

MARTA DZIUBA, DOROTA NAŁĘCZ, BARTŁOMIEJ DZIUBA

ANALIZA *IN SILICO* PEPTYDÓW IMMUNOAKTYWNYCH POCHODZĄCYCH Z BIAŁEK ŻYWNOSCI – BADANIA Z WYKORZYSTANIEM BAZY BIOPEP

Streszczenie

Analizie bioinformatycznej poddano 89 peptydów immunoaktywnych dostępnych w bazie BIOPEP. Obecność fragmentów potencjalnie immunoaktywnych stwierdzono w 90 ze 150 sekwencji analizowanych białek. Sekwencje aminokwasowe badanych peptydów analizowano z uwzględnieniem: długości łańcucha, udziału procentowego poszczególnych aminokwasów, pI, molowego współczynnika ekstynkcji, indeksu hydropatii i ładunku wypadkowego. Ponadto określono możliwości ich uwalniania *in silico* przez enzymy proteolityczne. Na podstawie komputerowej analizy z zastosowaniem programu ProtParam stwierdzono, że immunoaktywne peptydy to głównie fragmenty hydrofilowe, w sekwencji których przeważają takie aminokwasy, jak: Lys, Arg i Pro, obdarzone ładunkiem dodatnim w neutralnym pH. W komputerowej symulacji proteolizy *in silico* wybranych 11 białek żywności o największej częstotliwości występowania peptydów immunoaktywnych (parametr $A > 0,02$) wykazano, że tylko trzy enzymy: chymaza (EC 3.4.21.39), elastaza trzustkowa (EC 3.4.21.36) i endopeptydaza glicylowa (EC 3.4.22.25), spośród dostępnych w bazie BIOPEP, wykazywały specyficzność pozwalającą na uwalnianie peptydów immunoaktywnych w układzie jednego enzymu. Produktami hydrolizy analizowanych białek, przy użyciu wybranych enzymów proteolitycznych, były głównie 2 - 3 aminokwasowe fragmenty peptydowe.

Słowa kluczowe: peptydy immunoaktywne, baza BIOPEP, analiza bioinformatyczna, proteoliza *in silico*

Wprowadzenie

Białka są podstawowymi składnikami żywności zarówno pod względem żywieniowym, jak i funkcjonalnym. Są źródłem energii, ale przede wszystkim – aminokwasów niezbędnych do syntezy białek ustrojowych. Dodatkowo wiele białek wykazuje specyficzną aktywność biologiczną, która może kształtować funkcjonalne czy też prozdrowotne właściwości produktów żywnościowych. Białka te, jak i produkty ich

Dr inż. M. Dziuba, dr inż. D. Nałęcz, Katedra Biochemii Żywności, dr inż. B. Dziuba, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn. Kontakt: dziuba.uwm.edu.pl

hydrolizy – peptydy, mogą również wpływać na właściwości żywności oraz oddziaływać na organizm człowieka. To oddziaływanie związane jest z możliwością wzbogacania endogennego systemu peptydów bioaktywnych [5, 7, 9, 24].

W wyniku prac badawczych poznano i scharakteryzowano peptydy biologicznie aktywne [2, 3, 8]. Podjęto się też opracowania i zastosowania bazy białek i bioaktywnych peptydów BIOPEP [1], którą udostępniono na stronie internetowej [www.uwm.edu.pl/biochemia]. Zawiera ona podstawowe informacje na temat biologicznej aktywności peptydów, masy chemicznej i monoizotopowej, długości łańcucha, wartości EC_{50} i dane bibliograficzne. Komputerowa ocena białka jako prekursora bioaktywnych peptydów przeprowadzana jest na podstawie zaproponowanych kryteriów, a mianowicie: profilu potencjalnej aktywności białka, częstości występowania bioaktywnych fragmentów oraz ich potencjalnej aktywności. W bazie BIOPEP znajduje się 2609 peptydów bioaktywnych, wykazujących czterdzieści cztery rodzaje aktywności, w tym peptydy o aktywności immunomodulacyjnej i immunostymulacyjnej. Peptydy te mogą wzmacniać takie funkcje układu immunologicznego, jak: proliferacja limfocytów, aktywność komórek NK („naturalni zabójcy”), synteza przeciwciał i działanie cytokin. Ponadto peptydy immunoaktywne mogą redukować reakcje alergiczne u osób skłonnych do atopii i wzmacniać jelitową odporność w przewodzie pokarmowym [20]. Jest wiele przykładów wzmacniania lub osłabiania układu odpornościowego przez peptydy pochodzące z białek żywności [13, 14].

