

ANNA IWANIAK, DARIUSZ PASEMKO, MAŁGORZATA DAREWICZ,
MONIKA PROTASIEWICZ*

Katedra Biochemii Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

HYDROLIZA ENZYMATYCZNA *IN SILICO* WYBRANYCH SEKWENCJI BIAŁEK MIĘSA KURCZAKA W ASPEKCIE POZYSKIWIANIA PEPTYDÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH**

IN SILICO ENZYMATIC HYDROLYSIS
OF SELECTED CHICKEN MEAT PROTEIN SEQUENCES
IN THE ASPECT TO OBTAIN THE BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES

Streszczenie. W pracy przedstawiono wyniki analizy komputerowej (*in silico*) hydrolizy wybranych sekwencji białek mięsa kurczaka (*Gallus gallus*) w aspekcie otrzymywania peptydów biologicznie aktywnych. Sekwencje białek pochodziły z bazy danych UniProt, natomiast sekwencje peptydów – z bazy danych sekwencji białek i peptydów bioaktywnych BIOPEP. Do hydrolizy białek zastosowano kombinację enzymów: pepsyny (EC 3.4.23.1), trypsyny (EC 3.4.21.4) i chymotrypsyny (EC 3.4.21.1). Wykazano, że z analizowanych sekwencji białek mięsa kurczaka są potencjalnie uwalniane peptydy m.in. o aktywności antyoksydacyjnej, inhibitorów enzymów, stymulującej różne funkcje organizmu oraz przeciwkrzepliwą. Wśród inhibitorów enzymów peptydy hamujące działanie enzymu konwertującego angiotensynę, tj. inhibitory ACE (odpowiedzialne za redukcję ciśnienia krwi), były uwalniane ze wszystkich analizowanych sekwencji białek mięsa kurczaka. Uzyskane wyniki wskazują, że analiza bioinformatyczna składników żywności może być przydatnym narzędziem w projektowaniu żywności funkcjonalnej.

* Autorka jest uczestnikiem 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 budżetu województwa podlaskiego.

**Praca sfinansowana ze środków Katedry Biochemii Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Słowa kluczowe: białka żywności, peptydy biologicznie aktywne, hydroliza, analiza bioinformatyczna

Wstęp

Aktualnie wartość odżywcza białek jest postrzegana przez pryzmat szeregu czynników przyczyniających się do utrzymywania homeostazy organizmu (MILLWARD i IN. 2008). Jednym z kryteriów jakościowej oceny białek pochodzących z żywności jest możliwość enzymatycznego uwalniania z ich sekwencji peptydów wykazujących aktywność biologiczną (MEISEL i IN. 2006). Dotychczas scharakteryzowano kilkadziesiąt rodzajów aktywności biologicznej peptydów pochodzących z białek żywności (MINKIEWICZ i IN. 2008). Peptydy te mogą m.in. obniżać ciśnienie tętnicze krwi, hamować procesy krzepnięcia krwi, wykazywać aktywności: antyoksydacyjną, antybakteryjną, antyamnezijną oraz opioidową (IWANIAK i MINKIEWICZ 2007). Dzięki właściwościom wpływającym na poprawę stanu zdrowia organizmu niektóre z biopeptydów stanowią składniki nutraceutyków (SILVA i MALCATA 2005, TIDONA i IN. 2009).

Zróźnicowanie sekwencji peptydów bioaktywnych występujących w białkach źródłowych wiąże się z opracowywaniem i udoskonalaniem metod produkowania biopeptydów w skali laboratoryjnej oraz przemysłowej. Najczęściej stosowanymi metodami produkcji biopeptydów są: hydroliza enzymatyczna pod wpływem enzymów układu trawiennego lub za pomocą proteaz pochodzenia roślinnego i bakteryjnego oraz procesy fermentacyjne z udziałem proteolitycznych kultur bakteryjnych. W celu zwiększenia efektywności procesów prowadzących do uwolnienia peptydów powyższe metody mogą być stosowane w połączeniu (KORHONEN i PIHLANTO 2006).

