

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-2-97-105>

Поступила 24.04.2021

Поступила после рецензирования 20.05.2021

Принята в печать 28.06.2021

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

ВОДНО-СОЛЕВАЯ ЭКСТРАКЦИЯ КАК МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ СМЕСИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СВИНЬИ

Василевская Е. Р., Арюзина М. А., Ветрова Е. С.*

Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:*побочное сырье, извлечение биомолекул, биоактивные вещества, электрофорез***АННОТАЦИЯ**

Актуальным решением проблемы переработки отходов мясной промышленности в России является получение полезных биологически активных соединений из богатых ими органов. Целью настоящего исследования было изучение эффективности метода экстракции физиологическим раствором как способа извлечения смеси перспективных биологически активных соединений из поджелудочной железы свиньи, а также определение оптимального времени процесса. Исследование заключалось в проведении экстракции поджелудочной железы 0,9% раствором натрия хлорида в течение 5 ч 30 мин с дальнейшим определением общей концентрации белка биуретовым методом. Также получен протеомный профиль образцов, отбираемых на протяжении всего процесса, методом одномерного денатурирующего электрофореза по Лэммли в 12,5% полиакриламидном геле. На основе анализа зависимости содержания общего белка в экстрагенте от времени определено оптимальное время экстракции, которое составило 135–150 мин. По результатам электрофореза и данных биоинформационного анализа оптимальное время экстракции для целенаправленного выделения низкомолекулярной фракции соединений составляло 90 мин. На электрофореграммах обнаружены 13 белковых полос с молекулярной массой 52 кДа и ниже. Таким образом, 0,9% раствор натрия хлорида применим для получения экстрактов, богатых биоактивными веществами, в том числе гормонами, ферментами и другими физиологически активными соединениями.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по Государственному заданию № FNEN-2019–0008 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

Received 24.04.2021

Accepted in revised 20.05.2021

Accepted for publication 28.06.2021

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

SALINE EXTRACTION AS A METHOD OF OBTAINING A MIXTURE OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS OF PROTEIN NATURE FROM A PORCINE PANCREAS

Ekaterina R. Vasilevskaya, Marina A. Aryuzina, Evgeniya S. Vetrova*

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

KEY WORDS:*by-product raw materials, extraction of biomolecules, bioactive compounds, electrophoresis***ABSTRACT**

A relevant solution to the problem of processing meat industry waste in Russia is to obtain useful biologically active compounds from abundant organs. The aim of this study was to examine the effectiveness of the saline extraction as a method for extracting a mixture of promising biologically active compounds from the porcine pancreas, as well as to determine the optimal time for the process. The study consisted of extraction of the porcine pancreas with 0,9% sodium chloride solution for 5 h 30 min with further determination of the total protein concentration and proteomic profile of the samples taken throughout the process. Based on the analysis of the dependence of the total protein content in the extractant on time, the optimal extraction time was determined to be 135–150 minutes. When studying the results of electrophoresis and the data of their processing, the optimal extraction time for the targeted isolation of the low-molecular fraction of compounds was also determined to be 90 min. At the same time, 13 protein bands with a molecular weight of 52 kDa and below were found on the electropherograms. Saline should be considered applicable for obtaining extracts rich in biologically active substances, incl. hormones, enzymes and other physiologically active compounds.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No. FNEN-2019–0008 of the state assignment of the V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of RAS.

1. Введение

Одной из главных проблем большинства пищевых производств в РФ является вопрос утилизации или рационального использования отходов. На многих предприятиях мясной промышленности не налажена система сбора побочного

и эндокринно-ферментного сырья в связи со сложностью внедрения новых технологий или отсутствием потенциальных потребителей, поэтому практически весь объем сырья, не задействованного напрямую в схеме производства, утилизируется. По данным исследований [1] в России ежегодно

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Василевская, Е. Р. Арюзина, М. А. Ветрова, Е. С. (2021). Водно-солевая экстракция как метод получения смеси биологически активных соединений белковой природы из поджелудочной железы свиньи. *Пищевые системы*, 4(2), 97-105. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2020-4-2-97-105>

FOR CITATION: Vasilevskaya, E.R., Aryuzina, M.A., Vetrova, E.S. (2021). Saline extraction as a method of obtaining a mixture of biologically active compounds of protein nature from a porcine pancreas. *Food systems*, 4(2), 97-105. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-2-97-105>

получается более 1 млн т отходов мясной промышленности. Из всего объема побочного сырья на переработку направляется 20%. На основе полученного ресурса производят корма, кормовые добавки, применяемые в животноводстве, и удобрения — в сельском хозяйстве.

Интерес к побочному эндокринно-ферментному сырью животного происхождения возрос в 30-е годы XX века, когда начала развиваться медицина и ветеринария. После 1990-х годов использование сырья сократилось, так как уменьшился объем переработки скота и закрылись многие фармацевтические заводы, оборудованные для производства. Тем не менее исследования в этой области продолжают проводиться, поскольку спрос на лекарственные препараты растет, а полезные для человека соединения широко применяются в медицине (например, инсулин, рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза, липокаин, трипсин, химотрипсин и др.) и в пищевой промышленности в качестве пищевых добавок [2]. Многие соединения и их функции еще полностью не изучены, что открывает новое поле для исследований, поэтому многие авторы активно занимаются изучением этого направления [3,4,5]. Так, ведется изучение таких иммунокомпетентных органов свиньи, как тимус, селезенка, мезентеральные лимфатические узлы. Авторами [6,7,8,9,10] доказано, что в данном сырье содержатся функциональные белки, оказывающие противовоспалительное действие, регулирующие метаболические процессы, а также участвующие в иммунном ответе организма. Помимо указанных органов в качестве сырья для получения биологически активных соединений используют кровь свиней и коров с целью выделения гемоглобина, плазмы [11], а также семенники, гипофиз, слизистые оболочки различных частей организмов крупного рогатого скота для получения специфических биоактивных пептидов, гормонов и других полезных для человека соединений [12,13,14,15].

Поджелудочная железа свиньи является источником целого спектра биологически активных веществ (ферментов и гормонов), отвечающих за многие биохимические процессы, в том числе влияющие на метаболические пути [16]. Разработаны технологии получения таких соединений, как α -химотрипсин и трипсин, трипсиновый ингибитор. Также выделяют рибо- и дезоксирибонуклеазу [12,13], инсулин, производство которого привлекает особый интерес на протяжении уже почти века в связи с растущей потребностью лечения сахарного диабета [17]. Потенциал и перспективность свиньи как объекта в существующих и еще разрабатываемых технологиях основывается в первую очередь на схожем функционировании поджелудочной железы свиньи и человека, что позволяет транслировать влияние на человеческий организм определенных соединений, полученных из органа свиньи [18,19]. Благодаря вышеописанным свойствам поджелудочная железа свиньи используется для производства таких ферментных препаратов, как «Эластолитин», «Колитин», «Панкреатин», «Ликреаз» и др. [2]. Следует отметить, что перспективность органа не реализована полностью до сих пор. Это связано не только с приостановлением изучения поджелудочной железы в конце XX века, но и, в первую очередь, с возрождающимся интересом к различным органам, тканям, биологическим жидкостям, которые также исследуются с целью выявления возможных путей их дальнейшего применения. Параллельно с этим наблюдается довольно медленный процесс пополнения научной информации об отдельных, например, низкомолекулярных фракциях белковых компонентов поджелудочной железы в международных базах данных. Таким образом, потенциальным кажется изучение не только конкретных соединений, полученных из поджелудочной железы свиньи,

но и смесей биоактивных веществ, а также изучение их эффективного влияния на другие организмы.

