

PIOTR MINKIEWICZ, MAŁGORZATA DAREWICZ, ANNA IWANIAK,  
JUSTYNA BORAWSKA, JUSTYNA BUCHOLSKA, MONIKA HRYNKIEWICZ

**BIOLOGICZNIE AKTYWNE PEPTYDY POCHODZĄCE Z BIAŁEK  
ŻYWNOŚCI: BADANIA *IN SILICO*, *IN VITRO* I *IN VIVO*, ASPEKTY  
APLIKACYJNE ORAZ OCENA BEZPIECZEŃSTWA**

Streszczenie

Bioaktywne peptydy obecne w żywności mogą przyczynić się do zmniejszenia występowania chorób przewlekłych. W produktach spożywczych peptydy zazwyczaj są uwalniane poprzez hydrolizę enzymatyczną białek. W pracy przedstawiono wybrane metody analityczne, chemometryczne i bioinformatyczne, stosowane w badaniach molekularnych i biologicznych właściwości peptydów pochodzących z białek żywności. Opisano także metody zwiększania biodostępności peptydów oraz wybrane aspekty oceny ich bezpieczeństwa. Zrozumienie aspektów molekularnych biologicznej aktywności peptydów stwarza podstawy postępu w wykorzystaniu tych związków jako składników żywności zapobiegających chorobom dietozależnym.

**Słowa kluczowe:** peptydy bioaktywne żywności, metody analityczne, komputerowe bazy sekwencji, chemometria, biodostępność, bezpieczeństwo

**Wprowadzenie**

Białka pochodzące z żywności są głównie źródłem aminokwasów. Ich wartość oceniana jest także według kryteriów żywieniowych, np. strawności, obecności związków przeciwwywnieniowych lub właściwości alergennych [18]. Nowe, dodatkowe kryterium oceny białek dotyczy ich potencjalnej aktywności biologicznej oraz możliwości uwalniania z ich struktury aktywnych peptydów za pomocą enzymów lub czynników fizykochemicznych. Schlimme i Meisel [87] definiują bioaktywne peptydy jako fragmenty białek, które pozostają nieaktywne w ich sekwencji, natomiast po uwolnieniu

---

*Prof. dr hab. P. Minkiewicz, prof. dr hab. M. Darewicz, dr hab. A. Iwaniak, prof. nadzw., dr inż. J. Borawska, dr inż. J. Bucholska, mgr inż. M. Hrynkiewicz, Katedra Biochemii Żywności, Wyzd. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn. Kontakt: minkiew@uwm.edu.pl*

przez enzymy proteolityczne mogą oddziaływać z odpowiednimi receptorami w organizmie, regulując jego funkcje. Minkiewicz i wsp. [62] zdefiniowali pojęcie peptydomu żywności jako puli peptydów obecnych w surowcu lub produkcie żywnościowym. Struktura molekularna peptydów żywności wpływa na mechanizmy wchłaniania tych związków, jakość surowców i produktów spożywczych, kondycję psychofizyczną konsumentów oraz profilaktykę chorób dietozależnych [21, 62]. Zrozumienie zależności między strukturą molekularną peptydów a funkcją biologiczną żywności wymaga stosowania zaawansowanych metod badań o charakterze analitycznym i komputerowym. [39, 55, 85, 106, 110]. W celu ograniczenia kosztów i czasochłonności tych badań stosuje się metody oraz techniki bioinformatyczne, a także chemometryczne [73, 84, 85, 98]. Jedną z najważniejszych metod analizy białek i produktów ich degradacji jest wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie odwróconych faz (RP-HPLC). Kolumnową chromatografię cieczową bardzo często stosuje się do izolowania peptydów i białek na skalę przemysłową [1]. Najbardziej precyzyjną metodą identyfikacji peptydów i białek jest spektrometria mas (MS) bądź tandemowa spektrometria mas (MS/MS) [71]. Narzędzia bioinformatyczne umożliwiają przeprowadzenie symulacji procesu hydrolizy białek oraz ułatwiają identyfikację bioaktywnych peptydów przy wykorzystaniu wyników badań otrzymanych za pomocą spektrometrii mas [6, 85]. Programy oraz algorytmy służące do identyfikacji peptydów na podstawie wyników takich badań przedstawili Forner i wsp. [28]. Ostateczną weryfikacją i potwierdzeniem badań *in silico* są eksperymentalne oznaczenia aktywności biologicznej hydrolizatów i peptydów.

### **Metody oznaczania wybranych rodzajów aktywności biologicznej peptydów żywności**

Metody oznaczania aktywności biologicznej peptydów pochodzących z białek żywności przedstawiono na przykładzie peptydów inhibitorów konwertazy angiotensyny I oraz peptydów antyoksydacyjnych.

Konwertaza angiotensyny I (ACE) [EC 3.4.15.1] odgrywa wiodącą rolę w systemach odpowiedzialnych za regulację ciśnienia krwi [39, 40]. Wiele znanych peptydów z żywności może być inhibitorami ACE [47]. Aktywność inhibitorów ACE jest określana za pomocą parametru  $IC_{50}$ , którego wartość odpowiada stężeniu peptydu powodującego zmniejszenie aktywności enzymu o 50 %. Określenie aktywności inhibitorów ACE polega na spektrofotometrycznym pomiarze zawartości kwasu hipurowego (HA), powstającego na skutek działania konwertazy angiotensyny na hipurylo-L-histydyl-L-leucynę (HHL) w obecności wyizolowanych peptydów lub hydrolizatów białek o różnym stężeniu [14]. Jimsheena i Gowda [41] opracowali metodę, która pomija etap ekstrakcji HA z mieszaniny reakcyjnej. Innym sposobem jest pomiar zawartości HA z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami

(RP-HPLC) [80]. Stosowanie odmiennych metod utrudnia porównywanie wartości  $IC_{50}$  otrzymywanych w różnych badaniach. Niektórzy autorzy nie podają istotnych szczegółów dotyczących oznaczeń [68]. Według różnych autorów dipeptyd AP charakteryzuje się wartością  $IC_{50}$  w przedziale  $29 \div 230 \mu\text{M}$ , natomiast  $IC_{50}$  peptydu AVYPYQR wynosi  $15 \div 274 \mu\text{M}$  [2].

Pomiar aktywności przeciwnadciśnieniowej inhibitorów ACE w układzie *in vivo* prowadzony jest z udziałem ludzi lub zwierząt [40]. Doświadczenia prowadzi się najczęściej na czterotygodniowych szczurach rasy Wistar (ang. WKR, *Wistar Kyoto rats*) o normotensyjnym ciśnieniu krwi oraz szczepu SHR (ang. *spontaneously hypertensive rats*), tj. szczurach z predyspozycjami do rozwoju nadciśnienia [50]. Szczury karmione są raz dziennie określoną dawką peptydu przeliczoną na kilogram masy ciała. Peptyd podany w formie roztworu wodnego jest intubowany bezpośrednio do żołądka szczurów, a następnie co kilka godzin dokonywany jest pomiar ciśnienia krwi [70]. Badania ludzi obejmują pacjentów w łagodnym stadium nadciśnienia tętniczego. Pacjenci otrzymują określoną dawkę peptydu w formie ekstraktu lub produktu żywnościowego, a następnie w odpowiednich przedziałach czasowych dokonywany jest pomiar skurczowego oraz rozkurczowego ciśnienia krwi [40].

