

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-71

IN SILICO И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ПОТЕНЦИАЛА ПЕПТИДООБРАЗОВАНИЯ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ БЕЛКОВ РАПСА***IN SILICO AND EXPERIMENTAL APPROACHES TO ASSESSING THE POTENTIAL OF PEPTIDE FORMATION DURING HYDROLYSIS OF RAPESEED PROTEINS**

И. А. Дегтярев, И. А. Фоменко

Российский биотехнологический университет, Москва

I.A. Degtyarev, I.A. Fomenko

Russian Biotechnological University, Moscow

✉ Ivand152@yandex.ru

Аннотация

Одним из предметов современных исследований является получение и изучение свойств биологически активных пептидов (БАП). БАП возможно получить из природных источников, в частности из белков рапса (*Brassica napus*), путем направленного гидролиза белков с использованием ферментных препаратов. Современные биоинформационные методы исследования позволяют осуществить отбор пептидов в полученных гидролизатах на основе прогнозируемой биологической активности.

Abstract

One of the subjects of modern research is the production and study of the properties of biologically active peptides (BAP). BAP can be obtained from natural sources, from rapeseed (*Brassica napus*) proteins, by targeted hydrolysis of proteins using enzyme preparations. Modern bioinformatic research methods make it possible to select peptides in the obtained hydrolysates based on the predicted biological activity.

Целью данной работы являлась разработка технологии направленного протеолиза белков рапса с образованием пептидов и дальнейшим определением биологической активности методами *in silico*, а также сравнение результатов моделирования процесса теоретического гидролиза с использованием инструментов биоинформатики и определения их потенциальной активности.

Материалы и методы

Ферментативный гидролиз проводили с использованием ферментных препаратов (ФП) Alcalase 2.4 L FG (Novozymes A/S, Дания), Sqzyme PS (Suntaq International Limited, Китай) и Neutral protease (Sunson Industry Group Co, Китай) до степени гидролиза белка 10 %. Идентификацию пептидов в гидролизатах, полученных после ферментативной обработки, осуществляли методом жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS с использованием масс-спектрометра Orbitrap Lumos Tribrid (Thermo Fisher Scientific, США) с последующей сортировкой пептидов по убыванию по принципу соотношения площади пика пептида к суммарной площади пиков всех определенным данным способом пептидов (рис. 1–3).

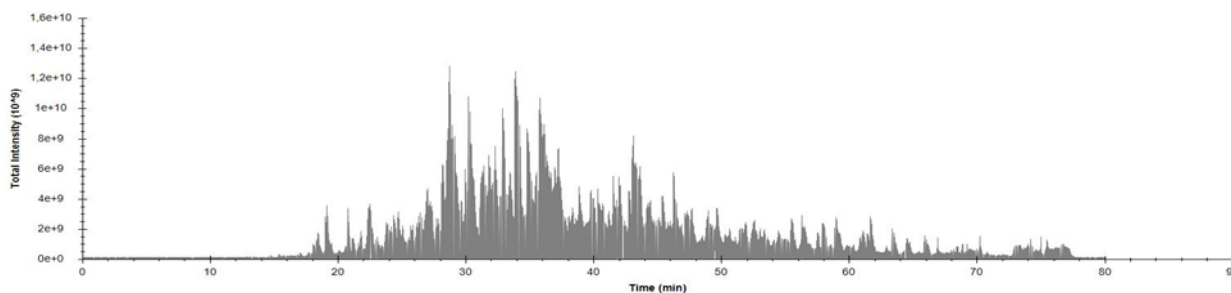


Рис. 1. Масс-спектры образца гидролизата белка рапса, полученного с использованием ФП Alcalase 2.4 L FG

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-16-00178).
© И. А. Дегтярев, И. А. Фоменко, 2025

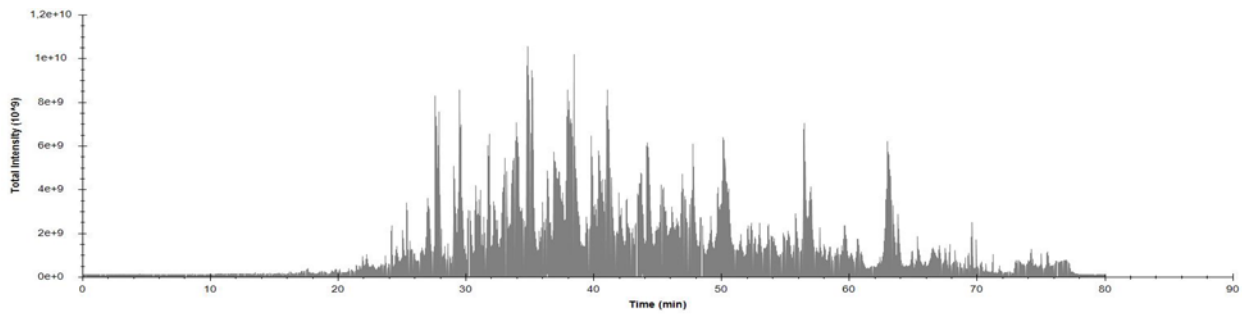


Рис. 2. Масс-спектры образца гидролизата белка рапса, полученного с использованием ФП Szyme PS