Важным этапом в анализе действия биологически активных веществ является процесс их выделения из сырья с максимальным сохранением активности соединений. Так, самым распространенным методом их получения является экстракция. Уже давно была разработана технология получения биоактивных веществ на примере ингибитора протеаз из поджелудочной железы путем кислотной экстракции с использованием трихлоруксусной или уксусной [20] и серной кислоты [21]. В дальнейшем может быть исследована применимость данного метода для получения смеси биологически активных соединений и преимущественно низкомолекулярных фракций. Также описан способ спиртовой экстракции [13], включающий обработку подкисленным этанолом, однако известно, что органические растворители могут оказывать денатурирующее действие на некоторые лабильные белки, например, ферменты и гормоны, вырабатываемые поджелудочной железой [22].

Помимо вышеперечисленных методов известна водно-солевая экстракция [23,24]. Методика имеет некоторые преимущества по сравнению с другими, а именно мягкие условия (отсутствие денатурирующих веществ, резких значений pH) и использование физиологического раствора в качестве экстрагента, что приближает условия экстрагирования к естественным условиям среды организма. В связи с этим в данной работе рассматривается водно-солевая экстракция с целью определения ее эффективности. Благодаря мягким условиям процесса реализуется возможность экстрагирования как ферментов (например, антиоксидантов: каталазы, глутатионпероксидазы [25] — и непосредственно ферментов), так и неферментных регуляторных соединений в активной форме, таких как неферментные катионные белки, [26,27], некоторые антиоксиданты небелковой природы (общий восстановленный глутатион, витамин С, витамин Е [25]) и др. Целью исследований в упомянутых выше работах было получение сведений об общих закономерностях выхода соединений и получения насыщенных целевыми соединениями экстрактов.

В связи с этим целью данного исследования является изучение процесса экстракции, а именно водно-солевой экстракции, ее эффективности по отношению к выделению белковых биологически активных соединений, а также определение пригодности данного метода для извлечения низкомолекулярных фракций веществ из поджелудочной железы свиньи. Предполагается, что отсутствие денатурирующих реагентов и жестких условий (экстремальные pH и температура) позволяет получать вытяжки биоактивных веществ с их большей концентрацией, активностью, а также с высоким содержанием низкомолекулярных соединений по сравнению с другими модификациями метода экстракции.

2. Материалы и методы

Объектом исследования являлась поджелудочная железа свиньи, которую отбирали на ООО «Пушкинский мясной двор».

Предлагаемая технология экстракции была воспроизведена по методикам, описанным авторами [3,26], и заключалась в нескольких ключевых этапах: измельчении сырья, экстракции, центрифугировании, заморозке.

Сырье хранилось в замороженном виде при минус $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$. Согласно [28], длительное низкотемпературное воздействие может привести к структурным изменениям некоторых белково-пептидных фракций, поэтому для получения более точного результата рекомендуется производить отбор свежего или недавно замороженного сырья.

После размораживания при температуре $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ сырье измельчали с использованием мясорубки (Kenwood, Англия) с решеткой: диаметр отверстий 3 мм, 100 отверстий в решетке.

Водно-солевую экстракцию проводили на ЛДУ (Лаботекс, Россия) 0,9% раствором натрия хлорида (гидромодуль 1:5) при скорости мешалки 400 об/мин в течение 330 мин с постоянным охлаждением до $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. Отбор проб для измерения концентрации белка и протеомного анализа производили точно, до начала экстракции (0 мин), и во время экстракции (5, 10, 15 мин и затем каждые 15 мин до конечной точки). Для измерения концентрации белка каждую пробу центрифугировали на центрифуге Centrifuge 5427R (Eppendorf AG, Германия) при 1301 g в течение 5 мин при 4°C . Надосадочную жидкость отбирали и замораживали при минус $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$. По завершении экстракции весь экстракт центрифугировали и измеряли конечное количество всей надосадочной жидкости и массу осадка.

Концентрацию белка в экстракте измеряли на фотометре BioChem SA (HTI, USA) биуретовым методом. Для этого в стеклянные пробирки вносили 600 мкл биуретового реактива (HTI, USA) и 10 мкл исследуемого образца. Реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего проводили измерение оптической плотности при 540 нм, используя в качестве раствора сравнения биуретовый реактив [3]. Этот метод, согласно авторам [29], является наиболее предпочтительным при исследовании широкого спектра белково-пептидных соединений.

Белковый состав экстрактов изучали методом одномерного денатурирующего электрофореза по Лэммли в присутствии SDS в 12,5% полиакриламидном геле. В качестве сравнения использовали маркер, включающий 11 стандартов определенных молекулярных масс: 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 и 5 кДа (Fermentas, Литва). Электрофорез проводили в камере «VE-10» (Helicon, США) без дополнительного охлаждения при комнатной температуре при напряжении 60 В в течение первых 30 минут и далее при напряжении 120 В до достижения образцами нижнего края геля. Полученные электрофореграммы окрашивали красителем Ку-масси бриллиантовым синим G-250 с последующей отмывкой уксусной кислотой.

Для протеомных исследований пробоподготовку исходного сырья осуществляли следующим способом. Из эппендорфа с замороженным сырьем отбирали приблизительно 0,150 г образца, гомогенизировали в тигле с водой дистил-

лированной (гидромодуль 1:4), центрифугировали на центрифуге (Eppendorf AG, Германия) при 15000 g в течение 7 мин при 4°C . Надосадочную жидкость смешивали с буфером для образцов (1% SDS, 0,05% β -меркаптоэтанол, 8М мочевины (или 10% глицерин), бромфеноловый синий) в разведении 1:1, кипятили на водяной бане в течение 5 мин и охлаждали в холодильнике.

Обработку электрофореграмм осуществляли посредством программы ImageJ (National Institutes of Health, USA). Биоинформационный анализ белков по результатам электрофореза проводили на основе базы данных UniProt Protein DataBase [30].

3. Результаты и обсуждение

Исследование содержания общего белка в образцах в процессе экстракции показало резкое увеличение его концентрации в 8,6 раз на 5 мин (Рисунок 1).

Самые высокие значения концентрации белка приходились на 60 и 135 мин и составляли 23,1 г/л и 23,3 г/л. На графике (Рисунок 1) отмечается также наличие пиков на 195, 255 и 330 мин (21,4 г/л; 21,0 г/л; 20,8 г/л соответственно). Эти скачки концентрации белка невысоки и в пределах погрешности могут считаться выходом скорости высвобождения белка из тканей на плато. В целом график после резкого возрастания приобретает слабый синусоидальный характер, что скорее всего связано с процессами ферментализа.

Результаты исследования электрофореграмм, представленных на Рисунке 2, показали наличие белков и пептидов преимущественно в диапазоне от 50 кДа и ниже. Насыщенность фракционных полос возрастает с 135 мин и достигает пика на 330 мин, что коррелируется с представленными ранее данными общего содержания белка.

