

diets, it was revealed that the body's needs for vitamins and minerals are fully covered.

Key words: food rations, Arctic zone, kelp, vitamin and mineral complex

УДК 658.5

АНТИМИКРОБНЫЙ ПЕПТИД КАК ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ИНГРЕДИЕНТ ПИЩЕВОЙ ПЛЕНКИ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ХРАНЕНИЯ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

Улитина Елизавета Андреевна, аспирант, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный аграрный университет»,
e-mail: egorulitin@inbox.ru

Тихонов Сергей Леонидович, д-р техн. наук, профессор, директор научно-образовательного центра «Прикладные нанобиотехнологии», ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет»,
e-mail: tihonov75@ru

Тихонова Наталья Валерьевна, д-р. техн. наук, профессор, заведующий кафедрой Пищевой инженерии аграрного производства, ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет»,
e-mail: tihonov75@bk.ru

ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет», Россия,
Екатеринбург, *e-mail: rector@urgau.ru*

Аннотация: Спроектирован и синтезирован новый пептид GVAPFYWDERHKARAFKPVRKYPG, спрогнозирована его биологическая активность и противомикробные свойства. Пептид имеет значение биоактивности 0,675963 при максимальном значении 1,0, что свидетельствует о наличии биоактивности у исследуемого пептида. Установлено, что пептид GVAPFYWDERHKARAFKPVRKYPG относится к противомикробным и имеет вероятность противомикробных свойств 0,633 при максимальном значении 1,0. Получена пищевая пленка с использованием пептида. Установлено, что у охлажденных мясных отрубов, упакованных в пищевую пленку с антимикробным пептидом КМАФАнМ после 7 суток хранения было ниже на 58,4%, количество дрожжевых клеток на 76,9%, что свидетельствует о высокой антимикробной эффективности пищевой пленки с пептидом.

Ключевые слова: пептид, антимикробные свойства, пищевая пленка, мясопродукты, продолжительность хранения

Пищевые продукты в процессе хранения могут быть подвержены окислительной и микробной порчи [1]. Продукты с высоким содержанием жира подвержены окислению из-за контакта масел и жиров с внешним кислородом и влагой, а также бактериальному загрязнению [2]. При окислении образуются

прогорклый запах и различные химические вещества, оказывающие вредное воздействие на организма человека [3]. В настоящее время упаковка пищевых продуктов считается одним из эффективных средств решения этих проблем [4] и, таким образом, играет важную роль в консервировании и обеспечении стабильности пищевых продуктов при хранении.

Одним из актуальных направлений исследований в пищевой науке является создание новых эффективных упаковок, в частности биоразлагаемых пленок и покрытий в состав которых входят натуральные пищевые макромолекулы, в частности, белки, полисахариды [5].

Существуют различные типы пищевых пленок, которые в зависимости от исходного сырья можно разделить на пищевые пленки на основе полисахаридов, белков, липидов и композитные пищевые пленки. Пищевые пленки, изготовленные из разного сырья, обладают разными свойствами и характеристиками с точки зрения механической прочности, водо- и газобарьерных свойств, стабильности при хранении и т.д.

Пленки на основе полисахаридов (например, хитозана, крахмала и его производных, целлюлозы и ее производных, альгината натрия, полисахарида пуллулана, пектина и т.д.). Как правило, однородны и прозрачны, обладают хорошими механическими и антибактериальными свойствами, а также высокой проницаемостью для диоксида углерода и кислорода. Поэтому пленки на основе полисахаридов обычно используются для микробиологической защиты мяса и мясных полуфабрикатов[6], а также для консервирования фруктов и овощей [7].

