

Разработка активного упаковочного материала на основе крахмала с использованием в качестве антимикробной добавки масляного экстракта гвоздики

Российский биотехнологический университет, г. Москва, Российская Федерация

А. Альхаир, Е. А. Шукина, М. И. Губанова, И. А. Кирш, А. М. Ермилова, И. С. Тверитникова

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Кирш Ирина Анатольевна
E-mail: kirshia@mgupp.ru

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:

данные текущего исследования доступны по запросу у корреспондирующего автора.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Альхаир, А., Шукина, Е. А., Губанова, М. И., Кирш, И. А., & Ермилова, А. М. (2023). Разработка и исследование активного упаковочного материала на основе крахмала с использованием в качестве антимикробной добавки натуральное эфирное масло. *Хранение и переработка сельхозсырья*, (4), 16–31. <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.4.474>

ПОСТУПИЛА: 03.07.2023

ПРИНЯТА: 15.12.2023

ОПУБЛИКОВАНА: 30.12.2023

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.



АННОТАЦИЯ

Введение: При возрастающей нагрузке на окружающую среду увеличивается потребность в отказе от использования химических веществ в качестве антимикробных агентов в упаковочной промышленности, что вызывает необходимость поиска инновационных природных решений для замены этих веществ. В рамках данного исследования были разработаны упаковочные материалы на основе крахмала с введением натуральной антимикробной добавки, которые могут стать ответом на эту проблему. Использование новых экологически чистых материалов позволяют продлить срок хранения пищевых продуктов, обеспечивая сохранность и безопасность.

Цель: Разработка активной упаковочной пленки из биополимера с введением в неё гвоздичного эфирного масла, определение антимикробных свойств полученного полимерного материала.

Материалы и методы: В данной работе пленку на основе крахмала готовили механическим перемешиванием исходных реагентов с введением эфирного масла различной концентрации. Далее определяли антимикробные свойства полимерного упаковочного материала диско-диффузным методом в соответствии с МУК 4.2.1890-04 по отношению к (*Bacillus subtilis*), (*Escherichia coli*), (*Candida albicans*) и (*Aspergillus niger*), также был проведен эксперимент по определению способности пленок с эфирным маслом снижать количество КМАФАнМ на поверхности колбасных изделий при их хранении.

Результаты: Было установлено, что образцы упаковочной пленки на основе крахмала с эфирным маслом гвоздики обладают антимикробной активностью по отношению к *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* и снижают количество колоний микроорганизмов на поверхности пищевого продукта.

Выводы: Разработанный материал имеет высокий потенциал использования в пищевой промышленности, поскольку позволяет улучшить качество и безопасность продуктов, в частности колбасных изделий, а также снизить количество пластиковых синтетических упаковочных материалов, оказывающих негативное влияние на окружающую среду. Полученный материал с антимикробными свойствами может быть использован для упаковки различных пищевых продуктов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

активная упаковка, пленка на основе крахмала; эфирное масло гвоздики; антимикробная пленка; антибактериальное покрытие; противогрибковые свойства; диско-диффузный метод, КМАФАнМ

Development of an Active Starch-Based Packaging Material Using Clove Oil Extract as an Antimicrobial Additive

Russian Biotechnological University,
Moscow, Russian Federation

Ali Alkhair, Ekaterina A. Shchukina, Marina I. Gubanova, Irina A. Kirsh,
Alexandra M. Ermilova, Isabella S. Tveritnikova

CORRESPONDENCE:

Irina A. Kirsh

E-mail: kirshia@mgupp.ru

DATA AVAILABILITY:

Data from the current study are available upon request from the corresponding author.

FOR CITATIONS:

Alkhair, A., Shchukina, E.A., Gubanova, M.I., Kirsh, I.A., & Ermilova, A.M. (2023). Development of an active starch-based packaging material using clove oil extract as an antimicrobial additive. *Storage and Processing of Farm Products*, (4), 16–31. <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.4.474>

RECEIVED: 03.07.2023

ACCEPTED: 15.12.2023

PUBLISHED: 30.12.2023

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.



ABSTRACT

Introduction: With increasing pressure on the environment, there is an increasing need to eliminate the use of chemicals as antimicrobial agents in the packaging industry, which raises the need to find innovative natural solutions to replace these substances. In this study, starch-based packaging materials with the introduction of a natural antimicrobial additive were developed as a potential answer to this problem. The use of new environmentally friendly materials can extend the shelf life of food products, ensuring preservation and safety.

Purpose: Development of active packaging film from biopolymer with introduction of clove essential oil into it, determination of antimicrobial properties of the obtained polymeric material.

Materials and Methods: In this work, starch-based film was prepared by mechanical mixing of initial reagents with the introduction of essential oil of different concentrations. Then antimicrobial properties of polymeric packaging material were determined by disk-diffusion method in accordance with MUK 4.2.1890-04 in relation to (*Bacillus subtilis*), (*Escherichia coli*), (*Candida albicans*) and (*Aspergillus niger*), also an experiment was conducted to determine the ability of films with essential oil to reduce the amount of CMAFANM on the surface of sausage products during their storage.

Results: It was found that samples of packaging film based on starch with clove essential oil have antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and reduce the number of microorganisms colonies on the surface of the food product.

Conclusion: The developed material has a high potential for use in the food industry, as it allows to improve the quality and safety of products, in particular sausage products, as well as to reduce the amount of plastic synthetic packaging materials that have a negative impact on the environment. The obtained material with antimicrobial properties can be used for packaging of various food products.

KEYWORDS

active packaging; starch-based film; clove essential oil; antimicrobial film; antibacterial coating; antifungal properties; disk-diffusion method; CMAFANM

ВВЕДЕНИЕ

Упаковочные материалы имеют большое значение для сохранения качества продуктов и обеспечения их безопасности для потребителей, продления сроков хранения продуктов питания. Упаковка является неотъемлемой частью жизненного цикла каждого продукта, так как помогает контролировать срок годности продуктов и упрощает их транспортировку и хранение, а также защищает продукты от внешних воздействий, таких как солнечный свет, влага, загрязнение, бактерии и другие вредные факторы. Наиболее перспективно использование натуральных природных полимерных материалов, так как использование синтетических упаковочных материалов негативно отражается на экологии.

Статистика показывает, что большая часть пластика не перерабатывается, что приводит к масштабному накоплению отходов. В 2020 году доля пластика составляла половину объёма коммунального мусора в РФ (ТАСС, 29 января 2021). По данным Минпромторга России, очень малая часть полиэтилена (20%) перерабатывается, почти столько же полипропилена (17%), а процент перерабатываемой макулатуры всего 30% (Стратегия развития промышленности по обработке, 2018). В связи со сложившейся ситуацией, создание и развитие упаковочных материалов на основе природных полимеров приведет к сокращению количества пластика, используемого в пищевой и упаковочной промышленности, и тем самым — к защите окружающей среды и человека от негативных последствий пластиковых отходов.

При разработке новых упаковочных материалов исследования были сосредоточены на создании многофункциональных упаковочных материалов, особенно биоразлагаемых с антимикробными и окислительными свойствами, способных продлить срок годности пищевых продуктов (Wen, 2021; Sadekuzzaman, 2015)¹. При создании упаковочных материалов с антимикробными свойствами предпочтительнее использование натуральных

добавок для достижения двух целей: во-первых, обеспечить безопасность потребителей и снизить риск для здоровья в результате снижения использования синтетических химических веществ, и во-вторых, не оказывать негативного влияния на продолжительность разложения упаковочных материалов². В то время как использование синтетических химических веществ может продлить процесс разложения (Sharma, 2021).