При рассмотрении протеомного профиля, полученного на 150 мин экстракции (Рисунок 2, трек 8), обнаружены 13 полос белковых фракций. Среди них присутствует четкая полоса 50–52 кДа, которая прослеживается с самого начала процесса экстракции (Рисунок 2, трек 4), четкие минорные полосы в диапазоне 37–49 кДа (37–38 кДа, 39–40 кДа, 42–43 кДа, 45–47 кДа) (Рисунок 2, трек 2), ярко выраженные полосы 33 и 31 кДа, минорная полоса 29 кДа, 25–27 кДа, две минорные полосы 20–21 кДа и 22 кДа, которые четче прослеживаются на ранних этапах экстракции (Рисунок 2, треки 4, 6, 7, 8), минорные полосы в диапазоне 12–18 кДа (12–14 кДа, 15 кДа, 17–18 кДа) (Рисунок 2, треки 3 и 4). Обнаружены низкомолекулярные соединений в диапазоне менее 10 кДа (Рисунок 2, треки 7 и 8).

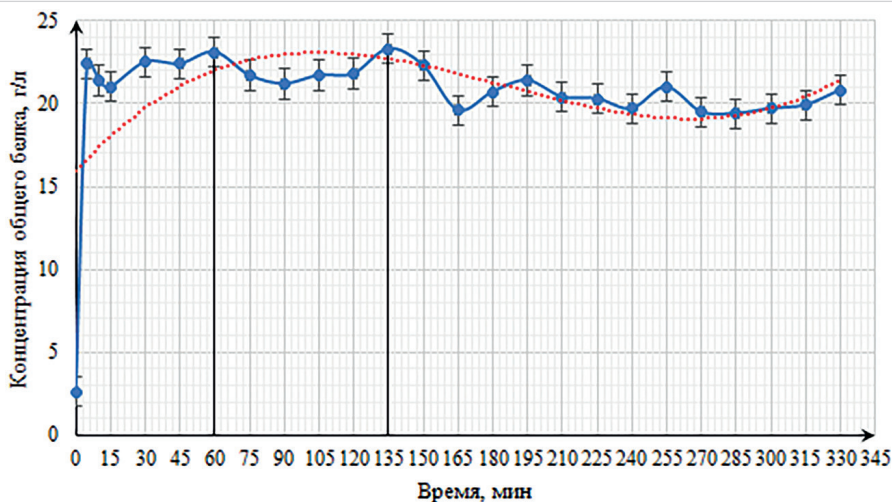


Рисунок 1. График зависимости содержания общего белка (г/л) в образцах от времени проведения экстракции (мин)

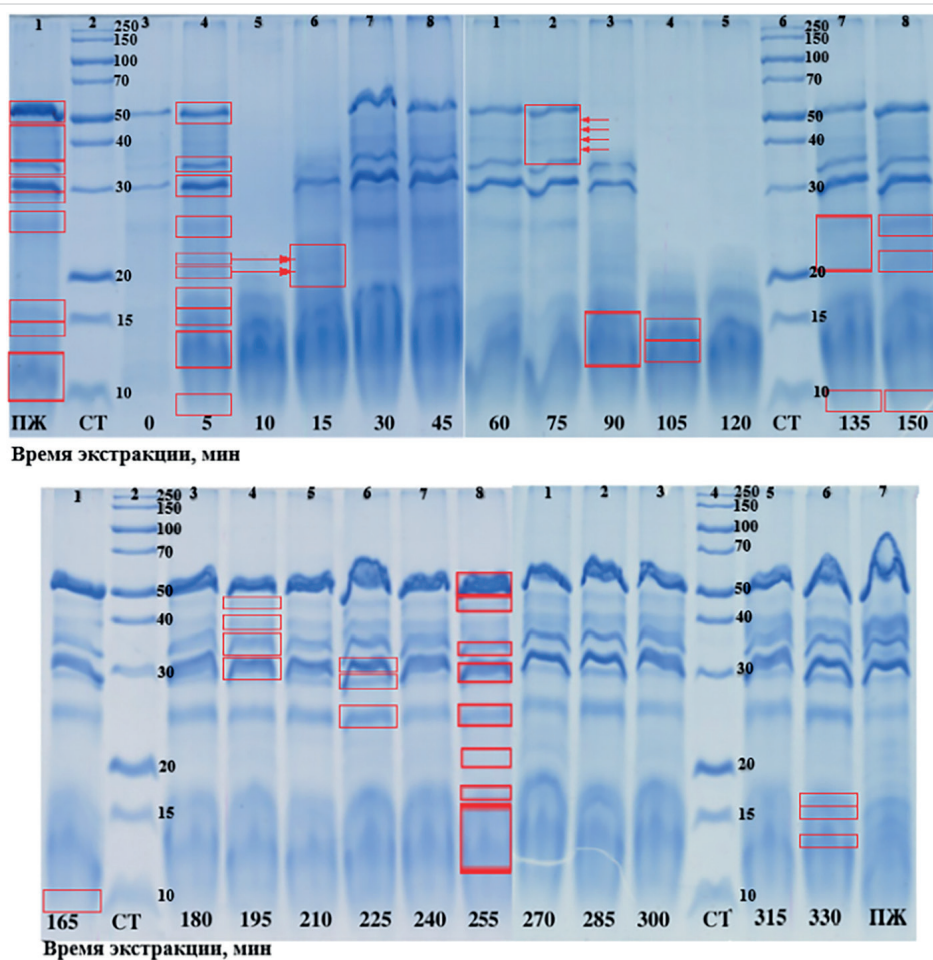


Рисунок 2. Одномерные электрофореграммы экстракта поджелудочной железы. Красным выделены значимые изменения во фракционном составе трека по сравнению с предыдущими треками

Результаты визуального анализа электрофореграмм соотносятся с данными, полученными посредством построения графиков в программе ImageJ, представленных на Рисунке 3.

Практически на всех графиках присутствуют пики в диапазоне 50–52 кДа, минорные пики в диапазоне 35–50 кДа, выраженность которых начинает увеличиваться с 165 мин (Рисунок 3, № 3, графики 1, 3–8; № 4, графики 1, 2, 6), пик 33–35 кДа, менее четкий пик в диапазоне 25–28 кДа, а также большое количество соединений молекулярной массой менее 20 кДа, которым соответствуют разные по высоте пики на всех графиках. Отмечено, что начиная с 60 мин процесса вплоть до 105 мин происходит увеличение выхода низкомолекулярной фракции с максимумом на 90 мин (Рисунок 3, № 2, график 3). Затем высота пиков падает и держится в пределах погрешности на одном уровне (Рисунок 3, № 3 и № 4).

При анализе полученных результатов электрофореграмм, графиков плотностей (графиков выраженности белковых фракций) особое внимание, наряду с общим протеомным профилем каждой стадии экстракции, уделялось низкомолекулярным фракциям, поскольку действие входящих в них биологически активных веществ не изучено полностью, и, таким образом, представляет отдельный интерес для дальнейшего изучения.

