

УДК 577.3

Е. А. Улитина, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова

**ХАРАКТЕРИСТИКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
СИНТЕЗИРОВАННОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА
В СОСТАВЕ БИОРАЗЛАГАЕМОЙ ПИЩЕВОЙ ПЛЕНКИ**

Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию 24.10.2023 г.

Принята к публикации 23.11.2023 г.

doi: 10.5922/gikbfu-2023-4-7

95

Для цитирования: Улитина Е. А., Тихонов С. Л., Тихонова Н. В. Характеристика и использование синтезированного антимикробного пептида в составе биоразлагаемой пищевой пленки // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер. Естественные и медицинские науки. 2023. №4. С. 95–102. doi: 10.5922/gikbfu-2023-3-7.

Одним из направлений в создании упаковки для пищевых продуктов является использование биоразлагаемых безопасных материалов и антимикробных веществ. К перспективным рецептурным ингредиентам для биоразлагаемых пленок относятся био-пептиды с антимикробными свойствами. Целью исследований стала разработка биоразлагаемой пищевой пленки с использованием синтезированного антимикробного пептида. Объектами послужили пептид, тест-штаммы *S. albicans*, *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Подтверждение чистоты и первичной структуры пептида проводили с помощью масс-спектрометрии. Антимикробную активность пептида изучали диско-диффузионным методом на грамположительных и грамотрицательных бактериях. Степень биоразложения пленки определяли через 1, 3 и 6 месяцев путем воздействия микроорганизмов. Проведен синтез пептида ACSAG. Полученный пептид по количественному и качественному составу аминокислот, последовательности, молекулярной массе соответствует известному антимикробному пептиду. Установлено, что синтезированный пептид обладает антимикробной активностью к *E. coli* ATCC 25922 и *B. subtilis*. Разработан состав для биоразлагаемой пленки, включающий агар-агар, глицерин, антимикробный пептид и дистиллированную воду. Доказано, что введение пептида в состав пленки снижает ее биоразлагаемость.

Ключевые слова: синтезированные пептиды, молекулярная масса, аминокислотная последовательность, противомикробное действие, биоразлагаемые пищевые пленки

Введение

Для упаковки пищевых продуктов широко используются контейнеры из пластика, обладающие необходимыми механическими, оптическими свойствами и имеющие невысокую стоимость по сравнению с другими видами упаковки. Применение контейнеров из пластика при



хранении пищевой продукции позволяет снизить проникновение газов и влаги в продукт, что способствует обеспечению показателей качества в течение всего срока годности [1]. Вместе с тем пластиковые контейнеры являются отходами, долго разлагаются, что усиливает загрязнение окружающей среды [2]. В связи с этим растет потребность в создании биоразлагаемых упаковочных материалов [3].

Согласно исследованию [4], биоразлагаемые полимеры, входящие в состав пищевых упаковок, покрытий и пленок, подразделяются на три основные группы. К первой группе относятся пленки и покрытия с использованием полисахаридов, в частности крахмала, целлюлозы, хитозана и др., и белков, например соевых. Во вторую группу включают синтетические полимеры, в частности поликапролактон. К третьей группе относят вещества, полученные в результате биотехнологического процесса и продуцируемые микроорганизмами.

Для увеличения срока хранения продуктов питания в состав биоразлагаемых материалов, используемых для создания пищевых упаковочных контейнеров и пленок, следует включать антимикробные вещества [5].

Большое количество биоразлагаемых пленок получено на основе крахмала, так как он характеризуется низкой стоимостью, доступен в промышленных объемах, безопасен и имеет необходимые структурно-механические свойства. Такие пищевые биоразлагаемые пленки, как правило, получают методом литья [6]. В качестве антимикробного вещества в состав пленок могут быть введены эфирные масла, наночастицы серебра и другие вещества [7; 8]. Так, в исследовании [9] в пищевые пленки предлагают включать порошок кожуры граната. Ингибирующее действие таких пленок доказано в отношении бактерий *S. aureus* и рода *Salmonella* в экспериментах *in vitro*.

В группу синтетических полимеров входит термопластичный биополимер PLA, получаемый из молочной кислоты путем ферментации крахмала. Благодаря своей способности к биологическому разложению в компостной среде и биосовместимости PLA нашел множество применений, поскольку обладает хорошими барьерными свойствами против водяных паров, O₂ и CO₂, высокой механической стойкостью и фотостабильностью [10].