Для предотвращения заражения пищевой продукции, которое может привести к непоправимым последствиям, одним из перспективных способов является введение или нанесение на упаковку специальных антимикробных добавок, обладающих бактерицидными свойствами². Существует ряд антимикробных добавок, допущенных для использования в упаковке пищевой продукции. В экологическом отношении перспективными являются натуральные природные добавки, в частности эфирные масла.

Эфирные масла привлекают внимание исследователей своими антимикробными свойствами, которые делают их безопасной альтернативой промышленным консервантам (Ashrafudoulla, 2020). Содержат активные вещества, такие как терпены, которые могут уничтожать бактерии, грибки и другие микроорганизмы или подавлять их рост. Наиболее популярными эфирными маслами являются масло чайного дерева, лимонника, масло эвкалипта, тимьяна, лаванды и масло гвоздики (Sharma, 2011), которые обладают антибактериальными и противогрибковыми свойствами. Поэтому они могут быть использованы для обработки и упаковки пищевых продуктов, чтобы предотвратить порчу и продлить срок годности. Экстракт гвоздичного масла безопасен, эффективен, широко используется в медицинских целях в качестве антисептика, однако информации о его антимикробных свойствах недостаточно для его использования в качестве антимикробной добавки в упаковочном материале для продления сроков хранения пищевой продукции. Целью данного исследования являлось опре-

¹ Патент RU 2 731 695 C1 Потороко И. Ю., Малинин А. В., Цатуров А. В., Науменко Н. В., Калинина И. В. Способ получения биоразлагаемого композиционного материала на основе растительных биополимеров. — 2020, № 2019139536 file:///C:/Users/H/Downloads/RU2731695C1.pdf

² Патент RU 2 669 865 C1 Малинкина О. Н., Папкина В. Ю., Шиповская А. Б. Композиция для получения биоразлагаемого полимерного материала и биоразлагаемый полимерный материал на её основе. — 2016, № 2017136410 file:///C:/Users/H/Downloads/RU2669865C1%20(1).pdf

деление влияния упаковочного материала на основе крахмала, содержащей эфирное масло гвоздики на микроорганизмы и оценка способности к подавлению микроорганизмов для пролонгации сроков хранения продуктов питания.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Пленки на основе природных полимеров всегда использовались как идеальные матрицы для включения натуральных эфирных масел, и основным недостатком этих пленок всегда было то, что они быстро растворяются в воде и становятся хрупкими. По некоторым данным, добавление к ним натурального эфирного масла усиливает гидрофобность поверхности упаковочного материала, увеличивает его прочность и снижает его паропроницаемость. (Ojagh, 2010; Pires, 2013).

Проведенные исследования подтверждают, что эфирное масло гвоздики обладает антимикробными свойствами в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и грибов. В эксперименте, проведенном Л. Нуньес и М. Д'Акино на газовом хроматографе (ГХ), определили химический состав: эвгенол (83,13%), β -кариофиллен (6,88%), α -гумулен (2,48%), оксикариофиллен (3,59%), эвгенилацетат (2,41%). Антимикробные свойства эфирного масла гвоздики приписывают эвгенолу (Nuñez, 2012; Tajkarimi, 2010).

Применение эфирного масла гвоздики

Эфирное масло гвоздики является эффективным компонентом, который может быть использован в различных областях жизни, и продолжение исследований в этой области только подтвердит его положительные свойства и возможности применения (Sienkiewicz, 2011).

Фармацевтика

Выявлено, что в состав лекарственных препаратов наиболее часто входят эфирные масла, основным компонентом которых являются монотерпены.

Гвоздичное масло содержится в таких лекарствах, как золотая звезда, кармолис, паронтал, эфилитт, эфквамон (Пономарева, 2016).

Медицина

Масло гвоздики обладает сильным антисептическим, спазмолитическим, укрепляющим, стимулирующим и ветрогонным действием, поэтому его можно применять в профилактических целях во время эпидемий воздушно-капельных и кишечных инфекций. Масло гвоздики является обезболивающим средством, а также оно укрепляет иммунную систему и оказывает согревающее действие³ (Batiha, 2020).

Ветеринария

Масло гвоздики обычно используется для анестезии или эвтаназии лабораторных или домашних рыб.

Безопасное использование эфирного масла гвоздики в пищевой упаковке

Широкое применение эвгенола не означает, что он не является токсичным при использовании в высоких концентрациях. Безопасная доза была определена на уровне 2,5 мг эвгенола на кг тела человека (Ulanowska, 2021). По данным Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США, эвгенол считается безопасным (Jeyakumar, 2021). Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США разрешило использование эвгенола в качестве антисептического анальгетика в медицине и в качестве ароматизатора в пищевой промышленности (Nejad, 2017; Basch, 2008; Kamatou, 2012).

Применение эфирного масла гвоздики в упаковке пищевых продуктов

Одной из трудностей, возникающих при использовании эфирных масел для консервирования пищевых продуктов, является их нестабильность. Их летучие компоненты и подверженность быстро-

³ Шавловская, О.А. (2016). Спектр применения эфирных масел в современной медицине на примере бальзама Золотая звезда. *Лечащий врач*, 10. <https://www.lvrach.ru/2016/10/15436568>

му окислению значительно снижают эффективность их использования в качестве природного консерванта. Этот факт натолкнул исследователей на мысль об использовании эфирных масел в упаковке (Sharma, 2021). Введение в полимерную матрицу натуральных эфирных масел привело к положительным результатам, выраженным в улучшении структуры получаемых пленок (Atar'es, 2016).

Эфирное масло гвоздики используется в производстве биологически активных упаковочных материалов, способных подавлять активность организмов, вызывающих порчу пищевых продуктов. Причина широкого использования биологически активных упаковочных материалов, в противовес химически активным, в которых обычно используются такие химические вещества, как поглотители ауксинов и газообразный этилен, связана с опасностью, которую эти химические вещества могут причинить здоровью человека (Sharma, 2021; Matan, 2006)

Наиболее распространенный способ приготовления пленок с эфирным маслом гвоздики заключается в использовании растворителя, такого как хлороформ. Этот процесс включает смешивание масла с растворителем и последующее перемешивание при низкой температуре в течение определенно-

го периода времени. Затем полученный раствор выливается на стеклянную пластину для создания пленки. Эфирное масло гвоздики имеет широкий спектр применения в создании упаковочных материалов. В таблице 1 приведены примеры его использования.

Механизм действия эвгенола

Эвгенол продемонстрировал антимикробные свойства против многих патогенов человека, включая широкую группу грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также грибов (Sienkiewicz, 2011; Fangjun, 2018; Gökalp, 2011).

Механизм действия эвгенола заключается в том, что он связывается с белками на поверхности микроорганизмов, таких как бактерии и грибы, и нарушает их функции. Эвгенол может разрушать клеточные стенки микроорганизмов, что приводит к их гибели (Raja, 2015).

