

**С. Л. Тихонов**

*Уральский государственный аграрный университет,  
Уральский государственный лесотехнический университет  
(г. Екатеринбург, Российская Федерация)*

**Н. В. Тихонова**

*Уральский государственный аграрный университет  
(г. Екатеринбург, Российская Федерация)*

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО  
РЕГЛАМЕНТА ЛАБОРАТОРНОГО ПОЛУЧЕНИЯ  
СИНТЕЗИРОВАННЫХ БИОПЕПТИДОВ**

***Аннотация.** Для обогащения пищевой продукции биопептидами целесообразно использовать синтезированные пептиды т.к. их можно получить в больших объемах и стабильного качества. В связи с этим, возникает необходимость создание проекта технологического регламента получения синтезированных биопептидов. Цель исследований — разработка технологического регламента лабораторного получения синтезированных биопептидов замедленного высвобождения. При разработке технологического регламента получения синтезированных пептидов руководствовались Федеральным законом от 27.12.2002 № 184-ФЗ. Разработан технологический регламент лабораторного получения синтезированных биопептидов замедленного высвобождения, который включает следующие разделы: требования к готовому биопептиду, компоненты и оборудование для синтеза, микрокапсулирования и оценки биологической эффективности биопептидов, описание процесса синтеза биопептида, оценка степени чистоты биопептида, методы подтверждения безопасности (оценка цитотоксичности и токсичности) биопептида.*

***Ключевые слова:** пептиды, технический регламент, синтез, подтверждение безопасности*

## DEVELOPMENT OF TECHNOLOGICAL REGULATIONS FOR THE LABORATORY PRODUCTION OF SYNTHESIZED BIOPEPTIDES

***Annotation.** To enrich food products with biopeptides, it is advisable to use synthesized peptides because they can be obtained in large quantities and of stable quality. In this regard, there is a need to create a draft technological regulation for the production of synthesized biopeptides. The purpose of the research is to develop technological regulations for the laboratory production of synthesized slow-release biopeptides. When developing the technological regulations for the production of synthesized peptides, they were guided by Federal Law No. 184-FZ of December 27, 2002. The technological regulations for the laboratory production of synthesized slow-release biopeptides have been developed, which includes the following sections: requirements for the finished biopeptide, components and equipment for synthesis, microcapsulation and evaluation of the biological effectiveness of biopeptides, description of the biopeptide synthesis process, assessment of the degree of purity of the biopeptide, methods for confirming the safety (assessment of cytotoxicity and toxicity) of the biopeptide.*

***Keywords:** peptides, technical regulations, synthesis, safety confirmation*

### Для цитирования:

**Тихонов, С. Л.** Разработка технологического регламента лабораторного получения синтезированных биопептидов / С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Вестник биотехнологии. 2024. № 2.

**Введение.** Создание высокоэффективных технологий глубокой переработки продовольственного сырья предполагает разработку продуктов для специализированного и персонализированного питания в качестве функциональных ингредиентов, которыми могут выступать биологически активные вещества, в том числе биопептиды [1].

Вопросами разработки пищевых продуктов, обогащенных БАВ посвящены исследования авторов [2, 3].

Известно, что пептиды можно получить из различного сырья растительного и животного происхождения, содержащего белок. Но при этом важно определить наилучший природный источник, позволяющий выделить пептид с необходимыми функциональными, профилактическими и лечебными свойствами. Для целенаправленного получения пептида следует учитывать метод пептидотерапии, основанный на использовании клеточных, тканевых и органных пептидов животного происхождения. Применение данного метода обосновывается тем, что существует определенная адресность биомолекул или так называемая «терапевтическая точность-таргетность», которая определяется влиянием молекулы пептида на конкретный орган и его функцию, при этом эффективность пептида не зависит от путей введения (пероральный, внутримышечный, внутривенный) в организм. Такой эффект называют эффектом гомологичности. Механизм высокой тропности пептида заключается в том, что субстанция, выделенная из конкретного органа, попадает в гомологичный орган или ткань, происходит куммуляция введенного биорегулятора в этом органе. Этот эффект доказан путем использования радиоактивных изотопов. Следовательно, пептиды проявляют свои фармакологические свойства в тех клетках, органах и тканях, из которых они выделены, т. е. существует принцип тропности или органно-тканевое подобие — *Similis similibi gaudet*: «подобное направляется к подобному». За открытие и описание механизма тропности американский ученый Г. Блобель получил Нобелевскую премию по медицине в 1999 году.

