

ALTERNATYWNE METODY OTRZYMYWANIA BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH BIAŁEK I PEPTYDÓW

Agnieszka Szmyt, Anna Dąbrowska, Józefa Chrzanowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Białka stanowią podstawowy materiał budulcowy wszystkich organizmów. Pełnią także szereg różnorodnych funkcji. Biologicznie aktywne białka oraz peptydy wykazują pozytywny wpływ na organizmy ludzi i zwierząt. Jednym z najlepszych źródeł biopeptydów jest żywność, zwłaszcza naturalnie bogata w białka. Tradycyjne metody pozyskiwania biopeptydów opierają się na hydrolizie enzymatycznej surowca białkowego, a następnie frakcjonowaniu i oczyszczaniu uzyskanych hydrolizatów. Do metod alternatywnych zalicza się syntezę chemiczną oraz techniki oparte na ekspresji heterologicznej genów kodujących docelowe sekwencje polipeptydowe. Ekspresja taka prowadzi do uzyskania rekombinowanych białek i peptydów. Technikę rekombinowanego DNA można wykorzystać do produkcji peptydów o aktywnościach immunologicznych, antyoksydacyjnych, antymikrobiologicznych, przeciwhipertensyjnych i wielu innych.

Słowa kluczowe: białka, peptydy, białka rekombinowane, biopeptydy, aktywność biologiczna, ekspresja heterologiczna, *Escherichia coli*

WSTĘP

Białka stanowią podstawowy materiał budulcowy każdego żywego organizmu oraz są niezbędne w przebiegu wszelkich procesów metabolicznych. Występują one w każdej jednostce systematycznej, począwszy od najprostszych prokariotów aż do złożonych organizmów eukariotycznych [Cozzone 2002]. Ich obecność stwierdzono także u wirusów. Białka są naturalnymi polimerami zbudowanymi z 20 podstawowych reszt aminokwasowych połączonych ze sobą wiązaniem peptydowym, utworzonym pomiędzy alfa-karboksyłową grupą pierwszego aminokwasu oraz grupą alfa-aminową drugiego aminokwasu [Cieplak, Sienkiewicz 2004]. W ten sposób formowany jest łańcuch polipeptydowy,

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Agnieszka Szmyt, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, e-mail: a.tatomir.szmyt@gmail.com

którego organizacja przestrzenna ma uporządkowany charakter. W zależności wielkości, a także ewentualnej budowy podjednostkowej wyróżniamy peptydy oraz białka.

Peptydy składają się najczęściej z mniej niż 100 aminokwasów. Dzieli się je ze względu na wielkość na dipeptydy, tripeptydy, tetrapeptydy itp. oraz na oligopeptydy, czyli cząsteczki utworzone z większej liczby aminokwasów (10–20) [Lintner 2010, Hu 2011]. Białka zbudowane są zaś z łańcuchów znacznie dłuższych, powyżej 100 aminokwasów i często składają się z podjednostek [Hu 2011]. Struktura białek jest hierarchiczna i według Lindestroma-Langa dzieli się na cztery poziomy molekularnego uporządkowania [Lindestrom-Lang 1952, Scheraga 1992]. Kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym decyduje o strukturze pierwszorzędowej białka. Sekwencja aminokwasowa determinuje także strukturę drugorzędową (alfa-helisa, beta-kartka) oraz trzeciorzędową (oddziaływania pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów). W przypadku białek złożonych wyróżnia się strukturę czwartorzędową, czyli przestrzenne rozmieszczenie poszczególnych podjednostek białkowych, będących odrębnymi łańcuchami polipeptydowymi.

BIOLOGICZNIE AKTYWNE BIAŁKA I PEPTYDY

Zarówno białka, jak i peptydy pełnią szereg funkcji biologicznych uzależnionych od ich struktury [Shenoy, Jayarama 2010]. Poza funkcją typowo budulcową, jak w przypadku białek strukturalnych, pełnią one rolę biologicznych katalizatorów (wszystkie enzymy poza rybozymami), transporterów, związków sygnałnych, umożliwiają kontakt pomiędzy komórkami i ich przyleganie do powierzchni, a także odgrywają ważną rolę w mechanizmach odpornościowych oraz cyklu komórkowym [Demain, Veishnay 2009]. Ostatnie 30 lat to ogromny postęp w badaniach strukturą i funkcjami białek [Kelly i in. 2005]. Podział białek ze względu na [na podstawie Ratnaparkhi i in. 2011]:

Pełnią funkcję:

- enzymy (polimerazy, hydrolazy, oksyreduktazy),
- hormony (enzdorfiny, adrenalina),
- białka transportowe (hemoglobina, cytochrom C),
- białka motoryczne (aktyna, miozyna),
- białka strukturalne (kolagen, elastyna),
- białka odpornościowe (przeciwciała, interferon, cytokiny),
- receptory (nikotynowe, muskarynowe),
- białka sygnałne (GTPaza),
- białka zapasowe (owoalbumina, kazeina).

