



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2024. Т. 24, вып. 2. С. 150–160

Izvestiya of Saratov University. Physics, 2024, vol. 24, iss. 2, pp. 150–160

<https://fizika.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-2-150-160>, EDN: YJIWQU

Научная статья

УДК 60:543.645.6:591.342.5



Оптимизация методов выделения и идентификации пептидов, выделенных из личинок *Hermetia illucens*

О. С. Ларионова[✉], Я. Б. Древкин, Н. Д. Тычинин, Л. С. Крылова, Б. И. Древкин, С. В. Ларионов

Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н. И. Вавилова, Россия, 410012, г. Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина, зд. 4, стр. 3

Ларионова Ольга Сергеевна, доктор биологических наук, заведующий кафедрой микробиологии и биотехнологии, larionova1@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5457-0306>

Древкин Ярослав Борисович, кандидат химических наук, доцент кафедры микробиологии и биотехнологии, drevko@list.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4007-2140>

Тычинин Николай Дмитриевич, аспирант 2-го года обучения кафедры микробиологии и биотехнологии, tychininnd@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0001-5620-4550>

Крылова Любовь Сергеевна, ассистент кафедры микробиологии и биотехнологии, krivalyubov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5140-3008>

Древкин Борис Иванович, доктор химических наук, профессор кафедры микробиологии и биотехнологии, drevkobi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7025-1097>

Ларионов Сергей Васильевич, доктор ветеринарных наук, член-корреспондент РАН, профессор кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза», larionov.sgau@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5024-161X>

Аннотация. Данная статья посвящена выделению и идентификации водорастворимых пептидов, выделенных из биомассы личинок черной львинки *Hermetia illucens*. Цель этого исследования заключалась в оптимизации метода выделения и контроля белковых фракций для их препаративного получения. Установлено, что при помощи эксклюзионной хроматографии с использованием сит с размером пор 3.5 и 7 кДа получены белковые фракции с соответствующим интервалом молекулярных масс. При разделении анализируемых фракций методом высокоэффективной жидкостной хроматографии получена смесь трех пептидов с отличием в хроматографическом времени удерживания менее 1 минуты, что было подтверждено тремя параллельными экспериментами по выделению и очистке пептидов. Поскольку белковые фракции 1 и 2 имели сходные значения, а первая и третья – меньшую разницу во времени удерживания, полного разделения данных хроматографических пиков не происходило. Поэтому в дальнейшем из-за сходных физико-химических свойств нами было решено не разделять данные три белковые фракции с различными временами удерживания, а проводить исследования со смесью пептидов. Методом динамического рассеяния света установлено, что размер белков составил от 68 до 141 нм в белковой фракции 1, от 37 до 79 нм в белковой фракции 2 и от 43 до 122 нм в белковой фракции 3. Таким образом, авторами был разработан алгоритм выделения водорастворимых пептидов из личинок насекомых, основанный на разделении белков с использованием диализных мембран и дальнейшим подтверждением их состава и очистки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором и методом динамического рассеяния света.

Ключевые слова: водорастворимые пептиды, высокоэффективная жидкостная хроматография, ультрафиолетовый детектор, динамическое рассеяние света

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

Для цитирования: Ларионова О. С., Древкин Я. Б., Тычинин Н. Д., Крылова Л. С., Древкин Б. И., Ларионов С. В. Оптимизация методов выделения и идентификации пептидов, выделенных из личинок *Hermetia illucens* // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2024. Т. 24, вып. 2. С. 150–160. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-2-150-160>, EDN: YJIWQU

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Optimization of methods for isolation and identification of peptides isolated from *Hermetia illucens* larvae

O. S. Larionova[✉], Ya. B. Drevko, N. D. Tychinin, L. S. Krylova, B. I. Drevko, S. V. Larionov

Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N. I. Vavilov, 4 zd., 3 str. Petra Stolypina prosp., Saratov 410012, Russia

Olga S. Larionova, larionova1@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5457-0306>

Yaroslav B. Drevko, drevko@list.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4007-2140>

© Ларионова О. С., Древкин Я. Б., Тычинин Н. Д., Крылова Л. С., Древкин Б. И., Ларионов С. В., 2024



Nikolay D. Tychinin, tychininnd@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0001-5620-4550>

Lyubov S. Krylova, krilovalyubov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5140-3008>

Boris I. Drevko, drevkobi@mail.ru, <https://orcid.org/000-0002-7025-1097>

Sergey V. Larionov, larionov.sgau@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5024-161X>

Abstract. Background and Objectives: The development of resistance of microorganisms to existing antibacterial agents requires constant updating of existing drugs and research in the search for alternative sources of active substances. In recent years, the problem of the emergence of microorganisms resistant to all existing antimicrobial drugs has become systematic and requires significant attention from researchers to search for alternative sources of active substances. The main problem in the development of drugs based on antimicrobial peptides is the search for optimal solutions in the preparation of these substances. Therefore, optimization and search for methods of isolation, analysis and control of protein fractions of water-soluble peptides used for the subsequent development of antibacterial drugs based on them is an urgent task.

Materials and Methods: Optimal conditions and methods have been selected for the preparative production of water-soluble peptides isolated from the biomass of *Hermetia illucens* larvae. Optimization and search of methods for isolation, analysis and control of protein fractions of these water-soluble peptides will ensure the accuracy of the results and obtain optimal amounts of protein fractions. **Results:** It has been found that the use of molecular sieves makes it possible to obtain a mixture of three peptides with a difference in chromatographic retention time of less than 1 minute, which has been confirmed by three parallel experiments on the isolation and purification of peptides. During HPLC it has been noted that protein fractions 1 and 2 have similar values and the first and third protein fractions have a smaller difference in retention time, which is why there is no complete separation of these chromatographic peaks. Comparison of the percentage of the area of the peptides obtained allows us to talk about the possibility of obtaining peptides of the same size from *H. illucens* larvae by HPLC, and in combination with DLS to obtain protein fractions with very similar physicochemical and physical characteristics, since this type of chromatography separates substances according to their size. **Conclusion:** The use of high-performance liquid chromatography makes it possible to establish the reproducibility of the method of isolation of antimicrobial peptides by cold extraction with water and further stages of protein purification, salting and molecular sieve chromatography, which, in correlation with DLS analysis, makes it possible to reliably identify the peptides obtained, and the developed technology of isolation and purification makes it possible to produce these proteins on an industrial scale at low cost.