Эффект тропности позволяет под действием пептидов усиливать процессы регенерации и восстанавливать функции гомологичных органов, по-другому, пептиды сердца — лечат сердце.

Для получения биопептидов необходимо провести протеолиз белка — получить гидролизат с естественным пептидом, сохранив аминокислотную последовательность (NPN), то есть комбинацию прогнозируемых и первоначально подтвержденных аминокислотных последовательностей [4].

Источником биологически активных пептидов с антиоксидантными, противомикробными, иммуномодулирующими свойствами, антигипертензивной активностью являются семена нута [5].

В нескольких исследованиях [6] из пепсинового и трипсинового гидролизата соевого белка получены пептиды с антиоксидантными свойствами. Установлено, что наибольшую антиоксидантную активность имели пептиды со средней молекулярной массой.

Но для обогащения пищевой продукции биопептидами целесообразно использовать синтезированные пептиды т.к. их можно получить в больших объемах и стабильного качества. В связи с этим, возникает необходимость создание проекта технологического регламента получения синтезированных биопептидов.

Цель исследований — разработка технологического регламента лабораторного получения синтезированных биопептидов замедленного высвобождения.

**Материалы и методы исследования.** При разработке технологического регламента получения синтезированных пептидов руководствовались Федеральным законом от 27.12.2002 N 184-ФЗ (ред. от 02.07.2021) «О техническом регулировании» (с изм. и доп., вступ. в силу с 23.12.2021) Статья 7. Содержание и применение технических регламентов.

**Результаты и обсуждение.** Разработан технологический регламент лабораторного получения синтезированных биопептидов замедленного высвобождения, который включает следующие разделы:

- требования к готовому биопептиду;
- компоненты и оборудование для синтеза, микрокапсулирования и оценки биологической эффективности биопептидов;
- описание процесса синтеза биопептида;
- описание процесса отщепления биопептида от смолы;
- описание процесса очистки биопептида;
- оценка степени чистоты биопептида;
- микрокапсулирование биопептида;
- методы подтверждения безопасности (оценка цитотоксичности и токсичности) биопептида;
- рекомендуемые методы подтверждения специальных свойств.

Требования к готовому биопептиду. В таблице 1 представлены требования к готовому биопептиду.

**Таблица 1** — Требования к готовому биопептиду

Наименование показателя	Норма
Внешний вид	белый кристаллический или мелкодисперсный порошок
Количество аминокислот	от 2 до 100
Аминокислотная последовательность	не более 100 аминокислот в пептидной цепи
Молекулярная масса	не нормируется
Чистота, %	не менее 9
Толщина защитного покрытия из мальтодекстрина, мкм	не менее 12
Степень слеживаемости, %	не более 5
Содержание влаги, %	не более 4

Разработанный технический регламент наряду с синтезом предполагает модификацию пептидов, направления которой представлены в таблице 2.

**Таблица 2** — Направления модификации пептидов

Биотинилирование	С-концевые модификации	Циклические биопептиды
Конъюгация жирных кислот	Флуоресцентные биопептиды	Гликопептиды
KLH, BSA, OVA конъюгация	Линкеры / спейсеры	Длинные биопептиды
Хелаты металлов	Метиляция	Множественные антигенные биопептиды
N-метиламиновая кислота	N-концевые модификации	ПЭГилирование (полиэтиленгликоль)
Фосфорилиция	Прелинирование	Гашенные флуоресцентные биопептиды (FRET-пептиды)
Пептиды, маркированные стабильными изотопами	Сульфация	Необычные и неприродные аминокислоты

Синтез пептидов включает создание циклических пептидов с циклизацией амидной связи, модификацию пептидов с С-концом (табл., модификацию пептидов с N-концом, синтез пептидов с флуоресцентной меткой, синтез пептидов с образованием хелатов металлов.

