

Białka pstrąga tęczowego jako potencjalne źródło biologicznie aktywnych peptydów

Monika Pliszka¹, Justyna Borawska¹, Monika Świtaj¹, Małgorzata Darewicz¹

¹ Katedra Biochemii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Pliszka M, Borawska J, Świtaj M, Darewicz M. Białka pstrąga tęczowego jako potencjalne źródło biologicznie aktywnych peptydów. Med Og Nauk Zdr. 2015; 21(3): 322–327. doi: 10.5604/20834543.1165361

Streszczenie

Wprowadzenie i cel pracy. Bioaktywne peptydy pochodzące z białek żywności mogą pełnić funkcje regulatorów układu sercowo-naczyniowego, nerwowego czy pokarmowego. Do najlepiej znanych bioaktywnych peptydów należą fragmenty białek o właściwościach przeciwnadciśnieniowych, z których większość to inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę I (inhibitory ACE). Celem badań było określenie profilu potencjalnej aktywności biologicznej wybranych białek pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) przy użyciu narzędzi bioinformatycznych dostępnych w bazie BIOPEP.

Materiał i metody. Sekwencje aminokwasowe 7 białek pochodzących z tkanki mięśniowej pstrąga pobrano z bazy danych UniProt. Dla każdej z wybranych sekwencji wyznaczono częstotliwość występowania biologicznie aktywnych fragmentów (parametr A) oraz potencjalną aktywność biologiczną (parametr B) białek. Następnie przeprowadzono symulowaną proteolizę *in silico* z wykorzystaniem 6 enzymów proteolitycznych.

Wyniki. Największą liczbę sekwencji biopeptydów (1999) zidentyfikowano w kolagenie pstrąga, w tym najwięcej fragmentów o aktywności inhibitora ACE. Białko to charakteryzowało się największą wartością parametrów A (0,7316) i B (0,1651) dla peptydów o aktywności inhibitora ACE ze wszystkich przebadanych sekwencji. Ficyna i papaina uwalniały największą liczbę bioaktywnych fragmentów z badanych białek pstrąga tęczowego.

Wnioski. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że kolagen jest najbogatszym źródłem peptydów bioaktywnych z przebadanych sekwencji aminokwasowych białek pstrąga tęczowego. Ficyna i papaina mogą być wykorzystane do produkcji hydrolizatów lub peptydów o potencjalnej aktywności biologicznej z tkanki mięśniowej pstrąga.

Słowa kluczowe

pstrąg tęczowy, bioaktywne peptydy, inhibitory ACE, hydroliza *in silico*

WPROWADZENIE

Konsumenci na całym świecie zwracają szczególną uwagę na produkty z udowodnioną aktywnością biologiczną, które wpływają korzystnie na zdrowie człowieka i mogą być stosowane w profilaktyce wielu chorób. Według obecnych poglądów składnikami żywności łączącymi specyficzne aktywności biologiczne z funkcjami prozdrowotnymi są m.in. biologicznie aktywne peptydy pochodzące z białek żywności. Biopeptydy mogą być uwolnione ze swoich prekursorów w trakcie procesu technologicznego lub hydrolizy enzymatycznej [1]. Rozpatrywane są jako regulatory m.in. układu krwionośnego, immunologicznego, nerwowego czy pokarmowego [2]. Bioaktywne peptydy pochodzące z produktów morskich poprzez swój wpływ na funkcje fizjologiczne organizmu mogą być nowym terapeutycznym rozwiązaniem wspomagającym leczenie i zapobiegającym chorobom cywilizacyjnym. Udowodniono, że hydrolizaty białek ryb wykazują aktywności biologiczne, które mogą kwalifikować je jako składnik żywności funkcjonalnej i nutraceutyków [3].

Do roku 2025 zachorowalność na nadciśnienie tętnicze krwi będzie dotyczyła 1,56 miliarda populacji światowej. Choroba ta może powodować zaburzenia w pracy układu krwionośnego człowieka oraz prowadzić do niewydolności nerek [4]. Najważniejszą fizjologiczną rolę w hipertensji pełni enzym konwertujący angiotensynę I (ang. *angiotensin converting enzyme* – ACE, EC 3.4.15.1). Z punktu widzenia biochemicznego, nieaktywna angiotensyna I – decapeptyd,