Właściwości antyoksydacyjne białek i peptydów są różnie definiowane, a do ich pomiaru wykorzystuje się wiele metod. Między innymi wykorzystywana jest zdolność antyoksydantów do dezaktywacji wolnych rodników. Reakcje te mogą przebiegać według dwóch mechanizmów: przeniesienia pojedynczego elektronu, tzw. SET (ang. *single electron transfer*) oraz przeniesienia atomu wodoru, tzw. HAT (ang. *hydrogen atom transfer*) [86]. W metodach z zastosowaniem mechanizmu typu SET mieszaninę reakcyjną stanowią przeciwutleniacz i oksydant zmieniający barwę wskutek redukcji. Uzyskane wyniki przelicza się często na równoważniki Troloxu, TEAC (ang. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) [86]. Metoda z użyciem roztworu DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl) wykorzystuje mechanizm SET [74, 86]. W badaniach stosuje się m.in. etanolowy roztwór DPPH<sup>•</sup> o barwie purpurowej (maksimum absorbancji -  $\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$ ) [109]. W czasie reakcji redukcji barwa roztworu zmienia się na żółtą. Metoda ta jest szeroko stosowana do pomiarów zdolności antyoksydacyjnej naturalnych surowców. Jest szybka i dokładna, a otrzymane wyniki są odtwarzalne [15]. Kolejna metoda oznaczania aktywności antyoksydacyjnej wykorzystuje wolny rodnik ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)]. Zastosowanie ABTS<sup>•+</sup> umożliwia pomiar całkowitej aktywności antyoksydacyjnej próbek żywności [15]. Rodniki ABTS<sup>•+</sup> tworzone są podczas reakcji chemicznych, np. z nadsiarczanem potasu (nadtlenosiarczanem(VI) dipotasu), elektrochemicznych lub enzymatycznych. Utlenienie ABTS<sup>•+</sup> następuje natychmiast, jednak maksymalną wartość absorbancji i pełną stabilność rodnik uzyskuje po upływie 6 h. Rodniki generowane podczas reakcji mają barwę niebieskozieloną (np.  $\lambda_{\text{max}} = 734 \text{ nm}$ ) [111]. Antyoksydanty powodują redukcję katio-

norodnika w stopniu zależnym od czasu trwania reakcji, stężenia przeciwutleniacza oraz jego aktywności [15]. Zaletami metody są duża szybkość reakcji kationorodnika ABTS<sup>•+</sup> z przeciwutleniaczami (zwykle w ciągu 30 min) oraz rozpuszczalność ABTS<sup>•+</sup> zarówno w wodzie, jak i w rozpuszczalnikach organicznych [15]. Inną metodą pomiaru aktywności antyoksydacyjnej jest test na siłę redukcji jonów żelaza (ang. *reducing power* lub *ferric-reducing power*), który pozwala na bezpośrednie określenie właściwości redukujących badanej próbki. Metoda polega na pomiarze redukcji heksacyjanożelazianu(III) potasu pod wpływem działania antyoksydanta i detekcji zmiany zabarwienia substratu ( $\lambda_{\text{max}} = 700 \text{ nm}$ ) [6]. Należy podkreślić, że żadna z metod oznaczania właściwości antyoksydacyjnych nie jest uznana za oficjalnie zestandaryzowaną. Stąd sugeruje się wykorzystywanie różnych metod w różnych warunkach utlenienia do oznaczania aktywności antyoksydacyjnej [86].

### **Zastosowanie spektrometrii mas, wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz elektroforezy kapilarnej w analizie biologicznie aktywnych peptydów żywności**

Do identyfikacji i ilościowego oznaczania peptydów stosowane są metody rozwijane na potrzeby badań proteomicznych. Najważniejszą z nich jest spektrometria mas (MS) [94]. Opublikowano wiele prac przeglądowych opisujących rozwój metod analitycznych (głównie MS) w badaniach peptydów oraz peptydomów danego organizmu, tkanki, organu lub produktu żywnościowego [9, 29, 62, 71, 73, 85]. Spektrometria mas jest łączona z wysokosprawną chromatografią cieczą z odwróconymi fazami (RP-HPLC) [26, 109] lub elektroforezą kapilarną (CE) [37, 43]. Główną zaletą CE jest możliwość miniaturyzacji sprzętu oraz małe zużycie odczynników, co zgodne jest z filozofią „zielonej chemii”, zalecającą poszukiwanie metod analitycznych najmniej obciążających środowisko [105]. Z kolei RP-HPLC umożliwia rozdzielanie peptydów w skali preparatywnej.

Biologicznie aktywne peptydy pochodzące z żywności powstają głównie w wyniku hydrolizy białek przez enzymy o różnej specyficzności [73]. W takiej sytuacji polecaną strategią może być sekwencjonowanie peptydów *de novo* na podstawie ich widm MS/MS [57]. Zastosowanie spektrometrii mas pozwala też na identyfikację enzymatycznych modyfikacji peptydów [56]. Peptydy w żywności ulegają także innym reakcjom chemicznym [100]. MS jest uniwersalną metodą, mogącą służyć do identyfikacji produktów takich reakcji.

Alternatywą sekwencjonowania *de novo* może być strategia badawcza naśladująca tzw. „proteomikę kierowaną hipotezą” [88]. Strategia ta polega na identyfikacji i obserwacji powstawania, degradacji, modyfikacji czy zmian zawartości wytypowanych białek lub peptydów będących markerami występowania lub zmian zawartości tych białek. Białka lub peptydy mogą być typowane m.in. na podstawie badań bioinformatycznych. Metody badawcze stosowane do badań peptydowych markerów bia-

łek mogą być także używane w badaniach biologicznie aktywnych peptydów [90]. W peptydach tych można poszukiwać fragmentów identycznych ze znanymi wcześniej sekwencjami aminokwasowymi zgromadzonymi w bazach danych [62, 63, 64] lub przewidywać aktywność fragmentów białek za pomocą programów, takich jak PeptideRanker [66].

Dodatkowe informacje ułatwiające identyfikację peptydu metodą RP-HPLC w połączeniu ze spektrometrią mas można uzyskać, wykorzystując przewidywanie czasów retencji za pomocą oprogramowania dostępnego w Internecie [48]. Jeśli przepis stosowany w danym laboratorium różni się od użytego przy opracowaniu programu, należy wprowadzić poprawkę w obliczeniach. W celu dostosowania przewidywań teoretycznych do metod analitycznych stosowanych w poszczególnych laboratoriach (rodzaj kolumn, gradient fazy ruchomej itd.) można zastosować strategię obejmującą obliczenie przewidywanych czasów retencji zbioru peptydów, zmierzenie czasów retencji tych samych peptydów oraz obliczenie równania opisującego zależność między teoretycznym czasem retencji obliczonym za pomocą dostępnego programu a rzeczywistym czasem retencji peptydów [24].