Postęp wiedzy na temat peptydów bioaktywnych z żywności przyczynił się do uzupełnienia metod ich otrzymywania o narzędzia analizy bioinformatycznej (*in silico*). Obecnie techniki oraz metody *in silico* stanowią narzędzie badawcze integralne z metodami analitycznymi i są z sukcesem stosowane również w badaniach dotyczących pozyskiwania peptydów bioaktywnych z białek mięsa (UDENIGWE i HOWARD 2013).

W świetle najnowszych badań białka pochodzenia zwierzęcego, w tym z mięsa i ryb, stanowią źródło bioaktywnych peptydów, których aktywność biologiczna została udokumentowana w badaniach *in vitro* i *in vivo* (RYAN i IN. 2011). Przykładem są peptydy pochodzące z hydrolizatów białek szynki hiszpańskiej (ang. *dry-cured Spanish ham*) zidentyfikowane przez ESCUDERA i IN. (2012). Wodne ekstrakty hydrolizatów białek podawane doustnie szczurom z wrodzonym nadciśnieniem tętniczym obniżały ich ciśnienie krwi (ESCUDERO i IN. 2013). Mięso drobiowe jest źródłem pełnowartościowego białka, a jego wartość odżywcza jest porównywalna z białkami mleka (NOWAK i TRZISZKA 2010). Jak podają NOWAK i TRZISZKA (2010), Polska należy do liczących się na światowych rynkach producentów mięsa drobiowego. Konsekwencją tego zjawiska jest zwiększenie udziału w diecie Polaków mięsa drobiowego, szczególnie kurcząt. Wpływ na to mają m.in. preferencje i świadomość konsumentów na temat walorów dietetycznych mięsa kurcząt, takich jak np. mała zawartość tłuszczu (NOWAK i TRZISZKA 2010).

Zainteresowanie naukowców badaniem białek mięsa jako źródła peptydów bioaktywnych oraz wprowadzanie metod bioinformatycznych do optymalizacji procedur

związanych z produkcją biopeptydów stało się podstawą podjęcia pracy. Jej celem było zastosowanie metod *in silico* do analizy możliwości enzymatycznego uwalniania peptydów aktywnych biologicznie z wybranych białek mięsa kurczaka.

Material i metody

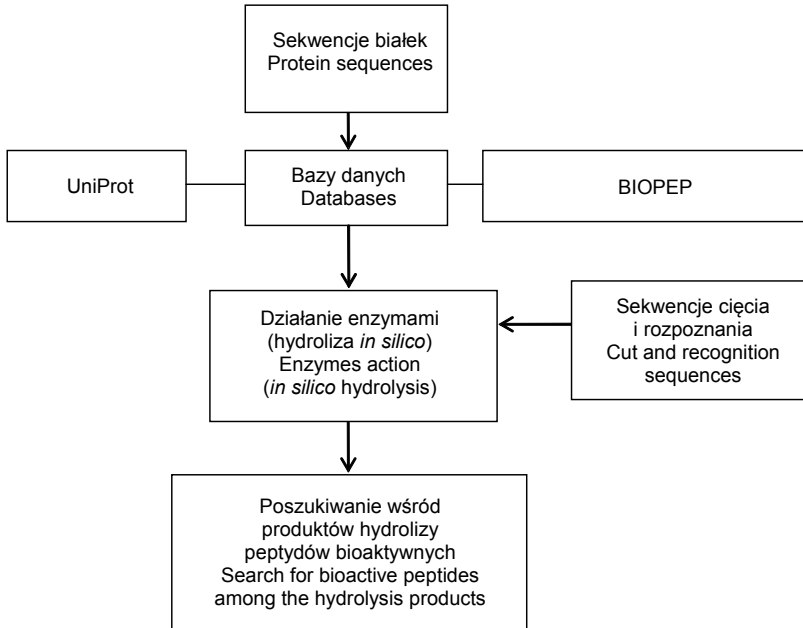
Badaniami objęto siedem sekwencji białek pochodzących z mięsa kurczaka (*Gallus gallus*). Sekwencje te liczyły od 147 do 1431 reszt aminokwasowych i były udostępnione w BAZIE DANYCH UNIPROT. Nazwy białek wraz z ich numerami identyfikacyjnymi oraz liczbą reszt aminokwasowych zestawiono w tabeli 1. Kryterium wyboru wymienionych sekwencji białek była ich dostępność w bazie danych UniProt, liczba reszt aminokwasowych, funkcja pełniona w organizmie oraz lokalizacja białka w materiale biologicznym (np. mięśnie szkieletowe, mięśnie prądkowane, ścięgna, krew). Z badań wyeliminowano takie sekwencje białek mięsa kurczaka, które były enzymami, białkami cytochromowymi, zawierały potranslacyjne modyfikacje lub liczyły kilkanaście reszt aminokwasowych, a ich podobieństwo sekwencyjne pozwalało na przypisanie ich do białek pochodzących z kurczaka. Efektem selekcji sekwencji białek dostępnych w bazie danych UniProt było ograniczenie ich liczby z 1362 do siedmiu objętych dalszą analizą.