Keywords: water-soluble peptides, high-performance liquid chromatography, ultraviolet detector, dynamic light scattering

Acknowledgments: The research was supported by the Russian Science Foundation (project No. 22-26-00167, <https://rscf.ru/project/22-26-00167/>).

For citation: Larionova O. S., Drevko Ya. B., Tychinin N. D., Krylova L. S., Drevko B. I., Larionov S. V. Optimization of methods for isolation and identification of peptides isolated from *Hermetia illucens* larvae. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2024, vol. 24, iss. 2, pp. 150–160 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-2-150-160>, EDN: YJIWQU

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC0-BY 4.0)

1. Актуальность

Развитие резистентности микроорганизмов к представленным на фармацевтическом рынке антибактериальным средствам требует постоянного обновления существующих препаратов и проведения исследований в области поиска альтернативных источников действующих веществ. Следует отметить, что первый задокументированный прецедент резистентности микроорганизмов при антимикробной терапии у людей был зарегистрирован в 1940-х годах для пенициллина, что произошло всего через несколько лет после его коммерциализации [1]. Однако в последние годы проблема появления микроорганизмов, устойчивых ко всем существующим антимикробным препаратам, приобрела систематический характер и требует существенного внимания от исследователей к поиску альтернативных источников действующих веществ [2–5]. Исследования, направленные на получение антимикробных пептидов (АМП) с заданными свойствами, являются в настоящее время одним из актуальных направлений в мировой фармацевтике, что связано с их высокой эффективностью и низкой вероятностью

селекции устойчивых к АМП штаммов микроорганизмов. На данный момент времени поиск антимикробных пептидов, выделяемых из насекомых, интересует мировое научное сообщество, что подтверждается выделением пептидов, обладающих антимикробной активностью к *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus coagulans*, *Citrobacter freundii*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus sanguinis* и *Staphylococcus aureus* [6–11]. Также некоторые пептиды показывали свою высокую эффективность в отношении вирусов, препятствуя их репликации [12, 13]. Исследования антибактериальной активности пептидов, выделенных из личинок, сосредоточены на корреляции отдельных фракций, полученных из различных видов насекомых, против ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий [14–22]. Вместе с тем основной проблемой в разработке препаратов на основе антимикробных пептидов является поиск оптимальных решений для препаративного получения данных субстанций.

Изыскание оптимальных методов выделения, анализа и контроля белковых фракций водорастворимых пептидов, используемых для после-



дующей разработки антибактериальных препаратов на их основе, является актуальной задачей.

2. Материалы и методы

Получение водорастворимых пептидов из биомассы личинок черной львинки *H. illucens* проводили в несколько стадий. Первоначально выполняли гомогенизацию биомассы с дальнейшей экстракцией водорастворимых пептидов дистиллированной водой с последующим центрифугированием для отделения побочной липидной фракции. На втором этапе использовали метод высаливания белков сульфатом аммония [23]. Далее проводили разделение пептидов при помощи эксклюзионной хроматографии при использовании сит с размером пор 3.5 и 7 кДа (MEMBRA-CEL, Франция). В качестве подвижной фазы использовали дистиллированную воду для снижения негативного влияния солевых растворов и других веществ на белки. Содержание белка в исследуемых фракциях определяли по методу Лоури на спектрофотометре «ShimadzuUV-1280» (Shimadzu Corporation, Япония) при длине волны 450 нм [24].

В дальнейшем для более четкой идентификации нами использовался метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектором (стайер-Аквилон, Россия). Хроматографический анализ химической чистоты получаемых пептидов осуществлялся на хроматографе Стайер Аквилон (Аквилон, Россия) с УФ-детектором и колонке BioSep-SEC-s2000 (Phenomenex, США) при использовании в качестве элюента дистиллированной воды и скорости потока 0.5 мл/мин и длине волны 254 нм. Изучение размера полученных пептидов после разделения на диализных мембранах проводили методом динамического рассеяния света (ДРС) на приборе Zetasizer (Malvern Instruments, Великобритания). Все измерения проводились в 10-миллиметровой кювете, в качестве растворителя использовали дистиллированную воду. Исследования проводили на базе центра коллективного пользования «Симбиоз» с применением научного оборудования в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (г. Саратов).

3. Результаты и их обсуждение

Получение новых антибактериальных веществ является актуальной задачей в связи с ростом числа антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов и необходимостью поиска новых решений для эффективного лечения инфекционных заболеваний. Однако для успешного решения задачи получения новых антибактериальных веществ необходимо подобрать оптимальные методы для определения чистоты получаемых соединений. В том числе для АМП на данный момент времени не разработано достаточно достоверных методов анализа, позволяющих идентифицировать и определять чистоту соединений. Для идентификации пептидов нами предлагался метод динамического рассеяния света, который позволяет достаточно достоверно определить размер частиц и наличие микропримесей в растворе [25]. Однако для определения чистоты продукта наиболее эффективным способом, принятым в мировой фармакопее, является хроматография. Для определения и разделения белков нами была выбрана жидкостная хроматография, так как использование газовой хроматографии теоретически невозможно в связи с необходимостью перевода исследуемого образца в газообразное состояние, что достигается за счет использования высоких температур и не может быть применено к белкам. Наиболее распространенным и достоверным способом определения чистоты получаемых веществ с невысокой температурой разложения является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, который и применяется в повседневной фармацевтической практике. Для анализа полученных пептидов нами в качестве элюента использовался раствор фосфатно-солевого буфера, что было связано не с его ионной силой или разделяющей способностью, а необходимостью создания одинаковых условий хроматографирования по водородному показателю, который соответствовал при анализе $pH = 7.4$. Колонкой для анализа была выбрана BioSep-SEC-s2000. Среди различных методов хроматографии хроматография исключения размера (SEC) может рассматриваться как основной метод определения характеристики белков на основе молекулярной массы [26]. SEC представляет собой неразрушающий метод разделения, который может разделять и количественно оценивать белковые смеси, и поэтому он наиболее ценен для контроля качества в производстве белка и для разработки процесса очистки биофармацевтических препаратов. На данный момент времени одной из наиболее