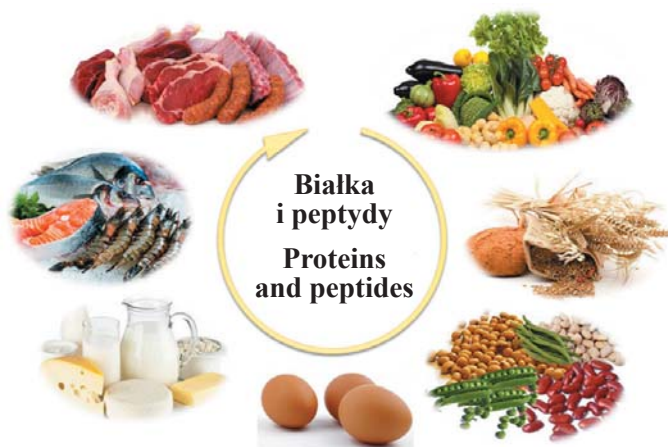
Lokalizację w przestrzeni komórkowej:

- białka błonowe,
- białka cytoplazmatyczne,
- białka sekrecyjne (związane z błoną komórkową oraz niezwiązane zewnątrzkomórkowe).

Modyfikacje postranslacyjne:

- białka natywne (bez modyfikacji),
- modyfikacje (glikozylacja, fosforylacja, lipidacja, hydroliza, acetylacja, formowanie mostków disiarczkowych itp.).

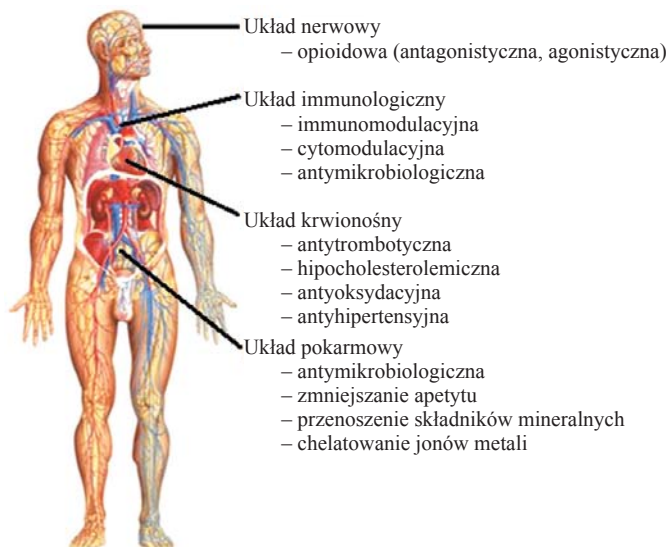
Białka stanowią także bardzo ważny komponent codziennej diety ludzi i zwierząt. Okazuje się bowiem, że niezależnie od swojej funkcji pełnionej w naturalnym miejscu występowania białka może ono także wykazywać funkcjonalność jako biologicznie aktywny składnik pożywienia. Badania ostatnich lat dostarczyły sporo dowodów na istnienie biologicznie aktywnych peptydów i białek, jako integralnych składników żywności, zwłaszcza naturalnie bogatej w proteiny (rys. 1) [Korhonen, Pihlanto 2006]. Termin „aktywność biologiczna” w tym przypadku oznacza aktywność zbliżoną do naturalnego hormonu albo też określonego związku leczniczego, w wyniku której dochodzi do wywołania pozytywnej odpowiedzi fizjologicznej w ustroju [Fitzgerald, Murray 2006]. Ważne, aby określony efekt biologiczny był mierzalny na fizjologicznie realistycznym poziomie [Moller i in. 2008].



