



Научная статья
4.3.3 – Пищевые системы (технические науки)
УДК 664:637.123

doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.03.020



КЛАССИФИКАЦИЯ И ПОДТВЕРЖДЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВОГО ПЕПТИДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *INVITRO*

Тихонов Сергей Леонидович¹, Тихонова Наталья Валерьевна²,
Пестова Инга Геннадьевна³, Мерзлякова Наталия Вадимовна⁴

¹ МСХА имени К. А. Тимирязева, Москва, Россия

^{1,2} Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия

¹ tihonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

² tihonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>

³ Пермский институт (филиал) РЭУ имени Г.В. Плеханова, Пермь, Россия

³ inga-pestova@rambler.ru

⁴ Хладокомбинат №3, Екатеринбург, Россия

⁴ merzlyakova@xk3.ru

Аннотация. Пептиды представляют большой интерес для производителей пищевой продукции как пищевые добавки широкого спектра антимикробного действия с высокой активностью при микромолярной концентрации. Молочный белок является легкодоступным источником пептидов антимикробного действия. Целью работы являлось выделение антимикробного пептида из белка молозива коров с последующей его классификацией и подтверждением биологической активности в эксперименте *invitro*. В качестве объектов исследований использовали пепсиновый гидролизат молозива коров и пептид с условным названием R(1), выделенный гидролизата молозива коров. Антимикробную активность пептида определяли диско-диффузионным методом. Из пепсинового гидролизата молозива коров выделен полипептид, состоящий из 11 аминокислот со следующей последовательностью: IRHGRCVSCSR. На основании идентификации пептида по базе «Antimicrobial Peptide Database» установлено, что он на 40 % подобен антимикробному пептиду AP00450, действующему губительно на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Идентификация по базе данных Protein NCBI показала сходство исследуемого пептида R(1) с антимикробным пептидом с названием «14 kDaphosphohistidinephosphatase». Установлено, что положительный заряд пептида составляет +1, молекулярная масса 7 кДа, изоэлектрическая точка 11,59, гидрофильность + 12,51 Ккал*моль⁻¹. Пептид и относится к α-спиральным, что свидетельствует об его антимикробной активности. В эксперименте *invitro* подтверждено противомикробное действие пептида.

Ключевые слова: молочный белок, пепсин, ферментативный гидролизат, молозиво коров, биологически активные пептиды, антимикробная активность.

Для цитирования: Классификация и подтверждение антимикробной активности пищевого пептида в эксперименте *invitro* / С. Л. Тихонов [и др.] // Ползуновский вестник. 2023. № 3. С. 150–155. doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.03.020. EDN: <https://elibrary.ru/ZQMDEG>.

Original article

LASSIFICATION AND CONFIRMATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A FOOD PEPTIDE IN AN IN VITRO EXPERIMENT

Sergey L. Tikhonov¹, Natalya V. Tikhonova², Inga G. Pestova³,
Natalia V. Merzlyakova⁴

^{1,2} Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia

¹ tihonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

© Тихонов С. Л., Тихонова Н. В., Пестова И. Г., Мерзлякова Н. В., 2023

КЛАССИФИКАЦИЯ И ПОДТВЕРЖДЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВОГО ПЕПТИДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ INVITRO

² tihonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>

³ Perm Institute (branch) Plekhanov Russian University of Economics, Perm, Russia