Эвгенол — это вещество, которое обладает антибактериальными свойствами и может бороться с различными видами бактерий, даже такими как *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

Таблица 1

Примеры использования эфирного масла гвоздики в создании упаковочных материалов

Полимер	Технология получения, концентрации эфирного масла и антимикробных свойств
(ПМК) и (PCL)	Эфирное масло было иммобилизовано в мезопористых наночастицах кремнезема в концентрациях 1 %, 2 % и 3 %. Пленки были получены путем растворения полимолочной кислоты (ПМК) и поликапролактона (PCL) в хлороформе и далее наливании раствора на стеклянную пластину. В результате пленки с эфирным маслом гвоздики показали антимикробные свойства в отношении (<i>E. coli</i>) и (<i>S. aureus</i>) (Wangwei, 2021).
(ПМК) и (PBAT)	Пленки на основе полимолочной кислоты и PBAT (бутиленадипат-котерефталат) были получены с тремя концентрациями эфирного масла гвоздики (1, 5 и 10) % с использованием хлороформа, этанола и глицерина. Компоненты перемешивались в течение 24 часов при температуре 23 ± 2 °C, далее раствор выливался на стеклянную пластину с тефлоновым покрытием. Пленки с эфирным маслом гвоздики показали антимикробные свойства в отношении (<i>E. coli</i>) и (<i>S. aureus</i>) (Shubham, 2020).
(ПГА) и (ПЭГ)	Материалы получали путём растворения в растворе хлороформа полигидроксибутирата (ПГА) в течение шести часов при температуре 60 °C. После этого раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 12 часов, затем перемешивали в течение 4 часов, далее подвергали фильтрации и добавляли полиэтиленгликоль (ПЭГ), далее перемешивали в течение часа. Отдельно были приготовлены растворы при концентрации эфирного масла гвоздики (5, 10 и 15) % путем растворения масла в соответствующих количествах в растворе хлороформа, эти растворы были добавлены к предварительно приготовленному раствору (ПГА) и (ПЭГ). В конце раствор выливали в чашку Петри и оставляли до полного испарения растворителя. Пленки с эфирным маслом гвоздики показали антимикробные свойства в отношении (<i>E. coli</i>), (<i>E. aerogenes</i>) и (<i>S. aureus</i>) (Silva, 2020).

и *Escherichia coli*. Его эффективность объясняется присутствием свободной группы ОН в его структуре. Говоря о грамотрицательных бактериях, эвгенол наносит повреждения цитоплазматической мембране. Благодаря своей гидрофобности эвгенол может легко проникать в мембрану липополисахаридных клеток и в их цитоплазму. Когда он находится внутри клетки, эвгенол вызывает изменения в ее структуре, что приводит к выходу внутриклеточных компонентов (Walsh, 2015)

Гидроксильная группа в эвгеноле может препятствовать действию протеазы, гистидинкарбоксилазы и амилазы у энтеробактерных аэрогенов, связываясь с ними. Исследования также показали потенциальную способность эвгенола ингибировать активность мембранной АТФ-фазы у моноцитогенов *Escherichia coli* и *Listeria 19*. Кроме того, считается, что эвгенол способен вызывать образование активных форм кислорода внутри клетки, что может привести к гибели клеток. Это достигается путем ингибирования роста клеток, повреждения клеточной мембраны и ДНК. Эти открытия представляют значимость эвгенола в борьбе с бактериальными инфекциями и открывают новые перспективы для разработки антимикробных препаратов на основе данного соединения. (Ulanowska, 2021).

Эвгенол также продемонстрировал противогрибковую активность против ряда грибковых штаммов. В случае грибов считается, что эвгенол нарушает функцию клеточной мембраны, ингибирует факторы вирулентности и предотвращает образование грибковой биопленки (El-Baky, 2016).

Таким образом, на основании проведенного нами анализа литературных данных, можно сделать вывод, что использование эфирного масла гвоздики в качестве антимикробной добавки перспективно и актуально для создания активной упаковки на основе природных полимеров, в том числе крахмала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Пленка на основе крахмала — контрольный образец. Пленка на основе крахмала, модифицированная гвоздичным маслом с различной концентраци-

ей (0,5; 1; 3; 5) %. Важным аспектом использования низкой концентрации эфирных масел является безопасность, так как уменьшается риск возникновения нежелательных побочных эффектов у потребителей. Это особенно важно для людей с аллергическими реакциями или гиперчувствительностью, которые могут негативно отреагировать на более высокие концентрации эфирных масел. Кроме того, гвоздичное масло может оказывать влияние на различные свойства, такие как оптические или растяжимые, что в свою очередь может повлиять на приемлемость продукта для потребителя. Однако использование меньшего количества гвоздичного масла также имеет другие преимущества — позволяет избежать ненужных затрат. Эфирные масла являются ценными и дорогостоящими ингредиентами, поэтому использование их в меньших концентрациях помогает снизить затраты на производство. Таким образом, использование низких концентраций эфирного масла в данной работе обеспечивает безопасность и экономическую эффективность.

Исследуемые материалы использовали в виде дисков диаметром 2 см и толщиной 1 мм, а также в виде покрытий на колбасных изделиях.

Материалы

Картофельный крахмал: Изготовитель: ООО «СКАЙФУД» Россия, 141865, Московская область, Дмитровский р-н, РП Некрасовский Ул. Ушакова, Д. 27 ГОСТР 53876-2010;

Глицерин: Производитель: Самарамедпром ОАО, Россия, 249717, Калужская обл., Козельский р-н, Фроловское, 703-67-30;

Уксус: Уксус столовый 9%, КомисКом ООО «Калязинский ЭПК», Россия, Тверская область., г. Калязин, ТУ 9182-003-00334586-02;

Гвоздичное масло (*eugenia caryophyllat*). Изготовитель: ООО «Бизнесойл» г. Москва, поселение Щаповское, пос. Курилово, Бренд: Aroma Bio; ТР ТС 009/2011, ТУ 9151-010-57042024-2015;

Питательная среда «Сабуро». Состав среды (1000 мл): агар — 20 гр, пептон — 10 г., глюкоза — 40 г. Производство «diaGene, Россия», ГОСТ 9.048-89;

Штаммы микроорганизмов: *Escherichia coli* — кишечная палочка — вид грамотрицательных палочковидных бактерий; *Bacillus subtilis* — известная также как сенная палочка или травяная палочка — вид грамположительных бактерий; *Candida albicans* — дрожжеподобный грибок, и *Aspergillus niger* — плесневый грибок (из коллекции центра коллективного пользования «Перспективные упаковочные решения и технологии рециклинга», кафедры «Промышленный дизайн, технология упаковки и экспертиза» Российского биотехнологического университета (РОСБИОТЕХ)).

Оборудование

Стерилизатор паровой DGM-200.

Термостат суховоздушный ТС-1/80 СПУ.

Стандартные стеклянные чашки Петри.

МЕТОДЫ

Метод получения упаковочного материала

В данной работе пленки готовили механическим перемешиванием исходных реагентов в дистиллированной воде. Далее полученный раствор разливали в стеклянные пластины и сушили при комнатной температуре в течение 3 дней.

Оценка антимикробной активности, а также фунгицидное воздействие гвоздичного масла

Антимикробную и фунгицидную активность гвоздичного масла для *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* оценивали с использованием метода дисков в соответствии с МУК 4.2.1890–04⁴.

Был проведен эксперимент по определению способности пленок с эфирным маслом снижать количество микроорганизмов, растущих на поверхности колбасных изделий после упаковывания в пленки и хранения при комнатной температуре (23 ± 2) °С в течение 7 суток методом КМАФАнМ.

Процедура исследования

Приготовление исследуемого материала

Для приготовления образцов исследуемого материала в дистиллированную воду вводили крахмал, уксус, глицерин и гвоздичное масло с концентрацией (0,5; 1; 3; 5) %. Затем проводили механическое перемешивание исходных реагентов и нагревали полученный раствор на водяной бане при температуре 98 ± 2 °С на 5 минут. Полученный раствор разливали в стеклянные пластины и сушили при комнатной температуре в течение 3 суток.