Rys. 1. Żywność bogata w białka: mięso, ryby, nabiał, jaja, warzywa strączkowe, zboża, owoce i warzywa [opracowanie własne]

Fig. 1. Food rich in proteins: meat, fish, dairy products, eggs, legumes, cereals, fruits and vegetables [own work]

Peptydy aktywnie biologicznie to specyficzne fragmenty większych cząsteczek, które wykazują pozytywny wpływ na funkcjonowanie oraz kondycję organizmu, w tym na człowieka [Moller i in. 2008, Udenigwe, Aluko 2012, Perez Espitia i in. 2012]. Ujawniają one swoje właściwości dopiero po uwolnieniu z cząsteczki macierzystego łańcucha białkowego i wykazują takie funkcje, jak: aktywność antymikrobiologiczna, antyhipertensyjna (inhibitory konwertazy angiotensyny – ACE), przeciwutleniająca, przeciwtrombotyczna czy immunomodulacyjna (rys. 2) [Fitzgerald, Murray 2006, Szerszunowicz, 2014]. Związki te mogą także przenikać barierę krew – mózg i oddziaływać na układ nerwowy jako agoniści lub antagoniści receptorów opioidowych bądź też wykazywać zdolność do chelatowania jonów metali [Hartmann, Meisel 2007]. Uwolnienie biopeptydów następuje w wyniku ograniczonej proteolizy *in vivo* enzymami występującymi naturalnie w przewodzie pokarmowym lub hydrolizy *in vitro* z udziałem proteaz pochodzenia mikrobiologicznego, roślinnego czy też zwierzęcego [Korhonen, Pihlanto 2006, Choi i in. 2011].



Rys. 2. Możliwe aktywności wykazywane przez biopeptydy pochodzące z żywności [opracowanie własne]

Fig. 2. Possible activities exhibited by food-derived biopeptides [own work]

POZYSKIWANIE BIAŁEK I PEPTYDÓW

Tradycyjne metody pozyskiwania biologicznie aktywnych białek i peptydów opierają się na hydrolizie surowca białkowego *in vitro*. W tym celu stosuje się czyste preparaty enzymatyczne lub też prowadzi proces fermentacji mikrobiologicznej, w którym wykorzystuje się całe komórki mikroorganizmów jak bakterie, drożdże lub grzyby strzępkowe [Hippkiss, Brownson 2000, Ingham, Moore 2007]. Uzyskaną mieszaninę peptydów poddaje się następnie frakcjonowaniu, np. z wykorzystaniem techniki chromatografii ultracieczowej HPLC [Hartmann, Meise 2007, del Mal Contreras i in. 2008, Danquah, Agyei 2012, Udenigwe, Aluko 2012]. Strategia taka jest obciążona szeregiem trudności, począwszy od pozyskania czystego surowca białkowego, uzyskania preparatu enzymatycznego (nie wszystkie proteazy są dostępne komercyjnie), a także złożonym i wieloetapowym procesem izolacji i oczyszczania poszczególnych frakcji peptydowych czy pojedynczego biopeptydu. Nie zawsze też czystość preparatu końcowego jest zadowalająca, dlatego stosowanie takiej procedury w skali przemysłowej jest mało opłacalne. Jednakże taka technika niesie ze sobą dużą wartość poznawczą.

Alternatywne metody pozyskiwania biologicznie aktywnych białek i peptydów obejmują syntezę chemiczną oraz biosyntezę opartą na zastosowaniu żywych komórek i całych organizmów (rośliny i zwierzęta transgeniczne) [Gill i in. 1995, Guzman i in. 2007]. Synteza chemiczna jest dość powszechnie wykorzystywana do otrzymywania biopeptydów zarówno w skali laboratoryjnej, jak i przemysłowej, w tym peptydów terapeutycznych. Jest to technika szybka (czas przyłączenia reszty aminokwasowej wynosi 20–60 min), umożliwia otrzymanie łańcuchów do 80 aminokwasów [Guzman i in. 2007]. Dużą zaletą tej metody jest możliwość wprowadzenia do syntezowanego łańcucha polipep-