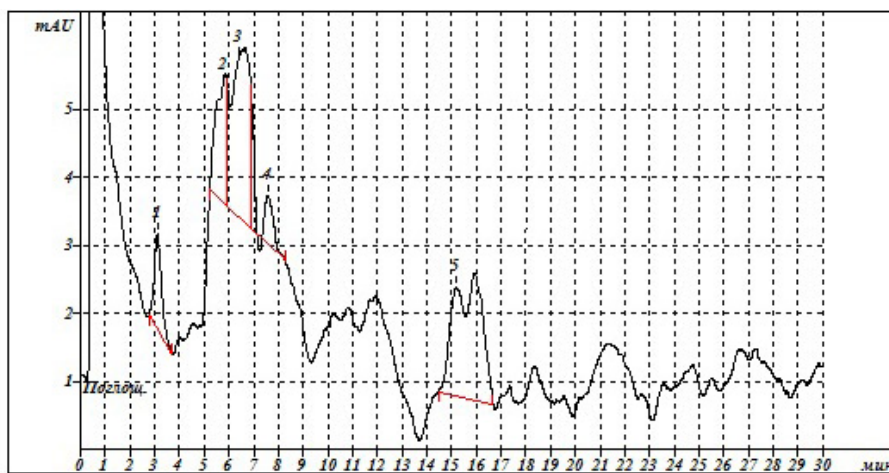
распространенных проблем, связанных с идентификацией биофармацевтических препаратов на основе белка, является изменение структуры белка более высокого порядка, приводящее к постоянному частичному разрушению или агрегированию. В последние годы большое внимание уделялось агрегации белка, поскольку она может повлиять на активность и растворимость белка или даже вызвать нежелательные иммунные реакции [27, 28]. Таким образом, можно предполагать, что для терапевтического применения белков возможность их агрегации представляется важной проблемой, определяя тем самым значительный интерес к методам их идентификации и изучения физико-химических характеристик [29].

Одним из наиболее успешно используемых методов разделения является жидкостная хроматография с использованием колонок, разделяющих белки в зависимости от их размера, т. е. в соответствии с их гидродинамическим радиусом за счет взаимодействия с пористой структурой хроматографической колонки. Белки с высокой массой при прохождении колонки не попадают в поры и выходят первыми, а молекулы меньшего размера могут задерживаться в порах колонки и, как следствие, иметь большее время удерживания. Чтобы достичь

необходимой дифференциации во времени хроматографии, колонка должна иметь достаточно большое количество пор и однородность. В отличие от других режимов хроматографии, SEC полагается на отсутствие какого-либо взаимодействия между анализируемым раствором и подвижной фазой. Основные принципы данной хроматографии описаны в литературе [30, 31]. SEC является идеальным решением для отделения и анализа белков от загрязняющих веществ, которые могут включать в себя агрегаты, клеточный мусор и другие примеси, возникающие в результате деградации с минимальной подготовкой образца. Кроме того, SEC может использоваться для оценки молекулярной массы с использованием калибровочных стандартов или абсолютных методов (рассеяние света) или для очистки образца.

Оптимальная скорость потока элюента нами была определена в 0.5 мл/мин, петля составляла 71.2 мкл. Анализ белковых фракций без разделения (без этапа проведения эксклюзионной хроматографии при использовании сит) показал наличие широкого спектра примесей (рис. 1).

Однако использование молекулярных сит позволило получить смесь трех пептидов с отличием в хроматографическом времени удерживания менее 1 мин (рис. 2–4), что было

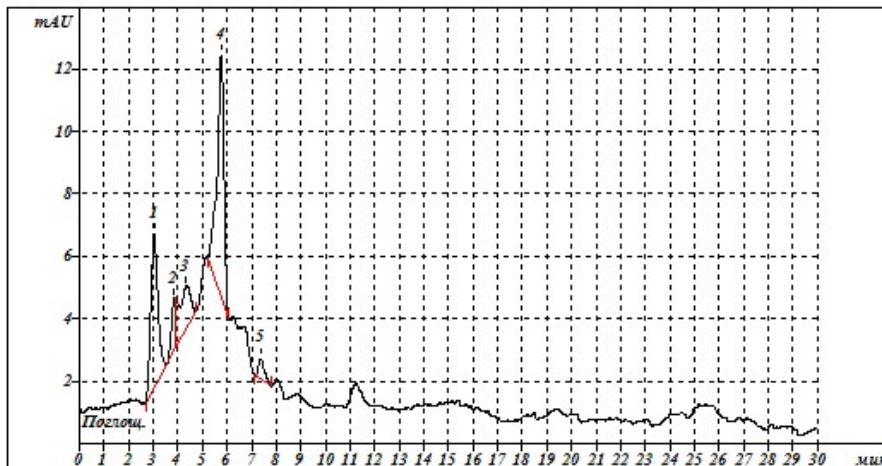


РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Абсолютная концентрация
Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь мАУ*сек	Площадь %	Название
1	3.118	29.25	7.66	
2	5.766	53.26	13.95	
3	6.399	123.76	32.42	
4	7.593	32.43	8.50	
5	15.19	143.00	37.46	
5	30.01	381.71	100.00	

Рис. 1. Хроматограмма белковых фракций, выделенных из биомассы личинок *H. illucens* без разделения (цвет онлайн)
Fig.1. Chromatogram of protein fractions isolated from the biomass of *H. illucens* larvae, without separation (color online)