³ inga-pestova@rambler.ru

⁴ Refrigerating plant No. 3, Yekaterinburg, Russia

⁴ merzlyakova@xk3.ru

Abstract. Peptides are of great interest to food manufacturers as food additives of a wide spectrum of antimicrobial action with high activity at micromolar concentration. Milk protein is an easily accessible source of antimicrobial peptides. The aim of the work was to isolate an antimicrobial peptide from cow colostrum protein, followed by its classification and confirmation of biological activity in an in vitro experiment. Pepsin hydrolysate of cow colostrum and a peptide with the conditional name R(1) isolated from cow colostrum hydrolysate were used as objects of research. The antimicrobial activity of the peptide was determined by the disco-diffusion method. A polypeptide consisting of 11 amino acids with the following sequence was isolated from the pepsin hydrolysate of cow colostrum: IR-HGRCVSCSR. Based on the identification of the peptide based on the Antimicrobial Peptide Database, it was found that it is 40% similar to the antimicrobial peptide AP00450, which acts ruinously on gram-positive and gram-negative bacteria. Identification by the Protein NCBI database showed the similarity of the studied peptide R(1) with an antimicrobial peptide named "14 kDaphosphohistidinophosphatase". It was found that the positive charge of the peptide is +1, the molecular weight is 7 kDa, the isoelectric point is 11.59, the hydrophilicity is + 12.51 Kcal * mol⁻¹. The peptide belongs to the α -helical, which indicates its antimicrobial activity. The antimicrobial effect of the peptide was confirmed in an in vitro experiment.

Keywords: milk protein, pepsin, enzymatic hydrolysate, cow colostrum, biologically active peptides, antimicrobial activity.

For citation: Tikhonov, S.L., Tihonova, N.V., Pestova, I.G. & Merzlyakova, N.V. (2023). Classification and confirmation of antimicrobial activity of a food peptide in an in vitro experiment. *Polzunovskiy vestnik*, (3), 150-155. (In Russ.). doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.03.020. <https://elibrary.ru/ZQMDEG>.

ВВЕДЕНИЕ

Большинство процессов консервирования пищевых объектов направлено на инактивацию микроорганизмов путем использования пищевых добавок с антимикробными и в тоже время канцерогенными свойствами, что вызывает отрицательное отношение потребителей к консервантам в целом [1]. Следовательно, актуальными являются исследования по поиску безопасных естественных способов биологического консервирования, обеспечивающих сохранение качества и микробиологической безопасности пищевой продукции на протяжении всего срока годности.

Внедрение технологий консервирования пищевых продуктов с использованием веществ природного происхождения также важно для предотвращения потерь при хранении и распространения болезней, вызванных потреблением продуктов питания с патогенной микрофлорой. В этой связи антимикробные пептиды (АМП) представляют большой интерес как пищевые добавки широкого спектра консервирующего действия с высокой активностью при микроконцентрации. АМП более выгодны по сравнению с антибиотиками благодаря их способности обходить распростра-

ненные механизмы резистентности, возникающие у микроорганизмов [2].

АМП могут быть получены из различных источников белка, в частности, из молочного, путем ферментативного гидролиза или микробиологической ферментации [3]. Для получения признанных антимикробных пептидов для расщепления белка часто используют пепсин [4].

Цель исследования – выделение антимикробного пептида из пепсинового гидролизата молозива коров с последующей его классификацией и подтверждением биологической активности в эксперименте *invitro*.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований:

- пепсиновый гидролизат молозива коров;
- пептид с условным названием R(1), выделенный из пепсинового гидролизата молозива коров.

Молекулярно-массовое распределение аминокислот в пептиде оценивали масс-спектрометрическим методом и идентифицировали методами MALDI-TOF и MS Ultraflex («Bruker», Германия). Анализ масс-спектров проводили с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint («Matrix Science»,

США) с использованием баз данных Protein NCBI и Antimicrobial Peptide Database.

Микросеквенирование осуществляли с помощью секвенатора MiSeq (Illumina, США), системы для высокопроизводительного секвенирования PGM Ion Torrent и системы спектрофотометрической оценки качества образца (Life Technologies, США).

Score (величина достоверности для каждого совпадения) пептида рассчитывали по формуле (1) [5]:

$$Score = \frac{50000}{M_{prot} \times n^{mi}}, \quad (1)$$

где M_{prot} – молекулярная масса для каждого совпавшего пептида;

n – произведение, которое рассчитывается из Mowse-матрицы весов M для каждого совпадения экспериментальных данных и масс пептидов, рассчитанных из записей в геномной базе данных Protein NCBI и APM.

Моделирование пространственной структуры пептида осуществляли с помощью программы молекулярного моделирования Schrodinger Maestro (США).