Tandemową spektrometrię (MS/MS) mas w połączeniu z wysokosprawną chromatografią cieczą z odwróconymi fazami zastosowano do identyfikacji oraz analizy ilościowej biologicznie aktywnych peptydów uwalnianych z białek mleka przez enzymy trawienne przewodu pokarmowego człowieka. Podczas analizy peptydy identyfikowano przy użyciu strategii sekwencjonowania *de novo*. Uzyskane sekwencje aminokwasowe stosowano jako zapytania do przeszukiwania bazy danych biologicznie aktywnych peptydów [8]. Podobną strategię zastosowano w analizie peptydomu mleka ludzkiego [17] i produktów hydrolizy białek ryb za pomocą trypsyny [10]. Sekwencjonowanie *de novo* stosowane jest przy poszukiwaniu nowych, biologicznie aktywnych peptydów. Wówczas produkty proteolizy białek rozdzielane są np. za pomocą chromatografii wykluczania na podstawie ich rozmiarów. Składniki frakcji aktywnych są następnie identyfikowane metodą MS/MS (RP-HPLC-MS/MS). Ostatni etap obejmuje syntezę zidentyfikowanych peptydów i badanie ich aktywności. Powyższa strategia została zastosowana do poszukiwania nowych peptydów hamujących aktywność ACE, pochodzących z grzybów [54, 55]. Syntetyczne peptydy zostały użyte w wymienionych wyżej eksperymentach także do symulacji enzymatycznej hydrolizy w przewodzie pokarmowym człowieka [54, 55]. Strategia naśladująca „proteomikę kierowaną hipotezą” może obejmować np. wyszukiwanie fragmentów łańcuchów białkowych o potencjalnej biologicznej aktywności, symulację proteolizy *in silico*, tworzenie symulowanych widm MS/MS oraz poszukiwanie peptydów w hydrolizatach białkowych przy wykorzystaniu uzyskanych danych [39].

### **Bazy danych biologicznie aktywnych peptydów**

Sposobem prezentacji informacji z dziedziny biologii oraz chemii są internetowe bazy danych [38, 65]. Do grup związków opisywanych w bazach należą m.in. peptydy. Wśród baz peptydów istnieją takie, które zawierają dane na temat związków o różnych rodzajach aktywności biologicznej np. BIOPEP [64], EROP-Moscow [112] czy PepBank [91]. Tworzone są także specjalistyczne bazy danych peptydów wykazujących poszczególne rodzaje aktywności, np. bazy peptydów antybakteryjnych: CAMP [103] i MilkAMP [95], antywirusowych: AVPdb [79] czy hemolitycznych (niszczących czerwone ciała krwi): Hemolytik [30]. Typowa baza danych zawiera sekwencje aminokwasowe peptydów, informacje na temat ich aktywności biologicznej oraz odnośniki literaturowe. Bazom danych towarzyszą narzędzia do wyszukiwania peptydów identycznych lub o wysokim stopniu podobieństwa do sekwencji użytych jako zapytania. Możliwe są dwa sposoby przeszukiwania baz. Pierwszy z nich zakłada użycie sekwencji białka lub polipeptydu jako zapytania i wyszukiwanie krótkich fragmentów wykazujących aktywność biologiczną [64]. Zapytaniami przy przeszukiwaniu baz mogą być także sekwencje peptydów [8, 10, 11, 17]. Drugi sposób [20, 61] zakłada użycie krótkiej sekwencji jako zapytania i przeszukiwanie baz danych białek, np. bazy UniProt [96]. Zapytaniami mogą być sekwencje zawierające więcej niż pięć reszt aminokwasowych.

Baza Quorumpeps [108], oprócz sekwencji aminokwasowych podanych za pomocą kodu jednoliterowego, zawiera struktury peptydów zapisane w kodzie SMILES [104]. Kod ten umożliwia opis struktury związków chemicznych należących do dowolnych grup. Związki zawierające elementy struktury wspólne z peptydami i wykazujące podobną aktywność biologiczną są określane jako peptydomimetyki. Są one często wykorzystywane jako leki [27]. Kod SMILES umożliwia porównanie struktury związków należących do różnych grup i ilościowe określenie podobieństwa między nimi [59]. Struktury peptydów zapisane w kodzie SMILES, który jest bardziej uniwersalny niż zapis sekwencji przy użyciu kodu jednoliterowego, mogą służyć jako zapytania przy przeszukiwaniu baz danych związków chemicznych o małej masie cząsteczkowej. Taka strategia może służyć zarówno do poszukiwania peptydomimetyków, jak i do przewidywania aktywności peptydu, którego struktura służyła jako zapytanie. Obecnie obserwuje się rozwój informatyki chemicznej, obejmujący m.in. tworzenie baz związków o małej masie cząsteczkowej [38, 60, 65, 93].

### **Analiza chemometryczna biologicznie aktywnych peptydów żywności**

Chemometria jest dziedziną nauki wykorzystującą analizę matematyczną oraz statystyczną w celu pozyskiwania użytecznych informacji pochodzących z wielowymiarowych danych pomiarowych. Metodami stosowanymi w praktyce chemometrycznej,

służącymi do analizowania, budowy i identyfikacji modeli, są m.in. sztuczne sieci neuronowe (ANN, ang. *artificial neural networks*), analiza głównych składowych (PCA, ang. *principal component analysis*), metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS, ang. *partial least squares*) [3]. Metody te stosowano do analizy bioaktywnych peptydów, np. sztuczne sieci neuronowe zastosowano do opracowania modelu przeznaczonego do przewidywania aktywności antybakteryjnej peptydów i programu AntiBP, działającego na podstawie tego modelu [53]. Wymieniona metoda została z sukcesem zastosowana do przewidywania aktywności peptydów antywirusowych [12].

Analizę głównych składowych zastosowano do określenia wpływu właściwości fizykochemicznych poszczególnych reszt aminokwasowych na aktywność biologiczną di- i tripeptydowych inhibitorów ACE [39]. Właściwości poszczególnych aminokwasów opisano za pomocą parametrów ilościowych znajdujących się w bazie danych AAindex [44]. Na podstawie PCA wykazano wpływ m.in. hydrofobowości, masy cząsteczkowej aminokwasów, obecności reszt aromatycznych lub alifatycznych na aktywność badanych peptydów. Stwierdzono ponadto, że o aktywności inhibitorów ACE decydowała obecność proliny [39]. PCA zastosowano także do poszukiwania nowych wskaźników definiujących strukturę aminokwasów. Wskaźniki te posłużyły następnie do określenia zależności pomiędzy strukturą a aktywnością 58 sekwencji inhibitorów ACE oraz 46 peptydów o smaku gorzkim [35].

Przykładem zastosowania chemometrii w badaniach peptydów bioaktywnych jest ustalanie ilościowej zależności między strukturą a aktywnością biologiczną (QSAR, ang. *quantitative structure-activity relationship*) [60] i/lub ilościowej zależności między strukturą a czasem retencji peptydów (QSRR, *quantitative structure-retention relationship*) [3, 4]. Modele matematyczne określające ilościowe zależności „struktura – właściwość” budowane są głównie na założeniach PLS [25]. Bez względu na rodzaj zależności „struktura – odpowiedź”, właściwości charakteryzujące strukturę badanych związków opisywane są przez atrybuty nazywane deskryptorami [97].

Metodę PLS zastosowali Udenigwe i Aluko [99], analizując wpływ różnych czynników na aktywność antyoksydacyjną hydrolizatów białek żywności. Wykazano, że skład aminokwasowy peptydów obecnych w hydrolizatach, w tym obecność reszt histydyny, wywierał negatywny wpływ na antyoksydacyjny efekt hydrolizatów. Natomiast hydrofobowy charakter hydrolizatów wpływał na zdolność usuwania wolnych rodników. Ta sama metoda zastosowana przez Wu i wsp. [107] do określenia zależności pomiędzy strukturą i aktywnością peptydowych inhibitorów ACE pochodzących z białek żywności pozwoliła na usystematyzowanie informacji na temat wpływu poszczególnych reszt aminokwasowych na aktywność peptydów liczących od 4 do 10 reszt aminokwasowych. Wykazano, że C-końcowa reszta łańcucha peptydu determinuje jego aktywność. W przypadku tetrapeptydów, C-końcowymi resztami aminokwasowymi sprzyjającymi zdolności hamowania aktywności ACE były tyrozyna i cysteina.