В результате были получены пленки упаковочных материалов на основе крахмала с добавлением гвоздичного масла. Исследуемые образцы формировались в виде дисков диаметром 2 см, толщиной 1 мм для определения антимикробной активности. Для проведения эксперимента по определению способности пленок с эфирным маслом снижать количество микроорганизмов КМАФАнМ, растущих на поверхности колбасных изделий после упаковывания в пленки и хранения при комнатной температуре (23 ± 2) °С в течение 7 суток, проводили нанесение исследуемых композиций путем окунания в них колбасных изделий с последующим высушиванием.

Оценка антимикробной активности, а также фунгицидного воздействия гвоздичного масла

В ходе исследования антимикробной активности пленочных материалов были выбраны наиболее значимые санитарно — показательные микроорганизмы в пищевой промышленности. Среди них были *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*.

Для этой цели в подготовленную в чашках Петри стерилизованную питательную среду «Сабуру» ввели суспензию 0,1 мл на основе физраствора каждого микроорганизма: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*. Затем поместили подготовленный упаковочный материал в виде кругов диаметром 2 см. Внесли 0,1 мл суспензии в каждую чашку Петри. С помощью шпателя Дригальского распределили суспензию микроорганизмов по всей поверхности чашки. После чего

⁴ МУК 4.2.1890–04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. — М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. — 91 с. <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293754/4293754463.pdf>

инкубировали образцы в термостате при температуре $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$ для *Candida albicans*, *Aspergillus niger* и $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ для *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*. Визуальную оценку поверхности образцов проводили через 2–8 суток.

Для определения способности исследуемых композиционных материалов снижать количество микроорганизмов, растущих на поверхности колбасных изделий, на поверхность продукта нанесли растворы композиций с различной концентрацией антимикробной добавки методом окунания. Исследуемые образцы закрепили в штативе и высушивали в течение 5 суток. Затем провели смыв с поверхности колбасного изделия (3 см^2) физраствором (50 мл). Полученную суспензию микроорганизмов в количестве 0,1 мл поместили в питательную среду «Сабуро» в чашки Петри, после чего провели инкубацию при 30°C в течение 7 суток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследуемой работы мы получили пленки на основе крахмала с добавлением эфирного масла гвоздики (Рисунок 1).

Визуальная оценка представленных на Рисунке 1 материалов показала, что материалы имеют однородную структуру, что указывает на хорошую совместимость между всеми компонентами рецептур. С увеличением концентрации пленка становится более шершавой и желтоватой.

На следующем этапе определяли антимикробные свойства полученных материалов диско — диффузным методом в соответствии с МУК 4.2.1890–04.

Закрытые чашки Петри с образцами инкубировали в термостате. Визуальную оценку поверхности образцов проводили через 48–120 ч для всех культур. Полученные результаты для исследуемых образцов представлены на Рисунках 2–10.

Из представленных фото на рисунке 2 видно, что зона ингибирования культуры наблюдается у образцов с концентрацией гвоздичного масла 3% и 5% соответственно.

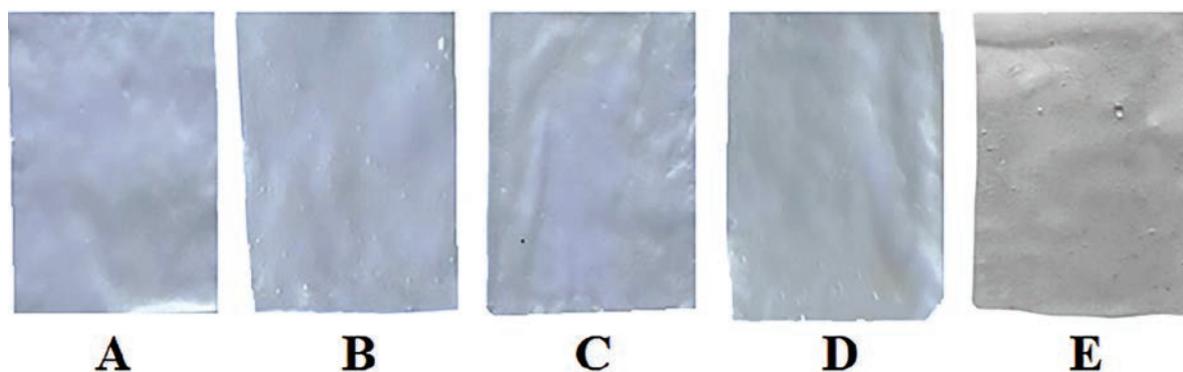
На следующем этапе проводили оценку антимикробных свойств через 5 суток у образцов с концентрацией 3% и 5% гвоздичного масла, так как у них проявилась наибольшая зона ингибирования по сравнению с контрольным образцом и образцами с концентрацией гвоздичного масла 0,5% и 1%.

На данном этапе образцы показали антибактериальные свойства с более высокой концентрацией 3%, 5%. Как видно из Рисунка 4 зона ингибирования составляет у данных образцов 11 мм.

Наилучшие результаты также у образцов с концентрацией антимикробной добавки 3% и 5%. Зона ингибирования уменьшилась через 5 суток у образца D на 2 мм, у образца E на 1 мм по сравнению с теми же образцами через 2 суток.

Рисунок 1

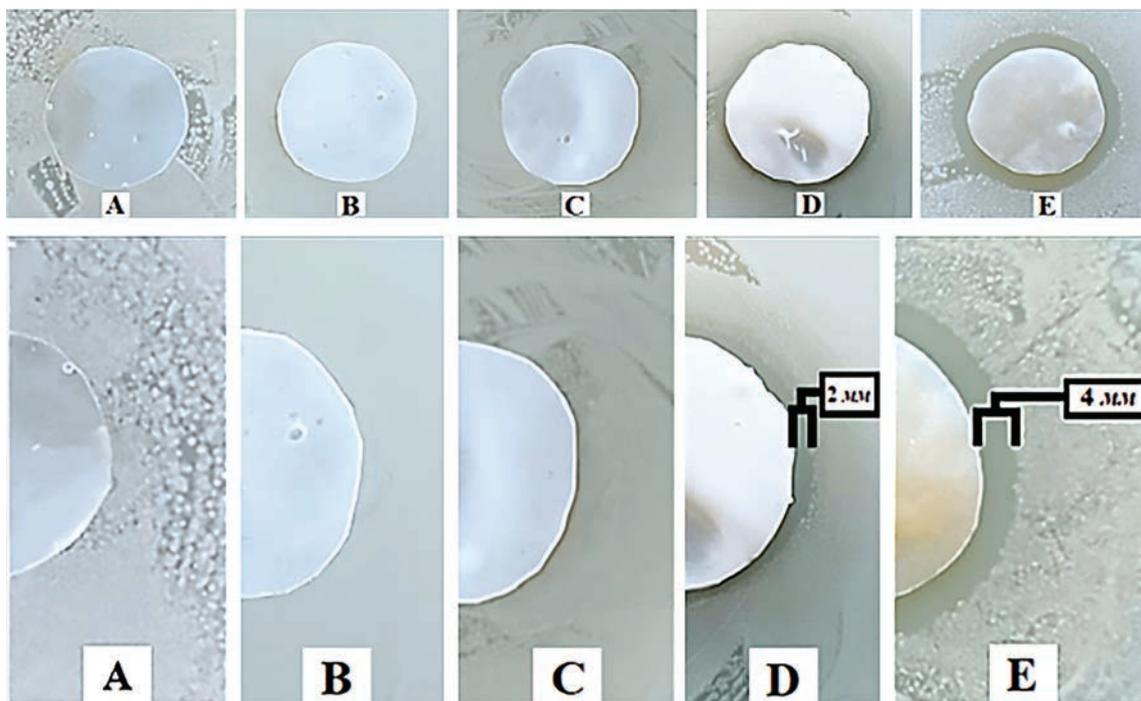
Внешний вид экспериментальных образцов, полученных материалов на основе крахмала