Некоторые пленки на основе полисахаридов обладают высокой гидрофильтностью до такой степени, что пленки слабо пропускают водяной пар и обладают водонепроницаемостью [8]. Эти пленки обычно используются для изготовления водорастворимых упаковочных пакетов (таких как порошковые приправы, упаковка кофейного порошка и т.д.) [9]. Пищевые пленки на липидной основе состоят из восков, жирных кислот, смол и т.д. И обычно обладают высокой водостойкостью из-за сильной гидрофобности алифатических углеродных цепей. Однако пленки на липидной основе, образованные только маслами и жирами, находят лишь небольшое применение из-за их плохих механических свойств. Как правило, масла и жиры могут использоваться в качестве добавок для ламинирования или образования эмульсий с другими материалами с целью улучшения водостойкости, пароизоляции, прозрачности, удлинения и т.д. композитных пленок [10]. Что касается покрытия для консервирования неповрежденных фруктов, широко используются материалы на липидной основе, которые могут не только блокировать испарение воды и сохранять фрукты свежими, но и делать поверхность фруктов глянцевой и улучшать сенсорные характеристики для потребителей. Однако покрытия на липидной основе, как правило, имеют воскообразный вкус при непосредственном употреблении. По сравнению с пищевыми пленками на основе полисахаридов и липидов пищевые пленки на основе белка обладают хорошими газобарьерными свойствами, механическими свойствами и вкусовыми качествами, и поэтому их часто используют для пищевых продуктов, склонных к окислению при хранении [11].

Пищевые покрытия представляют собой микрослои, состоящие из полисахаридов, белков, липидов, биоактивных соединений и композитных материалов, без посторонней помощи или в сочетании, которые наносятся непосредственно вокруг структуры пищевых продуктов путем погружения или распыления [12].

Авторы [13, 14] использовали порошок глютена (ПГ) и изолят соевого белка (ИСБ) в качестве основного сырья для приготовления раствора для нанесения покрытия и нанесли его на поверхность ядер арахиса и грецких орехов методом распыления. В арахисе, обернутым в оболочку из глютена и изолята соевого белка, содержание летучих жирных кислот было на 1, 2,5 и 1,8 (мг КОН / г) ниже, а перекисей - на 20, 60 и 50 (мэкв / кг) ниже, чем в контрольной группе без упаковки, после 100 дней хранения.

Кроме того, эти покрытия обеспечивают защиту от ультрафиолетового излучения, регулируют влажность и поддерживают внутреннее равновесие между растворенными веществами и газами, участвующими в процессе созревания и дыхания скоропортящихся продуктов. Пищевые покрытия обладают потенциалом функционировать в качестве носителя для многочисленных биологически активных соединений, таких как природные антиоксиданты, фенольные соединения и противомикробные препараты, что повышает их эффективность при консервировании пищевых продуктов и ограничивает микробный метаболизм на поверхности пищевых продуктов [15].

Целесообразным является рассмотрение в качестве универсального антимикробного и антиоксидантного средства в составе пищевых пленок биопептидов- мономеров от 4 до 50 аминокислот, которые могут приобретать амфипатическую вторичную структуру в виде α -спирали, β -шпилькообразного β листа, β -листа или смешанных структур α -спирали [16].

Конформационные пептиды α -спирали представляют собой относительно разнообразную и хорошо изученную группу АМП из природных источников, с сотнями различных последовательностей, уже идентифицированных [17].

Типичными пептидами с β -структурой является дефензин человека. У АМП из β -семейства есть по меньшей мере одна пара из двух β -нитей. Причина, по которой эта группа АМП структурно стабильна, заключается в том, что почти все они содержат остатки цистеина, которые образуют одну или более дисульфидных связей [18].

АМП, содержащие как α -спиральные, так и β -листовые элементы, обнаружены не только у людей и других млекопитающих, но также были описаны у различных беспозвоночных и растений. Классификация этого вида АМП основана на различном расположении из трех-пяти дисульфидных связей, таких как суперсемейство цис-дефензинов [19].

Некоторые АМП не имеют какой-либо конкретной трехмерной структуры в растворе или при контакте с мембранами и поэтому называются расширенными линейными структурами. В этих пептидах отсутствуют α -спирали и β -листы, и они обычно обогащены аминокислотами глицином, пролином, триптофаном [20].

Некоторые антимикробные пептиды не имеют линейной структуры, но имеют циклическую топологию «голова к хвосту» и «голова к боковой цепи» и для стабилизации содержат дисульфидные связи [21].

По сравнению с антибиотиками, биопептиды могут воздействовать на бактериальные мембранны или другие мишени. Кроме того, вероятность лекарственной устойчивости к пептидам, генерируемым генной мутацией, низка, поэтому устойчивость бактерий к АМП развивается намного слабее, чем к антибиотикам [22].