Для производства биоразлагаемых материалов применяют полимеры, полученные методом ферментации. Например, полигидроксibuтират (ПГБ) и поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат) (ПГБВ) продуцируются широким спектром бактерий путем ферментации сахаров и жиров [11].

В работе [12] получены биоразлагаемые пленки на основе ПГБ и известкового масла. В экспериментах *in vitro* доказано бактериостатическое действие вышеуказанных пленок в отношении *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* и *S. enterica*. Также получают противомикробные пленки с ПГБ и ванилином (20, 40, 50, 80, 100 или 200 мкг на 1 г ПГБ) методом литья. Пленки показали высокую бактериостатическую активность в отношении *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. flexneri* и *S. aureus*.

К перспективным антимикробным веществам относятся биопептиды, которые можно рассматривать в качестве потенциальных ингриди-



ентов в составе биоразлагаемых пищевых антимикробных пленок. Авторами [13] разработаны биоразлагаемые пленки с пептидом низин и подтверждена их эффективность против *L. plantarum*.

В связи с вышесказанным целью нашего исследования является разработка биоразлагаемой пищевой пленки с использованием синтезированного антимикробного пептида (АМП).

Материал и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали синтезированный АМП ACSAG [14], тест-штаммы *C. albicans*, *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*, агар-агар (ГОСТ 16280-2002 «Агар пищевой. Технические условия», «Айдиго»), пищевой глицерин (ГОСТ 6824-96 «Глицерин дистиллированный. Общие технические условия», ООО ПКФ «Нижегород-ХимПродукт»). Получение синтезированного пептида проводили в компании Permics Co., Ltd (Сучжоу, Китай) стандартным твердофазным пептидным синтезом Fmoc (SPPS) с последующей очисткой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографической колонке SHIMADZU Inertsil ODS-SP (4,6 × 250 мм × 5 мкм). Молекулярно-массовое распределение пептида оценивали масс-спектрометрическим методом и идентифицировали методом MALDI-TOF MS Ultraflex (Bruker, Германия). Анализ масс-спектров проводили с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint (Matrix Science, США) с использованием базы данных Protein NCBI.

Антимикробную активность пептида изучали диско-диффузионным методом на грамположительных и грамотрицательных бактериях. В качестве тест-штаммов выбраны *E. coli* и грамположительная бактерия *B. subtilis*. Культивирование штаммов бактерий проводили на плотной питательной среде LB (агар — 1,5 %, триптон — 1 %, дрожжевой экстракт — 0,5 %, NaCl — 1 %) и жидкой питательной среде LB (триптон — 1 %, дрожжевой экстракт — 0,5 %, NaCl — 1 %) при температуре 37 °С.

Диско-диффузионный метод определения антимикробной активности гидролизатов заключается в следующем. Тест-штамм высевали на агаризованную питательную среду газоном и одновременно на газон помещали исследуемый пептид. В качестве контроля использовался бумажный диск с питательной средой, в качестве препарата сравнения — диск с антибиотиком («Канамицин» из стандартного набора). Чашки Петри инкубировали при температуре, соответствующей оптимальной температуре роста каждого тест-штамма микроорганизма, в течение $24,0 \pm 0,5$ ч. Результаты учитывались по наличию и размеру (в мм) прозрачной зоны отсутствия роста микроорганизмов вокруг диска.

Толщину биоразлагаемой пленки измеряли с помощью микрометра МК 50-1 в трех различных местах пленки и рассчитывали среднюю. Степень биоразложения пленки определяли через 1, 3 и 6 месяцев путем воздействия микроорганизмов естественных условий (*P. funiculiosum*, *A. niger* и др.) в термостате при температуре 29–30 °С и относительной влажности не менее 90 %.

Степень достоверности рассчитывали статистическим анализом полученных результатов в программе GraphPad Prism 8.1 и с помощью алгоритмов one-way ANNOVA и two-way ANNOVA. Достоверным считалось различие $p < 0,05$.

Результаты

Проведен синтез пептида ACSAG. Согласно базе данных APD, синтезируемый пептид относится к антимикробным. На рисунке 1 представлена хроматограмма пептида.