tydowego aminokwasów niebiałkowych oraz automatyzacja całego procesu za pomocą syntezatorów [Nilsson i in. 2005, Frączak, Olma 2014]. Wśród metod syntezy chemicznej polipeptydów wyróżnia się syntezę w roztworze (SPS – *solution-phase synthesis*), syntezę na podłożu stałym (SPPS – *solid-phase peptide synthesis*), syntezę hybrydową łączącą w sobie SPS i SPPS oraz syntezę chemoselektywną [Kamysz 2011, Goodwin i in. 2012, Frączak, Olma 2014]. Mimo wielu zalet przemawiających za popularnością syntezy chemicznej polipeptydów metoda ta jest obciążona kilkoma wadami. Głównym ograniczeniem syntezy chemicznej jest tendencja do agregacji łańcuchów polipeptydowych dłuższych niż 20 aminokwasów, zwłaszcza bogatych w reszty hydrofobowe, co uniemożliwia dalsze wydłużenie produktu. Technika ta wymaga także stosowania grup ochronnych przyłączanych aminokwasów, które muszą zostać następnie usunięte. Wiąże to się także z zastosowaniem drogich odczynników, często niebezpiecznych dla środowiska [Nilsson i in. 2005, Guzman i in. 2007, Frączak, Olma 2014]. Problematiczne jest także całkowite usunięcie chemicznych zanieczyszczeń oraz niespecyficznych peptydów w gotowym produkcie, przez co synteza chemiczna polipeptydów jest procesem kosztownym [Kamysz 2011].

BIALKI I PEPTYDY REKOMBINOWANE

Biosynteza białek i peptydów, w tym wykazujących aktywność biologiczną, należy do strategii alternatywnych wobec pozyskiwania ich na drodze proteolizy. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu żywych układów biologicznych jako producentówżądanego łańcucha polipeptydowego. Proces ten jest najczęściej realizowany na drodze ekspresji heterologicznej określonego genu lub jego fragmentu, czyli na podstawie techniki rekombinowanego DNA. Efekt taki uzyskuje się poprzez transformację genetyczną, czyli wprowadzeniu obcego genu do komórek biorcy [Griffith 1928, Gietz, Woods 2001]. Prowadzi to do nabycia przez transformowane komórki zdolności do produkcji obcego, czyli heterologicznego białka. Gospodarzem do produkcji białek i peptydów rekombinowanych może zostać niemal każda żywa komórka, od najprostszych organizmów prokariotycznych, poprzez jednokomórkowe drożdże i grzyby, aż do zaawansowanych systemów wyższych eukariontów, jak komórki owadzie, ssacze czy linie nowotworowe. Listę najczęściej stosowanych systemów ekspresji heterologicznej zamieszczono w tabeli 1.

Projekt optymalnego i efektywnego systemu do celów produkcji rekombinowanych białek jest procesem złożonym i obejmuje kilka kluczowych etapów [Celik, Calik 2012]:

1. Dobór gospodarza, w którym możliwa będzie ekspresja docelowego genu oraz jego ewentualna modyfikacja postranslacyjna;
2. Wybór wektora ekspresyjnego (episomalnego lub integralnego), zawierającego odpowiedni promotor (konstitutywny, indukowany), terminator oraz marker selekcyjny;
3. Optymalizacja kodonów w genie (*codon bias*) ze względu na degenerację kodu genetycznego oraz związaną z tym dostępność określonego tRNA w komórkach gospodarza [Gustafsson i in. 2004];
4. Fuzja genu ze znacznikami ułatwiającymi oczyszczanie białka, zwiększającymi rozpuszczalność produktu lub jego szybkość detekcję (np. ogonek poli-histydynowy, fuzja z białkiem NusA, Trx, MBP czy GFP);

5. Wprowadzenie ewentualnej sekwencji sygnałnej, kierującej białko do różnych kompartmentów komórkowych lub promujących sekrecję białka;
6. Ochrona proteolityczna gotowego produktu (wykorzystanie szczepów delecyjnych, niezdolnych do produkcji niektórych wewnątrzkomórkowych proteaz, deponowanie białka w postaci ciał inkluzyjnych);
7. Optymalizacja medium hodowlanego, zapewniającego odpowiednie warunki procesu (źródło węgla i azotu, zasolenie, suplementacja auktotrofii, warunki ewentualnej indukcji);
8. Optymalizacja parametrów procesu (temperatura, pH, poziom natlenienia).

Tabela 1. Prokariotyczne i eukariotyczne systemy ekspresyjne.