Проникновение пептидов через мембранны является основным механизмом антибактериального действия. Катионные и гидрофобные остатки рассматриваются как две основные характеристики антимикробных пептидов. Наличие суммарного положительного заряда усиливает антибактериальные свойства пептидов. АМП способны предотвращать скопление микробов на поверхности, подавлять формирование микробных биопленок или разрушать их. Проникновение пептидов в биопленки происходит за счет трех движущих сил: суммарного положительного заряда, гидрофобной группы и селективной проницаемости мембранны (позволяющей пептидам проникать в клетку из раствора) [23]. Электростатические связи между катионными пептидами и отрицательно заряженными компонентами на внешней бактериальной оболочке притягивают друг друга. В конечном итоге пептид достигает поверхности клеточной мембранны и проникает через мембранны с помощью нескольких гипотетических моделей, таких как модель бочкообразной пластины, модель ковра, модель годовой поры, модель канала агрегации и модель тонущего плата. Последние исследования показывают, что АМП также могут разрушать клеточную мембранны с помощью некоторых неясных механизмов [24].

Авторы [25] синтезировали новый короткоцепочный пептид и протестировали его на ингибирование биопленки золотистого стафилококка. Ингибирующее действие синтетического пептида в отношении биопленки *Staphylococcus aureus* превосходил действие ванкомицина и линезолида в тех же концентрациях.

Пептиды в субингибирующих концентрациях могут вызывать повторную сенсибилизацию VRSA к некоторым обычным антибиотикам с потенциалом ингибирования развития лекарственной устойчивости (Martinez M. et al., 2019). Что касается механизма повторной сенсибилизации, исследователи предположили, что стабильный осмос пептидов в субингибирующей концентрации может быть полезен для улучшения проницаемости бактериальной мембранны и позволяет антибиотикам достигать целей с высокой вероятностью. Предыдущие исследования показали, что белок человеческого молока – липоидный комплекс ГАМЛЕТА (Человеческий α -лактальбумин, смертельный для опухолевых клеток) снижает чувствительность MRSA к метициллину и VRSA к ванкомицину путем деполяризации бактериальной мембранны и диссипации протонной динамики [26]. Другим интересным примером является антибиотик-1b (1-18), который, как было обнаружено, повышает чувствительность *Escherichia coli* к антибиотикам, когда его использование было ниже ингибирующих концентраций [27].

Уникальный эффект АМП, содержащих триптофан, недавно привлек внимание исследователей. Результаты подтвердили, что эти пептиды могут специфически связываться с ДНК бактерий и тем самым проявлять антибактериальный эффект. В другом случае исследователи обнаружили новый мутантный пептид тридекаптин М из грязевых бактерий, который может ингибировать рост *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Тридекаптин М влияет на кинетику протонов в процессе синтеза АТФ бактерий, проявляя таким образом сильную антибактериальную активность [28].

Цель исследований – разработка, синтез нового антимикробного пептида, его характеристика и экспериментальное обоснование возможности его использования в составе пищевой биоразлагаемой пленки для обеспечения стабильности мясопродуктов при хранении.

Материалы и методы исследований. В качестве объектов исследований использованы: охлажденные мясные полуфабрикаты, биоразлагаемая пищевая пленка, пептид с последовательностью GVAPFYWDERHKARAFKPVRKYPG.

Синтез пептида проводили методом трехфазного синтеза. Идентификацию проводили по базе данных пептидов EROP-Moscow (<http://erop.inbi.ras.ru/index.html>), Прогнозирование биологической активности пептида проводили по предсказателю активности Peptide Ranker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker>) и базе данных противомикробных пептидов_DRAMP - <http://dramp.cpru-bioinfor.org>, оценку свойств свойств пептидов по базе данных PepCalc (<http://pepcalc.com>). Исследование микробиологических показателей мяса исследовали по ГОСТ Р 54354—2011.

Результаты исследований. Из 26750 записей в базе данных EROP-Moscow созданный пептид не найден, что свидетельствует о его идентичности. По запросу в базу предсказателя биоактивности пептида Peptide Ranker (запрос (ID 171224706017625) установлено, что пептид имеет значение биоактивности 0,675963 при максимально значении 1,0, что свидетельствует о наличии биоактивности у исследуемого пептида.