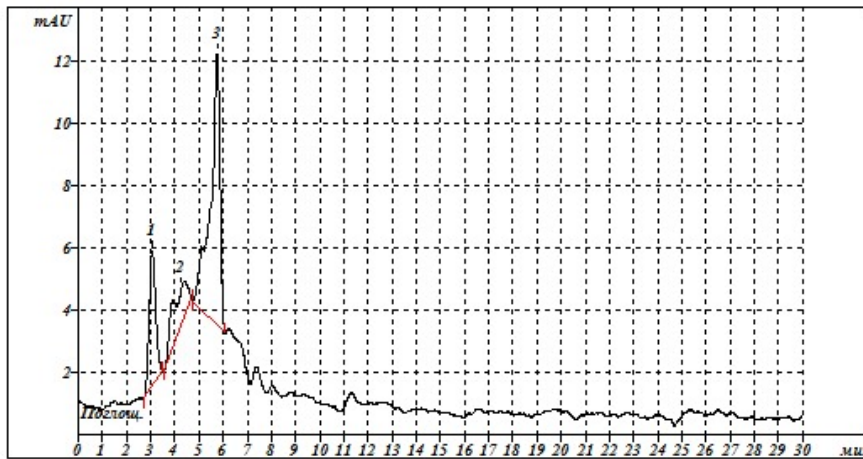


РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА
Метод расчета: Абсолютная концентрация
Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	3.025	96.40	30.00	
2	3.85	16.45	5.12	
3	4.329	48.91	15.22	
4	5.77	148.53	46.22	
5	7.358	11.04	3.44	
5	30.01	321.34	100.00	

Рис. 2. Хроматограмма белковой фракции 1, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* (цвет онлайн)

Fig. 2. Chromatogram of the protein fraction 1 isolated from the biomass of *H. illucens* larvae (color online)



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА
Метод расчета: Абсолютная концентрация
Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	3.056	81.58	21.90	
2	4.275	56.39	15.14	
3	5.758	234.54	62.96	
3	30.01	372.52	100.00	

Рис. 3. Хроматограмма белковой фракции 2, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* (цвет онлайн)

Fig. 3. Chromatogram of the protein fraction 2 isolated from the biomass of *H. illucens* larvae (color online)

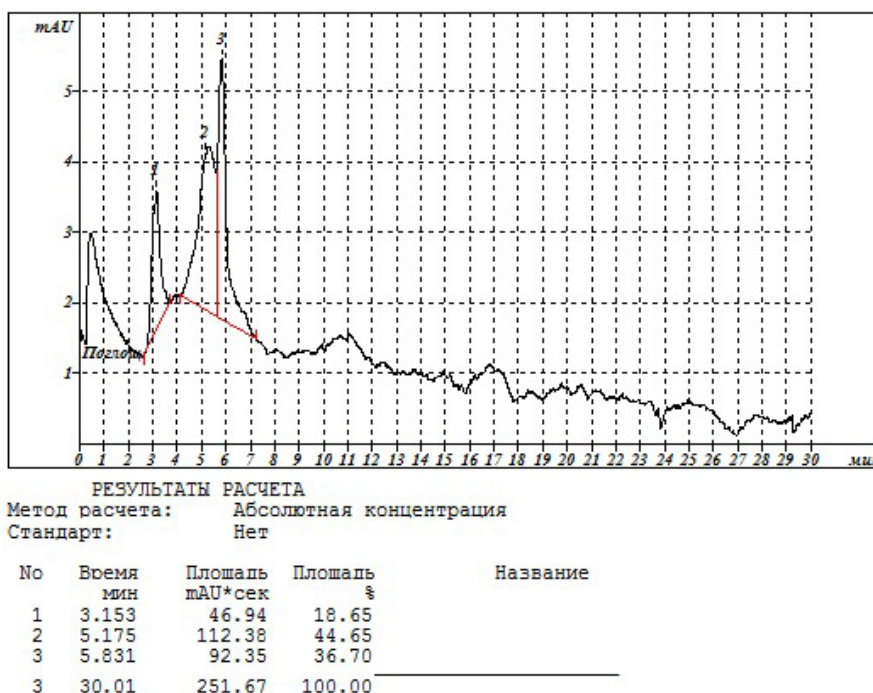


Рис. 4. Хроматограмма белковой фракции 3, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* (цвет онлайн)
Fig. 4. Chromatogram of the protein fraction 3 isolated from the biomass of *H. illucens* larvae (color online)

подтверждено тремя параллельными экспериментами по выделению и очистке пептидов из той же биомассы (табл. 1).

Следует отметить, что при проведении эксперимента в трех повторностях при соотношении белковой фракции 1 и белковой фракции 2 регистрировали более сходные значения, а отличие от белковой фракции 3 заключалось в том, что полученные белковые фракции 2 и 3 имели меньшую разницу во времени удерживания, из-за чего полного разделения данных хроматографических пиков не происходило. Поэтому далее нами было принято решение не разделять данные три белковые фракции с различным

временем удерживания из-за сходных физико-химических свойств, а проводить исследования динамического рассеяния света со смесью пептидов.

Сравнение выхода фракции по площади анализируемых пептидов позволяет предположить возможность получения пептидов одинакового размера из личинок *H. illucens* вышеуказанным методом выделения и очистки, а в сочетании с ДРС (рис. 5–7) – получение белковых фракций, обладающих очень близкими физико-химическими и физическими характеристиками, так как данный вид хроматографии производит разделение веществ в соответствии с их размером [32].