По полученным результатам исследования (Рисунок 2, трек 8) в соответствии с базой данных белков UniProt можно предположить о наличии в анализируемом экстракте поджелудочной железы следующих белков (рассмотрены соединения с молекулярной массой менее 30 кДа): глутатион

S-трансфераза омега-1 (27 кДа), проглюкагон (21 кДа), большой гастрин (17 кДа), главный изофермент фосфолипазы A2 (16,3 кДа), рибонуклеаза поджелудочной железы (13,8 кДа), колипаза (12 кДа), соматостатин (12,7 кДа). Эти биологически активные соединения являются регуляторами многих процессов, протекающих в организме:

- ❑ метаболизм L-аскорбиновой кислоты, процесс катаболизма ксенобиотиков, клеточный ответ на вещества, содержащие мышьяк. За эти функции отвечает глутатион S-трансфераза омега-1 [31];
- ❑ регуляция передачи сигналов активации аденилатциклазы, регуляция гомеостаза глюкозы и положительная регуляция глюконеогенеза, положительное регулирование импорта ионов кальция, активности протеинкиназ, фосфорилирование пептидил-серина и пептидил-треонина и многие другие процессы, за которые отвечает проглюкагон [32];
- ❑ большой гастрин стимулирует выделение слизистой оболочкой желудка соляной кислоты, а поджелудочной железой — пищеварительных ферментов [33];
- ❑ фосфолипаза A2 (кальций-зависимая) нацелена на гидролиз сложноэфирной связи ацильной группы жиров, находящейся в sn-2 положении фосфолипидов. Обладает антигельминтным действием: при заражении эпителии кишечника гельминтами напрямую влияет на содержание фосфатидилэтаноламина в мембране личинок гельминтов, обеспечивая лучшее иммунное распознавание, в конечном итоге снижая целостность личинок и инфекционность [34,35,36];

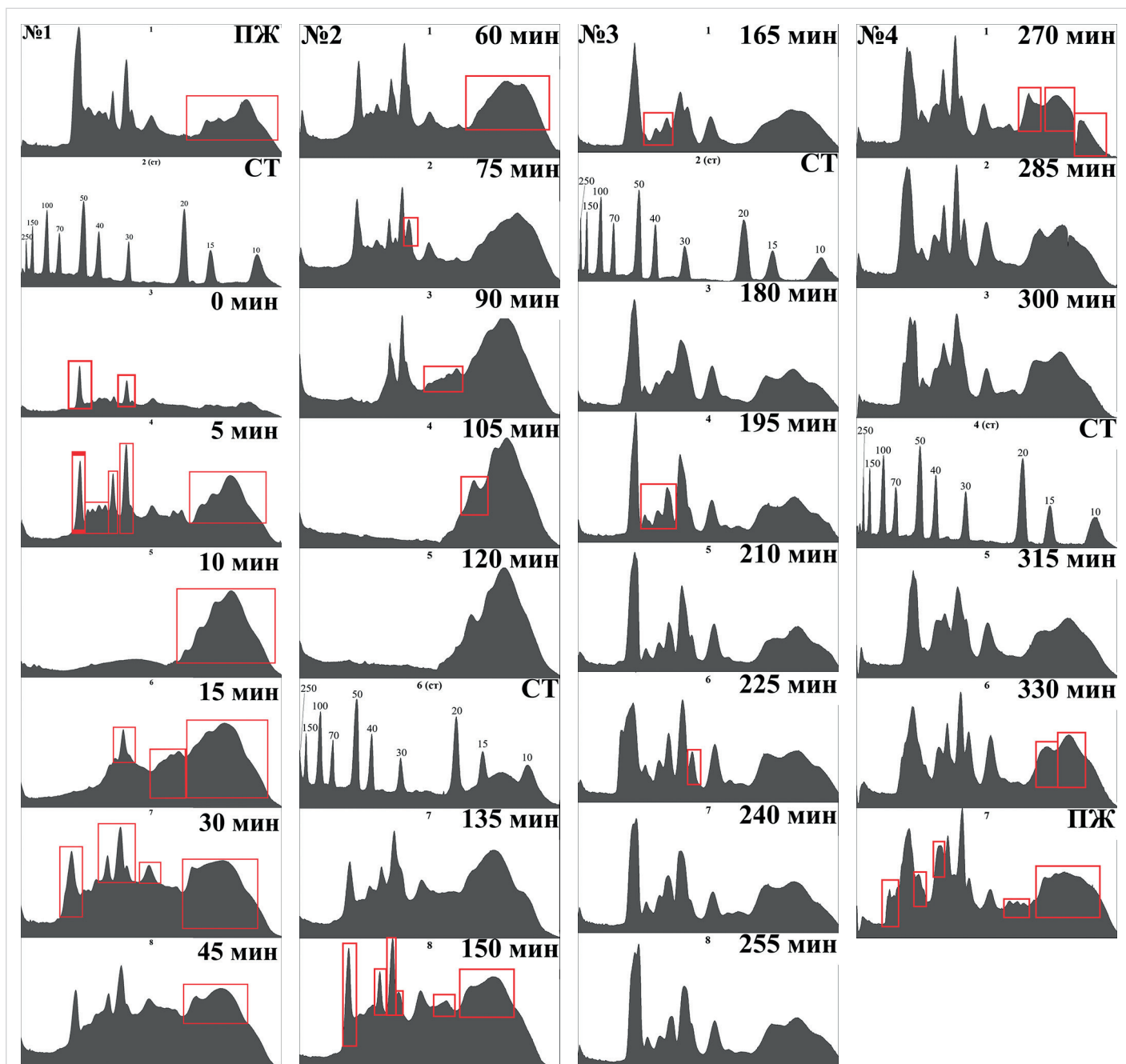


Рисунок 3. График выраженности белковых фракций. Красным отмечены характеристические изменения во фракционном составе в ходе экстракции

- ❑ рибонуклеаза поджелудочной железы является эндонуклеазой и катализирует расщепление РНК на 3-стороне пиримидиновых нуклеотидов [37];
- ❑ колипаза представляет собой кофактор липазы поджелудочной железы и обеспечивает ее закрепление на границе раздела липид-вода. Без колипазы фермент смывается солями желчных кислот, которые оказывают ингибирующее действие на липазу. Биологическая роль кофактора заключается в участии в пищеварении, катаболизме липидов [38];
- ❑ соматостатин подавляет секрецию гормонов гипофиза, может усиливать высвобождение глюкагона альфа-клетками поджелудочной железы, вызванное низким содержанием глюкозы. Может играть роль в регуляции артериального давления [39,40].

Негативное влияние в процессе экстрагирования веществ оказывает автолиз, заключающийся в расщеплении ферментами самих себя, либо других соединений, в т. ч.

целевых. Явление автолиза характерно для длительного времени экстракции [23], поскольку в вытяжке увеличивается концентрация автолитических ферментов. Их активность также повышается при комнатной температуре. Исследования [41] показывают увеличение разнообразия белковых соединений в протеомном профиле сырья, подвергнутого автолизу, по сравнению с нативным. Таким образом, рекомендуется проводить процесс при пониженных температурах, сокращать время экстрагирования, подкислять экстрагенты для подавления действия протеолитических ферментов и использовать нативное, либо замороженное сырье.

Среди существующих способов подавления автолиза интересным представляется добавление в исследуемые растворы ингибиторов протеаз, которые, способны ингибировать протеолитические ферменты путем образования с ними неактивных комплексов [42]. Большое количество ингибиторов протеиназ выделено как из растительного

сырья: бобовых (соя, фасоль, чина), овощей (картофель [43], томат, капуста), злаковых и др. [44], — так и животного: белков яиц домашних птиц [45], органов сельскохозяйственных животных, молозива [46] и др. По природе ингибиторы протеолитических ферментов принято делить на небелковые (гепарин, гиалоурановая кислота, мукополисахариды, соли тяжелых металлов и др.) и белковые, среди которых выделяют животные (ингибиторы типа Казала и Кюнитца-Нортропа и др.) и растительные (ингибиторы типа Кюнитца и Боумана-Бирка) ингибиторы протеаз.