Результаты прогнозирования противомикробной активности пептида представлены на рисунке 1.

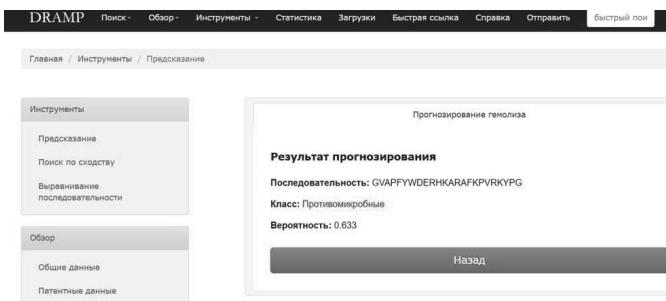


Рисунок 1 - Прогнозирование противомикробной активности пептида GVAPFYWDERHKARAFKPVRKYPG

Установлено, что пептид GVAPFYWDERHKARAFKPVRKYPG относится к противомикробным и имеет вероятность противомикробных свойств 0,633 при максимальном значении 1,0.

Результаты исследований физико-химических характеристик пептида представлены на рисунке 2.

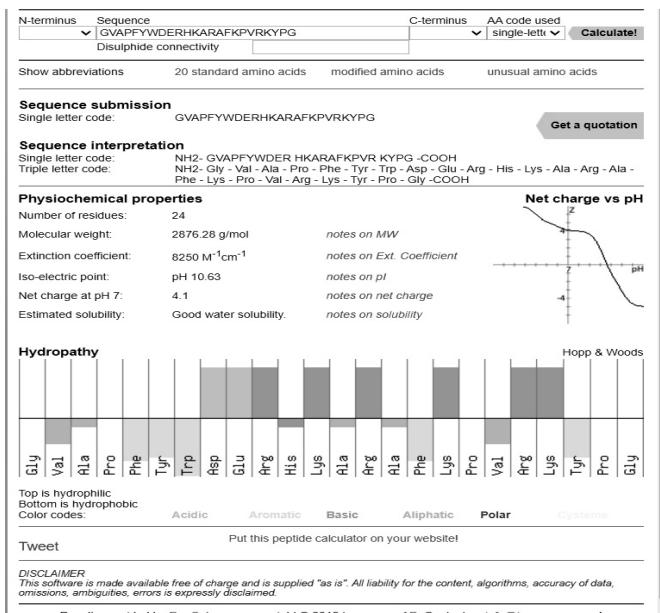


Рисунок 2 - Физико-химические характеристики пептида
GVAPFYWDERHKARAFKPVRKYPG

Установлено, что молекулярная масса пептида составляет 2876 Да, изоэлектрическая точка на уровне 10,63, общее гидрофобное соотношение, на уровне 33%, общий заряд равен + 4,25. Гидрофобность пептида по Уимли-Уайту в целом остатке (т.е. сумма энергии переноса пептида без остатка из воды на поверхность раздела POPC) составляет 4,85 ед. Предполагая, что цистеины находятся в паре, коэффициент молярной экстинкции количества пептида равен 8530 Потенциал связывания с белками (индекс Бомана) составляет 2,42 ккал / моль. Полученные данные свидетельствует, что исследуемый пептид относится к антимикробным.

Разработана и получена пищевая биоразлагаемая пленка, включающая в состав волу, глицерин, агар-агар и пептид GVAPFYWDERHKARAFKPVRKYPG.

Установлено, что у охлажденных мясных отрубов, упакованных в пищевую пленку с антимикробным пептидом КМАФАнМ после 7 суток хранения, было

ниже на 58,4%, количество дрожжевых клеток на 76,9%, что свидетельствует о высокой антимикробной эффективности пищевой пленки с пептидом.

Выводы. Разработан и получен новый антимикробный пептид, обладающий высокой биологической активностью. Доказано, что пептид эффективен для увеличения продолжительности хранения охлажденных мясных полуфабрикатов.