Celem przeprowadzonych badań była bioinformatyczna analiza peptydów immunoaktywnych oraz białek żywności, jako prekursorów tych peptydów z wykorzystaniem bazy BIOPEP.

Materiały i metody badań

Bioinformatyczną ocenę białek żywności jako prekursorów peptydów immunoaktywnych oraz ich fizykochemiczną charakterystykę przeprowadzono korzystając z bazy danych białek i bioaktywnych peptydów BIOPEP [1]. Analizowano sekwencje aminokwasowe 89 dostępnych w bazie peptydów immunoaktywnych oraz wybranych 150 białek.

Sekwencje aminokwasowe badanych peptydów analizowano z uwzględnieniem: długości łańcucha, udziału procentowego poszczególnych aminokwasów, pI, molowego współczynnika ekstynkcji, indeksu hydropatii i ładunku wypadkowego. Masa cząsteczkowa peptydów była wyliczana automatycznie po wybraniu sekwencji aminokwasowej w bazie BIOPEP. Ładunek wypadkowy określano na podstawie wartości pK grup jonizujących w łańcuchach bocznych aminokwasów: Lys, Arg, His, Glu i Asp w neutralnym pH. Obliczenia pozostałych parametrów wykonywano z wykorzystaniem programu Protparam [25]. Obliczenia wszystkich parametrów w odniesieniu do

sekwencji zawierających mniej niż 5 reszt aminokwasowych wykonywano samodzielnie, wykorzystując zdefiniowane algorytmy [12].

W bazie BIOPEP znajduje się panel „Analysis”, w którym automatycznie, po wybraniu sekwencji białka, wyznaczany jest profil jego potencjalnej biologicznej aktywności (zakładka „Profiles of proteins biological activity”) oraz obliczana jest częstość występowania motywów o określonej aktywności w łańcuchu polipeptydowym białka (zakładka „A, B, Y Calculation”). Profil potencjalnej aktywności biologicznej białka określa rodzaj, ilość i położenie występujących w białku fragmentów aktywnych. Częstość występowania fragmentów o określonej aktywności biologicznej w łańcuchu białkowym (parametr A) opisana jest równaniem:

$$A = a/N,$$

gdzie: a – liczba fragmentów o danej aktywności w łańcuchu białka, N – liczba reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym.

Białka żywności o najwyższej wartości parametru A (częstości występowania peptydów immunoaktywnych) poddano proteolizie *in silico* w bazie BIOPEP [1]. W celu określenia możliwości uwalniania peptydów immunoaktywnych z białek prekursorowych zastosowano aplikację „Enzyme(s) action”. Pozwala ona na hydrolizę białek jednym lub maksymalnie trzema dowolnie wybranymi enzymami proteolitycznymi spośród 28 dostępnych w bazie. W pracy wykorzystano 2 opcje hydrolizy białek: jednym i dwoma enzymami.

Wyniki i dyskusja

Analizie bioinformatycznej poddano 89 peptydów immunoaktywnych dostępnych w bazie BIOPEP. Wśród peptydów immunoaktywnych przeważały fragmenty zawierające w łańcuchu od czterech do sześciu reszt aminokwasowych (51 peptydów).

Wyniki komputerowej analizy składu aminokwasowego i właściwości fizykochemicznych peptydów immunoaktywnych zestawiono w tab. 1. i 2. Ponad 56 % wszystkich peptydów zawierało aminokwasy: Lys, Arg i Pro. W co najmniej dwudziestu peptydach występowały reszty: Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Phe, Tre, Tyr i Val. Najbardziej w analizowanych peptydach występowały: Ala, His, Trp i Cys. Udział procentowy aminokwasów w sekwencjach peptydów immunoaktywnych obliczono w odniesieniu do wszystkich badanych peptydów. Otrzymane wyniki wskazują, że pewne aminokwasy występują częściej w łańcuchach i mogą wpływać na immunoaktywność peptydów. W sekwencji biologicznie aktywnych peptydów i w zależności od rodzaju tej aktywności mogą dominować aminokwasy: Val, Leu, Pro, His, Tyr, Glu i Asp [17]. Maksymalne wartości średniego udziału aminokwasów we wszystkich analizowanych peptydach immunoaktywnych uzyskano w przypadku Lys, Arg i Pro, a minimalne – w Cys, Trp i His. Wartości średniego udziału aminokwasów w sekwen-