В поджелудочной железе свиньи синтезируются предшественники протеолитических ферментов: трипсиноген, химотрипсиноген, прокарбокисептидазы А и В, проэластаза, которые посредством частичного протеолиза превращаются в активные формы — трипсин, химотрипсин, карбокисептидазы А и Б и проэластазу, соответственно [47]. Ингибиторы подбираются с учетом типа протеаз. По строению активного центра трипсин, химотрипсин и эластаза являются сериновыми протеиназами, а карбокисептидазы А и В — металлозависимыми (Zn-зависимыми) [48]. На международном рынке представлен ряд препаратов — ингибиторов протеаз, которые используются как в фармакологической промышленности, так и в пищевой отрасли [49]. Для инактивации содержащихся в поджелудочной железе свиньи протеаз можно использовать как коммерческие ингибиторы протеаз, например, соевый ингибитор трипсина типа Кюнитца, который образует с трипсином стехиометрический рН-зависимый комплекс с оптимумом при рН 8, так и изначально присутствующие в тканях соединения, например, апротинин — ингибитор трипсина, синтезируемый в поджелудочной железе для предотвращения случайной активации трипсиногена и других протеаз, активируемых трипсином, — образующий с трипсином стабильный комплекс, который разрушается при значениях рН менее 3,2 или более 10.

Однако ингибиторы протеаз следует использовать в разумном количестве, поскольку при избытке они могут оказывать негативное влияние на организм, например, снижать скорость некоторых важных реакций обмена веществ [50]. Отмечается, что корректный баланс между протеазами и соответствующими ингибиторами лежит в основе многих физиологических процессов и используется во многих исследовательских работах по обработке животного и растительного сырья для получения целевых соединений или предотвращения контаминации и т. д. [51]

При диссоциации комплексов многие ингибиторы протеаз могут выводиться из системы различными физическими и биотехнологическими методами, такими как диалитрификация, ультрафильтрация, хроматография и др. При подборе подходящего способа элиминирования необходимо учитывать молекулярную массу и физические свойства не только ингибитора протеазы, но и целевых соединений, чтобы избежать их вымывания, отсеивания или потери.

4. Заключение

В ходе исследования динамики концентрации белка в процессе экстракции было отмечено достаточно быстрое достижение концентрацией белка высоких значений. Водно-солевая экстракция 0,9% раствором натрия хлорида позволяет достичь содержания белка $23,1 \pm 0,9$ г/л и $23,3 \pm 0,6$ г/л на 60 мин и на 135 мин соответственно. При этом качественный анализ содержания отдельных белковых фракций определил проявление насыщенных полос в диапазонах 50–52 кДа, 31–33 кДа, 29 кДа уже с 5 мин начала экстракции, а также наличие многих минорных полос в диапазонах 25–27 кДа, видимых с 30 мин процесса, 20–21 кДа, хорошо различимых с 5 мин по 45 мин процесса, и 12–18 и менее кДа, присутствующих на протяжении всего хода экстрагирования. Это свидетельствует о преимущественном наличии низкомолекулярных соединений массой менее 18 кДа и высокомолекулярных соединений до 52 кДа.

Оптимальным временем проведения экстрагирования стоит считать 135–150 мин, так как на этот момент приходится максимальное значение концентрации общего белка, достаточно хорошо различим протеомный профиль на электрофореграмме. Если же целевым продуктом является низкомолекулярная фракция, то время проведения процесса следует снизить до 90 мин, потому что, как видно из Рисунка 3, именно на эту точку приходится максимальная высота пика.

В качестве потенциального направления исследований можно рассматривать выделение из отдельных высоко- и низкомолекулярных фракций конкретных белков, изучение их активности. Перспективным также кажется проведение исследований, аналогичных представленному в настоящей статье и направленных на изучение процессов кислотной и спиртовой экстракции для формирования представлений о подходах к модификации процесса, способных стимулировать эффективность извлечения целевых веществ из исходного сырья.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Козырев, И. В., Федулова, Л. В. (2016). Повышение прибыли предприятия за счет сбора эндокриноферментного и специального сырья. *Мясные технологии*, 3, 6–11.
2. Сусь, И. В., Люблинская, Л. А., Бабурина, М. И. (2010). «Первичка» для мясной промышленности и не только. *Все о мясе*, 5, 20–23.
3. Василевская, Е. Р. (2019). Разработка кормовой добавки на основе биологически активных веществ из сырья животного происхождения. Автореф. дис. ... канд. техн. наук. Москва: ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН. — 24 с.
4. Савельева, Т. И., Асланова, Т. А., Гордиенко, И. М. (2018, 20 декабря). *Технология получения биологически активных пептидов из вторичного сырья животного происхождения*. Сборник III Всероссийской (национальной) научной конференции. Новосибирск: Новосибирский государственный аграрный университет, 2018.
5. Чернуха, И. М., Федулова, Л. В., Василевская, Е. Р., Ертикеева, Е. А., Ахремко, А. Г. (2015). Соединения антимикробного действия в слизистых оболочках животных. *Все о мясе*, 5, 32–35.
6. Василевская, Е. Р. (2019, 1–11 июня). *Тканеспецифичные белки, полученные с использованием воды с модифицированным изотопным составом*. Материалы Международной конференции NT + M&Eс' 2019. Гурзуф: ООО «Институт новых информационных технологий», 2019.
7. Василевская, Е. Р., Иванова, Е. А. (2018). Вода с пониженным содержанием дейтерия как основа для получения биологически активных веществ из иммунных органов *Sus scrofa*. Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. Москва: ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, 2018. № 1. — С. 43–45.
8. Котенкова, Е. А., Василевская, Е. Р., Ахремко, А. Г. (2017, 2–12 июня). *Влияние воды с модифицированным изотопным D/H составом на белково-пептидный профиль экстрактов животного происхождения*. Материалы Международной конференции. Гурзуф: ООО «Институт новых информационных технологий», 2017.
9. Федулова, Л. В., Василевская, Е. Р. (2017, 8–9 июня). *Биотехнологические аспекты разработки природного иммунокорректора как прогрессивная технология высококачественной продукции животноводства*. Материалы Международной конференции. Волгоград: Сфера, 2017.
10. Джимаков, С. С., Федулова, Л. В., Василевская, Е. Р., Басов, А. А. (2019, 1–11 июня). *Влияние различных фракций полипептидов, полученных из органов иммунной системы Sus scrofa на иммунологическую реактивность крыс*. Материалы Международной конференции NT + M&Eс' 2019. Гурзуф: ООО «Институт новых информационных технологий», 2019.
11. Mora, L., Reig, M., Toldrà, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65(PC), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.014>