W drugiej pozycji od C-końca powinny się znajdować: histydyna, tryptofan lub metionina, w trzeciej – izoleucyna, leucyna lub walina, natomiast w czwartej – metionina lub tryptofan [107]. Kim i Li-Chan [45] za pomocą PLS przeanalizowali zależność między strukturą a aktywnością peptydów o smaku gorzkim. Uzyskali model matematyczny dotyczący peptydów liczących od dwóch do trzech reszt aminokwasowych. Pripp i wsp. [77] za pomocą PLS opracowali matematyczny model QSAR dla peptydów pochodzących z białek mleka i wykazujących zdolność inhibicji ACE. Równania QSAR uwzględniały następujące deskryptory: hydrofobowość, rozmiar i ładunek aminokwasów: N- i C-końcowego. Wykazano, że aktywność peptydów liczących do sześciu reszt aminokwasowych była związana ( $R^2 = 0,73$ ) z hydrofobowością oraz dodatnim ładunkiem C-końcowego aminokwasu. W przypadku peptydów o dłuższych łańcuchach nie zaobserwowano wpływu właściwości fizykochemicznych C-końcowej reszty aminokwasowej na zdolność hamowania ACE. Właściwości N-końcowych reszt aminokwasowych inhibitorów ACE pochodzących z białek mleka nie wywierały wpływu na aktywność peptydów [77]. Metodę PLS wykorzystano do badania QSAR peptydów pochodzących z kazeiny- $\beta$ , hamujących działanie endopeptydaz prolinowych. Wykazano, że na wzrost aktywności duży wpływ ma hydrofobowość i molekularna objętość reszt aminokwasowych, a także ich położenie w łańcuchu peptydu [76].

Przykładem innej metody chemometrycznej jest zastosowanie ANN w analizie QSAR 58 sekwencji inhibitorów ACE [34]. Model QSAR uwzględniał następujące parametry opisujące właściwości peptydów: aktywność, obecność aminokwasów o charakterze hydrofilowym, struktura trójwymiarowa i rozmiar. Wykazano, że istotne znaczenie dla aktywności inhibitorów ACE ma obecność aminokwasu hydrofobowego usytuowanego na C-końcu peptydu.

Metody analizy chemometrycznej, szczególnie QSAR, stały się przydatnym narzędziem badawczym. Stosowanie modeli typu „struktura – odpowiedź” może w znacznym stopniu ułatwiać badania poprzez redukcję kosztów, czasu oraz zasobów ludzkich zaangażowanych w eksperyment [31]. W odniesieniu do badań nad bioaktywnymi peptydami, QSAR jest pomocna w modelowaniu właściwości peptydów jako składników żywności. Przewidywanie antymikrobiologicznych aktywności peptydów na podstawie QSAR może służyć np. do projektowania naturalnych związków o właściwościach konserwujących żywność. Metoda QSAR może być również stosowana w przewidywaniu innych właściwości peptydów, które powstają podczas procesów wytwarzania żywności, np. gorzkiego smaku peptydów powstających podczas dojrzewania serów [78].



### **Sposoby zachowania aktywności biologicznej peptydów żywności oraz możliwości ich dostarczenia do organizmu**

Żywność funkcjonalna zawierająca związki bioaktywne dostarcza konsumentom składników o działaniu prozdrowotnym i/lub terapeutycznym. Związki wykazujące biologiczną aktywność mogą być uwalniane w czasie przetwarzania żywności oraz podczas przemian w układzie pokarmowym. Aby spełnić swoją funkcję w organizmie, potencjalnie aktywny peptyd musi dotrzeć do odpowiedniego układu w stanie nienaruszonym [36, 47, 89]. W celu zachowania aktywności biopeptydów i zapobiegania ich degradacji podczas trawienia w przewodzie pokarmowym stosuje się m.in. metody mikro- i nanokapsułkowania w liposomach. Są to technologie coraz częściej stosowane w przemyśle spożywczym [23]. Substancją powlekającą są zwykle fosfolipidy, np. lecytyna [13]. Zamykanie związków bioaktywnych w liposomach stosowane jest nie tylko do produkcji żywności wzbogacanej w bioaktywne peptydy, ale także w luteinę czy kwasy tłuszczowe [52]. Liposomy występują w postaci pęcherzyków, które w swojej budowie zawierają podwójne warstwy cząsteczek fosfolipidowych. Cząsteczki te tworzą układ amfifilowy, a związek aktywny biologicznie umieszczony jest pomiędzy warstwami tłuszczowymi [23, 49, 52, 92]. Stabilność liposomów zależy od ich składu lipidowego, rozmiaru, płynności, hydrofilowości oraz ładunku powierzchniowego. Cechy te wywierają wpływ na zachowanie się liposomów w środowisku biologicznym [32, 69]. Chen i wsp. [13] wykazali efektywność procesu zamykania peptydów w liposomach w celu poprawy zdolności obniżania ciśnienia krwi. Wykazano, że mikrokapsułkowane peptydy obniżały skurczowe ciśnienie krwi u szczurów z nadciśnieniem o 45 mm Hg (LKP) i 35 mm Hg (LRP) [13].

Każda substancja aktywna zamykana w mikrokapsułce wymaga indywidualnego doboru składników materiału powlekającego, gwarantującego jej stabilność, zachowanie struktury oraz właściwości fizycznych [16]. Mikrokapsułkowanie polega na pułapkowaniu, czyli otaczaniu substancji lub mieszaniny substancji powłoką okrywającą aktywne cząsteczki. Materiały stosowane do mikrokapsułkowania powinny zabezpieczać cząsteczki bioaktywne przed działaniem różnych czynników, m.in. mikroorganizmów, światła, tlenu, zmian temperatury, wilgotności, kwasowości środowiska [23, 51]. Materiał powlekający (nośnik, otoczka) różni się właściwościami chemicznymi i fizycznymi od substancji powlekanej. Nośnikami są najczęściej białka, lipidy, sacharydy, woski, modyfikowane polisacharydy lub syntetyczne polimery. W technologii żywności najczęściej stosuje się polisacharydy pochodzenia naturalnego, takie jak: agar, chitozan, karagen, alginiany sodu lub wapnia oraz guma z nasion wianowłostki królewskiej (*Delonix regia*) [22, 23, 81, 82]. Rozmiar mikrokapsułek wynosi 0,2 ÷ 5000 µm. Kapsułki o rozmiarze poniżej 0,2 µm nazywane są nanokapsułkami, natomiast większe niż 5000 µm to makrokapsułki [5].

Na rynku dostępne są peptydy bioaktywne, występujące w postaci kapsułek. Przykładem są kapsułki Katsubushi [83], preparaty PRODIET F200/Lacticum [47] oraz Evolus. [46]. Kapsułkowanie może być z powodzeniem stosowane do hydrolizatów białkowych wykazujących aktywność biologiczną [82].