cjach, w których dany aminokwas był obecny, wskazują, że oprócz tych trzech dominujących aminokwasów pewne znaczenie może mieć obecność: Glu, Gly, Phe czy Tyr. Np. oryzatensyna, znany peptyd wielofunkcyjny wykazujący aktywność immunomodulacyjną powodującą skurcze mięśni gładkich i antagonistyczną do opioidowej, oraz peptydy jej pokrewne o takiej samej aktywności zawierają resztę Arg jako C-końcowy aminokwas, resztę Leu w pozycji trzeciej i resztę hydrofobową (Leu lub Tyr) w pozycji piątej od C-końca [29]. Ponadto w sekwencji oryzatensyny występują reszty Pro. Znaczenie Pro w kształtowaniu biologicznej aktywności omawiano w literaturze

Tabela 1. Zawartość aminokwasów w analizowanych peptydach immunoaktywnych.
Table 1. Content of amino acids in immunoactive peptides analysed.

| Aminokwasy Amino acids | Średnia zawartość aminokwasów Average content of amino acids [%] | | Liczba peptydów zawierających dany aminokwas Number of peptides containing given amino acid | Min. – maks. zawartość reszt aminokwasowych Min - max content of amino acid residues [%] |
|---------------------------|--|-------|--|--|
| | a | b | | |
| Ala | 1,68 | 16,61 | 9 | 3,10 - 33,30 |
| Arg | 11,79 | 20,58 | 51 | 5,30 - 50,00 |
| Asn | 2,31 | 12,08 | 17 | 4,00 - 20,00 |
| Asp | 3,77 | 17,65 | 19 | 4,50 - 40,00 |
| Cys | 0,47 | 13,80 | 3 | 8,00 - 16,70 |
| Gln | 3,05 | 13,58 | 20 | 4,00 - 25,00 |
| Glu | 4,80 | 21,37 | 20 | 5,30 - 66,70 |
| Gly | 5,90 | 18,77 | 28 | 3,60 - 66,70 |
| His | 0,54 | 9,54 | 5 | 3,10 - 16,70 |
| Ile | 4,94 | 15,16 | 29 | 4,00 - 33,30 |
| Leu | 5,92 | 16,33 | 32 | 5,60 - 66,70 |
| Lys | 12,91 | 22,98 | 50 | 3,60 - 50,00 |
| Met | 1,40 | 12,44 | 10 | 4,00 - 33,30 |
| Phe | 4,30 | 18,22 | 21 | 4,30 - 33,33 |
| Pro | 12,18 | 20,46 | 53 | 3,10 - 50,00 |
| Ser | 3,52 | 16,47 | 19 | 4,00 - 40,00 |
| Thr | 6,61 | 17,30 | 34 | 3,60 - 33,30 |
| Trp | 0,47 | 13,80 | 3 | 8,00 - 16,70 |
| Tyr | 6,05 | 18,56 | 29 | 3,10 - 50,00 |
| Val | 6,91 | 17,76 | 35 | 3,10 - 40,00 |

Objaśnienia: Explanatory notes:

a – wszystkie peptydy immunoaktywne / all immunoactive peptides;

b – peptydy zawierające dany aminokwas / peptides that contain given amino acid.

Tabela 2. Fizykochemiczne właściwości peptydów immunoaktywnych.

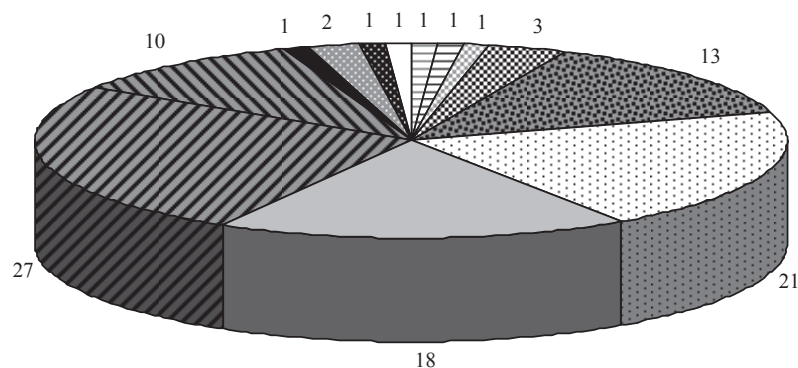
Table 2. Physical-chemical properties of immunoactive peptides.