Table 1. Prokaryotic and eukaryotic expression systems

Systemy ekspresyjne – Expression systems	
Bakterie – Bacteria	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Caulobacter crescentus</i> , <i>Streptomyces lividans</i>
Drożdże – Yeast	<i>Saccharomyces cerevisia</i> , <i>Pichia pastoris</i> , <i>Kluyvieromyces lactis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Zygosaccharomycetes bailii</i> , <i>Hansenula polymorpha</i>
Grzyby strzępkowe Filamentous fungi	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma reesei</i>
Pierwotniaki – Protozoa	<i>Leishmania tarentolae</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>Dictyostelium discoideum</i>
Glony – Algae	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Dunaleilla salina</i>
Komórki owadzie (systemy bakulowirusowe) Insect cells (baculovirus systems)	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf-9, Sf-21), <i>Trichoplusia ni</i> (Hi-5), <i>Drosophila melanogaster</i> (S2)
Ssacze linie komórkowe Mammalian cell lines	HeLa – <i>human cervican cancer</i> , HEK – <i>human embryonic kidney</i> , COS, Vero – <i>green African monkey kidney</i> , CHO – <i>Chinese hamster ovary</i> , BHK – <i>baby hamster kidney</i> , NSO – <i>mouse myeloma</i>
Rośliny transgeniczne Transgenic plants	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Lectuca sp.</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Oryza sativa</i> (Golden rice), <i>Lycopersicon sp.</i> (FlavrSavr tomato), <i>Glycine max</i> (Roundap Ready soybean), <i>Solanum sp.</i>
Zwierzęta transgeniczne Transgenic animals	<i>Pterophyllum sp.</i> , <i>Salmo salar</i> , <i>Sus scrofa</i> , <i>Bos taurus</i> , <i>Ovis aries</i> , <i>Capra hircus</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Oryctolagus cuniculus</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Camelus sp.</i> , <i>Canis lupus familiaris</i> , <i>Felis catus</i>

[Huisman i in. 1992, Van Valen, Maiorana 1991, Towers, Sattelle 2002, Mission i in. 2004, Sodayer 2004, Kushnir i in. 2005, Sanders, Hiatt 2005, Jarvis 2009, Rahbari i in. 2009, Rogalska i in. 2011, Niimi 2012, Unger, Peleg 2012, Jhansi Rani i in. 2013, Khan 2013; Natarajani in. 2013, Wheeler 2013, Kraeva i in. 2014]

[Huisman et al. 1992, Van Valen, Maiorana 1991, Towers, Sattelle 2002, Mission et al. 2004, Sodayer 2004, Kushnir et al. 2005, Sanders, Hiatt 2005, Jarvis 2009, Rahbari et al. 2009, Rogalska et al. 2011, Niimi 2012, Unger, Peleg 2012, Jhansi Rani et al. 2013, Khan 2013, Natarajani et al. 2013, Wheeler 2013, Kraeva i et al. 2014]

Mikroorganizmy stosuje się głównie jako producentów białek heterologicznych. Spośród nich obecnie najczęściej wykorzystuje się komórki Gram-ujemnej enterobakterii – *Escherichia coli*. Pałeczka okrężnicy jest pierwszym organizmem wykorzystanym w badaniach nad transformacją genetyczną, a także pierwszym systemem zastosowanym do komercyjnej produkcji biofarmaceutyku – rekombinowanej ludzkiej insuliny (Humulina, Eli Lilly and Co) [Casali 2003, Jarecka, Borowicz 2005, Sorensen, Mortensen 2005, Peti, Page 2007, Montgomery 2008, Ferrer-Miraller i in. 2009, Li 2011, Chen 2012,

Marisch i in. 2013, Fisher i in. 2014, Rosano, Ceccarelli 2014]. Bakteria ta charakteryzuje się bardzo dobrze poznaną genetyką oraz proteomiką, dlatego też stanowi organizm modelowy. Ponadto dostępny jest szeroki asortyment komercyjnych zestawów do ekspresji oraz oczyszczania ekspresjonowanego białka, co czyni cały proces szybkim i wysoce powtarzalnym. Główne wady oraz zalety *E. coli* jako systemu ekspresji heterologicznej przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wady i zalety systemu ekspresyjnego *Escherichia coli*
Table 2. Advantages and disadvantages of *Escherichia coli* expression system