Dla zwiększenia trwałości mikrokapsułek można zastosować metodę fluidyzacyjną, łączoną z metodami rozpyłowymi. W metodzie tej wykorzystuje się sprężony tlenek węgla(IV) lub azot, który nanosi się na powłokę okrywającą cząsteczki proszku [72].

Metoda mikro- i nanokapsułkowania związków biologicznie aktywnych, w tym peptydów, jest przedmiotem zainteresowania naukowców i technologów żywności, szczególnie przy opracowywaniu i poszukiwaniu nowych form dostarczenia organizmowi substancji prozdrowotnych. Mikrokapsułkowanie poprawia stabilność i biodostępność funkcjonalnych składników żywności podczas procesów trawienia. Należy mieć jednak świadomość ograniczeń nowych metod dostarczania bioskładników w formie niezmienionej, w aspekcie ulepszania m.in. metod oczyszczania peptydów.

### **Bezpieczeństwo spożywania biologicznie aktywnych peptydów żywności**

Stale poszukuje się biopeptydów o zdefiniowanej aktywności biologicznej. Nowoczesne metody izolowania, identyfikowania i charakterystyki nowatorskich właściwości w aspekcie zawartości bioaktywnych peptydów lub obecności ich białkowych prekursorów mogłyby być wykorzystane w zakresie produkcji funkcjonalnej żywności prozdrowotnej oraz preparatów pozwalających na eliminowanie lub ograniczanie stosowania dodatków do żywności (np. konserwantów) [1, 101]. Peptydy cechują się potencjałem biologicznym, nie zawsze jednak mogą być składnikiem produktów żywnościowych. Zastrzeżenia dotyczą bezpieczeństwa ich stosowania. Używanie biologicznie aktywnych hydrolizatów i peptydów w produkcji żywności powinno być poprzedzone badaniami żywieniowymi, konsumenckimi i toksykologicznymi. Badania powinny uwzględniać potencjalne zagrożenia wynikające m.in. z ewentualnej ich cytotoxycznosci [102] (aczkolwiek efekt cytotoxyczny biopeptydów może być wykorzystywany w terapii antynowotworowej [33]), z hamowania aktywności enzymów [42] czy też z alergennosci [67, 101]. Produkty fragmentacji białek zwykle obniżają swój potencjał alergenny, jednak może się zdarzyć, że produkt hydrolizy białka, nadal zawierający epitop białka macierzystego, nie zmieni swojej alergennosci. Taka sytuacja ma miejsce podczas trawienia żołądkowo-jelitowego białka Ara h 1, głównego alergenu orzeszków ziemnych. Peptydy, jakie otrzymano po trawieniu, nadal zachowywały właściwości alergenne białka rodzimego. Jak dotąd, niewiele badań dotyczyło niepożądanego czy wręcz szkodliwego wpływu biologicznie aktywnych peptydów pochodzących z żywności na zdrowie człowieka. Wyjątkiem w tym zakresie są badania dotyczące enteropatii związanej z nadwrażliwością na gluten. W etiologii celiakii

molekularne podłoże choroby związane jest z obecnością toksycznych peptydów w żywności spożywanej przez osoby predysponowane do rozwoju tej choroby trzewnej [21]. Badania z zakresu bezpieczeństwa stosowania bioaktywnych peptydów dotyczyły zwykle tych sekwencji, które są obecne w komercyjnie dostępnych produktach. Maeno i wsp. [58] zbadali produkty hydrolizy kazeiny oraz tripeptyd VPP otrzymane z fermentowanego mleka i stwierdzili, że nie mają one toksycznego działania narządowego. Ponstein-Simarro Doorten i wsp. [75] dowiedli, że Tensguard<sup>TM</sup>, będący funkcjonalnym składnikiem żywności zawierającym duże ilości tripeptydu IPP, nie wywiera działania mutagennego. Jing i wsp. [42] wykazali, że tripeptydy IPP i IVP nie wywierają negatywnego wpływu na metabolizm glukozy. Biologicznie aktywne peptydy otrzymywane z białek żywności podczas: 1) hydrolizy enzymami trawiennymi w układzie pokarmowym człowieka, 2) procesów fermentacji dzięki aktywności proteolitycznej mikroorganizmów, 3) enzymatycznej hydrolizy *in vitro* [18] i spożywane przez ludzi od wieków rzadko wywołują reakcje niepożądane. Nawet te rzadkie przypadki skłaniają do ostrożności i podejmowania badań w aspekcie negatywnych efektów działania biologicznie aktywnych peptydów.

### Podsumowanie

Białka dostarczają biologicznie aktywnych peptydów, które mogą być składnikami funkcjonalnych produktów żywnościowych. Zależność pomiędzy dietą a zdrowiem jest jednym z elementów profilaktyki wielu chorób i czynnikiem wpływającym na komfort życia człowieka. Konsumentów oczekują od żywności spełniania funkcji odżywczych oraz możliwości opóźnienia momentu pojawiania się tzw. chorób cywilizacyjnych i łagodzenia ich przebiegu. Przyczyniło się to do rozwoju rynku żywności funkcjonalnej, czyli produktów wywierających korzystny wpływ na zdrowie człowieka ponad poziom wynikający z ich wartości odżywczej. Znaczący udział w tym rynku przypada produktom zawierającym składniki powstałe po fragmentacji białek.

Narzędziami przydatnymi do rozdzielania i oznaczania peptydów i białek, a szczególnie peptydów o niskich masach cząsteczkowych, są metody chromatografii cieczowej wspomagane metodami: spektrometrii mas, komputerowymi oraz chemometrycznymi. Są one nieocenione w procesie rozdzielania tych substancji w skali preparatywnej i przy ich przemysłowej produkcji. Rozwój technik separacji membranowej oraz nano- i ultrafiltracji sprzyja wprowadzaniu do żywności nowo identyfikowanych peptydów. Technologie mikro- i nanokapsułkowania dostarczają rozwiązań poprawiających stabilność peptydów w różnych produktach żywnościowych oraz w trakcie trawienia. Kolejne badania powinny dotyczyć zawartości, molekularnych mechanizmów działania oraz biodostępności peptydów w surowcach i w produktach żywnościowych. Odrębnym wyzwaniem stosowania biologicznie aktywnych peptydów w żywności są

problemy prawne, pojawiające się wówczas, gdy surowcom i produktom żywnościowym przypisuje się właściwości prozdrowotne.