Примечание: А — контрольный образец без антимикробной добавки; В — образец с концентрацией гвоздичного масла 0,5%; С — образец с концентрацией гвоздичного масла 1%; D — образец с концентрацией гвоздичного масла 3%; E — образец с концентрацией гвоздичного масла 5%

Рисунок 2

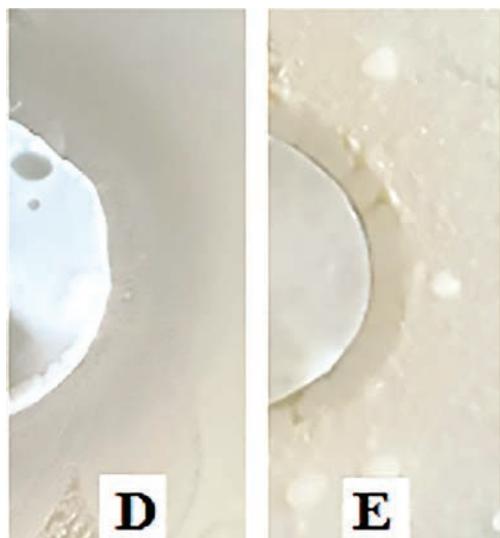
Внешний вид пленок инокулированных с *Candida albicans* через 2 суток



Примечание: А – контрольный образец без антимикробной добавки; В – образец с концентрацией гвоздичного масла 0,5 %; С – образец с концентрацией гвоздичного масла 1 %; D – образец с концентрацией гвоздичного масла 3 %; E – образец с концентрацией гвоздичного масла 5 %

Рисунок 3

Внешний вид пленок инокулированных с *Candida albicans* через 5 суток



Примечание: D – образец с концентрацией гвоздичного масла 3 %; E – образец с концентрацией гвоздичного масла 5 %

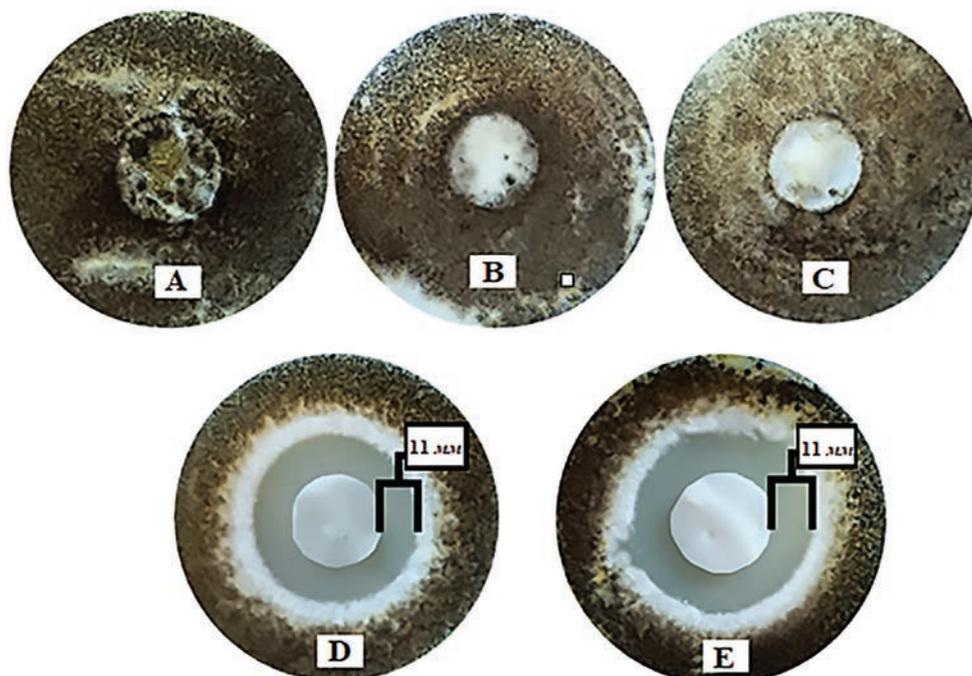
Из Рисунка 6 видно, что через 8 суток происходит подавление роста культуры *A.niger*. Таким образом, материалы с концентрацией гвоздичного масла 3 % и с концентрацией гвоздичного масла 5 % подавляют развитие культуры *Aspergillus niger* на протяжении всего периода наблюдения.

На фото, представленных на Рисунке 8 зона наблюдается зависимость увеличения зоны ингибирования культуры *Bacillus subtilis* от 0,3 мм до 2 мм с повышением концентрации антимикробной добавки от 0,5 % до 5 % соответственно, что свидетельствует о чувствительности данной культуры к воздействию гвоздичного масла.

На фото, представленном на Рисунке 9 незначительная зона ингибирования наблюдается только у образца с концентрацией гвоздичного масла 5 %.

Рисунок 4

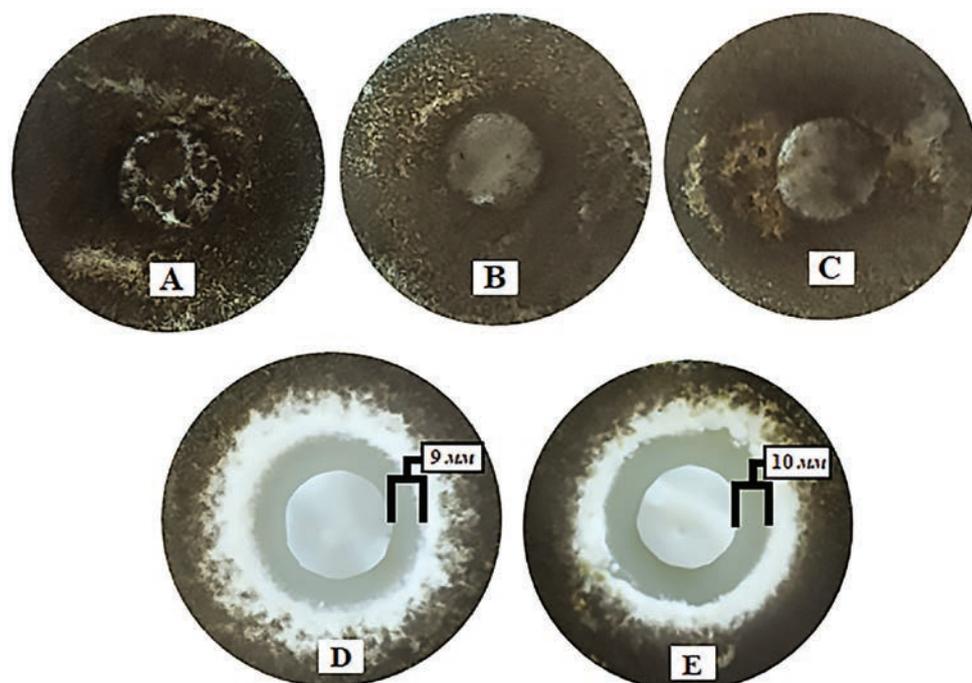
Внешний вид пленок инокулированных с *A.niger* через 2 суток



Примечание: А – контрольный образец без антимикробной добавки; В- образец с концентрацией гвоздичного масла 0,5 %; С – образец с концентрацией гвоздичного масла 1 %; D – образец с концентрацией гвоздичного масла 3 %; E – образец с концентрацией гвоздичного масла 5 %