Zalety – Advantages	Wady – Disadvantages
Bardzo dobrze poznana genetyka oraz proteomika	Brak procesów posttranslacyjnych
Well known genetics and proteomics	Lack of posttranslational modifications
Łatwość transformacji genetycznej i zdolność utrzymania plazmidu przez wiele generacji	Konieczność optymalizacji kodonów, zwłaszcza dla genów eukariotycznych
Easy transformation, plasmid stability through generations	Necessity of codon optimization
Szybki wzrost na niedrogich podłożach hodowlanych	Możliwość powstawania ciał inkluzyjnych
Quick growth on cheap medias	Formation of inclusion bodies
Bardzo szybka ekspresja oraz łatwość uzyskania nadekspresji białka	Możliwość zanieczyszczenia gotowego produktu endotoksynami (np. LPS)
Quick expression, easy to obtain overexpression	Possibility of contamination by enterotoxins (LPS)
Relatywnie niskie koszty prowadzenia procesu	Możliwość wywołania odpowiedzi immunologicznej przez fMet
Low cost of the process	Immunogenicity of fMet
Szeroki wybór komercyjnie dostępnych narzędzi oraz szczepów	
Wide range of genetic tools and hosts	

[Terpe 2006, Paliy, Gunasekera 2007, Demain, Vaishnav 2009]

Heterologiczna ekspresja białek i peptydów, w przypadku dobrze dopracowanych systemów i w zoptymalizowanych warunkach, jest procesem konkurencyjnym dla syntezy chemicznej. Jest to metoda szybka, pozwalająca na uzyskanie znacznych ilości polipeptydów. Umożliwia produkcję znacznie dłuższych sekwencji niż w przypadku syntezy chemicznej, a także łatwe przeniesienie procedury na skalę półtechniczną oraz przemysłową. Zastosowanie odpowiednich znaczników pozwala na nawet jednoetapowy proces oczyszczania. Manipulacja genetyczna w obrębie genu docelowego stwarza także szereg możliwości wprowadzania zmian, podnoszących np. biodostępność produktu, jego okres półtrwania czy zwiększający pożądaną aktywność biologiczną. Jest to także metoda konkurencyjna pod względem ekonomicznym. Wadą takiej strategii jest jednak konieczność każdorazowego optymalizowania warunków procesu, najczęściej w sposób empiryczny. Synteza biologiczna stwarza także trudności przy wprowadzaniu do łańcucha polipeptydowego aminokwasów niebiałkowych [Goodwin i in. 2012].

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach można zaobserwować znaczny wzrost wiedzy z zakresu biologicznej aktywności białek oraz peptydów, będących nieodłącznym składnikiem żywności spożywanej przez ludzi oraz zwierzęta. Biologicznie aktywne składniki wpisują się w szeroki trend tzw. żywności funkcjonalnej czy nutraceutyków. Udowodniono mierzalny wpływ

biopeptydów na kondycję organizmu. Są one w stanie oddziaływać na układ krwionośny, nerwowy, pokarmowy oraz immunologiczny, niosąc szereg właściwości prozdrowotnych dla jednostki. Pozyskiwanie biologicznie aktywnych białek i peptydów *in vitro* stwarza szereg możliwości wzbogacania codziennej diety ludzi oraz zwierząt w te składniki. Zwiększenie ich dostępności w przemyśle spożywczym znacznie ułatwia produkcję tzw. żywności funkcjonalnej, czyli specjalnego przeznaczenia żywieniowego. Możliwe jest także zastosowanie peptydów aktywnych biologicznie jako biofarmaceutyków. Peptydy charakteryzują się większą biodostępnością w porównaniu z całymi łańcuchami białkowymi czy pojedynczymi aminokwasami. Wykazują także znacznie mniejszą lub całkowity brak alergenicności w porównaniu z białkami natywnych [Sekhon 2010, Ratnaparkhi i in. 2011, Danquah, Agyei 2012].

Wszystkie z metod otrzymywania biopeptydów, tradycyjna czy też alternatywna, mają zarówno zalety, jak i wady, dlatego też brak jest uniwersalnej strategii, sprawdzającej się w przypadku otrzymywania dowolnego biopeptydu. Każdorazowo proces taki wymaga dokładnej analizy oraz przygotowania optymalnego układu doświadczalnego. Ważne jest także określenie bezpieczeństwa stosowania w przypadku wykorzystania danego białka lub peptydu jako składnika żywności czy też związku terapeutycznego.