Неочищенные биопептиды очищают методом ВЭЖХ.

Микрокапсулирование пептида необходимо проводить в 10%-м растворе мальтодекстрина в псевдокипящем слое при следующих технологических режимах: скорость витания частиц  $0,35 \times 10^{-3}$  м / с, время микрокапсулирования не менее 5 минут до содержания влаги не более 5 %, температура микрокапсулирования от 18 до 24 °С. Принципиальная схема инкапсуляции биопептидов представлена на рисунке 1.



*Рис. 2 Принципиальная схема инкапсуляции биопептидов*

*Подтверждение безопасности (оценка цитотоксичности и токсичности).* Общую цитотоксичность пептидов определяют методом NeutralRedStaining на культурах клеток НЕК293 или других, которые можно культивировать на среде DMEM.

Цитотоксичность определяют по формуле (8.1):

$$ЦТ = \frac{OD \text{ отрицательный контроль} - OD \text{ исследуемый образец}}{OD \text{ отрицательный контроль}} \times 100 \%, \quad (1)$$

где:

ЦТ — цитотоксичность;

OD исследуемый образец — оптическая плотность исследуемого образца при 518 нм;

OD отрицательный контроль — оптическая плотность необработанных клеток.

*Оценка биологической активности пептидов.* Оценку биологической активности пептидов необходимо проводить общепринятыми методами исследований, представленными в таблице 3.

**Таблица 3** — Оценка биологической активности пептидов

Биологическая активность пептида	Метод определения
Антимикробная	Диско-диффузионный
Антиоксидантная	DPPH, ABTS и FRAP
Противоопухолевая и противовирусная (жизнеспособность опухолевых клеток)	Микротетразолиевый тест (МТТ-тест); определение жизнеспособности на приборе ClarioStar (BMGLabtech, Россия)

**Выводы.** В результате исследований разработан технологический регламент лабораторного получения синтезированных биопептидов замедленного высвобождения. Полученный регламент включает требования к готовому

биопептиду, оборудование используемое для синтеза, оборудование для микрокапсулирования, исследуемые показатели биологической активности, способы исследования безопасности.

### Список литературы

1. *Галстян, А. Г.* Современные подходы к хранению и эффективной переработке сельскохозяйственной продукции для получения высококачественных пищевых продуктов / А. Г. Галстян, Л. М. Аксенова, А. Б. Лисицын [и др.] // Вестник Российской академии наук. — 2019. — Т. 89, № 5. — С. 539–542. — DOI: 10.31857/S0869-5873895539-542.

2. Мясной паштет для геродиетического питания при активном образе жизни / Е. А. Мифтахутдинова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова [и др.] // Ползуновский вестник. — 2020. — № 2. — С. 70–74. — DOI 10.25712/ASTU.2072-8921.2020.02.013. — EDN SJTHKM.

3. *Miftahutdinova, E. A.* Development of lithium-containing feed additive and its use for fortification of chicken broilers meat and by-products / E. A. Miftahutdinova, S. L. Tikhonov, N. V. Tikhonova // Theory and Practice of Meat Processing. — 2020. — Vol. 5, No. 1. — P. 27–31. — DOI 10.21323/2414-438X-2020-5-1-27-31. — EDN FEPQTN.

4. *Duffuler, P.* Bioactive Peptides: From Basic Research to Clinical Trials and Commercialization / P. Duffuler, K. S. Bhullar, S. C. de Campos Zani, J. Wu. — DOI: 10.1021/acs.jafc.1c06289 // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2022. — Vol. 70 (1). — P. 3585–3595.

5. *Ахангаран, М.* Биоактивные пептиды и антипитательные вещества нута: характеристика и свойства (обзор) / М. Ахангаран, Д. А. Афанасьев, И. М. Чернуха [и др.] // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. — 2022. — Т. 183, № 1. — С. 214–223. — DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-214-223.