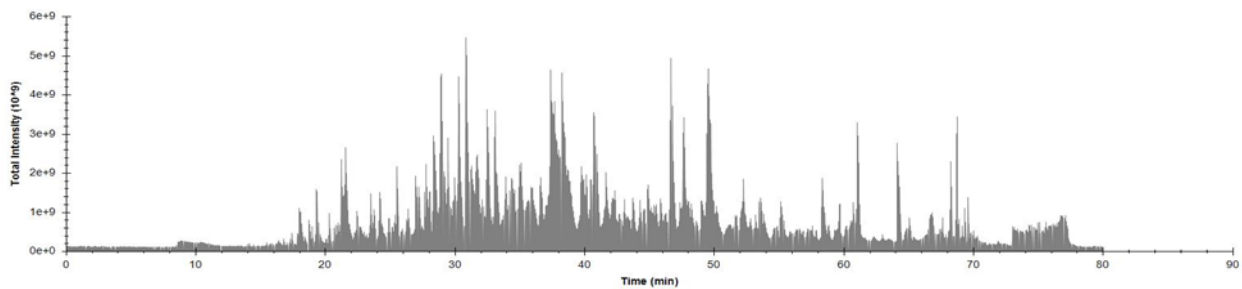


Рис. 3. Масс-спектры образца гидролизата белка рапса, полученного с использованием ФП Sunson neutral

В гидролизате, полученном с использованием ФП Alcalase 2.4 L FG, было определено 6667 пептидов, из которых отобраны 4 мажорных, в образце с ФП Szyme PS — 7678 пептидов, 3 из которых являются мажорными, а в образце с ФП Sunson neutral — 9034 пептида, из которых 6 являются мажорными. Отношение по площади под пиком для отсортированных пептидов составляло более 3 %. Далее провели прогнозирование *in silico* биологических активностей расшифрованных последовательностей мажорных пептидов с использованием инструментов баз данных BIOPEP-UWM, ToxinPred, AntiCP, AntiBP2, ANTPin и AntiTbPred. В результате было предсказано 13 пептидов со способностью ингибирования АПФ, противоопухолевой и гипогликемической активностями, 11 пептидов с потенциальными антиоксидантной и антигипертензивной активностями, 5 пептидов-ингибиторов α -глюкозидазы и 2 пептида с предполагаемыми антитромботическими свойствами.

Для проведения теоретического гидролиза аминокислотные последовательности белков рапса были получены в формате FASTA в базе данных UniProtKB. Поиск в данной БД был осуществлен на основе латинских наименований источников белков, а также по происхождению белка — Storage protein.

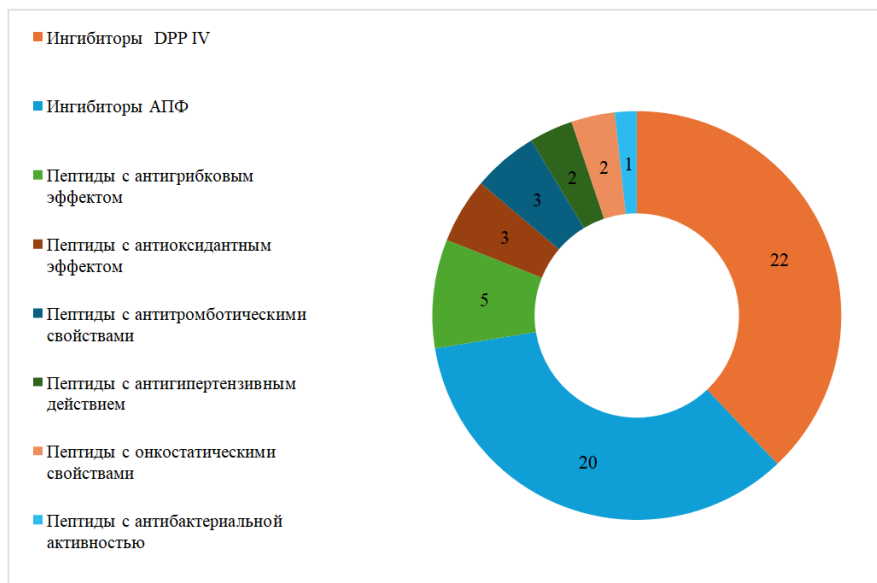


Рис. 4. Пептиды, полученные в результате исследования методом *in silico*

В рамках проекта РФФ № 25-16-00178 был проведен *in silico* протеолиз белков рапса с помощью инструмента Enzymes Action в базе данных BИОРЕР-UWM с использованием ферментов пепсина, рН > 2,0 (ЕС 3.4.23.1), трипсина (ЕС 3.4.21.4), протеиназы К (ЕС.3.4.21.67), папаина (ЕС 3.4.22.2) и бромелаина (ЕС 3.4.22.32). Для дальнейших исследований были отобраны пептиды, обладающие потенциальной биологической активностью. На рис. 4 изображено количество пептидов и их потенциальная активность после проведения исследования *in silico*. Из представленных данных видно, что результаты экспериментальных исследований в высокой степени коррелируют с данными, полученными в ходе исследования *in silico*.

Биоинформатические методы, включая виртуальный гидролиз и алгоритмы предсказания биологической активности, представляют собой известный инструмент в исследовании пептидов. Они позволяют быстро и без материальных затрат выявлять потенциально биологически активные пептиды на основе последовательности белков-предшественников. Проблема заключается в том, что прогнозы, основанные на биоинформатических моделях, зачастую не в полной мере соответствуют данным, полученным в ходе *in vitro* и *in vivo* исследований. Согласно виртуальному гидролизу и алгоритмам предсказания, пептиды должны обладать определенной биологической активностью, но в реальности могут проявлять ее в меньшей степени, отличаться по характеру активности или даже оказаться неактивными. Причины расхождения между виртуальными предсказаниями и экспериментальными данными лежат в сложности биологических систем и неполноте знаний о механизмах действия пептидов. Дополнение биоинформатических моделей данными экспериментальных исследований позволит в полной мере реализовать потенциал этих методов и повысить надежность прогнозов биологической активности пептидов, что откроет новые возможности для направленной разработки БАП с заданными свойствами.