, tongue, myeloid and epithelial cells, albeit in smaller quantities. This fact allows us to consider as a source of antimicrobial substances not only the granular apparatus, but also the tissues of the mucous membranes of mammals, including farm animals. These tissues due to its border position are constantly in contact with a wide range of different biological agents, including pathogenic and opportunistic microorganisms and viruses, agents of fungal nature, and

therefore can potentially contain a set of substances with antimicrobial action.

Particular attention should be paid to the isolation of such proteins and peptides taking into account structure and preservation of biological activity. For a sufficient degree of grinding of border mucous membranes, it is considered appropriate to use the technology of cryo-grinding in several repetitions. According to structure, most antimicrobial substances have alkaline isoelectric point, so it is preferable to use acidic solutions for extraction. In addition, at high ionic strength, they are prone to loss of their biological activity, which is why the use of salt solutions is undesirable. To remove colloidal suspension formed during extraction due to the presence of a large number of connective proteins (collagen and elastin) in the tissues, centrifugation at high speeds of extracts is considered rational [19,20,21]. According to the international database UniProt Protein Database, antimicrobial peptides are contained in a living organism often in the form of prepropeptide, containing «prestructural region», signal peptide and mature peptide [3,4], so it is advisable to apply proteolytic enzymes (e.g. trypsin, pepsin, elastase). Ultrafiltration is used quite effectively for molecular weight separation of protein-peptide substances [22]. The material for the manufacture of UF filters, usually inert to protein substances, does not cause their adhesion and inactivation, and the method is quick and easy.

Objects and methods

The objects of the study were the border areas of the mucous membranes of the tongue, larynx, submandibular salivary glands, submandibular lymph nodes, nasal and oral cavities and rectum of beef. Samples taken at the factory JSC «CRROS», Moscow region, Istrinskiy dis., vill. Denezhkino. The activity of the isolated antimicrobial peptides (AMP) were studied in the obtained native extracts after neutralization, in extracts after fermentolysis and ultrafiltrates with a molecular weight less than 50 kDa.

Samples of mucous membranes were extracted with a solution of 10 % acetic acid at a hydromodule of 1:5, stirring speed of 400 rpm, for 5 hours at (4–5) °C at LDU (Labotex, Russia). Then the extracts were centrifuged (Sigma 3K30, Germany) at 15,000 rpm and 4.0 °C, for 5 min, the supernatant was taken. The supernatant was neutralized to pH=6 with a solution of sodium hydroxide with a concentration of 4 mol/l. Next, part of the neutralized extracts were subjected to trypsinolysis (PanReac, activity 328 USP U/mg), part — ultrafiltration on centrifuge ultrafilters Amicon Ultra-4 (50kDa, Millipore). The isolation scheme is clearly shown in Figure 1.

To determine the antimicrobial activity of neutralized native samples and samples after trypsin treatment against *Listeria monocytogenes*, using Eva Green 50 μ l of the sample was mixed with 50 μ l of culture (10^6 cells/ml), incubated overnight in a thermostat at 37 °C. Then to 20 μ l of the mixture 5 μ l of Eva Green was added, 365 μ l of deion-