Антимикробную активность пептида определяли диско-диффузионным методом на грамположительных и грамотрицательных бактериях, в качестве тест-штаммов использовали *Escherichiacoli* и *Bacillus subtilis*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из пепсинового гидролизата молозива коров выделен полипептид, состоящий из 11 аминокислот с последовательностью IRHGRCVSCSR (изолейцин-аргинин-гистидин-глицин-аргинин-цистеин-валин-серин-цистеин-серин-аргинин), которому дали условное название R(1).

Аминокислотный состав пептида, прежде всего, влияет на его антимикробную активность и определяет механизм действия. Кроме того, антимикробные пептиды классифицируют на основе составляющих аминокислот, в частности, аргинина, гистидина и глицина. Установлено, что пептид R(1) содержит по одной аминокислоте аргинина, гистидина и глицина, причем они в пептидной цепи находятся друг за другом. Анализируя механизм действия АМП, следует отметить, что пептиды с аргинином и гистидином притягиваются к анионной бактериальной мембране [6].

В таблице 1 представлена характеристика аминокислотного состава пептидной последовательности. Содержание аминокислот следующее: Ile, Val, Gly, His по 9 %, Cys и Ser по 18 % и Arg – 27 %, молекулярная масса пептида 7 кДа.

На основании идентификации пептида по базе «Antimicrobial Peptide Database» установлено, что он на 40 % подобен антимикробному пептиду AP00450, действующему губительно на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Идентификация по базе данных Protein NCBI показала сходство исследуемого пептида R(1) (Score = 102) с антимикробным пептидом с названием «14 kDaphosphohistidinephosphatase».

Таблица 1 – Характеристика аминокислотного состава пептидной последовательности

Table 1 – Characteristics of the amino acid composition of the peptide sequence

Наименование показателя	Характеристика показателя
Гидрофобная аминокислота	I: 1 V: 1 L: 0 F: 0 C: 2 M: 0 A: 0 W: 0
Количество G и P	G: 1 P: 0
Отрицательно заряженная аминокислота	E: 0 D: 0
Положительно заряженная аминокислота	K: 0 R: 3 H: 1
Другая аминокислота	T: 0 S: 2 Y: 0 Q: 0 N: 0

При анализе аминокислотного состава пептида установлено, что в нем присутствуют неполярные аминокислоты, в частности, валин и изолейцин, имеющие незаряженный радикал. При сближении в пространстве радикалы этих аминокислот обеспечивают гидрофобное взаимодействие с мембраной клетки бактерий. Полярные, гидрофильные, незаряженные аминокислоты пептида – глицин, цистеин и серин за счет гидроксильной, сульфгидрильной и амидогруппы способны образовывать водородные связи мембраной клетки бактерий.

Общий положительный заряд пептида (+1) свидетельствует о том, что рН пептида меньше изоэлектрической точки, так как при уменьшении рН все больше аминокислот переходит в форму NH_3^+ , а диссоциация карбоксильных групп подавляется. Вышеизложенное подтверждается результатами исследований. Так, у пептида R(1) значение изоэлектрической точки составляет 11,59, и гидрофильность (гидрофобность) равна + 12,51 Ккал*моль⁻¹.

На рисунке 1 приведен масс-спектр образца R(1).

На основании установленных физических и химических характеристик пептида его можно отнести к антимикробным, так как большинство АМП – это амфипатические молекулы, состоящие из 6...100 аминокислот с

КЛАССИФИКАЦИЯ И ПОДТВЕРЖДЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВОГО ПЕПТИДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ INVITRO

молекулярной массой до 12 кДа с суммарным положительным зарядом от +1 до +9, который направляет пептид к отрицательно заряженным мембранам бактериальных клеток и позволяет его способности разрушать и дестабилизировать клеточные мембраны [7].

На основе структурной конформации АМП подразделяют на четыре категории: линейные, α -спиральные пептиды, β -плиссированные листовые пептиды, линейная удлиненная структура и как α -спиральные, так и β -листовые пептиды [8]. Пептид R(1) относится к альфа-спиральным пептидам.