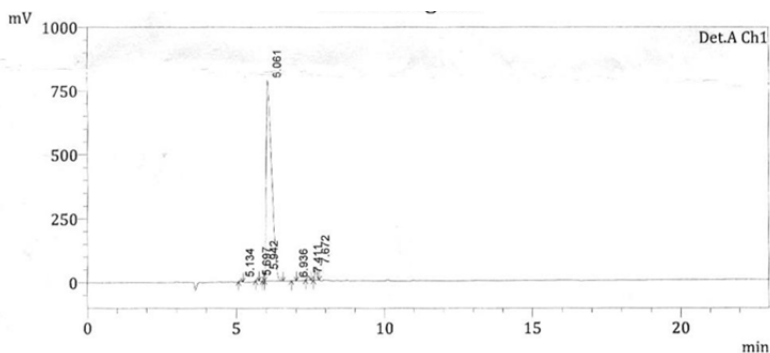


Рис. 1. Хроматограмма пептида

В таблице 1 представлены пиковые значения хроматограммы пептида T1.4с (детектор A Chi1/220 нм).

Таблица 1

Величины пиков хроматограммы пептида (детектор A Chi1/220 нм)

№ пика	Текущее время, с	Площадь, %	Высота, %
1	5,134	0,280	0,651
2	5,697	0,336	0,867
3	5,942	0,806	3,546
4	6,061	95,005	87,410
5	6,936	0,037	0,073
6	7,411	0,889	1,800
7	7,672	2,646	5,651
Итого	—	100,000	100,000

На рисунке 2 представлен масс-спектр пептида.

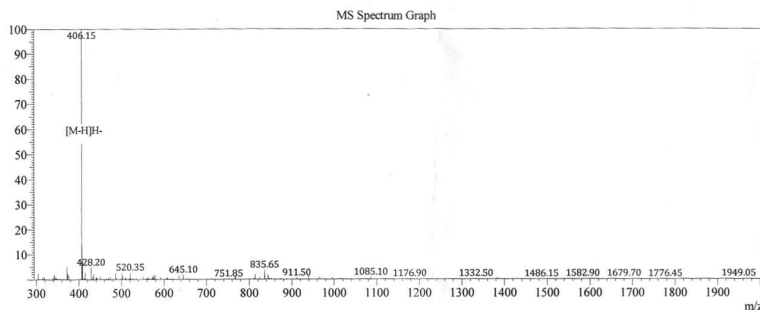


Рис. 2. Масс-спектр пептида



В таблице 2 представлена информация о синтезируемом пептиде.

Таблица 2

Теоретическая и фактическая молекулярные массы пептида

Наименование показателя	Характеристика
Последовательность	ACSAG
Номер	PCM15527-2-0815
Теоретическая молекулярная масса пептида, Да	407,44
Фактическая молекулярная масса пептида, Да	407,15

При идентификации пептида в базе данных антимикробных пептидов APD установлено, что исследуемый пептид состоит из 5 аминокислот, имеет гидрофобный остаток 60 % и молекулярную массу 407 Да.

Таким образом, полученный пептид по количественному и качественному составу аминокислот, их последовательности и молекулярной массе соответствует известному антимикробному пептиду.

В таблице 3 представлена антимикробная активность синтезированного пептида.

Таблица 3

Антимикробная активность синтезированного пептида

Наименование образца	Диаметр зоны лизиса, мм		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Исследуемый пептид	19 ± 1	24 ± 1	23 ± 1
Контроль	0	0	0
Антибиотик «Канамицин»	25 ± 2*	26 ± 2*	Не исследовали
Противомикробный препарат «Флуконазол»	Не исследовали	Не исследовали	27 ± 2*

Примечание: * $p \leq 0,05$ в сравнении с действием антибиотика «Канамицин» и противогрибкового препарата «Флуконазол».

Синтезированный пептид обладает антимикробной активностью к *E. coli* ATCC 25922 и *B. subtilis*. Так, зона лизиса при культивировании *E. coli* ATCC 25922 и *B. subtilis* составляет соответственно 19 и 24 мм в диаметре при использовании синтезированного пептида.

Разработан состав для биоразлагаемой пленки, включающий в качестве структурообразователя агар-агар, для придания эластичности — глицерин, антимикробный пептид и дистиллированную воду.

Технология производства пленки включает следующие этапы: растворение пептида в дистиллированной воде в соотношении 1:10, приготовление пленкообразующего раствора из агара и глицерина согласно рецептуре, внесение растворенного пептида и выдувание пленки через головку экструдера, охлаждение, калибровку, сушку пленки.

На основании органолептических и структурно-механических показателей определена рациональная дозировка агара и глицерина. Приготовили 3 образца базового состава для биоразлагаемой пленки (табл. 4).