6. *Жамсаранова, С. Д.* Ферментативная конверсия пищевого белка и оценка антиоксидантной активности пептидов / С. Д. Жамсаранова, С. Н. Лебедева, Б. А. Болхонов, Д. В. Соколов // Вестник ВСГУТУ. — 2021. — № 4 (83). — С. 5–14. — DOI: 10.53980/24131997\_2021\_4\_5.



**Тихонов Сергей Леонидович**, доктор технических наук, проф., профессор кафедры пищевой инженерии аграрного производства, Уральский государственный аграрный университет; профессор кафедры химической технологии древесины, биотехнологии и наноматериалов, Уральский государственный лесотехнический университет. 620075, Российская Федерация, г. Екатеринбург, ул. Карла Либкнехта, 42. E-mail: tihonov75@bk.ru ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

**Тихонова Наталья Валерьевна**, доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой пищевой инженерии аграрного производства, Уральский государственный аграрный университет, г. Екатеринбург. E-mail: kaf.zooring@urgau.ru.

## References

1. *Galstyan, A. G.* Modern approaches to the storage and efficient processing of agricultural products to obtain high-quality food products / A. G. Galstyan, L. M. Aksenova, A. B. Lisitsyn [et al.] // Bulletin of the Russian Academy of Sciences. — 2019. — Vol. 89, No. 5. — pp. 539–542. — DOI: 10.31857/S0869-5873895539-542.
2. Meat paste for herodietic nutrition with an active lifestyle / E. A. Miftakhutdinova, S. L. Tikhonov, N. V. Tikhonova [et al.] // Polzunovsky bulletin. — 2020. — No. 2. — pp. 70–74. — DOI 10.25712/ASTU.2072-8921.2020.02.013. — EDN SJTHKM.
3. *Miftahutdinova, E. A.* Development of lithium-containing feed additive and its use for fortification of chicken broilers meat and by-products / E. A. Miftahutdinova, S. L. Tikhonov, N. V. Tikhonova // Theory and Practice of Meat Processing. — 2020. — Vol. 5, No. 1. — P. 27–31. — DOI 10.21323/2414-438X-2020-5-1-27-31. — EDN FEPQTN.
4. *Duffuler, P.* Bioactive Peptides: From Basic Research to Clinical Trials and Commercialization / P. Duffuler, K. S. Bhullar, S. C. de Campos Zani, J. Wu. — DOI: 10.1021/acs.jafc.1c06289 // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2022. — Vol. 70 (1).— P. 3585–3595.

5. *Akhangaran, M.* Bioactive peptides and anti-nutritional substances of chickpeas: characteristics and properties (review) / M. Akhangaran, D. A. Afanasyev, I. M. Chernukha [et al.] // Proceedings on applied botany, genetics and breeding. — 2022. — Vol. 183, No. 1. — pp. 214–223. — DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-214-223.

6. *Zhamsaranova, S. D.* Enzymatic conversion of dietary protein and assessment of antioxidant activity of peptides / S. D. Zhamsaranova, S. N. Lebedeva, B. A. Bolkhonov, D. V. Sokolov // Bulletin of VSGUT. — 2021. — № 4 (83). — Pp. 5–14. – DOI: 10.53980/24131997\_2021\_4\_5.

**Tikhonov Sergey Leonidovich**, Doctor of Technical Sciences, Professor, Professor of the Department of Food Engineering of Agricultural Production, Ural State Agrarian University; Professor of the Department of Chemical Technology of Wood, Biotechnology and Nanomaterials, Ural State Forest Engineering University. 42 Karl Liebknecht str., Yekaterinburg, 620075, Russian Federation. E-mail: [tihonov75@bk.ru](mailto:tihonov75@bk.ru) Orchid: <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

**Tikhonova Natalia Valeryevna**, Doctor of Technical Sciences, Professor, Head of the Department of Food Engineering of Agricultural Production, Ural State Agrarian University, Yekaterinburg. E-mail: [kaf.zooing@urgau.ru](mailto:kaf.zooing@urgau.ru).