*Praca finansowana w ramach projektu NCN nr N N312 465240 i tematu statutowego Katedry Biochemii Żywności UWM w Olsztynie. Monika Hrynkiewicz jest uczestniczką projektu „Stypendia dla doktorantów województwa podlaskiego”, współfinansowanego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 8.2 Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji, ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz środków budżetu województwa podlaskiego.*

### Literatura

- [1] Agyei D, Danquah M.K.: Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 272-277.
- [2] Alemán A., Giménez B., Pérez-Santin E., Gómez-Guillén M.C., Montero P.: Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chem.*, 2011, **125**, 334-341.
- [3] Bączek T.: Usprawnienie identyfikacji peptydów w proteomice z wykorzystaniem chemometrycznej analizy danych. Rozprawa habilitacyjna, Akademia Medyczna, Gdańsk 2006.
- [4] Bączek T., Kaliszan R.: Predictions of peptides' retention times in reversed-phase liquid chromatography as a new supportive tool to improve protein identification in proteomics. *Proteomics*, 2009, **9**, 835-847.
- [5] Barbosa-Cánovas G.V., Ortega-Rivas E., Juliano P., Yan H.: Encapsulation processes. In: *Food Powders. Physical properties, processing and functionality*. Kluwer Academic Plenum Publishers. New York 2005, p. 199.
- [6] Barkia A., Bougateg A., Khaled H.B., Nasri M.: Antioxidant activities of sardinelle heads and/or viscera protein hydrolysates prepared by enzymatic treatment. *J. Food Biochem.*, 2010, **34**, 303-320.
- [7] Boonen K., Landuyt B., Baggerman G., Husson S.J., Huybrechts J., Schoofs L.: Peptidomics: The integrated approach of MS, hyphenated techniques and bioinformatics for neuropeptide analysis. *J. Sep. Sci.*, 2008, **31**, 427-445.
- [8] Boutrou R., Gaudichon C., Dupont D., Jardin J., Airinei G., Marsset-Baglieri A., Benamouzig R., Tomé D., Léonil J.: Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2013, **97**, 1314-1323.
- [9] Carrasco-Castilla J., Hernández-Álvarez A.J., Jiménez-Martínez C., Gutiérrez-López G.F., Dávila-Ortiz G.: Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Eng. Rev.*, 2012, **4**, 224-243.
- [10] Carrera M., Cañas B., Gallardo J.M.: The sarcoplasmic fish proteome: pathways, metabolic networks and potential bioactive peptides for nutritional inferences. *J. Proteom.*, 2013, **78**, 211-220.
- [11] Català-Clariana S., Benavente F., Giménez E., Barbosa J., Sanz-Nebot V.: Identification of bioactive peptides in hypoallergenic infant milk formulas by CE-TOF-MS assisted by semiempirical model of electromigration behaviour. *Electrophoresis*, 2013, **34**, 1886-1894.
- [12] Chang K.Y., Yang J.-R.: Analysis and prediction of highly effective antiviral peptides based on random forests. *PLoS ONE*, 2013, **8**, article e70166.

- [13] Chen T.-L., Lo Y.-C., Hu W.-T., Wu M.-C., Chen S.-T., Chang H.-M.: Microencapsulation and modification of synthetic peptides of food proteins reduces the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 1671-1675.
- [14] Cushman D.W., Cheung H.S.: Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, 1971, **20**, 1637-1648.
- [15] Cybul M., Nowak R.: Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. *Herba Pol.*, 2008, **54 (1)**, 68-78.
- [16] Dajnowiec F., Kubiak A., Zander L., Banaszczyk P.: Struktura mikrokapsulek estrów etylowych oleju roślinnego. *Acta Agrophys.*, 2011, **17**, 33-41.
- [17] Dallas D.C., Guerrero A., Khaldi N., Castillo P.A., Martin W.F., Smilowitz J.T., Bevins C.L., Barile D., German B., Lebrilla C.B.: Extensive *in vivo* human milk peptidomics reveals specific proteolysis yielding protective antimicrobial peptides. *J. Proteom. Res.*, 2013, **12**, 2295-2304.
- [18] Darewicz M., Dziuba B., Minkiewicz P., Dziuba J.: The preventive potential of milk and colostrum proteins and protein fragments. *Food Rev. Int.*, 2011, **27**, 357-388.
- [19] Darewicz M., Dziuba J.: Peptydy funkcjonalnie aktywne. W: *Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności*. Red: J. Dziuba, Ł. Fornal. WNT, Warszawa 2009, ss. 71-109.
- [20] Darewicz M., Dziuba J., Minkiewicz P.: Computational characterisation and identification of peptides for *in silico* detection of potentially celiac-toxic proteins. *Food Sci. Technol. Int.*, 2007, **13**, 125-133.
- [21] Darewicz M., Dziuba J., Minkiewicz P.: Celiac disease – background, molecular, bioinformatics and analytical aspects. *Food Rev. Int.*, 2008, **24**, 311-329.
- [22] Dembczyński R., Jankowski T.: Ukierunkowanie komórek drobnoustrojów metodą kapsułkowania – stan obecny i możliwości rozwoju tej metody. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 2004, **4 (41)**, 5-17.
- [23] Dłużewska E.: Mikrokapsułkowanie dodatków do żywności. *Przem. Spoż.*, 2008, **5**, 30-35.
- [24] Dziuba J., Minkiewicz P., Mogut D.: Determination of theoretical retention times for peptides analyzed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Acta Sci. Polon. Technol. Aliment.*, 2011, **10**, 209-221.
- [25] Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Trygg J., Wikström C., Wold S.: Non-linear PLS modelling. W: *Multi- and megavariate data analysis. Part II. Advanced applications and method extensions. Second revised and enlarged version*. Umetrics Academy, Umeå, Sweden, 2006, pp. 153-168.
- [26] Fekete S., Veuthey J.-L., Guillarme D.: New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **69**, 9-27.
- [27] Floris M., Moro S.: Mimicking peptides... *In silico*. *Mol. Inf.*, 2012, **31**, 12-20.
- [28] Forner F., Foster L.J., Toppo S.: Mass spectrometry data analysis in the proteomics era. *Curr. Bioinform.*, 2007, **2**, 63-93.
- [29] García M.C., Puchalska P., Esteve C., Marina M.L.: Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 2013, **106**, 328-349.
- [30] Gautam A., Chaudhary K., Singh S., Joshi A., Anand P., Tuknait A., Mathur D., Varshney G.C., Raghava G.P.S.: Hemolytik: a database of experimentally determined hemolytic and non-hemolytic peptides. *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, D444-D449.
- [31] Goodarzi M., van der Heyden Y., Fumar-Timofei S.: Towards better understanding of feature-selection or reduction techniques for Quantitative Structure-Activity Relationship models. *Trends Anal. Chem.*, 2013, **42**, 49-62.