Таблица 4

Базовый состав для биоразлагаемой пленки

Рецептурный ингредиент, %	Номер образца			
	1	2	3	4
Агар	4	6	8	10
Глицерин	1	2	3	4
Дистиллированная вода	до 100 %			

100

Лучшие органолептические показатели имела пленка образца №2 – плотная, гибкая и прозрачная. Другие образцы характеризовались высокой ломкостью и низкой эластичностью. При исследовании образца №2 пленки установлено, что она по физико-химическим показателям соответствует требованиям ГОСТ Р 57432-2017 «Упаковка. Пленки из биоразлагаемого материала». Так, ее толщина составила $0,43 \pm 0,02$ мм (норма не более 0,5 мм), прочность в продольном направлении $34,8 \pm 2,4$ МПа (кгс/см^2) (норма не менее 14), относительное удлинение при разрыве $24,1 \pm 1,2$ (норма не менее 5).

Степень биоразложения пленки определяли до и после введения в состав пептида в количестве 375,5 мкг на 1 мл. В указанной дозировке пептиды обладают антимикробным и противовирусным действием [15]. Установлено, что пленка подвергается биоразложению, но вместе с тем введение пептида в пленку ослабляет этот процесс. Так, у пленки с пептидом потеря массы через 1, 3 и 6 месяцев составляет 35, 48 и 76 %, без пептида – 53, 67 и 83 %. Полученные данные согласуются с исследованиями [16; 17], в которых наблюдалось снижение биоразлагаемости пленки при включении в ее состав противомикробных препаратов. Потенциальные изменения в поведении полимера при биологическом разложении будут зависеть от доз активных соединений в пленках, кинетики их высвобождения в среду и чувствительности различных микроорганизмов, ответственных за процесс разложения.

Заключение

На основе проведенных исследований разработана пищевая биоразлагаемая пленка, включающая агар-агар, глицерин и дистиллированную воду. В пленке в качестве антимикробного средства использован пептид с доказанной противобактериальной активностью.

Список литературы

1. Hernández-García E., Vargas M., González-Martínez C., Chiralt A. Biodegradable Antimicrobial Films for Food Packaging: Effect of Antimicrobials on Degradation // Foods. 2021. №10 (6). Art. №1256. doi: <https://doi.org/10.3390/foods10061256>.
2. Asociación Española de Basuras Marinas (AEBAM). ¿Qué Son Las Basuras Marinas? 2020. URL: <https://aebam.org/basuras-marinas/> (дата обращения: 14.11.2020).
3. Labeaga A. Polímeros Biodegradables. Importancia y potenciales Aplicaciones : Master's Thesis / Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid, 2018.
4. Ross G., Ross S., Tighe B. Bioplastics: New Routes, New Products. Amsterdam, 2017.
5. Gupta P., Toksha B., Rahaman M. Review on Biodegradable Packaging Films from Vegetative and Food Waste // Chem. Rec. 2022. №22 (7). Art. №e202100326. doi: <https://doi.org/10.1002/tcr.202100326>.



6. Valencia-Sullca C., Vargas M., Atarés L. Thermoplastic cassava starch-chitosan bilayer films containing essential oils // Food Hydrocoll. 2018. №75 P. 107–115. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.008>.

7. Syafiq R., Sapuan S., Zuhri M. Antimicrobial activity, physical, mechanical and barrier properties of sugar palm based nanocellulose/starch biocomposite films incorporated with cinnamon essential oil // J. Mater. Res. Technol. 2021. №11. P. 144–157. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.12.091>.

8. Shapi'i R., Othman S., Nordin N., Kadir Basha R. Antimicrobial properties of starch films incorporated with chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation // Carbohydr. Polym. 2020. №230. Art. №115602. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115602>.

9. Liu Y., Deng Y., Chen P., Duan M. Biodegradation analysis of polyvinyl alcohol during the compost burial course // J. Basic Microbiol. 2019. №59. P. 368–374. doi: <https://doi.org/10.1002/jobm.201800468>.

10. Serna C., Rodríguez S., Albán A. Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones // Ing. Compet. 2011. №5. Art. №16.

11. Rivera-Briso A., Serrano-Aroca A. Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement strategies for advanced applications // Polymers. 2018. №10. Art. №732. doi: <https://doi.org/10.3390/polym10070732>.

