

## STRESZCZENIE

### **Białka polędwicy wieprzowej surowo dojrzewającej jako potencjalne źródło bioaktywnych peptydów - badania *in silico* i *in vitro***

W oparciu o dokonany przegląd dotychczasowego stanu wiedzy postawiono następującą hipotezę badawczą: Białka wieprzowej surowej polędwicy dojrzewającej są potencjalnym źródłem bioaktywnych peptydów.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie potencjału białek surowej polędwicy dojrzewającej jako prekursorów biologicznie aktywnych peptydów oraz ocena możliwości jego kształtowania poprzez zastosowanie probiotycznych (*Lactobacillus rhamnosus* LOCK900; oraz *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) i potencjalnie probiotycznych (*Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł0938) szczepów bakterii kwasu mlekowego jako kultur startowych.

Weryfikacji tak sformułowanych założeń badawczych dokonano poprzez trzy cele podrzędne: (I) określenie wpływu czasu dojrzewania na aktywność biologiczną peptydów wieprzowej surowej polędwicy dojrzewającej; (II) określenie wpływu enzymatycznej hydrolizy pepsyną i pankreatyną oraz symulowanego wchłaniania *in vitro* na aktywność biologiczną peptydów wieprzowej surowej polędwicy dojrzewającej oraz (III) określenie wpływu probiotycznych oraz potencjalnie probiotycznych szczepów bakterii kwasu mlekowego na aktywność biologiczną peptydów wieprzowej surowej polędwicy dojrzewającej.

Podejście prezentowane w załączonych pracach polega na określeniu związku między procesem dojrzewania a aktywnością biologiczną peptydów uwalnianych podczas dwunastomiesięcznego (360 dni) dojrzewania polędwic wieprzowych. Podczas projektowania hipotezy badawczej zakładano, że zastosowanie różnych szczepów bakterii kwasu mlekowego jako kultur startowych może generować specyficzne sekwencje peptydów o właściwościach przeciwutleniających i hamujących działanie enzymu - konwertazy angiotensyny. Biologicznie aktywne sekwencje oceniano także podczas dwuetapowej enzymatycznej hydrolizy i symulowanej absorpcji *in vitro*. Analizy *in vitro* poprzedzono szczegółowym przeglądem literatury oraz analizą *in silico*.

Szczegółową charakterystykę aktywnych biologicznie peptydów pochodzących z mięsa i surowych dojrzewających wyrobów mięsnych oraz potencjalne możliwości ich wykorzystania w kontekście produkcji żywności funkcjonalnej opisano w pracy (I) pt. „Meat and fermented meat products as a source of bioactive peptides”. W opracowaniu przedstawiono definicję biologicznie aktywnych peptydów, opisano warunki ich powstawania z naciskiem na ich produkcję i występowanie w fermentowanych produktach mięsnych oraz dokonano ogólnej charakterystyki peptydów w kontekście ich różnorodnej bioaktywności i możliwych skutków prozdrowotnych powodowanych ich obecnością.

Ponieważ wśród różnych aktywności biopeptydów, inhibitory konwertazy angiotensyny I i peptydy antyoksydacyjne są najczęściej opisywane, te dwie grupy aktywności biologicznej peptydów rozpatrywano w dalszych analizach (IV i V).

W pracach II oraz III przedstawiono podejście *in silico* (w oparciu o bazę danych BIOPEP-UWM), w którym wybrane wieprzowe białka mięśniowe przedstawiono jako potencjalne źródła peptydów o wybranych aktywnościach, tj. prekursorzy smaku (II) jak również wskazując na ich potencjalne wielokierunkowe działania biologiczne (III). W opracowaniu II wskazano na białka miofibrylarne jako kluczowe w kształtowaniu profilu sensorycznego surowych wieprzowych wyrobów dojrzewających. W szczególności miozyna-2 okazała się dobrym prekursorem peptydów i aminokwasów aktywnych smakowo, odpowiedzialnych w największym stopniu za gorzkie, umami i kwaśne wrażenia smakowe. Podkreślono także rolę peptydów w supresji (kwasowości i słodczy) i uwydatnieniu (słony i umami) smaku, czego nie zaobserwowano w przypadku aminokwasów. Troponina T, była jedynym źródłem składników hamujących kwaśny smak.