Tabela 1. Wykaz białek mięsa kurczaka objętych analizą *in silico*
Table 1. List of chicken meat proteins taken for an *in silico* analysis

Lp. No.	Białko Protein	Numer identyfikacyjny w bazie danych UniProt Entry name in UniProt database	Liczba reszt aminokwasowych Number of amino acid residues
1.	Konektyna (fragment) Connectin (fragment)	Q08476	1 318
2.	Kolagen- α 1 (prekursor) α 1-Collagen (precursor)	P02457	1 431
3.	Miozyna, łańcuch lekki Myosin, light chain	P02604	192
4.	Tropomiozyna-1, łańcuch α Tropomyosin-1, α chain	P04268	284
5.	Tropomiozyna-1, łańcuch β Tropomyosin-1, β chain	P19352	284
6.	Troponina C Troponin C	P09860	161
7.	Hemoglobina (podjednostka β) Haemoglobin (β subunit)	P02112	147

Do przewidywania produktów hydrolizy wymienionych sekwencji zastosowano funkcję „Działanie enzymami” (ang. *Enzymes action*) udostępnionej w bazie danych sekwencji białek i peptydów bioaktywnych BIOPEP (BAZA DANYCH BIOPEP). Proce-

durę zastosowaną do przewidywania możliwości uwalniania bioaktywnych produktów proteolizy pochodzących z białek mięsa kurczaka przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Schemat procedury zastosowanej do hydrolizy *in silico* białek mięsa kurczaka

Fig. 1. Scheme of procedure applied for an *in silico* hydrolysis of chicken meat proteins

Podstawą modelu hydrolizy *in silico* białek były sekwencje rozpoznania i cięcia. Wolna reszta aminokwasowa lub jej krótkołańcuchowy fragment odpowiadały definicji sekwencji rozpoznania, natomiast resztę aminokwasową (N- lub C-końcową), przy której następowała hydroliza wiązania peptydowego, określono mianem sekwencji cięcia, tożsamej ze specyficznością działania enzymu (MINKIEWICZ i IN. 2009). Do hydrolizy wymienionych sekwencji białek zastosowano kombinację następujących enzymów proteolitycznych: pepsyny (EC 3.4.23.1), trypsyny (EC 3.4.21.4) i chymotrypsyny (EC 3.4.21.1).

Wyniki

W tabeli 2 przedstawiono wyniki hydrolizy *in silico* sekwencji białek mięsa kurczaka pod wpływem pepsyny, trypsyny i chymotrypsyny.

Iwaniak A., Pasemko D., Darewicz M., Protasiewicz M., 2014. Hydroliza enzymatyczna *in silico* wybranych sekwencji białek mięsa kurczaka w aspekcie pozyskiwania peptydów biologicznie aktywnych. Nauka Przyr. Technol. 8, 4, #49.