12. Дамдинсүрэн, Л., Алимаа, Ж., Чимэгээ, Н., Ариунаа, Э. (2016). *Биологически активные вещества животного происхождения*. Материалы конференции: Теоретические и практические вопросы интеграции химической науки, технологии и образования. Улан-Удэ: Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, 2016.
13. Салова, Т. Ю., Громова, Н. Ю. (2016). Теоретические аспекты получения биологически активных веществ из растительного и животного сырья. *Успехи современного естествознания*, 3, 39–43.
14. Котенкова, Е. А. (2018). Антимикробные биологически активные вещества, выделенные из слизистых оболочек свиней, как альтернативный подход к продлению сроков годности пищевой продукции. *Вопросы питания*, 87(55), 278–279.
15. Новиков, Д. А. (2014). Выделение и очистка продуктов биотехнологии. Методическое пособие. Минск: БГУ, 2014.
16. Притужалова, А.О. (2017). Анатомия и морфология поджелудочной железы крупного рогатого скота. *Молодежь и наука*, 4–1, 55.
17. Нефёдова, А. Р., Парамонова Р. Н. (2019). Инсулинотерапия XX века и производство инсулина в СССР. Память о прошлом –2019. 89–95.
18. Torcello-Gómez, A., Dupont, D., Jardin, J., Briard-Bion, V., Deglaire, A., Risse, K. et al. (2020). Human gastrointestinal conditions affect: In vitro digestibility of peanut and bread proteins. *Food and Function*, 11(8), 6921–6932. <https://doi.org/10.1039/d0fo01451f>
19. Muntholib, Sulistyaningrum, D., Subandi, Marfu'ah, S. (2020). *Identification of flavonoid isolates of papaya (carica papaya L.) seed and their activity as pancreatic lipase inhibitors*. Paper presented at the AIP Conference Proceedings, 2231, Article 3456. <https://doi.org/10.1063/5.0003456>
20. Пат. № 2088241. Способ получения основного ингибитора протеаз из легкого и поджелудочной железы крупного рогатого скота / Пак В. Н., Овечкина Л. Г. Опубл. 28.07.1997.
21. Заболоцкая, Е. Р., Виноходов, Д. О. (2018). Современные методы выделения и очистки ферментов. отделение нуклеаз от протеолитических ферментов в экстракте поджелудочной железы крупного рогатого скота. *Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)*, 47(73), 62–68.
22. Барбашов, К.А., Шубина, Т.П. (2020, 30 апреля). *Поджелудочная железа у животных*. Сборник статей XXVIII международной научно-практической конференции. 2020 — Москва: Актуальность РФ, 2020.
23. Кашинова, Э.Б., Котенкова, Е.А., Ертикеева, Е.А., Ахремко, А.Г. (2016). Оптимизация технологических режимов выделения биологически активных веществ из сырья животного происхождения. *Актуальная биотехнология*, 1(16), 17–22.
24. Кашинова, Э.Б. (2016). *Исследование in vitro биологической активности низкомолекулярных фракций, выделенных из органов желудочно-кишечного тракта свиней*. Международная научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук. Москва: ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, 2016.
25. Gomathi, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Devaki, K., Uma, C. (2013). Efficacy of evolulus alsinoides (L.) L. on insulin and antioxidants activity in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12(1), Article 39. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-39>
26. Дубровина, В.И., Лукьянова, С.В., Юрьева, О.В., Витязева, С.А., Николаев, В.Б., Ястремская, К.Ю. и др. (2015). Оценка иммуногенных свойств антигенного препарата *Bacillus anthracis Sterne 34F₂* в сочетании с наноконъюнктами (сообщение 3). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*, 14(5(84)), 62–66.
27. Логунова, Л.В., Зубрильчев, И.В., О. В. Андрианова, О.В. (2013). Динамика структурных преобразований предстательной и поджелудочной желез, а также изменение содержания ферментных катионных белков при некоторых эндокринопатиях. *Астраханский медицинский журнал*, 4, 86–88.
28. Василевская, Е.Р. (2017). *Сравнительное изучение белкового профиля животных экстрактов после заморозки*. Международная научно-практическая конференция, посвящённая памяти Василия Матвеевича Горбатова. Москва: ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, 2017. № 1. — С. 57–58.
29. Василевская, Е.Р., Котенкова, Е.А., Лукинова, Е.А., Калинова, Е.А. (2017). Методология исследования белково-пептидных компонентов экстрактов тканей *sus scrofa*. *Теория и практика переработки мяса*, 2(3), 79–85. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2017-2-3-79-85>
30. UniProt Protein knowledgebase (UniProtKB), 2002–2020. Retrieved from <https://www.uniprot.org/> Accessed December 16, 2021
31. Rouimi, P., Anglade, P., Benzekri, A., Costet, P., Debrauwer, L., Pineau, T., Tulliez, J. (2001). Purification and characterization of a glutathione S-transferase omega in pig: Evidence for two distinct organ-specific transcripts. *Biochemical Journal*, 358(1), 257–262. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580257>
32. Jiang, G., Zhang, B. B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology — Endocrinology and Metabolism*, 284(4 47–4), E671–E678. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00492.2002>
33. Monnet, E., Smeak, D.D. (2020). *Anatomy and Physiology of the Stomach*. Chapter in a book: *Gastrointestinal Surgical Techniques in Small Animals*. John Wiley & Sons, 2020.
34. Liebscher, S., Ambrose, R. L., Aktepe, T. E., Mikulashova, A., Prier, J. E., Gillespie, L. K. et al. (2018). Phospholipase A₂ activity during the replication cycle of the flavivirus west nile virus. *PLoS Pathogens*, 14(4), Article e1007029. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007029>
35. Astudillo, A. M., Balboa, M. A., Balsinde, J. (2019). Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A₂ enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochimica Et Biophysica Acta — Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(6), 772–783. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.002>
36. Entwistle, L. J., Pelly, V. S., Coomes, S. M., Kannan, Y., Perez-Lloret, J., Cziezo, S. et al. (2017). Epithelial-cell-derived phospholipase A₂ group 1B is an endogenous anthelmintic. *Cell Host and Microbe*, 22(4), 484–493.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.09.006>
37. Lang, D. —T., Wang, X. -P., Wang, L., Yu, L. (2017). Molecular evolution of pancreatic ribonuclease gene (RNase1) in Rodentia. *Journal of Genetics and Genomics*, 44(4), 219–222. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2017.05.002>
38. Haque, N., Prakash Prabhu, N. (2018). Binding orientation and interaction of bile salt in its ternary complex with pancreatic lipase-colipase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(4), 907–912. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.018>
39. Ørgaard, A., Holst, J. J. (2017). The role of somatostatin in GLP-1-induced inhibition of glucagon secretion in mice. *Diabetologia*, 60(9), 1731–1739. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4315-2>
40. Svendsen, B., Holst, J. J. (2021). Paracrine regulation of somatostatin secretion by insulin and glucagon in mouse pancreatic islets. *Diabetologia*, 64(1), 142–151. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05288-0>
41. Чернуха, И.М., Федуллова, Л.В., Котенкова, Е.А., Шишкин, С.С., Ковалев, Л.И. (2016). Длияние автолиза на протеомно-пептидный профиль сердечной мышцы и аорты *Bos taurus* и *Sus scrofa*. *Теория и практика переработки мяса*, 1(2), 4–9. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2016-1-2-4-9>
42. Mosolov, V.V., Valueva, T.A. (2011). Inhibitors of proteolytic enzymes under abiotic stresses in plants (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(5), 453–459. <https://doi.org/10.1134/S0003683811050097>
43. Гагарина, И.Н., Горькова, И.В., Костромичева, Е.В., Ботуз, М.И. (2015). Ингибиторы ферментов трипсина и химотрипсина в картофеле. *Современные тенденции развития науки и технологий*, 3–2, 49–51.
44. Петибская, В. С. (1999). Ингибиторы протеолитических ферментов. *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*, 5–6(252–253), 6–10.
45. Никифорова Т. Е. (2007). Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания. Иваново: Ивановский государственный химико-технологический университет, 2007.
46. Поляков, В.Ф., Ипатова, О.М., Усачев, И.И. (2018). Ингибиторы протеаз молозива млекопитающих, их функция в процессах пищеварения и защите организма животных. *Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии*, 5(69), 34–41.
47. Сереброва С. Ю. (2006). Перспективы применения ферментных препаратов в гастроэнтерологии. *Болезни органов пищеварения*, 8(1), 23–27.
48. Немова, Н. Н., Бондарева, Л. А. (2008). К вопросу об эволюции протеолитических ферментов. *Биомедицинская химия*, 54(1), 42–57.
49. Protease-Inhibitor Mix M. Serva. Serving scientists. Retrieved from https://serva.de/en/DE/ProductDetails/810_39102_Protease_Inhibitor_Mix_M_0_0.html Accessed May 20, 2021.
50. Pamirsky, I. E., Borodin, E. A., Shtarberg, M. A. (2012). *Regulation of Proteolysis of Plant and Animal Inhibitors*. LAP Lambert Academic Publishing, 2012.
51. Cotabarren, J., Lufirano, D., Parisi, M. G., Obregón, W. D. (2020). Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *Plant Science*, 292, Article 110398. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110398>