| Wyróżnik Index | Średnia wartość Mean value | Min. wartość Min value | Maks. wartość Max value |
|---|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Masa cząsteczkowa Molecular mass [Da] | 928,37 | 238,26 | 3669 |
| pI | 8,2 | 3,61 | 12,6 |
| Współczynnik molowej ekstynkcji Molar extinction coefficient | 2261,25 | 1490 | 11000 |
| Indeks niestabilności Instability index | 36,87 | -51,43 | 179,53 |
| Indeks alifatyczności Aliphatic index | 64,31 | 0,00 | 260 |
| Indeks hydropatii Hydrophathy index | -0,92 | -3,97 | 2,68 |
| Ładunek netto Net charge | 1 | -5 | 8 |

przedmiotu [10, 27, 31]. Wyniki analizy składu aminokwasowego peptydów immunomodulacyjnych wskazują, że wiele z nich to fragmenty, w których sekwencje dominuje jeden lub kilka aminokwasów [10, 17].

Konsekwencją składu aminokwasowego są określone właściwości struktury peptydów. W tab. 2. przedstawiono minimalne, średnie i maksymalne wartości wybranych parametrów fizykochemicznych analizowanych peptydów immunoaktywnych. Przykładowo, zakres mas cząsteczkowych peptydów wynosił od 238 do 3669 Da, a średnia masa cząsteczkowa – ok. 930 Da. Wśród peptydów przeważały te o masie 500 ÷ 700 Da (około 50 % wszystkich peptydów). Spośród 89 analizowanych peptydów 38 miało wartość pI < pH 7, a 51 – pI > pH 7. Ta obserwacja łączy się z analizą wypadkowych ładunków peptydów obliczonych w neutralnym pH oraz analizowaną powyżej zawartością poszczególnych aminokwasów: 18 peptydów miało ładunek ujemny, 53 – dodatni, pozostałe peptydy były obojętne (rys. 1). Wiele znanych peptydów obronnych, naturalnie wytwarzanych w układzie immunologicznym, ma cząsteczki obdarzone ładunkiem dodatnim, co wynika z obecności w ich składzie aminokwasów zasadowych [17, 28]. Molowy współczynnik ekstynkcji obliczono tylko fragmentom, w sekwencji których występował co najmniej jeden z aminokwasów absorbujących światło przy długości fali $\lambda = 280$ nm, to znaczy Tyr, Trp i Cys (32 peptydy). Wartość molowego współczynnika ekstynkcji większości peptydów była niska i wynosiła 1490, co jest zbliżone z małą zawartością głównie Trp i Cys. Około 54 % analizowanych peptydów

(48) miało wartość indeksu niestabilności poniżej czterdziestu, co znaczy, że były stabilne [16]. Indeks alifatyczności, dodatnio skorelowany z termostabilnością, jest definiowany jako względna objętość zajmowana przez łańcuchy boczne Ala, Val, Ile i Leu. W przypadku 22 analizowanych fragmentów indeks alifatyczności wynosił zero, co znaczy, że peptydy nie zawierały żadnego z wymienionych aminokwasów. Wartość indeksu alifatyczności w granicach $50 \div 80$ uzyskało około 30 % wszystkich peptydów. Wartość indeksu hydropatii, wskazującego na stopień rozpuszczalności peptydów, była ujemna w przypadku 64 spośród analizowanych peptydów. Świadczy to o ich hydrofilowym charakterze [25].



Ładunek wypadkowy/Net charge: \square -5 \square -4 \square -3 \square -2 \square -1 \square 0 \square 1 \square 2 \square 3 \square 4 \square 5 \square 6 \square 8

Rys. 1. Rozkład ładunku netto peptydów immunoaktywnych [%].

Fig. 1. Immunoactive peptides net charge distribution [%].