Библиографический список

1. Gaikwad, K.K.; Singh, S.; Negi, Y.S. Ethylene scavengers for active packaging of fresh food produce. *Environ. Chem. Lett.* 2020, 18, 269–284.
2. Shao, L.; Chen, S.; Wang, H.; Zhang, J.; Xu, X.; Wang, H. Advances in understanding the predominance, phenotypes, and mechanisms of bacteria related to meat spoilage. *Trends Food Sci. Technol.* 2021, 118, 822–832. *Molecules* 2023, 28, 7800 18 of 21
3. Fernández-Pan, I.; Carrión-Granda, X.; Maté, J.I. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control* 2014, 36, 69–75.
4. Han, J.W.; Ruiz Garcia, L.; Qian, J.P.; Yang, X.T. Food packaging: A comprehensive review and future trends. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2018, 17, 860–877.
5. Chen, Z.H.; Chen, J.Q.; Liu, X.X.; Wang, X. Research progress of application of polysaccharides, proteins and their composite coatings in preservation of postharvest berries. *Storage Process* 2022, 22, 97–103.
6. Ma, C.F. The Effect of Modified Atmosphere Packaging and Coating Process on the Quality of Frozen Tilapia Fillets. Master's Thesis, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, China, 2017.
7. Tran, P.H.; Duan, W.; Lee, B.; Tran, T.T. The use of zein in the controlled release of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 2019, 566, 557–564.
8. Fan, Y.Z.; Lu, R.X.; Zhu, H.Y.; Miao, M. Fresh-keeping effect of pullulan polysaccharide coating treatment on cherry tomato. *Food Ferment. Ind.* 2023, 49, 86–91.
9. Zhang, Q.; Yin, L.J.; Chen, F.S. Research progress on polysaccharide-based edible film. *Cereals Oils* 2020, 33, 1–3.
10. Friedman, M.; Juneja, V.K. Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *J. Food Prot.* 2010, 73, 1737–1761
11. Cheng, K.; Demirci, A.; Catchmark, J.M. Pullulan: Biosynthesis, production, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 92, 29–44.
12. Cheng H. et all. Starch-based biodegradable packaging materials: A review of their preparation, characterization and diverse applications in the food industry, *Trends in Food Science & Technology*, 2021, V. 114 P. 70-82, doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.017
13. Rodrigues, D.C.; Cunha, A.P.; Brito, E.S.; Azeredo, H.M.; Gallao, M.I. Mesquite seed gum and palm fruit oil emulsion edible films: Influence of oil content and sonication. *Food Hydrocoll.* 2016, 56, 227–235.

14. Wang, R.L.; Bian, K.; Xu, S.Y. Study on preventing fat deterioration in nuts coated with edible film from vegetable proteins. *J. Henan Univ. Technol. (Nat. Sci. Ed.)* 2002, 23, 19–22.
15. Hu Y. Characterization of emulsion films prepared from soy protein isolate at different preheating temperatures, *Journal of Food Engineering*, 2021, V. 309, 110697, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110697>
16. Castillo-Juárez I. et all. .Antimicrobial peptides properties beyond growth inhibition and bacterial killing. *Peer. 2022* 10:e12667 <https://doi.org/10.7717/peerj.12667>
17. Porcelli, F. On the role of NMR spectroscopy for characterization of antimicrobial peptides / F. Porcelli, A. Ramamoorthy, G. Barany, G. Veglia. – DOI: 10.1007/978-1-62703-583-5_9 // Methods in Molecular Biology. – 2013. – Vol. 1063. – P. 159–180.
18. Deshayes, C. Drug delivery systems for the oral administration of antimicrobial peptides: promising tools to treat infectious diseases / C. Deshayes, M. N. Arafath, V. Apaire-Marchais, E. Roger. – DOI: 10.3389/fmedt.2021.778645 // Frontiers in Medical Technology. – 2022. – Vol. 3. – P. 778645.
19. Van Dijk, A. Identification of chicken cathelicidin-2 core elements involved in antibacterial and immunomodulatory activities / A. van Dijk, E. M. Molhoek, E. J. A. Veldhuizen, J. L. M. Tjeerdsma-van Bokhoven, E. Wagendorp, F. Bikker, H. P. Haagsman. – DOI: 10.1016/j.molimm.2009.05.019 // Molecular Immunology. – 2009. – Vol. 46 (13). – P. 2465–2473.
20. Khoshakhlagh, K. Encapsulation of D-limonene in *Alyssum homolocarpum* seed gum nanocapsules by emulsion electrospraying: Morphology characterization and stability assessment / K. Khoshakhlagh, M. Mohebbi, A. Koocheki, A. R. Allafchian. – DOI: 10.1016/j.bcdf.2018.03.001 // Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. – 2018. – Vol. 16. – P. 43–52.
21. Shafee, T. M. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function / T. M. A. Shafee, F. T. Lay, T. K. Phan, M. A. Anderson, M. D. Hulett. – DOI: 10.1007/s00018-016-2344-5 // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2017. – Vol. 74 (4). – P. 663–682.
22. Hancock, R. E. W. Antimicrobial and host-defense peptides as new antiinfective therapeutic strategies / R. E. W. Hancock, H. G. Sahl. – DOI: 10.1038/nbt1267 // Nature Biotechnology. – 2006. – Vol. 24 (12). – P. 1551–1557.
23. Jenssen, H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R. E W. Hancock. – DOI: 10.1128/CMR.00056-05 // Clinical Microbiology Reviews. – 2006. – Vol. 19 (3). – P. 491–511.
24. Yasir, M. Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms / M. Yasir, M. D. P. Willcox, D. Dutta. – DOI: 10.3390/ma11122468 // Materials. – 2018. – Vol. 11 (12). – P. 2468.
25. Mohamed, M. F. Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus* / M. F. Mohamed, A. Abdelkhalek, M. N. Seleem. – DOI: 10.1038/srep29707 // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6 (1). – P. 29707.