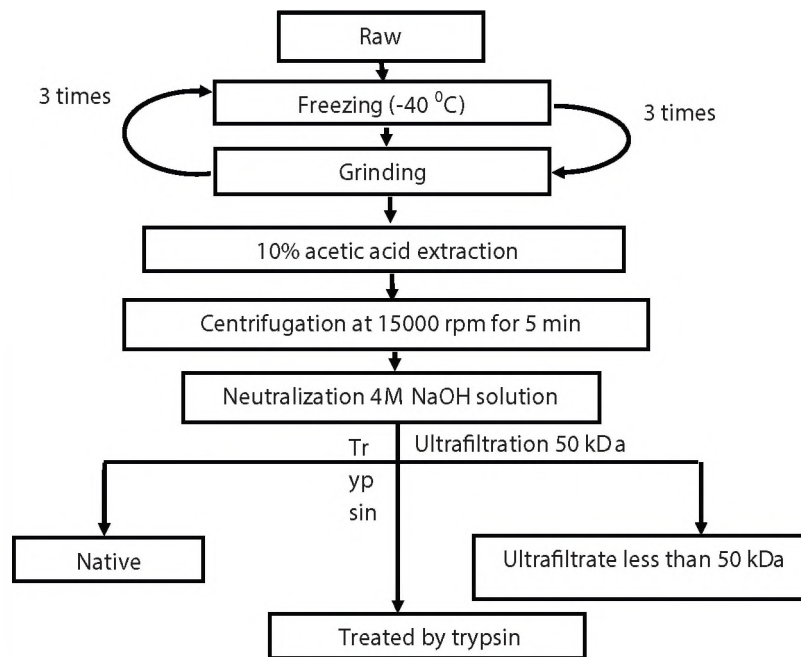


Figure 1. Scheme of antimicrobial peptides (AMP) isolation from animal raw materials

ized water and 10 µl of DMSO (to remove background red fluorescence), incubated in the dark for 10–15 min, living and dead cells were measured on the flow cytometer Guava EasyCyte (MerkMillipore).

To determine the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* neutralized native samples and samples after ultrafiltration (Mm less than 50 kDa) using Eva Green and PI 10 µl of the sample was mixed with 90 µl culture (106 KL/ml), incubated overnight in a thermostat at 37 °C. Then to 20 µl of the mixture 5 µl Eva Green was added, 365 µl of deionized water and 10 µl DMSO (10 µl DMSO to remove the background red fluorescence), incubated in the dark for 10–15 minutes, measured living cells on a flow cytometer Guava EasyCyte (MerkMillipore). 3 µl PI was added to 20 µl of the mixture, 377 µl of 0.9 % sodium chloride solution was added, 10–15 min were incubated in the dark, dead cells were measured on a flow cytometer Guava EasyCyte (MerkMillipore).

Results and discussion

Determination of antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* of native and trypsin-treated samples by flow cytometry using Eva Green dye is presented in Table 1.

Mucous of the rectum and the oral cavity possessed the highest activity, the ratio of living cells decreased to 2.7%, treatment of trypsin in relation to the mucous membranes of the tongue, submandibular salivary glands and lymph nodes led to the increase in activity, in the case of the mucous membranes of the larynx, nasal cavity and rectum — no effect on the activity, and in relation to mucous membrane in oral cavity, on the contrary, reduced.

Determination of antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* of native samples and samples after ultrafiltration (UF) (Mm less than 50 kDa) by flow cytometry using Eva Green and PI is presented in Table 2.

Table 1. Results of antimicrobial activity determination against *Listeria monocytogenes* of native and trypsin-treated samples by flow cytometry using Eva Green dye

Sample	% living cells	
	Native	Treated by trypsin
Control (positive)	92.3%	
Control (negative)	4.1%	
The mucosa of the tongue	81.9%	36.2%
The mucosa of the larynx	98.8%	100.0%
Submandibular salivary glands	82.3%	11.1%
Submandibular lymph nodes	62.5%	44.4%
The mucosa of the nasal cavity	100.0%	100.0%
The mucosa of the rectum	20.8%	96.4%
The mucosa of the oral cavity	2.7%	6.0%

The mucous membranes of the tongue and nasal cavity were most active, the proportion of surviving cells decreased to 22.0%. Adding extracts of lymph nodes, mucous membranes of the oral cavity and rectum to the culture lead to the increase in the number of survived cells almost by 2 times, but the proportion of dead cells (stained PI) reached 51.6% of all cells.

Presumably, this observation is due to the fact that antimicrobial peptides (AMP) are «packed» in a protein molecule, which can be used by microorganisms initially as a substrate, and only after releasing have an antimicrobial effect. The revealed observation was confirmed by the fact that such effect was not observed in ultrafilters. In addition, in some UF when removing high-molecular substances, antimicrobial activity increased. Native extracts of the mucous membrane of the larynx and submandibular salivary glands did not have a significant antimicrobial effect on the culture. UF the larynx, oral cavity and rectum

Table 2. Results of antimicrobial activity determination against *Pseudomonas aeruginosa* of native samples and samples after UF (Mm less than 50 kDa) by flow cytometry using Eva Green and PI dyes.