Tabela 2. Bioaktywne peptydy potencjalnie uwalniane z białek mięsa kurczaka pod wpływem pepsyny, trypsyny i chymotrypsyny

Table 2. Bioactive peptides potentially released from chicken meat proteins by pepsin, trypsin and chymotrypsin

Białko Protein	Aktywność peptydów Activity of peptides	Sekwencja ^{1,2} Sequence ^{1,2}	Liczba uwolnionych peptydów Number of released peptides
1	2	3	4
Konektyna (fragment) Connectin (fragment)	Inhibitor ACE ACE inhibitor	IR, VF, MY, VY, PL, VK (2), GL, HL, GK (3), IAK, SF (2), AR, EY, EK (3)	20
	Antyoksydacyjna Antioxidative	HL, EL (5), MY, IR, VY	9
	Inhibitory enzymów innych niż ACE ³ Enzyme inhibitors other than ACE ³	IR	1
	Hipotensyjna Hypotensive	IR	1
	Stymulująca różne funkcje organizmu ⁴ Stimulating different functions of organism ⁴	VL, IL	2
	Razem ⁵ – Total ⁵		27
Kolagen- α 1 (prekursor) α 1-Collagen (precursor)	Inhibitor ACE ACE inhibitor	VY, GY, PGL, GF (5), GL (6), GR (2), GK, SF, EY, EK, TF	21
	Antyoksydacyjna Antioxidative	TY (2), VY	3
	Przeciwnkrzepliwa Antithrombotic	GPR	1
	Razem ⁵ – Total ⁵		23
Miozyna, łańcuch lekki Myosin, light chain	Inhibitor ACE ACE inhibitor	VF, VK	2
	Stymulująca różne funkcje organizmu ⁴ Stimulating different functions of organism ⁴	IL	1
	Razem ⁵ – Total ⁵		3
Tropomiozyna-1, łańcuch α Tropomyosin-1, α chain	Inhibitor ACE ACE inhibitor	QK (2), EK	3

Tabela 2 – cd. / Table 2 – cont.

1	2	3	4
	Antyoksydacyjna Antioxidative	EL, EAK	2
	Stymulująca różne funkcje organizmu ⁴ Stimulating different functions of organism ⁴	VL	1
	Razem ⁵ – Total ⁵		6
Tropomiozyna-1, łań- cuch β Tropomyosin-1, β chain	Inhibitor ACE ACE inhibitor	QK (2), EK	3
	Antyoksydacyjna Antioxidative	EAK	1
	Razem ⁵ – Total ⁵		4
Troponina C Troponin C	Inhibitor ACE ACE inhibitor	MF, GK (2)	3
	Antyoksydacyjna Antioxidative	EL	1
	Inhibitory enzymów innych niż ACE ³ Enzyme inhibitors other than ACE ³	EF	1
	Hipotensyjna Hypotensive	EF	1
	Stymulująca różne funkcje organizmu ⁴ Stimulating different functions of organism ⁴	VL	1
	Razem ⁵ – Total ⁵		6
Hemoglobina (podjed- nostka β) Haemoglobin (β subunit)	Inhibitor ACE ACE inhibitor	IVY, GK, VR, QK, AR (2)	6
	Antyoksydacyjna Antioxidative	PW	1
	Stymulująca różne funkcje organizmu ⁴ Stimulating different functions of organism ⁴	VL	1
	Razem ⁵ – Total ⁵		8

¹ Sekwencje peptydów podano za pomocą jednoliterowego kodu aminokwasów.² W nawiasach podano liczbę peptydów o tej samej sekwencji.³ Inhibitory endopeptydaz prolinowych i/lub dipeptydylokarboksypeptydaz.⁴ Stymulatory: czynności błony śluzowej żołądka, wchłaniania fosfoinozytolu lub wchłaniania glukozy.⁵ Uwzględniono peptydy o identycznej sekwencji, różniące się aktywnością biologiczną.¹ Sequences of peptides are given with the use of amino acid one-letter code.² The numbers in brackets mean the number of peptides possessing identical sequences.³ Prolyl endopeptidase and/or dipeptidylcarboxypeptidase inhibitors.⁴ Stimulators of: stomach mucosal membrane function, phosphoinositole or glucose uptake.⁵ Number includes the peptides with identical sequence and different biological activity.