Таблица 1 / Table 1

Сравнительная характеристика белковых фракций, полученных из биомассы личинок *H. illucens* методом ВЭЖХ

Comparative characteristics of protein fractions obtained from the biomass of *H. illucens* larvae by HPLC

№ образца / Sample no.	Время удерживания белковой фракции, мин / Retention time of protein fraction, min			Площадь пика белковой фракции, мВА·с / The peak area of the protein fraction, mAU·s		
	фракция 1 / fraction 1	фракция 2 / fraction 2	фракция 3 / fraction 3	фракция 1 / fraction 1	фракция 2 / fraction 2	фракция 3 / fraction 3
1	3.02	3.85	4.33	96.4	65.36	148.53
2	3.06	4.28	5.76	81.58	56.39	234.54
3	3.16	5.18	5.83	46.94	112.38	92.35
<i>M ± m</i>	3.08 ± 0.08	4.44 ± 0.77	5.31 ± 0.96	74.97 ± 28.72	78.04 ± 34.03	158.47 ± ± 81.04

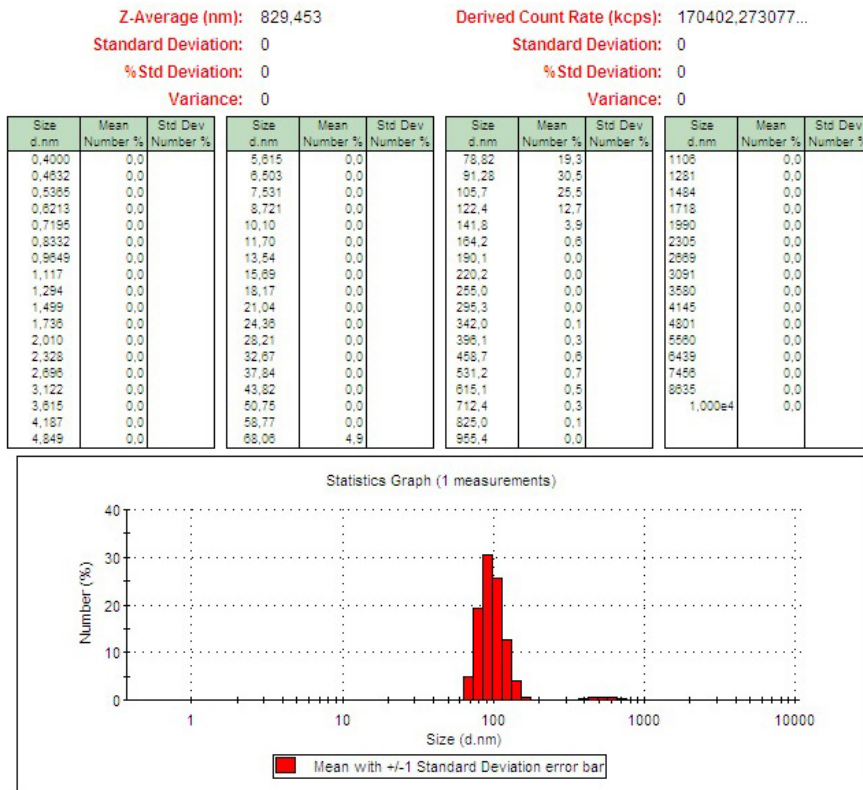


Рис. 5. Изучение белковой фракции 1, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* методом ДРС (цвет онлайн)
 Fig. 5. Study of protein fraction 1 isolated from the biomass of *H. illucens* larvae by the DLS method (color online)

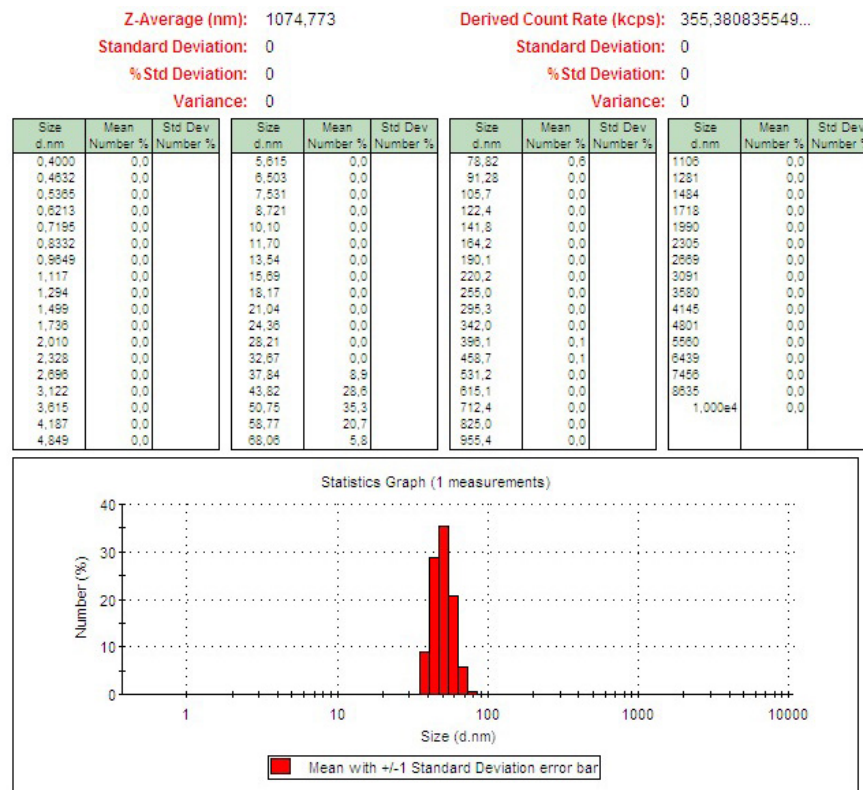


Рис. 6. Изучение белковой фракции 2, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* методом ДРС (цвет онлайн)
 Fig. 6. Study of protein fraction 2 isolated from the biomass of *H. illucens* larvae by the DLS method (color online)