Рисунок 5

Внешний вид пленок инокулированных с *A.niger* через 5 суток



Примечание: А – контрольный образец без антимикробной добавки; В – образец с концентрацией гвоздичного масла 0,5 %; С – образец с концентрацией гвоздичного масла 1 %; D – образец с концентрацией гвоздичного масла 3 %; E – образец с концентрацией гвоздичного масла 5 %

Рисунок 6

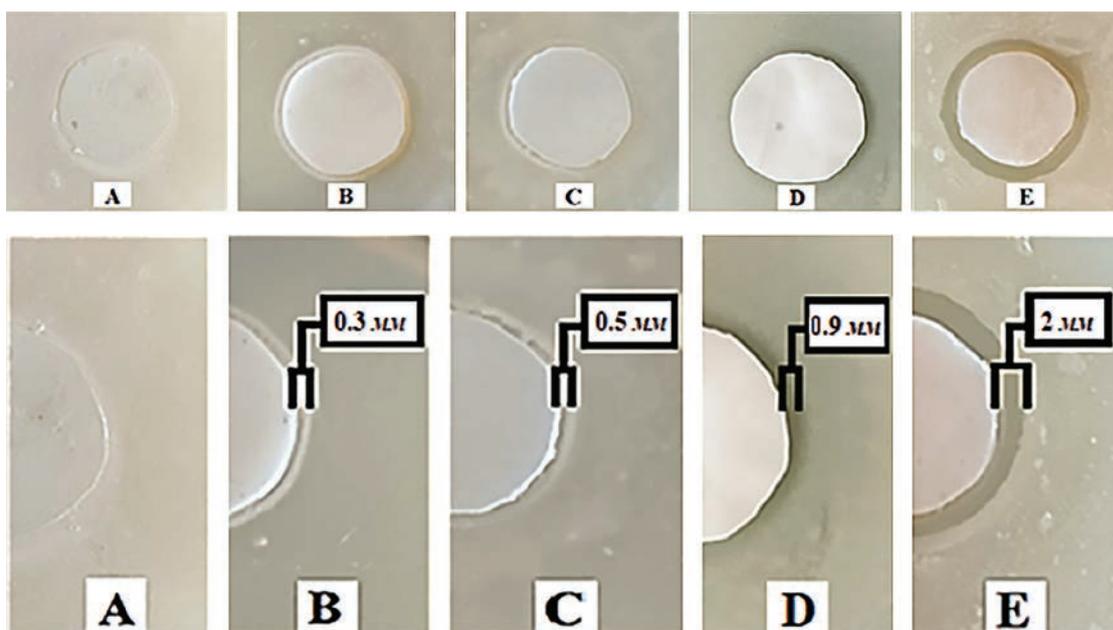
Внешний вид пленок инокулированных с *A.niger* через 8 суток



Примечание: А – контрольный образец без антимикробной добавки; В – образец с концентрацией гвоздичного масла 0,5 %; С – образец с концентрацией гвоздичного масла 1 %; D – образец с E – образец с концентрацией гвоздичного масла 5 %

Рисунок 7

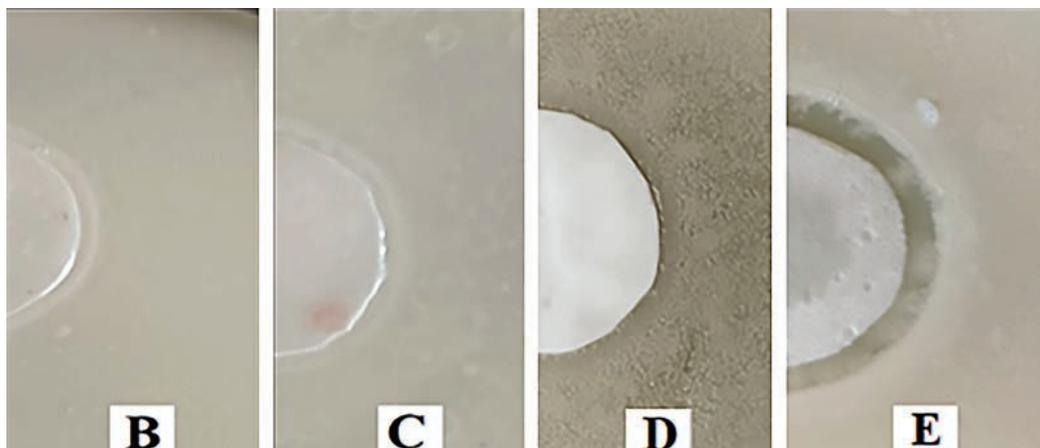
Внешний вид пленок инокулированных с *Bacillus subtilis* через 2 суток



Примечание: А – контрольный образец без антимикробной добавки; В – образец с концентрацией гвоздичного масла 0,5%; С – образец с концентрацией гвоздичного масла 1%; D – образец с E – образец с концентрацией гвоздичного масла 5 %

Рисунок 8

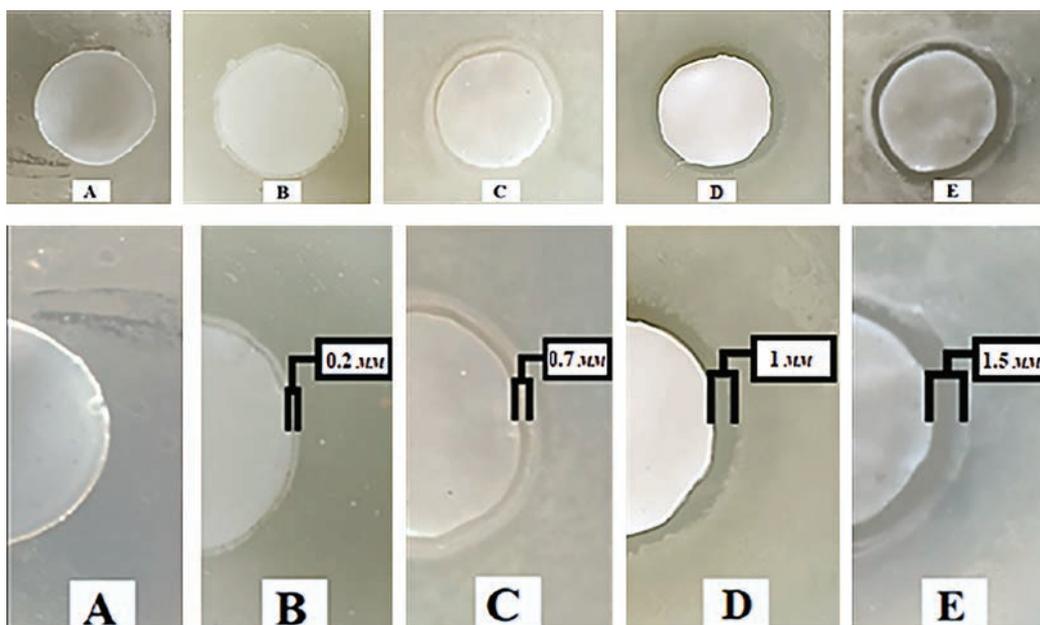
Внешний вид пленок инокулированных с *Bacillus subtilis* через 5 суток



Примечание: В – образец с концентрацией гвоздичного масла 0,5 %; С – образец с концентрацией гвоздичного масла 1 %; D – образец с E – образец с концентрацией гвоздичного масла 5 %