Wyniki komputerowej symulacji hydrolizy białek mięsa kurczaka wykazały, że pod wpływem zastosowanej kombinacji enzymów uwalniane były m.in. peptydy o następujących aktywnościach biologicznych: inhibitora ACE, tj. enzymu konwertującego angiotensynę (ACE, EC 3.4.15.1), antyoksydacyjnej, inhibitorowej, hipotensyjnej, przeciwkrzepliwej oraz stymulującej. Inhibitory ACE były uwalniane z każdej analizowanej sekwencji białka mięsa kurczaka. Poza inhibitorami ACE zastosowane do hydrolizy *in silico* enzymy uwalniały z badanych sekwencji białek peptydy określone mianem „inhibitora” lub „stymulującego”. Zapis „inhibitor” należy rozumieć jako inhibitor innych enzymów, takich jak endopeptydaza prolinowa i/lub dipeptydylokarboksypeptydaza. Peptydami o aktywności „stymulującej” były stymulatory czynności błony śluzowej żołądka, wchłaniania fosfoinozytolu lub glukozy (BAZA DANYCH BIOPEP). Charakterystyka aktywności przypisanej biologicznym inhibitorom lub stymulatorom została przedstawiona w pracy IWANIAK i DZIUBY (2011).

Analiza *in silico* peptydów bioaktywnych uwolnionych z białek mięsa kurczaka wykazała, że kilka z nich wykazuje więcej niż jeden rodzaj aktywności. Są to np. sekwencje IR (inhibitor ACE, inhibitor innych enzymów, peptyd antyoksydacyjny, hipotensyjny) czy HL (inhibitor ACE, peptyd antyoksydacyjny). Wykazano również, że długość łańcucha badanej sekwencji białka ma wpływ na liczbę potencjalnie uwalnianych peptydów. Najwięcej biopeptydów było uwalnianych z białek o najdłuższych sekwencjach (tj. z konektyny i kolagenu).

Dyskusja

Otrzymywanie peptydów bioaktywnych jest przedmiotem zainteresowania zarówno naukowców, jak i producentów żywności. Nowoczesne badania w tym zakresie obejmują kilka aspektów, takich jak: wzbogacanie żywności w peptydy w formie pozwalającej zachować ich aktywność (PIHLANTO i KORHONEN 2003) oraz optymalizacja i projektowanie produktów o właściwościach zdrowotnych poprzez wprowadzanie i rozwój nowoczesnych technologii (TIDONA i IN. 2009). Technologie te coraz częściej korzystają z metod analizy bioinformatycznej, do których należy m. in. analiza *in silico* procesów hydrolizy białek pod kątem możliwości pozyskiwania biopeptydów (CARRASCO-CASTILLA i IN. 2012).

Do symulowania proteolizy białek wybrano kombinację trzech enzymów: pepsyny, trypsyny i chymotrypsyny. Wymieniony układ enzymów z sukcesem zastosowali MARCZAK i IN. (2003) w celu pozyskania peptydów o aktywności inhibitora ACE z białek rzepek. Ponadto zastosowane enzymy są enzymami trawiennymi w przewodzie pokarmowym człowieka, a ich użycie w analizie prognostycznej może wstępnie wskazywać, jakie aktywne peptydy mogą powstawać w wyniku trawienia białek w organizmie ludzkim.

Przeprowadzona analiza produktów hydrolizy białek mięsa kurczaka wykazała, że z każdej sekwencji były uwalniane inhibitory ACE. Są to peptydy odgrywające istotną rolę w obniżaniu ciśnienia tętniczego krwi, a ponadto jest to najliczniejsza oraz najbardziej scharakteryzowana grupa peptydów pochodzących z białek żywności (IWANIAK i MINKIEWICZ 2007). Potwierdza to liczba opublikowanych prac udostępnionych w repozytoriach internetowych, takich jak np. Scopus (BAZA DANYCH SCOPUS). Dane

z września 2013 roku wskazują – po wprowadzeniu słów kluczowych „ACE inhibitory peptides” – prawie 1300 rekordów na temat inhibitorów ACE. Ponadto peptydy o aktywności inhibitora ACE zidentyfikowano w białkach mleka, mięsa, jaj, ryb, nasion zbóż i roślin oleistych oraz w mikroorganizmach, a efekt przeciwnadciśnieniowy wielu inhibitorów ACE potwierdzono w badaniach na ludziach i zwierzętach. Na przykład zastosowanie proteazy z *Aspergillus oryzae* do hydrolizy kolagenu kurczaka pozwoliło na otrzymanie peptydów wykazujących efekt inhibicji ACE, co udowodniono w badaniach na szczurach z nadciśnieniem tętniczym. Karmienie szczurów hydrolizatami kolagenu powodowało znaczną redukcję ciśnienia krwi (50 mm Hg) obserwowaną już po dwóch godzinach od momentu podania. Efekt ten utrzymywał się do sześciu godzin (SAIGA i IN. 2008, RYAN i IN. 2011).