Sample	Native		After UF (Mm less than 50 kDa)	
	survived cells (in relation to control)	the proportion of dead cells (in relation to the survived cells)	survived cells (in relation to control)	the proportion of dead cells (in relation to the survived cells)
The mucosa of the tongue	22.0 %	5.6 %	49.9 %	8.6 %
Mucosa of the larynx	77.1 %	1.1 %	59.3 %	5.2 %
Submandibular salivary glands	85.1 %	1.6 %	157.3 %	8.4 %
Submandibular lymph nodes	147.5 %	51.6 %	142.1 %	4.1 %
The mucosa of the nasal cavity	40.5 %	4.7 %	44.4 %	9.2 %
The mucosa of the rectum	144.3 %	10.2 %	49.5 %	9.7 %
The mucosa of the oral cavity	166.2 %	38.0 %	44.8 %	6.2 %

Table 3. Results of antimicrobial activity determination in relation to *Staphylococcus aureus* of native samples and samples after UF (Mm less than 50 kDa) by flow cytometry using Eva Green and PI dyes.

Sample	Native		After UF (Mm less than 50 kDa)	
	survived cells (in relation to control)	the proportion of dead cells (in relation to the survived cells)	survived cells (in relation to control)	the proportion of dead cells (in relation to the survived cells)
The mucosa of the tongue	32.1 %	29.3 %	62.1 %	10.8 %
The mucosa of the larynx	22.1 %	34.0 %	49.0 %	25.8 %
Submandibular salivary glands	9.2 %	66.8 %	17.8 %	18.5 %
Submandibular lymph nodes	18.4 %	77.3 %	39.1 %	38.7 %
The mucosa of the nasal cavity	7.0 %	12.2 %	24.2 %	14.9 %
The mucosa of the rectum	21.8 %	69.1 %	31.9 %	30.3 %
The mucosa of the oral cavity	76.6 %	54.6 %	83.3 %	7.3 %

extracts led to an increase in activity, in the case of lymph nodes — did not affect the activity, and in respect of the mucous membrane of the tongue and submandibular salivary glands — on the contrary, reduced.

Determination of antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* of native samples and after UF (Mm less than 50 kDa) by flow cytometry using Eva Green and PI is presented in Table 3.

Almost all native samples possessed antimicrobial activity, the greatest antimicrobial effect was observed in extracts of the nasal mucosa, the proportion of surviving cells did not exceed 7.0 %. It is worth noting that the proportion of dead cells in all samples was significantly higher than in the experiment with respect to *Pseudomonas aeruginosa*, which indicates a higher activity of samples with respect to gram-positive bacteria. UF for most of the samples did not lead to increased activity.

Conclusion

The study of antimicrobial activity of substances included in the border tissues of bovine mucous membranes against gram-positive and gram-negative bacteria by flow cytometry suggests that the extracts of the mucous membranes of the tongue, oral and nasal cavities are the most promising. Interesting is also the observations found in respect of submandibular lymph nodes and oral mucosa. Application of enzymatic treatment for releasing the antimicrobial peptides (AMP) from preproprotein and ultrafiltration for purification from less effective high-molecular compounds were also reasonable.

Acknowledgements

This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 17-76-10033).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Лукинова, Е.А., Котенкова, Е.А., Макаренко, А.Н. (2017). Антимикробные вещества: альтернативный подход к продлению сроков хранения. *Теория и практика переработки мяса*, 2(3), 4–20.
2. Асланова, М.А., Дыдыкин, А.С., Федуллова, Л.В., Деревицкая, О.К. (2017). Влияние электромагнитной обработки на окислительную стабильность и микробиологическую безопасность мясных полуфабрикатов. *Теория и практика переработки мяса*, 2(3), 39–48.
3. Государственная политика Российской Федерации в области здорового питания. [Электронный ресурс: URL:

<https://rmapo.ru/medical/58-osnovy-gosudarstvennoy-politiki-rossiyskoy-federacii-v-oblasti-zdorovogo-pitaniya-naseleniya-na-period-do-2020-goda.html> Дата обращения: 04.07.2018 г.]

4. The Antimicrobial Peptide Database [Электронный ресурс: URL: <http://aps.unmc.edu> Дата обращения: 08.06.2018]
5. Кулакова, Е.В., Елизарова, В.М., Пампура, А.Н. (2012). Эндогенные антимикробные полипептиды — факторы неспецифической защиты организма. *Российский стоматологический журнал*, 6, 42–45.