REFERENCE:

1. Kozyrev, I. V., Fedulova, L. V. (2016). Increasing the profit of the enterprise due to the collection of endocrine-enzyme and special raw materials. *Meat Branch*, 3, 6–11. (In Russian)
2. Sus' I.V., Lyublinskaya, L.A., Baburina, M.A. (2010). "Primary" for the meat industry and not only. *Vsyo o myase*, 5, 20–25. (In Russian)
3. Vasilevskaya E. R. (2019). Development of a feed additive based on biologically active substances from raw materials of animal origin. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Candidate of Technical Sciences. Moscow: Gorbatov Research Center for Food Systems. — 24 p. (In Russian)
4. Savel'yeva, T.I., Aslanova, T.A., Gordiyenko, I.M. (2018, 20 December). *Technology for obtaining biologically active peptides from secondary raw materials of animal origin*. Processing of the III All-Russian (national) Scientific Conference. Novosibirsk: Novosibirsk State Agrarian University, 2018. (In Russian)
5. Chernukha, I.M., Fedulova, L.V., Vasilevskaya, E.R., Ertikeeva, E.A., Akhremko, A.G. (2015). Research of mucous membranes of animals. *Vsyo o myase*, 5, 32–35. (In Russian)
6. Vasilevskaya, E.R. (2019, 1–11 June). *Tissue specific proteins extracted with water with modified isototic composition*. Materials of the International

Conference NT + M&Ec ' 2019. Gurzuf: Institute of New Information Technologies, 2019. (In Russian)