Badania DZIUBY i IN. (2005) wykazały, że długość sekwencji białka wpływa wprost proporcjonalnie na liczbę uwalnianych peptydów. Oznacza to, że im dłuższa sekwencja białka, tym większa liczba peptydów jest uwalniana. W omawianych w niniejszej publikacji badaniach z białek o najdłuższych sekwencjach, tj. z konektyny i kolagenu, uwolniono odpowiednio 27 i 23 biopeptydy. Z pozostałych sekwencji, liczących ponad 100 reszt aminokwasowych, uwolniono od trzech do ośmiu sekwencji o zdefiniowanej aktywności.

Długość łańcucha peptydu jest bardzo istotna z punktu widzenia jego wchłaniania z przewodu pokarmowego do krwi. Peptydy uwalniane z analizowanych białek liczyły od dwóch do trzech reszt aminokwasowych. Badania dotyczące procesu wchłaniania peptydów wskazują, że sekwencje krótkołańcuchowe łatwiej pokonują barierę jelitową niż wolne aminokwasy (DAREWICZ i IN. 2011).

Symulując procesy hydrolizy białek w warunkach *in vitro* oraz decydując o wyborze enzymów, należy pamiętać, że zależnie od pochodzenia enzymu i jego właściwości, takich jak: stabilność, wydajność katalityczna, przewaga poszczególnych izoform, oddziaływań z inhibitorami, można uzyskać różne produkty hydrolizy białek, co nie zawsze odzwierciedlają wyniki uzyskane za pomocą analizy *in silico* (ŻELAZKO i IN. 2007). Rozbieżności między wynikami hydrolizy białek prowadzonej w warunkach *in vitro/in vivo* a *in silico* mogą również wynikać stąd, że programy przeznaczone do komputerowej symulacji hydrolizy białek są głównie projektowane na podstawie danych na temat specyficzności enzymów, co jest pewnym uproszczeniem. Hydroliza wiązania peptydowego zależy nie tylko od swoistości enzymu, lecz także od dostępności wiązania peptydowego (IWANIAK 2011).

Przedstawione i przedyskutowane w niniejszym opracowaniu wyniki eksperymentu polegającego na zastosowaniu metod komputerowych (bioinformatycznych) do analizy składników żywności są ważnym elementem koncepcji projektowania żywności funkcjonalnej i nutraceutyków. Tradycyjne metody stosowane podczas pozyskiwania bioaktywnych peptydów polegają zwykle na wykorzystaniu szerokiego zestawu białek i enzymów, a potem wyborze jednego lub dwóch hydrolizatów do dalszej charakterystyki. Jest to metoda czasochłonna i wymaga sporych nakładów finansowych (MAJUMDER i WU 2010). Przydatność badań *in silico* w połączeniu z analizą w warunkach laboratoryjnych wykazała IWANIAK (2011). Przedmiotem badań była identyfikacja peptydów w hydrolizatach globuliny owsa (*Avena sativa*), którą uprzednio poddano procesowi hydrolizy *in silico* z udziałem pepsyny, kombinacji pepsyny i trypsyny oraz pepsyny i chymotrypsyny. Za pomocą chromatografii cieczowej połączonej ze spektro-

metrię mas (LC-MS) potwierdzono obecność kilku peptydów bioaktywnych w hydrolizatach globuliny owsa, co wykazała komputerowa symulacja proteolizy tego białka. W trzech analizowanych hydrolizatach globuliny owsa zidentyfikowano odpowiednio $\frac{1}{4}$, $\frac{3}{8}$ oraz $\frac{1}{7}$ peptydów (IWANIAK 2011). Pierwsza liczba określa, ile peptydów zidentyfikowano w warunkach laboratoryjnych, druga zaś jest liczbą peptydów potencjalnie uwalnianych za pomocą metody *in silico*.