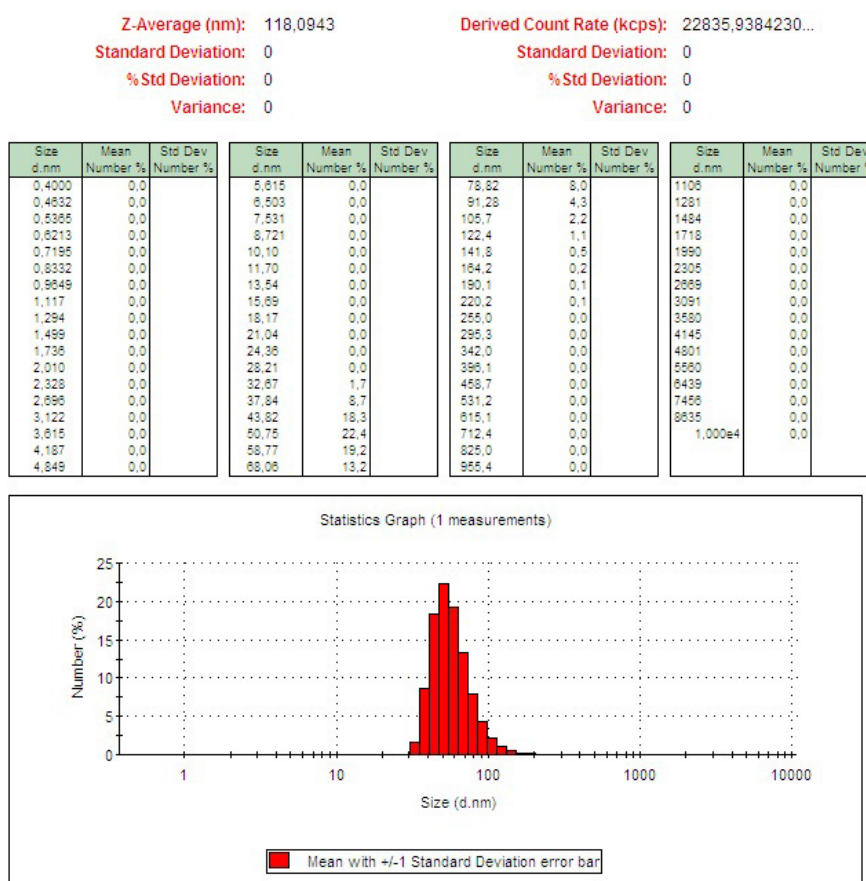


Рис. 7. Изучение белковой фракции 3, выделенной из биомассы личинок *H. illucens* методом ДРС (цвет онлайн)
 Fig. 7. Study of protein fraction 3 isolated from the biomass of *H. illucens* larvae by the DLS method (color online)

Таблица 2 / Table 2

Соотношение хроматографических выходов, %

Ratio of chromatographic outputs, %

№ образца / Sample no.	Хроматографический выход, % / Chromatographic output, %		
	фракция 1 / fraction 1	фракция 2 / fraction 2	фракция 3 / fraction 3
1	31.07	21.06	47.87
2	21.90	15.14	62.96
3	18.65	44.65	36.69
<i>M ± m</i>	24 ± 7	27 ± 18	49 ± 15

Методом динамического рассеяния света было установлено, что размер белков составил от 68 до 141 нм в белковой фракции 1; от 37 до 79 нм в белковой фракции 2 и от 43 нм до 122 нм в белковой фракции 3 соответственно (рис. 5–7). Также для подтверждения того, что полученные вещества являются белками, нами был проведен анализ растворов, используемых для анализа методом ДРС на содержание белка

методом Лоури [24]. Установлено, что чистота белка составляла 93–97%.

Заключение

Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии позволило установить воспроизводимость метода выделения антимикробных пептидов методом холодной экстракции дистиллированной водой и дальнейшими стадиями очистки белков, высаливанием и молекулярно-ситовой хроматографии, что, в корреляции с ДРС анализом, позволяет достоверно идентифицировать получаемые пептиды, а разработанный алгоритм выделения и очистки дает возможность производить данные белковые фракции в промышленных масштабах по низкой себестоимости.