Рисунок 9

Внешний вид пленок инокулированных с *Escherichia coli* через 2 суток



Примечание: А – контрольный образец без антимикробной добавки; В – образец с концентрацией гвоздичного масла 0,5 %; С – образец с концентрацией гвоздичного масла 1 %; D – образец с E – образец с концентрацией гвоздичного масла 5 %

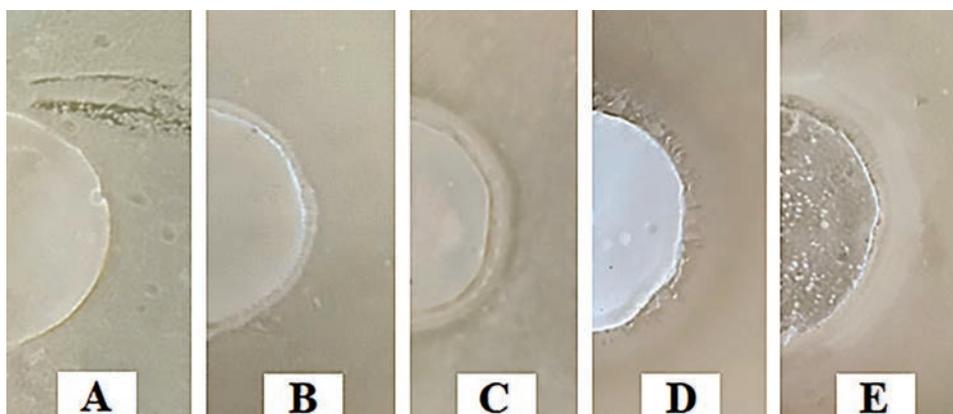
На фото, представленных на Рисунке 9 зона ингибирования культуры *Escherichia coli* увеличивается от 0,2 мм до 1,5 мм с повышением концентрации антимикробной добавки в образцах от 0,5 % до 5 % соответственно, что свидетельствует о чувствительности данной культуры к воздействию гвоздичного масла через 2 суток.

Из представленного на Рисунке 11 фото видно, что культура *Escherichia coli* развивалась на исследуемом материале, подавления культуры через 5 суток нет.

Далее провели эксперимент по определению способности пленок с эфирным маслом снижать ко-

Рисунок 10

Внешний вид пленок инокулированных с *Escherichia coli* через 5 суток

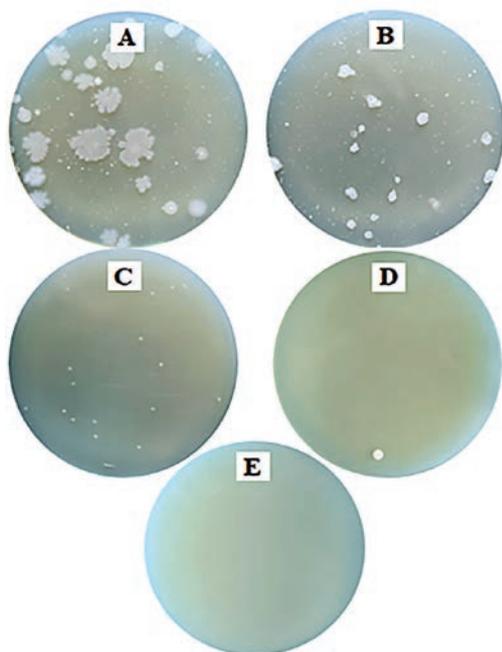


Примечание: А – контрольный образец без антимикробной добавки; В – образец с концентрацией гвоздичного масла 0,5%; С – образец с концентрацией гвоздичного масла 1%; D – образец с концентрацией гвоздичного масла 3%; E – образец с концентрацией гвоздичного масла 5%

личество микроорганизмов (КМАФАнМ) растущих на поверхности колбасных изделий с течением времени, результаты представлены на Рисунке 11.

Рисунок 11

Внешний вид колоний микроорганизмов (КМАФАнМ) в Чашках Петри после 7 суток инкубации смывов



Примечание: А – колбасное изделие без упаковки; В – колбасное изделие с упаковкой без эфирного масла; С – колбасное изделие в упаковке с эфирным маслом с концентрацией 0,5%; D – колбасное изделие в упаковке с эфирным маслом с концентрацией 1%; E – колбасное изделие в упаковке с эфирным маслом с концентрацией 3%

Из представленного на Рисунке 11 фото видно, что наибольшее количество КМАФАнМ наблюдается при хранении колбасного изделия без упаковки, при хранении продукта в упаковке без эфирного масла количество КМАФАнМ снизилось, при введении в материал эфирного масла 0.5% и 1% количество КМАФАнМ резко снизилось, при хранении колбасного изделия в упаковке с концентрацией эфирного масла 3% КМАФАнМ подавляются в срок до 7 суток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Плёнка на основе крахмала с добавлением эфирного гвоздичного масла

При визуальной оценке полученных пленок установлено, что пленки являются однородными, гладкими, средняя толщина составляет 1 мм. С увеличением концентрации эфирного масла материал становился более шершавым и пористым с желтоватым оттенком по сравнению с контрольным образцом. Материал с добавкой эфирного масла гвоздики имеет слабый запах.

Антигрибковая активность

В ходе исследования были изучены штаммы патогенных грибов *Aspergillus niger* и *Candida albicans*, их развитие на средах, содержащие материалы

с эфирным маслом. Исследование антигрибковой активности показало, что повышение эффективности гвоздичного масла наблюдалось при увеличении его концентрации в упаковочном материале.

В отношении *Candida albicans*: Введение масла в материал с концентрациями 0,5% и 1% не дало значимых результатов, культура продолжала развиваться. Однако с увеличением концентрации до 3% и 5% антимикробной добавки привело к ингибированию роста культуры *Candida albicans*, зона ингибирования составила 2 мм и 4 мм соответственно уже через 2 суток. На 5-е сутки подавление культуры не обнаруживается.

В отношении *Aspergillus niger* материал, содержащий гвоздичное масло, проявил наиболее высокую фунгицидную активность. При концентрации эфирного масла 3% и 5% зона ингибирования составила 11 мм через 2 суток, 9 мм и 10 мм через 5 суток и через 8 суток культура подавлялась антимикробной добавкой.

Материалы, содержащие гвоздичное масло в отношении *Aspergillus niger*, показали лучшие антигрибковые свойства, чем в отношении *Candida albicans*.

Антимикробная активность

Антимикробная активность эфирного масла слабее, чем антигрибковая активность по отношению к *Aspergillus niger*. Однако, гвоздичное масло при введении в материал проявило ингибирующее действие на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Различные виды бактерий показали почти одинаковые результаты. Грамотрицательные микроорганизмы *Escherichia coli* показали, что с увеличением концентрации эфирного масла зона ингибирования возрастает: 0,5% — 0,2 мм, 1% — 0,7 мм; 3%-1 мм; 5% — 1,5 мм через 2 суток. На пятые сутки зона ингибирования составила 0 мм.

Грамположительные организмы *Bacillus subtilis* с увеличением концентрации эфирного масла в материале подавляются. При концентрации эфирного масла 0,5%-0,3мм, 1%-0,5мм; 3%-0,9мм; 5%-2мм через 2 дня. На пятые сутки по отношению к культуре *Bacillus subtilis* очевиден неболь-

шой эффект ингибирования у материала с концентрацией эфирного масла 5%. Ранее проведенные эксперименты, направленные на изучение антимикробных характеристик гвоздичного масла в качестве компонента пищевой пленки, также продемонстрировали положительные результаты. Проводились аналогичные исследования материалов на основе полимолочной кислоты, поликапролактона, бутиленадипат-котерефталата, полигидроксibuтирата и полиэтиленгликоля с использованием в качестве антимикробной добавки эфирного масла гвоздики в концентрации 1, 5, 10 и 15% на антимикробную активность по отношению к *E. Coli*, *S. Aureus* (Ванвэй, 2021; Шубхам, 2020; Сильва, 2020). Было установлено, что пленки с эфирным маслом гвоздики проявляют антимикробные свойства в отношении указанных культур. В данной работе были проведены антимикробные исследования по отношению к другим видам микроорганизмов, в том числе на антигрибковую активность.