Analizy *in silico* przedstawione w publikacji III przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszej kolejności oceniono potencjał nienaruszonych (jako całe cząstki) białek mięśniowych, a następnie sekwencje białek poddano hydrolizie *in silico* enzymami proteolitycznymi, tj. pepsyną, tripsyną oraz chymotrypsyną (jednoetapowo). W oparciu o pierwszą część doświadczenia potwierdzono obecność peptydów o łącznie 25 różnych potencjalnych aktywnościach biologicznych obecnych w strukturze analizowanych białek, co potwierdza przepuszczenie o wysokim potencjale mięsa i wyrobów mięsnych do modulowania fizjologicznych funkcji organizmu ludzkiego. Spośród nich, aktywność hamująca działanie enzymów: dipetydylo peptydazy IV oraz konwertazy angiotensyny I jak również aktywność przeciwutleniająca była najczęściej określana (III). Dalsze badania dotyczące hydrolizy *in silico* sekwencji białek ujawniły, że pod wpływem kombinacji zastosowanych enzymów trawiennych mogą być uwalniane peptydy potencjalnie wpływające na organizm ludzki, niemniej jednak zaobserwowano utratę potencjału peptydów w zakresie oferowanej aktywności biologicznej w wyniku działania enzymów w porównaniu do nienaruszonych sekwencji białek. Wśród badanych białek miofibrylarnych, miozyna-2 i nebulina są najbogatszym potencjalnym źródłem fragmentów wykazujących w szczególności zdolność do hamowania działania dipeptydylo peptydazy IV oraz konwertazy angiotensyny po hydrolizie *in silico*. Miozyna-2 była również prekursorem dużej liczby peptydów antyoksydacyjnych. Zauważono również, że więcej niż jedna aktywność może być przypisana do danej sekwencji peptydowej (III). Obserwacje te weryfikowano analizami w ramach procedury *in vitro*.

Podjęto próbę oceny aktywności biologicznej ekstraktów białek otrzymanych z surowej polędwicy dojrzewającej (IV i V). Analizy przeprowadzono na różnych etapach procesu produkcyjnego (to jest po 28, 90, 180, 270 i 360 dniach dojrzewania). Ekstrakty białek poddano również dwuetapowej hydrolizie *in vitro* pepsyną i pankreatyną oraz procesowi symulowanego wchłaniania przy zastosowaniu półprzepuszczalnej membrany (7kDa). Dodatkowo otrzymane frakcje peptydów poddano analizom chromatograficznym przy użyciu spektrometrii mas (LC-MS/MS), co pozwoliło na oznaczenie sekwencji aminokwasowej

peptydów. W końcowym etapie otrzymane sekwencje analizowano *in silico* pod kontem ich potencjalnej aktywności biologicznej, przyporządkowując dodatkowo sekwencje peptydów do konkretnego białka. Podejście takie umożliwiło potwierdzenie bądź negację wyników analiz *in silico* prezentowanych w publikacji **III** w zakresie poszukiwania źródła sekwencji modulującej funkcje ludzkiego organizmu.

W prezentowanych badaniach próby z *L. acidophilus* Bauer Ł0938 wykazywały najsilniejsze właściwości antyrodnikowe (**IV**) w obrębie frakcji WSF oraz najsilniejsze właściwości inhibujące ACE w obrębie frakcji SSF (**V**). Z uwagi na powyższe, zastosowanie szczepu *L. acidophilus* Bauer Ł0938 uznano za najkorzystniejsze z punktu widzenia uwalniania biologicznie aktywnych peptydów na poziomie produktu oraz po procesie enzymatycznej hydrolizy i symulowanego wchłaniania *in vitro* wieprzowej surowej poledwicy dojrzewającej.

Potwierdzono wpływ czasu dojrzewania na zawartość peptydów (**IV**) w ekstraktach białek, a tym samym na ich aktywność biologiczną ( $p < 0.01$ ) (publikacja **IV** oraz publikacja **V**). Obserwowano wzrost aktywności biologicznej ekstraktów otrzymanych z wyrobów po 180 dniach dojrzewania, po czym następował spadek aktywności biologicznej aż do końca analizowanego okresu, pomimo postępującej degradacji białek. W oparciu o tę obserwację uznano sześciomiesięczny okres dojrzewania za optymalny w kontekście analizowanych aktywności biologicznych peptydów.