PIŚMIENNICTWO

- Casali N., 2003. *Escherichia coli* host strains. *Methods in Molecular Biology*, 235, 27–48.
- Celik E., Calik P., 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 30, 1108–1118.
- Chen R., 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*, 30, 1102–1107.
- Choi J., Sabikhi L., Hassan A., Anand S. 2012. Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 65 (1), 1–2.
- Cieplak M., Sienkiewicz A., 2004. Białka [w:] *Encyklopedia Fizyki Współczesnej*, Wydawnictwo PWN SA, Warszawa, <http://aneksy.pwn.pl/efw/>.
- Cozzzone, A.J., 2002. *Proteins: Fundamental Chemical Properties* [in:] eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Danguah M.K., Agyei D., 2012. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnology*, 1 (2), 1–7.
- Demain A.L., Vaishnav P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27, 297–306.
- Ferrer-Miralles N., Domingo-Espin J., Corchero J.L., Vazquez E., Villaverde A., 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*, 8 (17).
- Fisher A.K., Freedman B.G., Bevan D.R., Senger R.S., 2014. A review of metabolic and enzymatic engineering strategies for designing and optimizing performance of microbial cell factories. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 11, 91–99.
- Frączak O., Olma A., 2014. Metoda O-acyloizopeptydowa w syntezie peptydów. *Wiadomości chemiczne*, 68, 1–17.
- Gietz R.D., Woods R.A., 2001. Genetic transformation of yeast. *Biotechniques*, 30 (4), 822–826.
- Gill I., Lopez-Fandino R.L., Jorba X., Vulfson E.N. 1996. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18 (3), 162–183.
- Goodwin D., Simerska P., Teth I., 2012. Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity. *Current Medical Chemistry*, 19, 4451–4461.
- Griffith F., 1928. The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene*, 27, 113–159.

- Gustafsson C., Govindarajan S., Minshull J., 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22, 346–353.
- Guzman F., Barberies S., Illanes A., 2007. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10 (2).
- Hartmann R., Meisel H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163–169.
- Hipkiss A.R., Brownson C., 2000. A possible new role for the ant-ageing peptide carnosine. *Cellular and Molecular Life Science*, 57 (5), 747–753.
- Hu G., 2011. Understanding the fundamentals of peptides and proteins. *Bioprocessing Journal*, 10 (1), 12–14.
- Huisman M.J., Cornellissen B.J.C., Jongedijk E., 1992. Transgenic potato plants resistant to viruses. *Euphytica*, 63, 187–197.
- Ingham A.B., Moore R.J., 2007. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 47, 1–9.
- Jarecka M., Borowia P., 2005. Terapeutyczne i rynkowe perspektywy rekombinowanych leków. *Biotechnologia*, 4 (71), 7–27.
- Jarvis D.L., 2009. Baculovirus-infected cell expression system. *Methods in Enzymology*, 463, 191–222.
- Jhansi Roni S., Usha R., 2013. Transgenic plants: types, benefits, public concern and future. *Journal of Pharmacy Research*, 6 (8), 879–883.
- Kamysz W., 2011. Pół wieku syntezy peptydów. *Laborant*, 2, 38–40.
- Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751, 119–139.
- Khan K.H., 2013. Gene expression in mammalian cells and its applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3 (2), 257–263.
- Korhonen H., Pihlanto A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945–960.
- Kraeva N., Ishemgulova A., Lukes J., Yurchenko V., 2014. Tetracycline-inducible gene expression system in *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 198 (1), 11–13.
- Kushnir S., Gase K., Breitling R., Alexandrov K., 2005. Development of an inducible expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein Expression and Purification*, 42 (1), 37–46.
- Lee D., Redfern O., Orengo Ch., 2007. Predicting protein function from sequence and structure. *Molecular Cell Biology*, 8, 995–1005.
- Li Y., 2011. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. *Protein Expression and Purification*, 80, 260–267.
- Linderstrom-Lang U.K., 1952. *Proteins and Enzyme*. Lane Medical Lectures, 6, Stanford, CA: Stanford University Publications, University Series, Medical Science.
- Lintner K., 2010. Peptides and protein, w *Cosmetics Dermatology: products and procedures*, (ed.) Draeos Z.D., Blackwell Publishing, 290–299.
- del Mar Contreras M., Lopez-Esposito I., Hernandez-Ledesma B., Ramos M., Recio I., 2008. Application of mass spectrometry to the characterisation and quantification of food-derived bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91 (4), 981–994.
- Marisch K., Bayer K., Cserjan-Puschmann M., Luchner M., Striedner G., 2013. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microbial Cell Factories*, 12 (58).
- Mission A., Kalantidis K., Boutla A., Tzortzakaki S., Tabler M., Tsagris M., 2004. Generation of transgenic potato plants high resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Molecular Breeding*, 14, 185–197.
- Montgomery S.A., 2008. Successful microbial expression systems. *BioProcess International*, 2–3.