Следует отметить, что общая формула антимикробных пептидов включает гидрофобные аминокислоты: изолейцин (I) или лейцин (L) и катионные аминокислоты: аргинин или лизин. В исследуемом нами пептиде имеется аминокислота изолейцин и 3 аминокислоты аргинин, обладающие антимикробными свойствами, что, возможно, свидетельствует о его противомикробной активности. Такая комбинация гидрофобных и по-

ложительно заряженных аминокислот обуславливает/обеспечивает α -спиральную конформацию пептида.

Механизм действия α -спиральных пептидов заключается в следующем: полярная фаза притягивается к отрицательно заряженной мембране, а неполярная фаза вызывает проникновение пептида в мембрану за счет Ван-дер-Ваальсовых сил и гидрофобных взаимодействий, приводящих к повышению проницаемости мембраны микробной клетки [9].

Кроме того, изолейцин обеспечивает конъюгацию пептида с другими молекулами через группу $-SH$. Уровень гидрофильности ($+11,59$ Ккал*моль $^{-1}$) свидетельствует о возможности проникновения пептида через мембрану бактериальной клетки. Можно предположить, что исследованный пептид R(1) должен обладать высокой химической активностью, амфильностью и, возможно, противомикробными свойствами.

Для подтверждения антимикробной активности пептида проведены исследования *in vitro* (таблица 2).

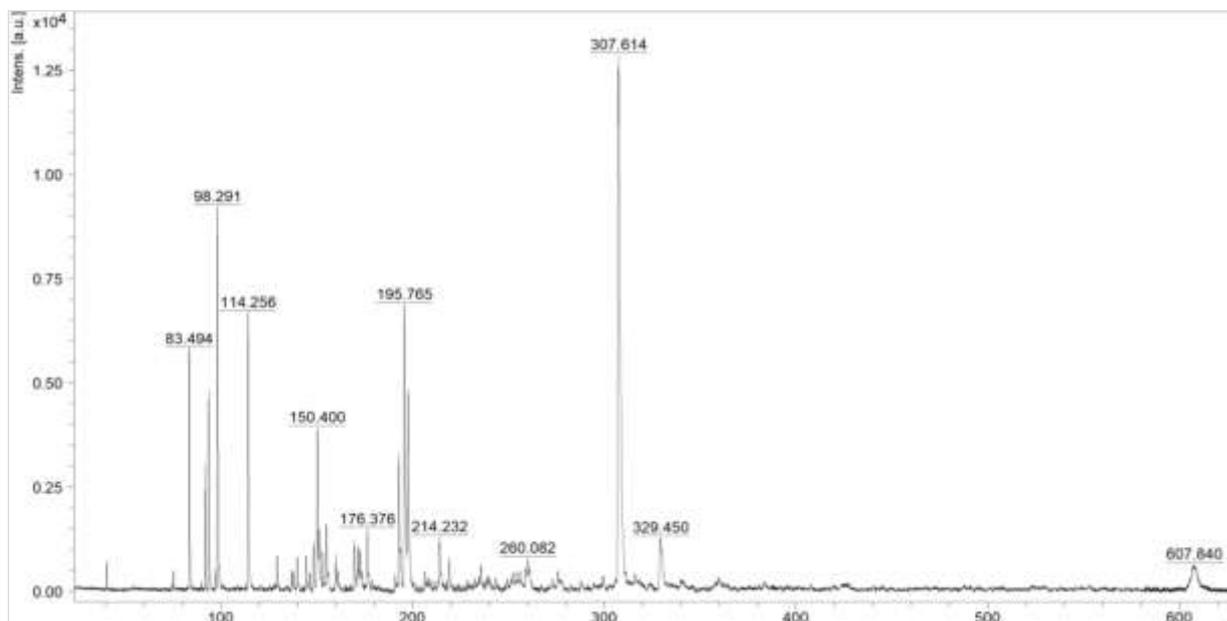


Рисунок 1 – Масс-спектр образца R(1)

Figure 1 – Mass spectrum of sample R(1)

Таблица 2 – Антимикробная активность пептида R (1)