W oparciu o wyniki przedstawione w pracach **IV** i **V** stwierdzono wpływ działania zastosowanych proteaz na aktywność biologiczną peptydów powstałych w wyniku konwersji białek mięsa. Wykazano, że postęp hydrolizy enzymatycznej sprzyja uwalnianiu cząsteczek o aktywności biologicznej mierzonej przez zdolność do wychwytywania rodnika ABTS (**IV**) oraz działających jako inhibitory ACE (**V**). Niemniej jednak analizując poszczególne etapy hydrolizy, mniej peptydów o właściwościach antyrodnikowych wiązało się z działaniem pepsyną niż z pankreatyną (**IV**). Stwierdzono, że poziom hamowania ACE przez hydrolizaty po hydrolizie jednoetapowej jest wyższy niż w przypadku hydrolizy dwuetapowej. Otrzymane wyniki sugerują, że to specyfika enzymów (**IV** i **V**), a nie stopień hydrolizy (**IV**), determinuje uwalnianie peptydów bioaktywnych. W oparciu o wyniki analiz chromatograficznych finalnych hydrolizatów ( $< 7\text{kDa}$ ) wykazano, że 98% zidentyfikowanych peptydów było potencjalnym źródłem sekwencji pośrednio odpowiedzialnych za obniżanie ciśnienia krwi (**V**), podczas gdy zaledwie 38% sekwencji określono jako potencjalne przeciwutleniacze (**IV**). Co więcej, potencjalnie najbardziej aktywne sekwencje działające jako przeciwutleniacze w większości pochodziły z białek sarkoplazmatycznych. Z kolei białka miofibrylarne były lepszymi potencjalnymi prekursorami inhibitorów ACE niż peptydów przeciwutleniających. Aktywne biologicznie sekwencje o przewidywanej zdolności do inhibicji ACE w głównej mierze pochodziły z białka MLC1f (Uniprot ID: A1XQT6). Wyniki te są tożsame z wynikami otrzymanymi metodami *in silico*, potwierdzając tym samym znaczenie metod predykcyjnych w poszukiwaniu źródeł biologicznie aktywnych peptydów (**III**).

## Wnioski

1. Czas dojrzewania wpływa na aktywność biologiczną peptydów wieprzowej surowej polędwicy dojrzewającej. Sześciomiesięczny okres dojrzewania uznano za optymalny w kontekście analizowanych aktywności biopeptydów.
2. Enzymatyczna hydroliza *in vitro* pepsyną i pankreatyną wpływa na aktywność biologiczną peptydów wieprzowej surowej polędwicy dojrzewającej, przy czym wpływ ten jest odmienny dla analizowanych aktywności. Etap hydrolizy pepsyną jest najkorzystniejszy w kontekście generowania peptydów będących inhibitorami ACE. Z kolei etap hydrolizy pankreatyną przyczynia się do uwalniania peptydów o silnej aktywności przeciwnadciśnieniowej.
3. Peptydy otrzymane z wieprzowej surowej polędwicy dojrzewającej zachowują aktywność biologiczną po etapie symulowanego wchłaniania *in vitro*.
4. Rekomenduje się szczep *Lactobacillus acidophilus* Bauer Ł0938 do stosowania podczas produkcji wieprzowej surowej polędwicy dojrzewającej z uwagi na wysoką aktywność przeciwutleniającą i hamującą działanie ACE peptydów otrzymanych z wyrobów inokulowanych tym szczepem.

## Odniesienie do publikacji:

- I. Stadnik Joanna, **Kęska Paulina** (2015). Meat and fermented meat products as a source of bioactive peptides. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(3), 181-190.
- II. **Kęska Paulina**, Stadnik Joanna (2017). Taste-active peptides and amino acids of pork meat as components of dry-cured meat products: An *in-silico* study. *Journal of Sensory Studies*, 32(6), s. 1 - 9, art no.: e12301.
- III. **Kęska Paulina**, Stadnik Joanna (2016). Porcine myofibrillar proteins as potential precursors of bioactive peptides - an *in silico* study. *Food & Function*, 7(6), 2878 - 2885.
- IV. **Kęska Paulina**, Stadnik, Joanna (2018). Stability of antiradical activity of protein extracts and hydrolysates from dry-cured pork loins with probiotic strains of LAB. *Nutrients*, 10(4), s. 1 - 15, art. no.: 521.
- V. **Kęska Paulina**, Stadnik Joanna (2018). The stability of angiotensin I-converting enzyme-inhibiting activity of protein hydrolysates obtained from dry-cured pork loins inoculated with probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9765-y>.