Таким образом, проведенные нами исследования позволяют расширить спектр использования масляного экстракта гвоздики в качестве антимикробной добавки в упаковочном материале по отношению к *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*. Установлена более высокая эффективность использования масляного экстракта гвоздики в качестве антимикробной добавки в упаковочном материале на основе крахмала против грамположительных бактерий, меньшая эффективность использования наблюдается против грамотрицательных микроорганизмов (Рисунок 9, 11).

Определение способности материала с эфирным маслом подавлять количество микроорганизмов (КМАФАнМ), растущих на поверхности колбасных изделий

В результате проведенного эксперимента было установлено, что с увеличением концентрации эфирного масла в упаковке количество колоний уменьшается. При концентрации 1%, образовалась только одна колония микроорганизмов. При концентрации антимикробной добавки в исследуемом материале 3% колоний не было обнаружено вовсе, что подтверждает наличие антимикробных свойств полученного материала.

ВЫВОДЫ

Исследование доказало, что полученные пленочные материалы на основе крахмала с добавлением гвоздичного масла с различной концентрацией (0,5; 1; 3; 5) % обладают значительной антимикробной активностью против выбранных микроорганизмов. Проведенные эксперименты доказали высокую способность материала, содержащего эфирное масло гвоздики к подавлению грамположительных (*B. subtilis*) и грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*), а также лучшую противогрибковую активность по отношению к плесневым грибам *Aspergillus niger*. При этом он показал более низкую способность к ингибированию *S. albicans*. Наиболее значимую антимикробную активность проявляют образцы на основе крахмала с концентрацией эфирного масла 3 % и 5 %.

В результате нашего исследования было доказано, что эфирное масло гвоздики в упаковочных образцах на основе крахмала может быть эффективно использовано в качестве добавки для создания ак-

тивных упаковочных материалов, способных продлить срок годности пищевых продуктов.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Али Альхаир: проведение исследования, курирование данных, верификация данных.

Екатерина Александровна Щукина: проведение исследования, создание черновика рукописи.

Марина Ивановна Губанова: концептуализация, руководство исследованием.

Ирина Анатольевна Кириш: разработка методологии исследования.

Александра Максимовна Ермилова: проведение исследования.

Изабелла Сергеевна Тверитникова: написание-рецензирование и редактирование рукописи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Пономарева, Е. И., Молохова, Е. И., & Холов, А. К. (2015). Применение эфирных масел в фармации. *Современные проблемы науки и образования*, 4, 567.
- Ponomareva, E. I., Molokhova, E. I., & Kholov, A. K. (2015). The use of essential oils in pharmacy. *Modern Problems of Science and Education*, 4, 567. (In Russ.)
- Ashrafudoulla, Md., Mizan, Md. F. R., Park, Si H., & Ha, SD. (2020). Current and future perspectives for controlling *Vibrio* biofilms in the seafood industry: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(2), 456–794. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1767031>
- Atar´es, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51–62.
- Basch, E, Gasparyan, A, Giese, N, Hashmi, S, Miranda, M, Sollars, D, Seamon, E, Tanguay-Colucci, S, Ulbricht, C, Varghese, M, Vora, M, & Weissner, W. (2008). Clove (*Eugenia aromatica*) and clove oil (eugenol). *Journal Diet Suppl*, 5, 117–146. <https://doi.org/10.1080/19390210802335391>
- Batiha, G. E., Alkazmi, L. M., Wasef, L. G., Beshbishy, A. M., Nadwa, E. H., & Rashwan, E. K. (2020). *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. *Biomolecules*, 10, 202. <https://doi.org/10.3390/biom10020202>
- El-Baky, R. M. A., & Shawky, Z. (2016). Eugenol and linalool: Comparison of their antibacterial and antifungal activities. *African Journal of Microbiology Research*, 10(44), 1860–1872. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8283>
- Fangjun, L., & Zhijia, Y. (2018). Tumor suppressive roles of eugenol in human lung cancer cells. *Thorac. Cancer*, 9, 25–29. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12508>
- Gökalp, F. (2016). A study on the chemical properties of eugenol and eugenol acetate, clove essential oils. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 34 (3), 407–414.
- Jeyakumar, G. E., & Lawrence, R. (2021). Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against *Escherichia coli*. *Journal of Herbal Medicine*, 26, 100406. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100406>
- Kamatou, G. P., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2012). Eugenol – from the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17(6), 6953–6981. <https://doi.org/10.3390/molecules17066953>
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A. J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., & Parker, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Journal Food Microbiol*, 107, 180–185. <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>
- Nejad, S. M., Özgüneş, H., & Başaran, N. (2017). Pharmacological and toxicological properties of Eugenol. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 201–206. <https://doi.org/10.4274/tjps.62207>

- Nuñez, L., & Aquino, M. D'. (2012). Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 43 (4), 1255–1260. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400003>
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033>
- Pires, C., Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Nunes, M. L., & Marques, A. (2013). Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.019>
- Raja, M. R. C., Srinivasan, V., Selvaraj, S., & Mahapatra S. K. (2015). Versatile and synergistic potential of Eugenol: A review. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 6 (5), 1000367. <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000367>
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., & Ha SD. (2015). Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14 (4), 491–509. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12144>
- Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry*, 343, 128403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128403>
- Shubham, S., Sandra, B., Brendan, D., Amit K. J., & Swarna, J. (2020). Characterization and antimicrobial activity of biodegradable active packaging enriched with clove and thyme essential oil for food packaging application. *Foods*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.3390/foods9081117>
- Sienkiewicz, M., Denys, P., & Kowalczyk, E. (2011). Antibacterial and immunostimulatory effect of essential oils. *International Review of Allergology and Clinical Immunology*, 17(1), 40–44.
- Silva, I. D. L., Andrade, M. F., Caetano, V. F., Hallwass, F., Brito, A. M. S. S., & Vinhas, G. M. (2020). Development of active PHB/PEG antimicrobial films incorporating clove essential oil. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 30(2), e2020021. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.09319>
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199–1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
- Ulanowska, M., & Olas, B. (2021). Biological properties and prospects for the application of Eugenol — A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3671. <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>
- Walsh, S. E., Maillard, J.-Y., Russell, A. D., Catrenich, C. E., Charbonneau, D. L., & Bartola, R. G. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 240–247. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01825.x>
- Wangwei, L., Rui, C., Bifen, Z., Yuyue, Q., Guiguang, C., Lin, L., & Minglong, Y. (2021). Influence of clove essential oil immobilized in mesoporous silica nanoparticles on the functional properties of poly (lactic acid) biocomposite food packaging film. *Journal of Materials Research and Technology*, 11, 1152–1161. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.01.098>
- Wen, L., Liang, Yu., Lin, Z., Xie, D., Zheng, Z., Xu, C., & Lin, B. (2021). Design of multifunctional food packaging films based on carboxymethyl chitosan/polyvinyl alcohol crosslinked network by using citric acid as crosslinker. *Polymer*, 230, 124048. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124048>