Table 2 – Antimicrobial activity of peptide R (1)

Образец	Диаметрзонылизиса, мм		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
R(1)	17	19	6
Контроль	0	0	0
Антибиотик «Канамицин»	22	24	Не исследовали
Противогрибковый препарат «Флуконазол»	Не исследовали		26

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hager E., Chen J., Zhao L. Minireview: parabens exposure and breast cancer // *Int J Environ Res Public Health*. 2022. Vol. 19(3). P. 1873. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031873>.
2. Guha S., Sharma H., Deshwal G.K. A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species // *Food Prod Process and Nutr*. 2021. Vol. 3:2. P. 1–15. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00045-7>.
3. Sharma C., Rokana N., Chandra M., Singh B.P., Gulhane R.D., Gill J.P.S., Ray P., Puniya A.K., Panwar H. Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals // *Front Vet Sci*. 2018. Vol. 4. P. 1–27.
4. Shivanna S.K., Nataraj B.H. Revisiting Therapeutic and Toxicological Fingerprints of Milk-Derived Bioactive Peptides: An Overview // *Food Biosci*. 2020. P. 100771. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100771>.
5. Беризовская Е.И., Ихалайнен А.А., Антонин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Митрофанов Д.А., Удинцев А.В., Аксенов А.В., Шевлякова О.А., Родин И.А., Шпигун О.А. Методы обработки масс-спектрометрических данных при идентификации пептидов и белков // *Вестник Московского университета Сер. 2. Химия*. 2015. № 5. С. 266–327.
6. Niaz B., Saeed F., Ahmed A., Imran M., Maan A.A., Khan M.K.I., Suleria H.A.R. Lactoferrin (LF): a natural antimicrobial protein // *Int J Food*. 2019. Vol. 22. P. 1626–1641. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1666137>.
7. Singh A., Duche R.T., Wandhare A.G. [et al.]. Milk-Derived Antimicrobial Peptides: Overview, Applications, and Future Perspectives // *Probiotics & Antimicro*. 2023. Vol. 15. P. 44–62. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-10004-y>.
8. Sansi M.S., Iram D., Zanab S., Vij S., Puniya A.K., Singh A., Meena S. Antimicrobial bioactive peptides from goat Milk proteins: in silico prediction and analysis // *J Food Biochem*. 2022. Vol. 5. P. 14311. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14311>.
9. Yount N.Y., Bayer A.S., Xiong Y.Q., Yeaman M.R. Advances in antimicrobial peptide immunobiology // *Biopolymers*. 2006. Vol. 84. P. 435–

458. <https://doi.org/10.1002/bip.20543>.

Информация об авторах

С. Л. Тихонов – доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой технологии хранения и переработки плодоовощной и растениеводческой продукции Российского государственного аграрного университета МСХА имени К. А. Тимирязева.

Н. В. Тихонова – доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой пищевой инженерии и аграрного производства Уральского государственного аграрного университета.

И. Г. Пестова – старший преподаватель кафедры технологии и организации питания и услуг Пермского института (филиала) РЭУ им. Г.В. Плеханова.

Н. В. Мерзлякова – генеральный директор Хладокомбината № 3.

Information about the authors

S.L. Tikhonov - Doctor of Technical Sciences, Professor Head of the Department of Technology of Storage and Processing of Fruit and vegetable and Crop Products of the Russian State Agricultural University of the Moscow State Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev.

N.V. Tikhonova - Doctor of Technical Sciences, Professor, Head of the Department of Food Engineering and Agricultural Production of the Ural State Agrarian University.

I.G. Pestova - Senior Lecturer of the Department of Technology and organization of catering and services of the Perm Institute (branch) Plekhanov Russian University of Economics.

N.V. Merzlyakova - General Director of the Refrigerating plant No. 3.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare that there is no conflict of interest.*

Статья поступила в редакцию 28.03.2023; одобрена после рецензирования 13.08.2023; принята к публикации 11.09.2023.

The article was received by the editorial board on 28 Mar 2023; approved after editing on 13 Aug 2023; accepted for publication on 11 Sep 2023.