7. Vasilevskaya, E.R., Ivanova, E.A. (2018). *Water with a reduced deuterium content as a basis for obtaining biologically active substances from the immune organs of Sus scrofa*. International scientific and practical conference dedicated to the memory of Vasily Matveyevich Gorbato, 2018. 1, 43–45. (In Russian)
8. Kotenkova, E.A., Vasilevskaya, E.R., Akhremko, A.G. (2017, 2–12 June). *Deuterium depleted water influence on protein-peptide profile in extracts prepared from animal immune organs*. Materials of the International Conference. Gurzuf: Institute of New Information Technologies, 2019. (In Russian)
9. Fedulova, L.V., Vasilevskaya, E.R. (2017, 8–9 June). *Biotechnological aspects of the development of a natural immunocorrector as a progressive technology for high-quality livestock products*. Materials of the International Conference. Volgograd: Sfera, 2017. (In Russian)
10. Dzhimak, S.S., Fedulova, L.V., Vasilevskaya, E.R., Basov, A.A. (2019, 1–11 June). *Influence of different polypeptides fractions derived from Sus scrofa immune organs on the rats immunological reactivity*. Materials of the International Conference NT + M&Ec ' 2019. Gurzuf: Institute of New Information Technologies, 2019. (In Russian)
11. Mora, L., Reig, M., Toldrà, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65(PC), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.014>
12. Damdinsuren L., Alimaa, Zh, Chimegee, N., Ariunaa, E. (2016). *Biologically active compounds of animal origin*. Materials of the International Conference. Ulan-Ude: East Siberian State University of Technologies and Management, 2016. (In Russian)
13. Salova, T. Yu., Gromova, N. Yu. (2016). Theoretical aspects of obtaining biologically active substances from plant and animal materials. *Advances in Current Natural Sciences*, 3, 39–43. (In Russian)
14. Kotenkova, E. A. (2018). Antimicrobial biologically active substances isolated from the mucous membranes of pigs as an alternative approach to extending the shelf life of food products. *Problems of Nutrition*, 87(S5), 278–279. (In Russian)
15. Novikov, D. A. (2014). Isolation and purification of biotechnology products. Minsk: BGU, 2014. (In Russian)
16. Prituzhalova, A. O. (2017). Anatomy and morphology of the pancreas of cattle. *Youth and Science*, 4–1, 55. (In Russian)
17. Nefyodova, A. R., Paramonova, R. N. (2019). Insulin therapy of the 20th century and insulin production in the USSR. 89–95. (In Russian)
18. Torcello-Gómez, A., Dupont, D., Jardin, J., Briard-Bion, V., Deglaire, A., Risse, K. et al. (2020). Human gastrointestinal conditions affect: In vitro digestibility of peanut and bread proteins. *Food and Function*, 11(8), 6921–6932. <https://doi.org/10.1039/d0fo01451f>
19. Muntholib, Sulistyaningrum, D., Subandi, Marfu'ah, S. (2020). *Identification of flavonoid isolates of papaya (carica papaya L.) seed and their activity as pancreatic lipase inhibitors*. Paper presented at the AIP Conference Proceedings, 2231, Article 3456. <https://doi.org/10.1063/5.0003456>
20. Pak V. N., Ovechkina L. G. A method of obtaining the main protease inhibitor from the lung and pancreas of cattle. Patent RF, no.2088241, 1997. (In Russian)
21. Zabolockaya, E. R., Vinohodov, D. O. (2018). Modern methods of isolation and purification of enzymes. Separation of nucleases from proteolytic enzymes in extract of pancreas of cattle. *Processing St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University)*, 47(73), 62–68. (In Russian)
22. Barbashov, K.A., Shubina, T.P. (2020, 30 April). *Pancreas in animals*. Collection of articles of the XXVIII International Scientific and Practical Conference Moscow: Current news, 2020. (In Russian)
23. Kashinova, E.B., Kotenkova, E.A., Ertikeeva, E.A., Akhremko, A.G. (2016). Optimization of technological regimes of isolation of biologically active substances from animal raw materials. *Current Biotechnology*, 1(16), 17–22. (In Russian)
24. Kashinova, E.B. (2016). *In vitro study of low molecular weight fractions extracted from porcine gastrointestinal organs*. International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and specialists of the Department of Agricultural Sciences of the RAS. Moscow: Gorbato Research Center for Food Systems, 2016. (In Russian)
25. Gomathi, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Devaki, K., Uma, C. (2013). Efficacy of evolvulus alsinoides (L.) L. on insulin and antioxidants activity in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12(1), Article 39. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-39>
26. Dubrovina, V.I., Lukyanova, S.V., Yurieva, O.V., Vityazeva S. A., Nikolaev, V.B., Yastremskaya, K. Yu. et al. (2015). Evaluation of the immunogenic properties of the antigen preparation bacillus anthracis Sterne 34F₂ combined with nanocomposites (communication 3). *Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 5(84), 62–66. (In Russian)
27. Logunova, L.V., Zubrilchev, I.V., Andrianova, O.V. (2013). The dynamics of structural changes in the prostate gland and pancreas and change in content of non-enzymatic cationic proteins in some endocrinopathy. *As-trakhan Medical Journal*, 8(4), 86–88. (In Russian)
28. Vasilevskaya, E.R. (2017). *Comparative study on the protein profile of animal extracts after freezing*. International scientific and practical conference dedicated to the memory of Vasily Matveyevich Gorbato, 2017. 1, 57–58. (In Russian)
29. Vasilevskaya, E.R., Kotenkova, E.A., Lukinova, E.A., Kalinova, E.A. (2017). Research methodology of Sus scrofa tissue extracts protein-peptide components. *Theory and practice of meat processing*, 2(3), 79–85. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2017-2-3-79-85>
30. UniProt Protein knowledgebase (UniProtKB), 2002–2020. Retrieved from <https://www.uniprot.org/> Accessed December 16, 2021
31. Rouimi, P., Anglade, P., Benzekri, A., Costet, P., Debrauwer, L., Pineau, T., Tulliez, J. (2001). Purification and characterization of a glutathione S-transferase omega in pig: Evidence for two distinct organ-specific transcripts. *Biochemical Journal*, 358(1), 257–262. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580257>
32. Jiang, G., Zhang, B. B. (2005). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology — Endocrinology and Metabolism*, 284(4 47–4), E671–E678. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00492.2002>
33. Monnet, E., Smeak, D.D. (2020). Anatomy and Physiology of the Stomach. Chapter in a book: *Gastrointestinal Surgical Techniques in Small Animals*. John Wiley & Sons, 2020.
34. Liebscher, S., Ambrose, R. L., Aktepe, T. E., Mikulasova, A., Prier, J. E., Gillespie, L. K. et al. (2018). Phospholipase A₂ activity during the replication cycle of the flavivirus west Nile virus. *PLoS Pathogens*, 14(4), Article e1007029. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007029>
35. Astudillo, A. M., Balboa, M. A., Balsinde, J. (2019). Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A₂ enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochimica Et Biophysica Acta — Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(6), 772–785. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.002>
36. Entwistle, L. J., Pelly, V. S., Coomes, S. M., Kannan, Y., Perez-Lloret, J., Czieso, S. et al. (2017). Epithelial-cell-derived phospholipase A₂ group 1B is an endogenous anthelmintic. *Cell Host and Microbe*, 22(4), 484–493.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.09.006>
37. Lang, D. -T., Wang, X. -P., Wang, L., Yu, L. (2017). Molecular evolution of pancreatic ribonuclease gene (RNase1) in Rodentia. *Journal of Genetics and Genomics*, 44(4), 219–222. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2017.05.002>
38. Haque, N., Prakash Prabhu, N. (2018). Binding orientation and interaction of bile salt in its ternary complex with pancreatic lipase-coliase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(4), 907–912. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.018>
39. Ørgaard, A., Holst, J. J. (2017). The role of somatostatin in GLP-1-induced inhibition of glucagon secretion in mice. *Diabetologia*, 60(9), 1731–1739. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4315-2>
40. Svendsen, B., Holst, J. J. (2021). Paracrine regulation of somatostatin secretion by insulin and glucagon in mouse pancreatic islets. *Diabetologia*, 64(1), 142–151. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05288-0>
41. Chernukha, I.M., Fedulova, L.V., Kotenkova, E.A., Shishkin, S.S., Kovalyov, L.I. (2016). The influence of autolysis on the protein-peptide profile of Bos taurus and Sus scrofa heart and aorta tissues. *Theory and practice of meat processing*, 1(2), 4–9. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2016-1-2-4-9> (In Russian)
42. Mosolov, V.V., Valueva, T.A. (2011). Inhibitors of proteolytic enzymes under abiotic stresses in plants (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(5), 453–459. <https://doi.org/10.1134/S0003683811050097>
43. Gagarina, I.N., Gorkova, I.V., Kostromicheva, E.V., Botuz, M.I. (2015). Inhibitors of trypsin and chymotrypsin enzymes in potatoes. *Modern Trends in the Development of Science and Technology*, 3–2, 49–51. (In Russian)
44. Petibskaya, B. C. (1999). Proteolytic enzyme inhibitors. *Izvestiya Vuzov. Food Technology*, 5–6, 6–10. (In Russian)
45. Nikiforova, T.E. (2007). Safety of food raw materials and food products. Ivanovo: Ivanovo State University of Chemical Technology, 2007. (In Russian)
46. Polyakov, V.F., Ipatova, O.M., Usachev, I.I. (2018). Mammals' colostrum protease inhibitors, their function in digesting and protection of animals. *VESTNIK of the Bryansk State Agricultural Academy*, 5(69), 38–41. (In Russian)
47. Serebrova, S. Yu. (2006). Prospects for the use of enzyme preparations in gastroenterology. *Diseases of the Digestive System*, 8(1), 23–27. (In Russian)
48. Nemova, N. N., Bondareva, L. A. (2008). To the problem of proteolytic enzyme evolution. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 54(1), 42–57. (In Russian)
49. Protease-Inhibitor Mix M. Serva. Serving scientists Retrieved from https://serva.de/enDE/ProductDetails/810_39102_Protease_Inhibitor_Mix_M_0_0.html Accessed May 20, 2021
50. Pamirsky, I. E., Borodin, E. A., Shtarberg, M. A. (2012). Regulation of Proteolysis of Plant and Animal Inhibitors. LAP Lambert Academic Publishing, 2012.
51. Cotabarren, J., Lufano, D., Parisi, M. G., Obregón, W. D. (2020). Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *Plant Science*, 292, Article 110398. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110398>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
<p>Василевская Екатерина Романовна — кандидат технических наук, научный сотрудник, экспериментальная клиника — лаборатория биологически активных веществ, 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.vasilevskaya@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4752-3939</p>	<p>Ekaterina R. Vasilevskaya — candidate of technical sciences, researcher, Experimental clinic-laboratory of biologically active substances of animal origin, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-92-11 E-mail: e.vasilevskaya@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4752-3939</p>
<p>Арюзина Марина Александровна — старший лаборант, экспериментальная клиника -лаборатория биологически активных веществ, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-92-11 E-mail: m.aryuzina@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6886-496X</p>	<p>Marina A. Aryuzina — senior laboratory assistant, Experimental clinic-laboratory of biologically active substances of animal origin, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-92-11 E-mail: m.aryuzina@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6886-496X</p>
<p>Ветрова Евгения Сергеевна — старший лаборант, экспериментальная клиника — лаборатория биологически активных веществ, 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.vetrova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2219-5964 * автор для контактов</p>	<p>Evgeniya S. Vetrova — senior laboratory assistant, Experimental clinic-laboratory of biologically active substances of animal origin, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-92-11 E-mail: e.vetrova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2219-5964 * corresponding author</p>
Критерии авторства	Contribution
<p>Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат</p>	<p>Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism</p>
Конфликт интересов	Conflict of interest
<p>Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов</p>	<p>The authors declare no conflict of interest</p>