Obecność fragmentów potencjalnie immunoaktywnych stwierdzono w 90 ze 150 sekwencji analizowanych białek. Parametr A analizowanych białek przyjmował wartości od 0,0013 do 0,0287. Najbogatszym potencjalnym źródłem peptydów immunoaktywnych (parametr $A > 0,02$) okazały się białka: warianty genetyczne krowiej kazeiny- β , laktoalbumina- α pochodząca z różnych gatunków, mioglobina, flawodoksyna, prolamina ryżu, inhibitor trypsyny i monelina. W łańcuchach polipeptydowych wariantów genetycznych kazeiny- β występowało od 4 do 6 peptydów immunoaktywnych, w laktoalbuminie- α – 3, we flawodoksynie – 2, a w pozostałych białkach po jednym potencjalnie immunoaktywnym fragmencie. Motywy o potencjalnej aktywności immunomodulacyjnej występują w hydrofilowych fragmentach cząsteczek białkowych, o czym świadczy ujemna wartość indeksu hydropatii (średnia wartość indeksu hydropatii fragmentów potencjalnie immunoaktywnych wyniosła -0,92).

Tabela 3. Możliwość uwalniania peptydów immunoaktywnych z białek prekursorowych przez enzymy proteolityczne (BIOPEP).
 Table 3. Possibility of releasing immunoactive peptides from precursor proteins by proteolytic enzymes (BIOPEP).

| ID białka prekursorowego ID of precursor protein | Enzym proteolityczny / Proteolytic enzyme | | | | | | | | | | | |
|---|---|--|--|---|--|--|------------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------|
| | Chymaza Chymase (EC 3.4.21.39) | Elastaza pankreatynowa Pancreatic elastase (EC 3.4.21.36) | Endopeptydaza glicylova Glycyl endopeptidase (3.4.22.25.) | Chymaza / Endopeptydaza glutamylova II Chymase / Glutamyl endopeptidase II (EC 3.4.21.39/EC 3.4.21.82) | Elastaza pankreatynowa/V-8 proteaza Pancreatic elastase / V-8 protease (EC 3.4.21.36/EC 3.4.21.19) | Elastaza pankreatynowa/ Endopeptydaza glutamylova II Pancreatic elastase/ Glutamyl endopeptidase II (EC 3.4.21.36/EC 3.4.21.82) | | | | | | |
| | Liczba Number | Liczba Number | Liczba Number | Liczba Number | Liczba Number | Liczba Number | Liczba Number | Liczba Number | Liczba Number | Liczba Number | Liczba Number | Liczba Number |
| 1077 | - | 1 | 1 | - | 2 | 2 | - | 2 | YG/(18-19) YG/(50-51) | YG/(18-19) YG/(50-51) | 2 | YG/(18-19) YG/(50-51) |
| 1082 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | YG/(50-51) | YG/(50-51) | 1 | YG/(50-51) |
| 1097 | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - | LLY/(191-193) | LLY/(191-193) | - | - |
| 1098 | 1 | - | - | - | - | - | 2 | - | LLY/(191-193) PGPIP/(63-68) | LLY/(191-193) PGPIP/(63-68) | - | - |
| 1102 | 1 | - | - | - | - | - | 2 | - | LLY/(191-193) PGPIP/(63-68) | LLY/(191-193) PGPIP/(63-68) | - | - |
| 1108 | - | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | 1 | YG/(105-106) | YG/(105-106) | 1 | YG/(105-106) |
| 1115 | - | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | 2 | YG/(37-38) | YG/(37-38) | 2 | YG/(37-38) YG/(69-70) |
| 1125 | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| 1232 | - | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | 1 | YG/(70-71) | YG/(70-71) | 1 | YG/(70-71) |