26. Martinez, M. Synergistic and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P5 against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* / M. Martinez, S. Gonçalves, M. R. Felício, P. Maturana, N. C. Santos, L. Semorile, A. Hollmann, P. C. Maffia. – DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.05.008 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 2019. – Vol. 1861 (7). – P. 1329–1337.
27. Marks, L. R. The human milk protein-lipid complex HAMLET sensitizes bacterial pathogens to traditional antimicrobial agents / L. R. Marks, E. A. Clementi, A. P. Hakansson. – DOI: 10.1371/journal.pone.0043514 // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7 (8). – P. 43514.
28. Massarelli, E. Combining immune checkpoint blockade and tumor-specific vaccine for patients with incurable human papillomavirus 16-related cancer: a phase 2 clinical trial / E. Massarelli, W. William, F. Johnson, M. Kies, R. Ferrarotto, M. Guo [et al.] – DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.4051 // *JAMA Oncology*. – 2019. – Vol. 5 (1). – P. 67–73.
29. Han, X. Interactions of designed trp-containing antimicrobial peptides with DNA of multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa* / X. Han, Z. Kou, F. Jiang, X. Sun, D. Shang. – DOI: 10.1089/dna.2019.4874 // *DNA and cell biology*. – 2021. – Vol. 40 (2). – P. 414–424.

ANTIMICROBIAL PEPTIDE AS A FUNCTIONAL INGREDIENT OF FOOD FILM TO INCREASE THE SHELF LIFE OF MEAT PRODUCTS

*Ulitina E. A., postgraduate student, South Ural State Agrarian University,
e-mail: egorulitin@inbox.ru*

*Tikhonov S. L., PhD, Professor, Director of the Scientific and Educational Center "Applied Nanobiotechnology", Ural State Agrarian University,
e-mail: tihonov75@ru*

*Tikhonova N. V., PhD, Professor, Head of the Department of Food Engineering of Agricultural Production, Ural State Agrarian University,
e-mail: tihonov75@bk.ru*

Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia,
e-mail: rector@urgau.ru

Abstract: A new peptide GVAPFYWDERHKARAFKPVRKYPG was designed and synthesized, its biological activity and antimicrobial properties were predicted. The peptide has a bioactivity value of 0.675963 with a maximum value of 1.0, which indicates the presence of bioactivity in the studied peptide. It was found that the peptide GVAPFYWDERHKARAFKPVRKYPG belongs to antimicrobial and has a probability of antimicrobial properties of 0.633 with a maximum value of 1.0. A food film was obtained using the peptide. It was found that chilled meat cuts packed in food film with antimicrobial peptide KMAFAnM after 7 days of storage had a 58.4% lower number of yeast cells by 76.9%, which indicates a high antimicrobial effectiveness of food film with peptide.

Keywords: peptide, antimicrobial properties, food film, meat products, shelf life