12. Castro-Mayorga J., Martínez-Abad A. Stabilization of antimicrobial silver nanoparticles by a polyhydroxyalkanoate obtained from mixed bacterial culture // Int. J. Biol. Macromol. 2014. №71. P. 103–110. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.059>.

13. Correa J., Molina V., Sanchez M., Kainz C. Improving ham shelf life with a polyhydroxybutyrate/polycaprolactone biodegradable film activated with nisin // Food Packag. Shelf Life. 2017. №11. P. 31–39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.11.004>.

14. Liu Y., Sun Z., Wang C. Purification of a novel antibacterial short peptide in earthworm // Eisenia foetida. 2004. №36 (4). P. 297–302. doi: 10.1093/abbs/36.4.297.

15. Тихонов С.Л., Чернуха И.М. Полипептид молока коров — перспективный функциональный ингредиент специализированной пищевой продукции для профилактики вирусных инфекций // Ползуновский вестник. 2023. №1. С. 114–122. doi: <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.014>.

16. Gonçalves S., Strauss M., Martinez D. The Positive Fate of Biochar Addition to Soil in the Degradation of PHBV-Silver Nanoparticle Composites // Environ. Sci. Technol. 2018. №52. P. 13845–13853. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01524>.

17. Pavoni J., Luchese C., Tessaro I. Impact of acid type for chitosan dissolution on the characteristics and biodegradability of cornstarch/chitosan based films // Int. J. Biol. Macromol. 2019. №138. P. 693–703. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.089>.

Об авторах

Елизавета Андреевна Улитина — асп., Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия.

E-mail: egorulitin@inbox.ru

ORCID: 0009-0006-8660-4527

Сергей Леонидович Тихонов — д-р техн. наук, проф., Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия.

E-mail: tihonov75@bk.ru

ORCID: 0000-0003-4863-9834

Наталья Валерьевна Тихонова — д-р техн. наук, проф., зав. кафедрой пищевой инженерии аграрного производства, Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия.

E-mail: tihonov75@bk.ru

ORCID: 0000-0001-5841-1791



E. A. Ulitina, S. L. Tikhonov, N. V. Tikhonova

CHARACTERIZATION AND USE
OF SYNTHESIZED ANTIMICROBIAL PEPTIDE
IN THE COMPOSITION OF BIODEGRADABLE FOOD FILM

Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia

Received 24 October 2023

Accepted 23 November 2023

doi: 10.5922/gikbfu-2023-4-7

102

To cite this article: Ulitina E. A., Tikhonov S. L., Tikhonova N. V., 2023, Characterization and use of synthesized antimicrobial peptide in the composition of biodegradable food film, *Vestnik of Immanuel Kant Baltic Federal University. Series: Natural and Medical Sciences*, №4. P. 95 – 102. doi: 10.5922/gikbfu-2023-4-7.

*One direction in the development of food packaging involves the use of biodegradable safe materials along with antimicrobial agents. Among the promising prescribed ingredients for biodegradable films are biopeptides with antimicrobial properties. The research goal was to develop a biodegradable food film using a synthesized antimicrobial peptide. The objects of the study were the peptide, test strains of *C. albicans*, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis*. The confirmation of the purity and primary structure of the peptide was conducted using mass spectrometry. The antimicrobial activity of the peptide was studied using the disc diffusion method on both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The degree of film biodegradation was determined after 1, 3, and 6 months by exposing it to microorganisms. The peptide ACSAG was synthesized, and its quantitative and qualitative composition of amino acids, sequence, and molecular mass corresponded to a known antimicrobial peptide. It was established that the synthesized peptide possesses antimicrobial activity against *E. coli* ATCC 25922 and *B. subtilis*. A composition for the biodegradable film was developed, incorporating agar-agar, glycerin, antimicrobial peptide, and distilled water. It was demonstrated that the addition of the peptide to the film composition reduces its biodegradability.*

Keywords: synthesized peptides, molecular weight, amino acid sequence, antimicrobial action, biodegradable food films

The authors

Elizaveta A. Ulitina, PhD Student, Ural State Agrarian University, Russia.

E-mail: egorulitin@inbox.ru

ORCID: 0009-0006-8660-4527

Prof. Sergey L. Tikhonov, Ural State Agrarian University, Russia.

E-mail: tihonov75@bk.ru

ORCID: 0000-0003-4863-9834

Prof. Natalya V. Tikhonova, Ural State Agrarian University, Russia.

E-mail: tihonov75@bk.ru

ORCID: 0000-0001-5841-1791