Fragmety białka, odpowiadające sekwencjom bioaktywnych peptydów, wykazują aktywność po ich uwolnieniu ze struktury prekursora. Aby uzyskać odpowiedź na pytanie o możliwość uwalniania peptydów immunoaktywnych, przeprowadzono proteolizę *in silico* wybranych 11 białek żywności o największej częstości występowania peptydów immunoaktywnych (parametr $A > 0,02$). Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 3. Tylko trzy enzymy proteolityczne, spośród 28 zgromadzonych w bazie BIOPEP, wykazywały specyficzność, pozwalającą na uwalnianie peptydów immunoaktywnych w układzie jednego enzymu. Enzymami tymi były: chymaza (EC 3.4.21.39), elastaza trzustkowa (EC 3.4.21.36) i endopeptydaza glicylowa (EC 3.4.22.25). Pozostałe bioaktywne fragmenty otrzymano stosując trzy kombinacje dwóch różnych enzymów proteolitycznych. Produktami hydrolizy analizowanych białek, przy użyciu wybranych enzymów proteolitycznych, były głównie 2-, 3-aminokwasowe fragmenty peptydowe. Wyjątek stanowił heksapeptyd PGPIP_N, uwalniany wraz z peptydem LLY, w wyniku działania następczego chymazy (EC 3.4.21.39) i endopeptydazy glutamylowej II (EC 3.4.21.82) z krowiej kazeiny- β , wariantów genetycznych A2 i E (białka, ID 1098 i 1102). W wyniku hydrolizy krowiej kazeiny- β , wariantu genetycznego A1 (białko, ID 1097), przy zastosowanej kombinacji wymienionych enzymów otrzymano tylko jeden produkt hydrolizy – peptyd LLY. Peptyd LLY był uwalniany również pod wpływem samoistnego działania chymazy (EC 3.4.21.39) i był jedynym produktem hydrolizy krowiej kazeiny- β (wszystkich trzech analizowanych wariantów genetycznych). Świadczy to o niewielkich różnicach w uwalnianiu produktów proteolizy w warunkach *in silico*, w zależności od wariantu genetycznego danego białka. Wskazuje jednak na możliwość uwalniania nowych, innych produktów hydrolizy. Niewielkie różnice ilościowe w produktach komputerowej symulacji proteolizy stwierdzono w zależności od gatunku na przykładzie laktoalbuminy- α . W przypadku krowiej i ludzkiej laktoalbuminy- α (białka, ID 1077 i 1115) w kombinacji 2 enzymów proteolitycznych: elastazy trzustkowej (EC 3.4.21.36) i proteazy V8 (EC 3.4.21.19) były uwolnione 2 immunoaktywne fragmenty peptydowe YG, natomiast z owczej laktoalbuminy- α (białko, ID 1082) tylko jeden peptyd YG (tab. 3). W układzie działania jednego enzymu, z łańcuchów krowiej i ludzkiej laktoalbuminy- α , enzymy: elastaza trzustkowa (EC 3.4.21.36) i endopeptydaza glicylowa (EC 3.4.22.25) uwolniły po 1 fragmencie peptydowym YG. Z owczej laktoalbuminy- α nie został zaś uwolniony żaden peptyd immunoaktywny. Ponadto w tab. 3. przedstawiono wyniki proteolizy *in silico* mioglobiny (ID 1125) oraz inhibitora trypsyny (ID 1232). Nie uwolniono żadnego dłuższego, znanego fragmentu immunoaktywnego. W literaturze szeroko omówiono pozyskiwanie peptydów w procesie enzymatycznej hydrolizy [4, 13, 26, 30]. Przykładem są immuno-peptydy otrzymane z kazeiny- α_{s1} , - β i - κ oraz laktoalbuminy- α , które mogą zarówno tłumić, jak i wzmacniać odpowiedź immunologiczną. Otrzymywany w wyniku enzymatycznej hydrolizy krowiej kazeiny- β peptyd

B-kazomorfiną wzmacnia proliferację limfocytów i komórek NK [23]. Kazocydyna i isracydyna, peptydy otrzymywane z kazeiny- α_{s1} , stymulują fagocytozę i odpowiedź immunologiczną wywołaną infekcją bakteryjną [22]. Peptydy powstałe w wyniku hydrolizy kazeiny- κ przez trypsynę inhibują agregację płytek krwi i wiązanie fibrynogenu z płytkami krwi [11].

Hydroliza białek żywności *in silico* (baza BIOPEP) przeprowadzana jest wyłącznie na podstawie rozpoznania w strukturze pierwszorzędowej określonej reszty/określonych reszt aminokwasowych w łańcuchu substratu, zgodnie ze zdefiniowaną specyficznością danego enzymu. Program nie uwzględnia takich czynników, jak wpływ warunków fizykochemicznych (temperatura, pH) środowiska czy struktury wtórnej białek, które znacząco mogą wpływać na efektywność proteolizy [6].