Badania *in silico* polegające m.in. na analizie prognostycznej są zgodne z ideą QbD (ang. *quality by design*), oznaczającą jakość poprzez projektowanie. Według koncepcji QbD „jakość nie może być badana na etapie produktu, powinna być oceniana na etapie projektowania” (TSIRK 2010). Dzięki metodom *in silico*, takim jak m.in. programowanie procesów hydrolizy białek pod kątem pozyskiwania biopeptydów, białka mogą być poznawane już na etapie „przedlaboratoryjnym”. Wprowadzenie badań *in silico* przed etapem analizy *in vitro* znacznie ułatwia odkrywanie nowych bioaktywnych peptydów obecnych w białkach źródłowych (MAJUMDER i WU 2010).

Wnioski

1. Hydroliza *in silico* badanych sekwencji białek mięsa kurczaka wykazała, że pod wpływem kombinacji enzymów: pepsyny, trypsyny i chymotrypsyny mogą być uwalniane peptydy odgrywające istotną rolę w obniżaniu ciśnienia tętniczego krwi (inhibitory ACE).

2. Liczba potencjalnie uwalnianych biopeptydów jest zależna od długości łańcucha polipeptydowego białka. Najwięcej peptydów jest uwalnianych z białek o najdłuższej sekwencji, tj. kolagenu i konektyny, a najmniej – z białek takich, jak hemoglobina, troponina C oraz tropomiozyny (α oraz β).

Literatura

- BAZA DANYCH BIOPEP. Katedra Biochemii Żywności UW-M, Olsztyn. [<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>; dostęp: lipiec 2013].
- BAZA DANYCH SCOPUS. [<http://www.scopus.com>; dostęp: wrzesień 2013].
- BAZA DANYCH UNIPROT. [<http://www.uniprot.org>; dostęp: lipiec 2013].
- CARRASCO-CASTILLA J., HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ A.J., JIMÉNEZ-MARTÍNEZ C., GUTIÉRREZ-LÓPEZ G.F., DÁVILA-ORTIZ G., 2012. Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Eng. Rev.* 4, 4: 224-243.
- DAREWICZ M., BORAWSKA J., MINKIEWICZ P., IWANIAK A., 2011. Peptydy biologicznie aktywne jako składniki żywności funkcjonalnej. *Przem. Spoż.* 67, 11: 38-41.
- DZIUBA J., NIKLEWICZ M., IWANIAK A., DAREWICZ M., MINKIEWICZ P., 2005. Structural properties of proteolytic-accessible bioactive fragments of selected animal proteins. *Polimery* 50: 424-428.
- ESCUADERO E., ARISTOY M.-C., NISHIMURA H., ARIHARA K., TOLDRÁ F., 2012. Antihypertensive effect and antioxidative activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Sci.* 91: 306-311.