6. Zasloff, M., Martin, B., Chen, H. — C. (1988). Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(3), 910–913.

7. Ge, Y., Yan, H., Hui, B., Ni, Y., Wang, S., Cai, T. (2002). Extraction of natural vitamin E from wheat germ by supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 685–689.

8. Shi, J. (1996). Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents Chemother*, 40(1), 115–121.

9. Thouzeau, C., Le Maho, Y., Froget, G., Sabatier, L., Le Bohec, C., Hoffmann, J.A., Bulet, P. (2003). Spheniscins, Avian β -Defensins in Preserved Stomach Contents of the King Penguin, Aptenodytes patagonicus. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51053–51058.

10. Cole, A.M., Weis, P., Diamond, G. (1997). Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18), 12008–12013.

11. Mor, A., Nicolas, P. (1994). Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *European Journal of Biochemistry*, 219(1–2), 145–154.

12. Hee Lee, I.N., Cho, Y., Lehrer, R.I. (1997). Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infection and Immunity*, 65(7), 2898–2903.

13. Wilcox, W., Eisenberg, D. (1992). Thermodynamics of melittin tetramerization determined by circular dichroism and implications for protein folding. *Protein Science*, 1(5), 641–653.

14. Овчинникова, Т.В. (2011). Структурно-функциональное исследование природных пептидных антибиотиков. Диссертация

ция докт. хим. наук. — М, Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. — 68 с.

15. Кокряков, В.Н. (1995). Физико-химические и функциональные свойства антимикробных белков и пептидов. Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб, НИИ экспериментальной медицины РАМН. — 48 с.

16. Шамова, О.В. (1995). Физико-химическая характеристика и функциональные свойства дефензинов и протегринов. Автореф. дис. канд. биол. наук. СПб, НИИ экспериментальной медицины РАМН. — 24 с.

17. Шамова, О.В. (2013). Молекулярно-клеточные основы реализации биологической активности антимикробных пептидов лейкоцитов. Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб, НИИ экспериментальной медицины РАМН. — 48 с.

18. Василевская, Е.Р., Федуллова, Л.В. (2015). Животное сырье как источник природных регуляторов иммунитета. *Актуальная биотехнология*, 3(14), 97–98.

19. Жаркова, М.С. (2016). Сочетанное действие белков и пептидов системы врожденного иммунитета и соединений различной химической природы в реализации их антибиотических свойств. Автореф. дис. канд. биол. наук. Санкт-Петербург, НИИ экспериментальной медицины РАМН. — 24 с.

20. Bhat, Z.F., Kumar, S., Bhat, H.F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5377–5392

21. Przybylski, R., Firdaus, L., Châtaigné, G., Dhulster, P., Nedjar, N. (2016). Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food Chemistry*, 211, 306–311.

22. Keska, P., Stadnik, J. (2017). Antimicrobial peptides of meat origin — an in silico and in vitro analysis. *Protein and Peptide Letters*, 24(2), 165–173.

REFERENCES

1. Lukinova, E.A., Kotenkova, E.A., Makarenko, A.N. (2017). Antimicrobial substances: an alternative approach to the extension of shelf life. *Theory and practice of meat processing*, 2(3), 4–20. (In Russian)

2. Aslanova, M.A., Dydykin, A.S., Fedulova, L.V., Derevitskaya, O.K. (2017). An effect of the electromagnetic treatment on oxidative stability and microbiological safety of meat semi-prepared products. *Theory and practice of meat processing*, 2(3), 39–48. (In Russian)

3. State policy of the Russian Federation in the field of healthy nutrition. [Electronic resource: URL: <https://rmapo.ru/medical/58-osnovy-gosudarstvennoy-politiki-rossiyskoy-federacii-v-oblasti-zdorovogo-pitaniya-naseleniya-na-period-do-2020-goda.html> Access data: 04.07.2018]. (In Russian)

4. The Antimicrobial Peptide Database [Electronic resource: URL: <http://aps.unmc.edu> Access data: 08.06.2018].

5. Kulakova, E.V., Elizarova, V.M., Pampura, A.N. (2012). Endogenous antimicrobial polypeptides — factors of nonspecific protection of the organism. *Rossiiskii Stomatologicheskii Zhurnal*, 6, 42–45. (In Russian)

6. Zasloff, M., Martin, B., Chen, H. — C. (1988). Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(3), 910–913.

7. Ge, Y., Yan, H., Hui, B., Ni, Y., Wang, S., Cai, T. (2002). Extraction of natural vitamin E from wheat germ by supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 685–689.