Analizując możliwość uwalniania bioaktywnych peptydów z białek prekursorowych przez enzymy proteolityczne, należy podkreślić, że specyficzne oddziaływanie fizjologiczne nie musi przejawiać się po doustnym podaniu peptydu lub w wyniku jego uwolnienia przez enzymy przewodu pokarmowego. Peptydy o właściwościach fizjologicznych, takich jak opioidowe czy immunostymulacyjne, na przykład pochodzące z białek mleka, ulegają najprawdopodobniej dalszej hydrolizie w organizmie [15].

Wnioski

1. Baza białek i peptydów bioaktywnych BIOPEP jest przydatnym narzędziem analizy immunoaktywnych peptydów pochodzących z białek prekursorowych w modelowych badaniach *in silico*. Pozwala ona w szybki i prosty sposób znaleźć sekwencje białka najbogatsze w elementy immunoaktywne.
2. Wyniki analizy z zastosowaniem programu ProtParam wskazują, że immunoaktywne peptydy to głównie fragmenty hydrofilowe, w sekwencji których przeważają takie aminokwasy, jak: Lys, Arg i Pro, obdarzone ładunkiem dodatnim w neutralnym pH.
3. Badania *in silico* mogą mieć znaczenie w poszukiwaniu źródeł i otrzymywaniu peptydów immunoaktywnych, a tym samym w opracowywaniu diet pacjentów, produkcji żywności funkcjonalnej i nutraceutyków.

Praca badawcza finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekt nr NN312484240 oraz Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, projekty nr: 528-0713-0819 i 528-0712-809

Literatura

- [1] BIOPEP. [online]. Dostęp w Internecie: [01.2009, 12.2011, 01.2013.]: <http://www.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biochemia>

- [2] Carrasco-Castilla J., Hernandez-Alvarez A.J., Jimenez-Martinez C., Gutierrez-Lopez G.F., Davila-Ortiz G.: Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Eng. Rev.*, 2012, **4** (4), 224-243.
- [3] Chanput W., Nakai S., Theerakulkait C.: Introduction of new computer softwares for classification and prediction purposes of bioactive peptides: case study in antioxidative tripeptides. *Int. J. Food Prop.*, 2010, **13**, 947-959.
- [4] Chen C., Chi Y.J.: Antioxidant, ACE inhibitory activities and functional properties of egg white protein hydrolysate. *J. Food Biochem.*, 2012, **36**, 383-394.
- [5] Choi J., Sabikhi L., Hassan A., Anand S.: Bioactive peptides in dairy products. *Int. J. Dairy Technol.*, 2012, **65** 1-12.
- [6] Dziuba J., Iwaniak A., Darewicz M., Niklewicz M.: Computer simulation of animal proteins proteolysis in aspect of obtaining bioactive peptides. *Pol. J. Nat. Sci.*, 2002, **10**, 209-222.
- [7] Dziuba M., Darewicz M.: Food proteins as precursors of bioactive peptides - Classification into families. *Food Sci. Technol. Int.*, 2007, **13**, 393-404.
- [8] Dziuba M., Dziuba B.: *In silico* analysis of bioactive peptides. In: Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals. Mine Y, Li-Chan ECY, Jiang B (eds). Blackwell Publishing Ltd. and Institute of Food Technologists, London, Boca Raton, FL, 2010, pp. 325-340.
- [9] Dziuba M., Minkiewicz P., Dąbek M.: Peptides, products of specific proteolysis as a molecular marker of allergenic proteins – *in silico* studies. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2013 **12** (1), 101-112.
- [10] Epanand R.M., Vogel H.J.: Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *BBA-Biomembranes*, 1999, **1462**, 11-28.
- [11] Fiat A.M., Jolles P.: Caseins of various origins and biologically-active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. *Mol. Cell. Biochem.*, 1989, **87**, 5-30.
- [12] Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.: Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*. Walker JM (ed). Humana Press Inc., Totowa, New York 2005, pp. 571-607.
- [13] Gautier S.F., Pouliot Y., Saint-Sauveur D.: Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Int. Dairy J.*, 2006, **16**, 1315-1323.
- [14] Gill H.S., Doull F., Rutherford K.J., Cross M.L.: Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br. J. Nutr.*, 2000, **84**, 111-117.
- [15] Gobetti M., Stepaniak L., De Angelis M., Corsetti A., Di Cagno R.: Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. *CRC Cr. Rev. Food Sci.*, 2002, **42**, 223-239.
- [16] Guruprasad K., Reddy B.V.B., Pandit M.W.: Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition – a novel-approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng.*, 1990, **4**, 155-161.
- [17] Jenssen H., Hancock R.E.: Therapeutic potential of HDPs as immunomodulatory agents. In: *Antimicrobial Peptides. Methods and Protocols*. Giuliani A, Rinaldi A (eds). Humana Press Inc., Monserrato 2010, pp. 329-347.
- [18] Kannan A., Hettiarachchy N.S., Lay J.O., Liyanage R.: Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides*, 2010, **31**, 1629-1634.
- [19] Korhonen H., Pihlanto A.: Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.*, 2006, **16**, 945-960.
- [20] Korhonen H., Pihlanto A.: Food-derived bioactive peptides - Opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Design*, 2003, **9**, 1297-1308.
- [21] Kyte J., Doolittle R.F.: A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 1982, **157** (1), 105-132.