Список литературы

1. Wright G. D. QA Antibiotic resistance where does it come from and what can we do about it // BMC Biology.



2010. Vol. 8. P. 123. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>
2. Arias C. A., Murray B. E. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2008. Vol. 6, № 5. P. 637–655. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.637>
3. Martens E., Demain A. L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States // *J. Antibiot.* 2017. Vol. 70, № 5. P. 520–526. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.30>
4. Payne D. J., Gwynn M. N., Holmes D. J., Pompliano D. L. Drugs for bad bugs: Confronting the challenges of antibacterial discovery // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007. Vol. 6. P. 29–40. <https://doi.org/10.1038/nrd2201>
5. Tommasi R., Brown D. G., Walkup G. K., Manchester J. I., Miller A. A. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015. Vol. 14. P. 529–542. <https://doi.org/10.1038/nrd4572>
6. Manniello D., Moretta A., Salvia R., Scieuzo C., Lucchetti D., Vogel H., Sgambato A., Falabella P. Insect antimicrobial peptides: Potential weapons to counteract the antibiotic resistance // *Cel. Mol. Life Sci.* 2021. Vol. 78, № 9. P. 4259–4282. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03784-z>
7. Lu H. L., Leger R. S. Insect immunity to Entomopathogenic fungi // *Adv. Genet.* 2016. Vol. 94. P. 251–285. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.002>
8. Hultmark D., Steiner H., Rasmuson T., Boman H. G. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* // *Eur. J. Biochem.* 1980. Vol. 106. P. 7–16. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991>
9. Ursic-Bedoya R., Buchhop J., Joy J. B., Durvasula R., Lowenberger C. Prolixicin: A novel antimicrobial peptide isolated from *Rhodnius prolixus* with differential activity against bacteria and *Trypanosoma cruzi* // *Insect Mol. Biol.* 2011. Vol. 20. P. 775–786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01107>
10. Vilcinskis A. Anti-infective therapeutics from the Lepidopteran model host *Galleria mellonella* // *Curr. Pharm. Des.* 2011. Vol. 17. P. 1240–1245. <https://doi.org/10.2174/138161211795703799>
11. Vonkavaara M., Pavel S. T. I., Hölzl K., Nordfelth R., Sjöstedt A., Stöven S. Francisella is sensitive to insect antimicrobial peptides // *J. Innate Immun.* 2013. Vol. 5. P. 50–59. <https://doi.org/10.1159/000342468>
12. Kruse T., Kristensen H. H. Using antimicrobial host defense peptides as anti-infective and immunomodulatory agents // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2008. Vol. 6, № 6. P. 887–895. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.6.887>
13. Chernysh S., Kim S. I., Bekker G., Pleskach V. A., Filatova N. A., Anikin V. B., Platonov V. G., Bulet P. Antiviral and antitumor peptides from insects // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99. P. 12628–12632. <https://doi.org/10.1073/pnas.192301899>
14. Thomas S., Andrews A. M., Hay N. P., Bourgoise S. The anti-microbial activity of maggot secretions: Results of a preliminary study // *J. Tissue Viability.* 1999. Vol. 9, № 4. P. 127–132. [https://doi.org/10.1016/s0965-206x\(99\)80032-1](https://doi.org/10.1016/s0965-206x(99)80032-1)
15. Bexfield A., Nigam Y., Thomas S., Ratcliffe N. A. Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // *Microbes Infect.* 2004. Vol. 6, № 14. P. 1297–1304. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.08.011>
16. Huberman L., Gollop N., Mumcuoglu K. Y., Block C., Galun R. Antibacterial properties of whole-body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots // *J. Wound Care.* 2007. Vol. 16, № 3. P. 123–127. <https://doi.org/10.12968/jowc.2007.16.3.27011>
17. Jaklic D., Lapanje A., Zupancic K., Smrke D., Gunde-Cimerman N. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria // *J. Med. Microbiol.* 2008. Vol. 57 (Pt. 5). P. 617–625. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47515-0>
18. Arora S., Lim C. S., Baptista C. Antibacterial activity of *Lucilia cuprina* maggot extracts and its extraction techniques // *Int. J. Integr. Biol.* 2010. Vol. 9, № 1. P. 43–48.
19. Arora S., Baptista C., Lim C. S. Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus* // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2011. Vol. 10, № 6. P. 1–8. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-6>
20. Barnes K. M., Gennard D. E., Dixon R. A. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species // *Bull. Entomol. Res.* 2010. Vol. 100, № 6. P. 635–640. <https://doi.org/10.1017/S000748530999071X>
21. Masiero F. S., Aquino M. F. K., Nassu M. P., Pereira D. I. B., Leite D. S., Thyssen P. J. First record of larval secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* // *Neotrop. Entomol.* 2017. Vol. 46, № 1. P. 125–129. <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0444-4>
22. El-Bassiony G. M., Stoffolano J. G. In vitro antimicrobial activity of maggot excretions/secretions of *Sarcophaga (Liopygia) argyrostoma* (Robineau-Desvoidy) // *Afr. J. Microbiol. Res.* 2016. Vol. 10, № 27. P. 1036–1043. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8102>
23. Швайцер М., Грин Б. Э., Сигалл К. И., Лоджи Д. Баркон ньютрасайнс корп. Получение растворимого изолята белка канолы. Патент № 2475036 С2 РФ, МПК А23J 1/14, А23J 3/14; № 2011105041/10; Заявл. 10.07.09; Опубл. 20.02.13, Бюл. 27. 23 с.
24. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
25. Ларионова О. С., Древо Я. Б., Ханадеев В. А., Горшунуова С. В., Козлов Е. С., Ларионов С. В. Анализ