- [32] Gregoriadis G., Perrie Y., Liposomes. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2010, DOI: 10.1002/9780470015902.a0002656.pub2.
- [33] Hartmann R., Wal J.M., Bernard H., Pentzien A.K.: Cytotoxic and allergenic potential of bioactive proteins and peptides. *Curr. Pharm. Des.*, 2007, **13**, 897-920.
- [34] He R., Ma H., Zhao W., Qu W., Zhao J., Luo L., Zhu W.: Modelling the QSAR of ACE-inhibitory peptides with ANN and its applied illustration. *Int. J. Pept.*, 2012, article 620609.
- [35] Hemmateenejad B., Miri R., Elyasi M.: A segmented principal component analysis-regression approach to QSAR study of peptides. *J. Theor. Biol*, 2012, **305**, 37-44.
- [36] Hernández-Ledesma B., Contreras M.D.M., Recio I.: Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2011, **165**, 23-35.
- [37] Ibáñez C., Simó C., García-Cañas V., Cifuentes A., Castro-Puyana M.: Metabolomics, peptidomics and proteomics applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry in foodomics: A review. *Anal. Chim. Acta*, 2013, **802**, 1-13.
- [38] de la Iglesia D., Garcia-Remesa M., de la Calle G., Kulikowski C., Sanz F., Maojo V.: The impact of computer science in molecular medicine: enabling high-throughput research. *Curr. Topics Med. Chem.*, 2013, **13**, 526-575.
- [39] Iwaniak A.: Analiza zależności między strukturą peptydów pochodzących z białek żywności a ich aktywnością inhibitorową wobec enzymu konwertującego angiotensynę. Ocena przydatności metod *in silico* w badaniach nad białkowymi prekursorami bioaktywnych peptydów. Wyd. UWM, Olsztyn 2011.
- [40] Iwaniak A., Minkiewicz P., Darewicz M.: Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2014, **13**, 114-134.
- [41] Jimsheena V.K., Gowda L.R.: Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion. *Food Chem.*, 2011, **125**, 561-569.
- [42] Jing P., Qian B., Hea Y., Zhao X, Zhang J., Zhao D., Lv Y., Deng Y.: Screening milk-derived anti-hypertensive peptides using quantitative structure activity relationship (QSAR) modelling and *in vitro/in vivo* studies on their bioactivity. *Int. Dairy J.*, 2014, **35**, 95-101.
- [43] Kašička V.: Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2011–2013). *Electrophoresis*, 2014, **35**, 69-95.
- [44] Kawashima S., Pokarowski P., Pokarowska M., Koliński A., Katayama T., Kanehisa M.: AAindex: amino acid index database, progress report 2008. *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, D202-D205.
- [45] Kim H.O., Li-Chan E.C.Y., Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **64**, 10102-10111.
- [46] Korhonen H.: Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Funct. Foods*, 2009, **1**, 177-187.
- [47] Korhonen H., Pihlanto A.: Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.*, 2006, **16**, 945-960.
- [48] Krokhin O.: Peptide retention prediction in reversed-phase chromatography: Proteomic applications. *Expert Rev. Proteom.*, 2012, **9**, 1-4.
- [49] Kulkarni S.B., Betageri G.V., Singh M.: Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *J. Microencapsulation*, 1995, **12**, 229-246.
- [50] Kurtz T.W., Curtis Morris R. Jr., Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 1987, **10**, 128-131.
- [51] Lasoń E., Ogonowski J.: Kapsułkowanie - metoda immobilizacji materiałów bioaktywnych. *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania*, 2010, **15 (1)**, 29-35.
- [52] Lasoń E., Ogonowski J.: Kapsułkowanie w przemyśle spożywczym. *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania*, 2010, **15 (3)**, 34-40.

- [53] Lata S., Sharma B.K., Raghava G.P.S.: Analysis and prediction of antibacterial peptides. BMC Bioinform., 2007, **8**, article 263.
- [54] Lau C.C., Abdullah N., Shuib A.S.: Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from an edible mushroom, *Pleurotus cystidiosus* O.K. Miller identified by LC-MS/MS. BMC Compl. Alternative Med., 2013, **13**, article 313.
- [55] Lau C.C., Abdullah N., Shuib A.S., Aminudin N.: Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from edible mushroom *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) imbach identified by LC-MS/MS. Food Chem., 2014, **148**, 396-401.
- [56] Lothrop A.P., Torres M.P., Fuchs S.M.: Deciphering post-translational modification codes. FEBS Lett., 2013, **587**, 1247-1257.
- [57] Ma B., Johnson R.: *De novo* sequencing and homology searching. Mol. Cell. Proteom., 2012, **11**, article 10.1074/mcp.O111.014902-1.
- [58] Maeno M., Nakamura Y., Mennear J.H., Bernard B.K.: Studies of the toxicological potential of tripeptides (L-valyl-L-prolyl-L-proline and L-isoleucyl-L-prolyl-L-proline): III. Single- and/or repeated-dose toxicity of tripeptides-containing *Lactobacillus helveticus*-fermented milk powder and casein hydrolysate in rats. Int. J. Toxicol., 2005, **24**, 41-59.
- [59] Maldonado A.G., Doucet J.P., Petitjean M., Fan B.-Y.: Molecular similarity and diversity in chemoinformatics: From theory to applications. Mol. Divers., 2006, **10**, 39-79.
- [60] Martínez-Mayorga K., Medina-Franco J.L.: Chemoinformatics – application in food chemistry. Adv. Food Nutr. Res., 2009, **58**, 33-56.
- [61] Minkiewicz P., Bucholska J., Darewicz M., Borawska J.: Epitopic hexapeptide sequences from Baltic cod parvalbumin beta (allergen Gad c 1) are common in the universal proteome. Peptides, 2012, **38**, 105-109.
- [62] Minkiewicz P., Dziuba J., Darewicz M., Iwaniak A., Dziuba M., Nałęcz D.: Food peptidomics. Food Technol. Biotechnol., 2008, **46**, 1-10.
- [63] Minkiewicz P., Dziuba J., Darewicz M., Iwaniak A., Michalska J.: On line programs and databases of peptides and proteolytic enzymes – a brief update for 2007-2008. Food Technol. Biotechnol., 2009, **47**, 345-355.
- [64] Minkiewicz P., Dziuba J., Iwaniak A., Dziuba M., Darewicz M.: BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. J. AOAC Int., 2008, **91**, 965-980.
- [65] Minkiewicz P., Miciński J., Darewicz M., Bucholska J.: Biological and chemical databases for research into the composition of animal source foods. Food Rev. Int., 2013, **29**, 321-351.
- [66] Mooney C., Haslam N.J., Pollastri G., Shields D.C.: Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. PLoS ONE, 2012, **7**, article e45012.
- [67] Moreno F.J.: Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity. Biomed. Pharmacother., 2007, **61**, 50-60.
- [68] Murray B.A., Walsh D.J., FitzGerald R.J.: Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. J. Biochem. Biophys. Methods, 2004, **59**, 127-137.
- [69] Nag O.K., Awasthi V.: Surface engineering of liposomes for stealth behavior. Pharmaceutics, 2013, **5**, 542-569.
- [70] Nakahara T., Sugimoto K., Sano A., Yamaguchi H., Katayama H., Uchida R.: Antihypertensive mechanism of a peptide-enriched soy sauce-like seasoning: the active constituents and its suppressive effect on renin-angiotensin-aldosterone system. J. Food Sci., 2011, **76**, H201-H206.
- [71] Panchoaud A., Affolter M., Kussmann M.: Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects. J. Proteom., 2012, **75**, 3546-3559.