- [22] Lahov E., Regelson W.: Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Caseicidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.*, 1996, **34**, 131-145.
- [23] Migliore-Samour D., Floch F., Jolles P.: Biologically-active casein peptides implicated in immunomodulation. *J. Dairy Res.*, 1989, **56**, 357-362.
- [24] Moller N.P., Scholz-Ahrens K.E., Roos N., Schrezenmeir J.: Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur. J. Nutr.*, 2008, **47**, 171-182.
- [25] ProtParam. [online]. EXPASY. Dostęp w Internecie [01.2012.]: <http://web.expasy.org/protparam/>
- [26] Schober Y., Yoo S.H., Paik H.D., Spengler B., Roempp A., Jayaprakasha H.M., Yoon Y.C.: Characterization of bioactive peptides derived by enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate. *Milchwissenschaft*, 2012, **67**, 55-57.
- [27] Srinivasan M., Dunker A.K.: Proline rich motifs as drug targets in immune mediated disorders. *Int. J. Pept.*, 2012, 634769:1-634769:14.
- [28] Steintraesser L., Kraneburg U., Jacobson F., Al-Benna S.: Host defense peptides and their antimicrobial - immunomodulatory duality. *Immunobiology*, 2011, **216**, 322-333.
- [29] Takahashi M., Moriguchi S., Ikeno M., Kono S., Ohata K., Usui H., Kurahashi K., Sasaki R., Yoshikawa M.: Studies on the ileum-contracting mechanisms and identification as a complement C3a receptor agonist of oryzatensin, a bioactive peptide derived from rice albumin. *Peptides*, 1996, **17**, 5-12.
- [30] Udenigwe C.C., Aluko R.E.: Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci.*, 2012, **77** (1), 11-24.
- [31] Zhang L., Falla T.J.: Host defense peptides for use as potential therapeutics. *Curr. Opin. Invest. Dr.*, 2009, **10**, 164-171.

IN SILICO ANALYSIS OF IMMUNOACTIVE PEPTIDES DERIVED FROM FOOD PROTEINS – A STUDY BASED ON BIOPEP DATABASE

S u m m a r y

89 immunoreactive peptides available in the BIOPEP Database were bioinformatically analyzed. It was determined that potentially immunoreactive peptide fragments were present in 90 of 150 sequences of the proteins analysed. In the sequences of immunoreactive peptides studied, the following was analysed: peptide chain length, percent content of individual amino acids, pI, molar extinction coefficient, hydrophathy index, and net charge. Furthermore, it was determined whether it was possible to *in silico* release those peptides using specific proteolytic enzymes. Based on the results of the computer analysis performed using a ProtParam software, it was confirmed that the immunoreactive peptides were, mainly, hydrophilic fragments and in their sequence, the alkaline amino acids prevailed, such as: Arg, Lys, and Pro, with a positive net charge in neutral pH. A computer simulation of *in silico* proteolysis of 11 selected food proteins showing the highest occurrence frequency of immunoreactive peptides (parameter A > 0.02) was performed and based thereon, it was proved that of all the enzymes available in the BIOPEP Database, only three proteolytic enzymes, i.e.: chymase (EC 3.4.21.39), pancreatic elastase (EC 3.4.21.36), and glycyl endopeptidase (EC 3.4.22.25) were able to release immunoreactive peptides in one enzyme setup. The 2-3 amino acid peptide fragments were, mainly, produced during the hydrolysis of the analyzed proteins performed using proteolytic enzymes.

Key words: immunoreactive peptides, BIOPEP Database, bioinformatic analysis, *in silico* proteolysis ☒