- Natarajan S., Luthira D., Bae H., Lakshman D., Mitra A. 2013. Transgenic soybeans and soybean protein analysis: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (48), 11736–11743.
- Nilsson B.I., Soellner M.B., Raines R.T., 2005. Chemical synthesis of proteins. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structures*, 34, 91–118.
- Niimi T., 2012. Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: a review. *Methods in Molecular Biology*, 824, 307–315.
- Paliy O., Gunasekera T.S., 2007. Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1169–1172.
- Perez Espitia, P. J., de Fátima Ferreira Soares, N., dos Reis Coimbra, J. S., de Andrade, N. J., Souza Cruz, R. and Alves Medeiros, E.A., 2012. Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 187–204.
- Peti W., Page R., 2007. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expression and Purification*, 51: 1–10.
- Rahbari R., Sheahan T., Modes V., Collier P., Macfarlane C., Badge R.M., 2009. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *BioTechniques*, 46 (4), 277–284.
- Ratnaparkhi M.P., Chandhari S.P., Pandya V.A., 2011. Peptides and proteins in pharmaceuticals. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3 (2), 1–9.
- Rogalska T., Bay J.Ch., AbouHalder M., Hefferon K.L., 2011. Current status of plants as vaccine production platforms. *Clinical and Cellular Immunology*, S4, 003.
- Rosano G.L., Ceccarelli E.A. 2014. Recombinant protein expression in microbial systems. *Frontiers in Microbiology*, 5 (341), 1–2.
- Sanders R.A., Haitt W., 2005. Tomato transgene structure and silencing. *Native Biotechnology*, 3 (23), 287–289.
- Sekhon S.B., 2010. Biopharmaceuticals: an overview. *Thai Journal of Pharmaceutical Science*, 34, 1–19.
- Scheraga H.A., 1992. Contribution of physical chemistry to an understanding of protein structure and function. *Protein Science*, 1, 691–693.
- Shenoy S.R., Jayaram B., 2010. Proteins: sequence to structure and function- current status. *Current Protein and Peptide Science*, 11, 498–514.
- Sodoyer R., 2004. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *Biodrugs*, 18 (1), 51–62.
- Sorensen H.P., Mortensen K.K., 2005. Advances genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115, 113–128.
- Szarszunowicz I., 2014. Wpływ peptydów bioaktywnych uwalnianych z białek mleka krowiego na układ krwionośny. *Innowacyjne mleczarstwo*, 2 (1), 4–12.
- Terpe K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 211–222.
- Towers P.R., Sattelle D.B., 2002. A *Drosophila melanogaster* cell line (S2) facilitates post-genome functional analysis of receptors and ion channels. *BioEssays*, 24 (11), 1066–1073.
- Udenigwe Ch.C., Aluko R.E., 2012. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 71 (1), R11-R24.
- Unger T., Peleg Y., 2012. Recombinant protein expression in the baculovirus-infected insect cell system. *Methods in Molecular Biology*, 800, 187–199.
- Van Valen L.M., Maiorana V.C., 1991. HeLa, a new microbial species. *Evolutionary Theory & Review*, 10, 71–74.
- Wheeler M.B., 2013. Transgenic animals in agriculture. *Nature Education Knowledge*, 4 (11), 1.

ALTERNATIVE METHODS FOR THE BIOACTIVE PROTEINS AND PEPTIDES PREPARATION

Abstract. Proteins are the main building components of all living organisms. They show many different functions and may be a source of biologically active peptides which express a positive impact on living organisms. One of the best sources of biopeptides is food, naturally rich in protein. Common methods for obtaining biopeptides are often based on the enzymatic hydrolysis of precursor protein, fractioning and purification of the hydrolysate. The alternative approach is chemical synthesis and techniques based on the heterological expression of peptides coding sequences. The expression is used for production peptides with many different activities i.e. immunomodulating, antioxidant, antimicrobial, antihypertensive and many others.

Key words: proteins, peptides, recombinant proteins, biopeptides, biological activity, heterologous expression, *Escherichia coli*

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.11.2015

Do cytowania – For citation: Szmyt A., Dąbrowska A., Chrzanowska J., 2015. Alternatywne metody otrzymywania biologicznie aktywnych białek i peptydów, *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 14 (3), 33–44.