- [72] Piasecka A., Moderska K.: Mikrokapsulacja białek – metody i zastosowanie. *Biotechnologia*, 2010, **1 (88)**, 34-45.
- [73] Picariello G., Mamone G., Nitride C., Addeo F., Ferranti P.: Protein digestomics with integrated platforms to study food-protein digestion and derived functional and active peptides. *Trends Anal. Chem.*, 2013, **52**, 120-134.
- [74] Pihlanto A., Mäkinen S.: Antihypertensive properties of plant protein derived peptides. In: *Bioactive food peptides in health and disease*. Eds. B. Hernández-Ledesma, C.-C. Hsieh, InTechOpen, Rijeka 2013, pp. 145-182.
- [75] Ponstein-Simarro Doorten A.Y., vd Wiel J.A.G., Jonker D.: Safety evaluation of an IPP tripeptide-containing milk protein hydrolysate. *Food Chem. Toxicol.*, 2009, **47**, 55-61.
- [76] Pripp A.H.: Quantitative structure-activity relationship of prolyl oligopeptidase inhibitory peptides derived from  $\beta$ -casein using simple amino acid descriptors. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 224-228.
- [77] Pripp A.H., Isaksson T., Stepaniak L., Sørhaug T.: Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *Eur. Food Res. Technol.*, 2004, **219**, 579-583.
- [78] Pripp A.H., Isaksson T., Stepaniak L., Sørhaug T., Ardö Y.: Quantitative structure activity relationship modelling of peptides and proteins as a tool in food science. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **16**, 484-494.
- [79] Qureshi A., Thakur N., Tandon H., Kumar M.: AVPdb: a database of experimentally validated antiviral peptides targeting medically important viruses. *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, D1147-D1153.
- [80] Qureshi T.M., Vegarud G.E., Abrahamsen R.K., Skeie S.: Characterization of the Norwegian autochthonous cheese Gamalost and its angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity during ripening. *Dairy Sci. Technol.*, 2012, **92**, 613-625.
- [81] Rajam R., Karthik P., Parthasarathi S., Joseph G.S., Anandharamakrishnan C.: Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *J. Funct. Foods*, 2012, **4**, 891-898.
- [82] Ruiz Ruiz J.C., Segura-Campos M.R., Betancur-Ancona D.A., Chel-Guerrero L.A.: Encapsulation of *Phaseolus lunatus* protein hydrolysate with angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. *Biotechnology*, 2013, article 341974.
- [83] Ryan J.T., Ross R.P., Bolton D., Fitzgerald G.F., Stanton C.: Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 2011, **3**, 765-791.
- [84] Sagardia I., Roa-Ureta R.H., Bald C.: A new QSAR model, for angiotensin I-converting enzyme inhibitory oligopeptides. *Food Chem.*, 2013, **136**, 1370-1376.
- [85] Sánchez-Rivera L., Martínez-Maqueda D., Cruz-Huerta E., Miralles B., Recio I.: Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides, *Food Res. Int.*, 2014, **63**, 170-181.
- [86] Sarmadi B.H., Ismail A.: Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 2010, **31**, 1949-1956.
- [87] Schlimme E., Meisel H.: Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung*, 1995, **39**, 1-20.
- [88] Schmidt A., Claassen M., Aebersold R.: Directed mass spectrometry: towards hypothesis-driven proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2009, **13**, 510-517.
- [89] Segura-Campos M., Chel-Guerrero L., Betancur-Ancona D., Hernandez-Escalante V.M.: Bioavailability of bioactive peptides. *Food Rev. Int.*, 2011, **27**, 213-226.
- [90] Sénéchal S., Kussmann M.: Nutriproteomics technologies and applications for identification and quantification of biomarkers and ingredients. *Proc. Nutr. Soc.*, 2011, **70**, 351-364.



- [91] Shtatland T., Guettler D., Kossodo M., Pivovarov M., Weissleder R.: PepBank – a database of peptides based on sequence text mining and public peptide data sources. *BMC Bioinform.*, 2007, **8**, article 280.
- [92] Stebelska K., Wyrozumska P., Grzybek M., Sikorski A.: Charakterystyka i medyczne zastosowanie konstrukcji liposomowych. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2002, **11**, 229-242.
- [93] Strona MetaComBio: Dostęp w Internecie [01.03.2014.]: <http://www.uwm.edu.pl/metachemibio/index.php/about-metacombio>.
- [94] Suder P., Silberring J. (Red.): *Spektrometria mas*. Wyd. UJ, Kraków 2006.
- [95] Théolier J., Fliss I., Jean J., Hammami R.: MilkAMP: a comprehensive database of antimicrobial peptides of dairy origin. *Dairy Sci. Technol.*, 2014, **94**, 181-193.
- [96] The UniProt Consortium: Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, D191-D198.
- [97] Todeschini R., Consonni V.: QSAR/QSPR Modeling. In: *Molecular descriptors for chemoinformatics*. Vol. I: Alphabetical listing. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2006, p. 153.
- [98] Udenigwe C.C.: Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends Food Sci. Technol.*, 2014, **36**, 137-143.
- [99] Udenigwe C.C., Aluko R.: Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food hydrolysates. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, **12**, 3148-3161.
- [100] Van Lancker F., Adams A., De Kimpe N.: Chemical modifications of peptides and their impact on food properties. *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 7876-7903.
- [101] Van Putten M.C., Frewer L.J., Gilissen L.J.W., Gremmen B., Peijnenburg A.C.M., Wichers H.J.: Novel foods and food allergies: a review of the issues. *Trends Food Sci. Technol.*, 2006, **17**, 289-299.
- [102] Vaucher R.A., de Souza da Motta A., Brandelli A.: Evaluation of *in vitro* cytotoxicity of the antimicrobial peptide P34. *Cell Biol. Int.*, 2010, **34**, 317-323.
- [103] Waghv F.H., Gopi L., Barai R.S., Ramteke P., Nizami B., Idicula-Thomas S.: CAMP: collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, D1154-D1158.
- [104] Weininger D.: SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *J. Chem. Inf. Computer Sci.*, 1988, **28**, 31-36.
- [105] Welch C. J., Wu N., Biba M., Hartman R., Brkovic T., Gong X., Helmy R., Schafer W., Cuff J., Pirzada Z., Zhou L.: Greening analytical chromatography. *Trends Anal. Chem.*, 2010, **29**, 667-680.
- [106] White B.L., Sanders T.H., Davis J.P.: Potential ACE-inhibitory activity and nanoLC-MS/MS sequencing of peptides derived from aflatoxin contaminated peanut meal. *LWT - Food Sci. Technol.*, 2014, **56**, 537-542.
- [107] Wu J., Aluko R.E., Nakai S.: Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4-10 amino acids residues. *QSAR Comb. Sci.*, 2006, **25**, 873-880.
- [108] Wynendaele E., Bronselaer A., Nielandt J., D'Hondt M., Stalmans S., Bracke N., Verbeke F., Van De Wiele C., De Tré G., De Spiegeleer B.: Quorumpeps database: chemical space, microbial origin and functionality of quorum sensing peptides. *Nucleic Acids Res.*, 2013, **41**, D655-D659.
- [109] Xie F., Smith R. D., Shen Y.: Advanced proteomic liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2012, **1261**, 78-90.
- [110] Yanrong R., Qiang W., Shaocheng C., Haiyan C.: Integrating computational modeling and experimental assay to discover new potent ACE-inhibitory peptides. *Mol. Inf.*, 2014, **33**, 43-52.
- [111] You L., Regenstein J.M., Liu R.H.: Optimization of hydrolysis conditions for the production of antioxidant peptides from fish gelatin using response surface methodology. *J. Food Sci.*, 2010, **75**, C582-C587.

[112] Zamyatnin A.A., Borchikov A.S., Vladimirov M.G., Voronina O.L.: The EROP-Moscow oligopeptide database. *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, D261-D266.

**BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES FROM FOOD PROTEINS: *IN SILICO*, *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDIES, APPLICATION ASPECTS, AND SAFETY EVALUATION**

S u m m a r y

Bioactive peptides present in foods may contribute to reducing the prevalence of chronic diseases. In foods, the peptides are usually released *via* enzymatic hydrolysis of proteins. In the paper, some selected analytical, chemometrics, and bioinformatics methods are presented, which are applied to evaluate the molecular and biological aspects of peptides derived from food proteins. There are also described methods to enhance the bioavailability of peptides as are some selected aspects of evaluating the safety. Understanding the molecular aspects of bioactive activity of peptides provides a basis for the progress in utilizing those compounds as components of foods that prevent the diet-related diseases.

**Key words:** food bioactive peptides, analytical methods, computer-aided sequence databases, chemometrics, bioavailability, and safety ☒