- ESCUADERO E., MORA L., FRASER P.D., ARISTOY M.-C., ARIHARA K., TOLDRÁ F., 2013. Purification and identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham. *J. Proteom.* 78: 499-507.
- IWANIAK A., 2011. Analiza zależności pomiędzy 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. Rozpr. Monogr. UW-M Olszt. 162.
- IWANIAK A., DZIUBA J., 2011. BIOPEP-PBIL tool for the analysis of the structure of biologically active motifs derived from food proteins. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 1: 118-127.
- IWANIAK A., MINKIEWICZ P., 2007. Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 6, 3: 5-15.
- KORHONEN H., PIHLANTO A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 16: 945-960.
- MAJUMDER K., WU J., 2010. A new approach for identification of novel antihypertensive peptides from egg proteins by QSAR and bioinformatics. *Food Res. Int.* 43: 1371-1378.
- MARZAK E.D., USUI H., FUJITA H., YANG Y., YOKOO M., LIPKOWSKI A. W., YOSHIKAWA M., 2003. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides* 24, 6: 791-798.
- MEISEL H., WALSH D.J., MURRAY B., FITZGERALD R.J., 2006. ACE inhibitory peptides. W: *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. Red. Y. Mine, F. Shahidi. Taylor and Francis, Boca Raton: 269-315.
- MILLWARD D.J., LAYMAN D.K., TOMÉ D., SCHAAFSMA G., 2008. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. *Am. J. Clin. Nutr.* 87 (suppl): 1576S-1581S.
- MINKIEWICZ P., DZIUBA J., DAREWICZ M., IWANIAK A., MICHALSKA J., 2009. Online programs and databases of peptides and proteolytic enzymes – a brief update for 2007-2008. *Food Technol. Biotechnol.* 47, 4: 345-355.
- MINKIEWICZ P., DZIUBA J., IWANIAK A., DZIUBA M., DAREWICZ M., 2008. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *J. AOAC Int.* 91: 965-980.
- NOWAK M., TRZISZKA T., 2010. Zachowania konsumentów na rynku mięsa drobiowego. *Żywn. Nauka Technol. Jakość* 68, 1: 114-120.
- PIHLANTO A., KORHONEN H., 2003. Bioactive peptides and proteins. *Adv. Food Nutr. Res.* 47: 175-276.
- RYAN J.T., ROSS R.B., BOLTON D., FITZGERALD G.F., STANTON C., 2011. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients* 3: 765-791.
- SAIGA A., IWAI K., HAYAKAWA T., TAKAHATA Y., KITAMURA S., NISHIMURA T., MORIMATSU F., 2008. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10: 9586-9591.
- SILVA S.V., MALCATA X., 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.* 15: 1-15.
- TIDONA F., CRISCIONE A., GUASTELLA A.M., ZUCCARO A., BORDONARO A., MARLETTA D., 2009. Bioactive peptides in dairy products. *Ital. J. Anim. Sci.* 8: 315-340.
- TSIRK A., 2010. Quality by design: a peptide CMO approach. *PharManuf. Int. Pept. Rev.*: 28-31.
- UDENIGWE C.C., HOWARD A., 2013. Meat proteome as the source of functional biopeptides. *Food Res. Int.* 54: 1021-1032.
- ŻELAZKO M., CHRZANOWSKA J., POLANOWSKI A., 2007. Proteiny trzustkowe – zróżnicowanie międzygatunkowe i wynikające z tego implikacje żywieniowe i biotechnologiczne. *Biotechnologia* 76, 1: 107-120.

IN SILICO ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SELECTED CHICKEN MEAT PROTEIN SEQUENCES IN THE ASPECT TO OBTAIN THE BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES

Summary. The work presents the results of a computer analysis (*in silico*) applied for the hydrolysis of the selected sequences of the chicken (*Gallus gallus*) meat proteins to obtain the biologically active peptides. The protein sequences were derived from UniProt database, whereas bioactive peptide sequences – from the database of protein and bioactive peptides sequences BIOPEP. The combination of enzymes applied to start the proteolysis was: pepsin (EC 3.4.23.1), trypsin (EC 3.4.21.4), and chymotrypsin (EC 3.4.21.1). It was found, that due to the combination of the enzymes applied, the analysed chicken meat proteins potentially released peptides with the activities such as antioxidant, enzyme inhibitors, stimulating different body functions, and antithrombotic. Among the peptides functioning as enzyme inhibitors, ACE inhibitors (i.e. peptides involved in blood pressure reduction) were enzymatically released from all chicken meat protein sequences. Our results prove the suitability of bioinformatic analysis of food components in the design of functional food.

Key words: food proteins, biologically active peptides, hydrolysis, bioinformatics analysis

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Anna Iwaniak, Katedra Biochemii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn, Poland, e-mail: ami@uwm.edu.pl

Zaakceptowano do opublikowania – Accepted for publication:

2.07.2014

Do cytowania – For citation:

Iwaniak A., Pasemko D., Darewicz M., Protasiewicz M., 2014. Hydroliza enzymatyczna *in silico* wybranych sekwencji białek mięsa kurczaka w aspekcie pozyskiwania peptydów biologicznie aktywnych. *Nauka Przyr. Technol.* 8, 4, #49.