- белковых фракций водорастворимых пептидов методом динамического рассеяния света // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия : Физика. 2023. Т. 23, вып. 1. С. 37–45. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2023-23-1-37-45>
26. Hong P., Koza S., Bouvier E. S. P. A Review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates // *J. Liq. Chromatogr. RT.* 2012. Vol. 35. P. 2923–2950. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724>
 27. Patten P. A., Schellekens H. The immunogenicity of biopharmaceuticals: Lessons learned and consequences for protein drug development // *Dev. Biol. (Basel)*. 2003. Vol. 112. P. 81–97.
 28. Rosenberg A. S. Effects of protein aggregates: An immunologic perspective // *AAPS J.* 2006. Vol. 8. P. 501–507. <https://doi.org/10.1208/aapsj080359>
 29. Philo J. S. A critical review of methods for size characterization of non-particulate protein aggregates // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2009. Vol. 10. P. 359–372. <https://doi.org/10.2174/138920109788488815>
 30. Striegel A., Yau W. W., Kirkland J. J., Bly D. D. Modern size-exclusion liquid chromatography: Practice of gel permeation and gel filtration chromatography. 2nd ed. New York : Wiley, 2009. 512 p.
 31. Wu C. S. Handbook of size-exclusion chromatography and related techniques. New York : Marcel Dekker, 2003. 720 p.
 32. Хлебцов Б. Н., Пылаев Т. Е., Ханадеев В. А., Хлебцов Н. Г. Применение спектроскопии поглощения и динамического рассеяния света в исследованиях систем золотых наночастиц + ДНК // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия : Физика. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 136–149. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2017-17-3-136-149>
- References**
1. Wright G. D. QA Antibiotic resistance where does it come from and what can we do about it. *BMC Biology*, 2010, vol. 8, pp. 123. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>
 2. Arias C. A., Murray B. E. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2008, vol. 6, no. 5, pp. 637–655. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.637>
 3. Martens E., Demain A. L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *J. Antibiot.*, 2017, vol. 70, no. 5, pp. 520–526. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.30>
 4. Payne D. J., Gwynn M. N., Holmes D. J., Pompliano D. L. Drugs for bad bugs: Confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2007, vol. 6, pp. 29–40. <https://doi.org/10.1038/nrd2201>
 5. Tommasi R., Brown D. G., Walkup G. K., Manchester J. I., Miller A. A. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2015, vol. 14, pp. 529–542. <https://doi.org/10.1038/nrd4572>
 6. Manniello D., Moretta A., Salvia R., Scieuzo C., Lucchetti D., Vogel H., Sgambato A., Falabella P. Insect antimicrobial peptides: Potential weapons to counteract the antibiotic resistance. *Cel. Mol. Life Sci.*, 2021, vol. 78, no. 9, pp. 4259–4282. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03784-z>
 7. Lu H. L., Leger R. S. Insect immunity to Entomopathogenic fungi. *Adv. Genet.*, 2016, vol. 94, pp. 251–285. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.002>
 8. Hultmark D., Steiner H., Rasmuson T., Boman H. G. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*, 1980, vol. 106, pp. 7–16. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991>
 9. Ursic-Bedoya R., Buchhop J., Joy J. B., Durvasula R., Lowenberger C. Prolixicin: A novel antimicrobial peptide isolated from *Rhodnius prolixus* with differential activity against bacteria and *Trypanosoma cruzi*. *Insect Mol. Biol.*, 2011, vol. 20, pp. 775–786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01107>
 10. Vilcinskas A. Anti-infective therapeutics from the Lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Curr. Pharm. Des.*, 2011, vol. 17, pp. 1240–1245. <https://doi.org/10.2174/138161211795703799>
 11. Vonkavaara M., Pavel S. T. I., Hölzl K., Nordfelth R., Sjöstedt A., Stöven S. Francisella is sensitive to insect antimicrobial peptides. *J. Innate Immun.*, 2013, vol. 5, pp. 50–59. <https://doi.org/10.1159/000342468>
 12. Kruse T., Kristensen H. H. Using antimicrobial host defense peptides as anti-infective and immunomodulatory agents. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2008, vol. 6, no. 6, pp. 887–895. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.887>
 13. Chernysh S., Kim S. I., Bekker G., Pleskach V. A., Filatova N. A., Anikin V. B., Platonov V. G., Bulet P. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, pp. 12628–12632. <https://doi.org/10.1073/pnas.192301899>
 14. Thomas S., Andrews A. M., Hay N. P., Bourgoise S. The anti-microbial activity of maggot secretions: Results of a preliminary study. *J. Tissue Viability*, 1999, vol. 9, no. 4, pp. 127–132. [https://doi.org/10.1016/s0965-206x\(99\)80032-1](https://doi.org/10.1016/s0965-206x(99)80032-1)
 15. Bexfield A., Nigam Y., Thomas S., Ratcliffe N. A. Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect.*, 2004, vol. 6, no. 14, pp. 1297–1304. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.08.011>
 16. Huberman L., Gollop N., Mumcuoglu K. Y., Block C., Galun R. Antibacterial properties of whole-body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots. *J. Wound Care.*, 2007, vol. 16, no. 3, pp. 123–127. <https://doi.org/10.12968/jowc.2007.16.3.27011>
 17. Jaklic D., Lapanje A., Zupancic K., Smrke D., Gunde-Cimerman N. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J. Med. Microbiol.*, 2008, vol. 57 (pt. 5), pp. 617–625. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47515-0>



18. Arora S., Lim C. S., Baptista C. Antibacterial activity of *Lucilia cuprina* maggot extracts and its extraction techniques. *Int. J. Integr. Biol.*, 2010, vol. 9, no. 1, pp. 43–48.
19. Arora S., Baptista C., Lim C. S. Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2011, vol. 10, no. 6, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-6>
20. Barnes K. M., Gennard D. E., Dixon R. A. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. *Bull. Entomol. Res.*, 2010, vol. 100, no. 6, pp. 635–640. <https://doi.org/10.1017/S000748530999071X>
21. Masiero F. S., Aquino M. F. K., Nassu M. P., Pereira D. I. B., Leite D. S., Thyssen P. J. First record of larval secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Neotrop. Entomol.*, 2017, vol. 46, no. 1, pp. 125–129. <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0444-4>
22. El-Bassiony G. M., Stoffolano J. G. In vitro antimicrobial activity of maggot excretions/secretions of *Sarcophaga (Liopygia) argyrostoma* (Robineau-Desvoidy). *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2016, vol. 10, no. 27, pp. 1036–1043. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8102>
23. Schweizer M., Green B. E., Segal K. I., Lodges D. Burcon Nutrascience MB Corp. *Soluble Canola Protein Isolate Production*. Patent no. 2475036 RF, 2013 (in Russian).
24. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chemistry*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.
25. Larionova O. S., Drevko Ya. B., Khanadeev V. A., Gorbunova S. V., Kozlov E. S., Larionov S. V. Analysis of protein fractions of water-soluble peptides by dynamic light scattering. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2023, vol. 23, iss. 1, pp. 37–45 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2023-23-1-37-45>
26. Hong P., Koza S., Bouvier E. S. P. A Review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *J. Liq. Chromatogr. RT*, 2012, vol. 35, pp. 2923–2950. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724>
27. Patten P. A., Schellekens H. The immunogenicity of biopharmaceuticals: Lessons learned and consequences for protein drug development. *Dev. Biol. (Basel)*, 2003, vol. 112, pp. 81–97.
28. Rosenberg A. S. Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. *AAPS J.*, 2006, vol. 8, pp. 501–507. <https://doi.org/10.1208/aapsj080359>
29. Philo J. S. A critical review of methods for size characterization of non-particulate protein aggregates. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2009, vol. 10, pp. 359–372. <https://doi.org/10.2174/138920109788488815>
30. Striegel A., Yau W. W., Kirkland J. J., Bly D. D. *Modern size-exclusion liquid chromatography: Practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. 2nd ed. New York, Wiley, 2009. 512 p.
31. Wu C. S. *Handbook of size-exclusion chromatography and related techniques*. New York, Marcel Dekker, 2003. 720 p.
32. Khlebtsov B. N., Pylaev T. E., Khanadeev V. A., Khlebtsov N. G. Application of absorption and dynamic light scattering spectroscopy in studies of gold nanoparticle + DNA systems. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 136–149 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2017-17-3-136-149>

Поступила в редакцию 30.10.2023; одобрена после рецензирования 23.01.2024; принята к публикации 21.02.2024
The article was submitted 30.10.2023; approved after reviewing 23.01.2024; accepted for publication 21.02.2024