8. Shi, J. (1996). Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents Chemother*, 40(1), 115–121.

9. Thouzeau, C., Le Maho, Y., Froget, G., Sabatier, L., Le Bohec, C., Hoffmann, J.A., Bulet, P. (2003). Spheniscins, Avian β -Defensins in Preserved Stomach Contents of the King Penguin, Aptenodytes patagonicus. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51053–51058.

10. Cole, A.M., Weis, P., Diamond, G. (1997). Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18), 12008–12013.

11. Mor, A., Nicolas, P. (1994). Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *European Journal of Biochemistry*, 219(1–2), 145–154.

12. Hee Lee, I.N., Cho, Y., Lehrer, R.I. (1997). Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infection and Immunity*, 65(7), 2898–2903.

13. Wilcox, W., Eisenberg, D. (1992). Thermodynamics of melittin tetramerization determined by circular dichroism and implications for protein folding. *Protein Science*, 1(5), 641–653.

14. Овчинникова, Т.В. (2011). Structural and functional study of natural peptide antibiotics. Dissertation for the scientific degree of Doctor of Chemical Sciences. — М: Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry. — 68 p. (In Russian)

15. Kokryakov, V.N. (1995). Physico-chemical and functional properties of antimicrobial proteins and peptides. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Doctor of Biological Sciences. St. Petersburg: Research Institute of Experimental Medicine RAMS. — 48 p. (In Russian)

16. Shamova, O.V. (1995). Physico-chemical characteristics and functional properties of defensins and proteasins. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Candidate of Biological Sciences. St. Petersburg, Research Institute of Experimental Medicine RAMS. — 24 p. (In Russian)

17. Shamova, O.V. (2013). Molecular-cellular bases of realization of biological activity of antimicrobial peptides of leukocytes. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Doctor of Biological Sciences. St. Petersburg: Research Institute of Experimental Medicine RAMS. — 48 p. (In Russian)

18. Vasilevskaya, E.R., Fedulova, L.V. (2015). Animal raw materials as a source of natural regulators of immunity. *Actual biotechnology*, 3(14), 97–98. (In Russian)

19. Zharkova, M.S. (2016). Combined action of proteins and peptides of the system of innate immunity and compounds of different chemical nature in the realization of their antibiotic properties. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Candidate of Biological Sciences. St. Petersburg: Research Institute of Experimental Medicine RAMS. — 24 p. (In Russian)

20. Bhat, Z.F., Kumar, S., Bhat, H.F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5377–5392

21. Przybylski, R., Firdaus, L., Châtaigné, G., Dhulster, P., Nedjar, N. (2016). Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food Chemistry*, 211, 306–311.

22. Keska, P., Stadnik, J. (2017). Antimicrobial peptides of meat origin — an in silico and in vitro analysis. *Protein and Peptide Letters*, 24(2), 165–173.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Лукинова Екатерина Александровна — старший лаборант, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-92-11
E-mail: e.lukinova@fncps.ru

Котенкова Елена Александровна — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-92-11
E-mail: e.kotenkova@fncps.ru

*автор для переписки

Полищук Екатерина Константиновна — старший лаборант, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-92-11
E-mail: kat.1997@mail.ru

Критерии авторства

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 20.07.2018

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Ekaterina A. Lukinova — senior laboratory assistant, Experimental clinic-laboratory «Biologically active substances of an animal origin», V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-92-11
E-mail: e.lukinova@fncps.ru

Elena A. Kotenkova — candidate of technical sciences, senior research scientist, Experimental clinic-laboratory «Biologically active substances of an animal origin», V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences,
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-92-11
E-mail: e.kotenkova@fncps.ru
*corresponding author

Ekaterina K. Polischuk — senior laboratory assistant, Experimental clinic-laboratory «Biologically active substances of an animal origin», V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, 109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-92-11
E-mail: kat.1997@mail.ru

Contribution

Authors are equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 20.07.2018