ulega przemianie pod wpływem ACE w angiotensynę II – oktapeptyd, która jest czynnikiem powodującym m.in. zwężenie naczyń krwionośnych. Istnieje wiele syntetycznych inhibitorów ACE, m.in. captopril, lisinopril, enalapril, stosowanych w leczeniu nadciśnienia tętniczego u ludzi. Jednak pomimo skutecznego działania mogą one również wywoływać objawy niepożądane takie jak kaszel, alergie, zaburzenia smaku oraz wysypki skórne. Dlatego znacznie wzrosło zainteresowanie peptydowymi inhibitorami enzymu konwertującego angiotensynę pochodzącymi z żywności (ang. *angiotensin converting enzyme inhibitory peptides* – ACEIP), które mogą być stosowane jako substancje wspomagające związki syntetyczne z ograniczonymi działaniami ubocznymi [1]. Dodatkowo mogą one pozytywnie wpływać na funkcje fizjologiczne organizmu związane z utratą wagi lub regulacją systemu immunologicznego. Zwrócenie uwagi na korzyści dostarczane przez naturalnie występujące w żywności białka jako źródła peptydowych inhibitorów ACE, spowodowało wzrost liczby badań oraz zidentyfikowanych inhibitorów w hydrolizatach białek pochodzących z mleka, jajek, rzepaku, soi, orzeszków ziemnych, ryżu, kukurydzy, serwatki, wołowiny, kurczaka i wielu innych. Peptydy biologicznie aktywne zostały również wyizolowane z surowców pochodzenia morskiego [5]. Bioaktywne peptydy pochodzące z białek ryb wykazują wiele biologicznych aktywności takich jak: antyoksydacyjną, przeciwnadciśnieniową, antymikrobiologiczną, opioidową, prebiotyczną, immunomodulacyjną, przeciwzakrzepową i hipocholesterolemiczną [2].

Informacje udostępnione przez Organizację Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) dowodzą, że 44% ryb spożywanych przez konsumentów pochodzi z akwakultury. W opinii ekspertów FAO hodowla może zaspokoić

Adres do korespondencji: Monika Pliszka, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Biochemii Żywności, Plac Cieszyński 1
E-mail: monika.pliszka@uwm.edu.pl

Nadesłano: 1 grudnia 2014; zaakceptowano do druku: 6 czerwca 2015

rosnące zapotrzebowanie na ryby oraz zmniejszyć popyt na stale obniżający się poziom zasobów ryb morskich [6]. Pstrąg tęczowy należy do rodziny ryb łososiowatych. Do Europy został sprowadzony z Ameryki Północnej w latach osiemdziesiątych XIX wieku. W Polsce jest przede wszystkim rybą hodowlaną. Jego hodowla rozwinęła się szczególnie w dwóch regionach kraju – na Pomorzu oraz Warmii i Mazurach [7]. Pstrąg tęczowy, obok karpia, odgrywa istotną rolę w polskiej akwakulturze ze względu na zawartość makroelementów i mikroelementów, a także łatwo przyswajalnego białka i kwasów tłuszczowych [7, 8, 9]. Tkanka mięśniowa pstrąga zawiera około 18% białka i charakteryzuje się występowaniem wszystkich aminokwasów egzogennych, w tym najwięcej jest lizyny i leucyny [8]. Badania Łuczyńskiej i in. [9] wykazały zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych w tkance mięśniowej pstrąga na poziomie około 27%, wśród których dominował kwas palmitynowy (18%), oraz zawartość n-3 polienowych kwasów tłuszczowych na poziomie około 23%.

W badaniach z zakresu nauki o żywności popularność zdobywają metody *in silico* czyli metody komputerowe, przede wszystkim ze względu na obniżone koszty. Przeprowadzenie badań za pomocą narzędzi bioinformatycznych oraz wykorzystanie baz danych dostępnych on-line często okazuje się bardzo ważnym etapem przed rozpoczęciem badań laboratoryjnych [10].

CEL PRACY

Metody komputerowe zostały wykorzystane w prezentowanych badaniach w celu analizy obecności sekwencji bioaktywnych peptydów w sekwencjach aminokwasowych białek pstrąga tęczowego oraz potencjalnych możliwości enzymatycznego uwalniania bioaktywnych peptydów z wybranych białek pstrąga.

MATERIAŁ I METODY

Do badań *in silico* wybrano 7 sekwencji białek pstrąga tęczowego lub ich fragmentów, występujących w tkance mięśniowej ryb. Sekwencje aminokwasowe białek pochodziły z bazy danych UniProt (www.expasy.org; dostęp: marzec 2014), natomiast sekwencje aminokwasowe bioaktywnych peptydów z bazy danych białek i peptydów BIOPEP (www.uwm.edu.pl/biochemia; dostęp: marzec 2014). Nazwy wybranych białek pstrąga wraz z numerami dostępu w bazie danych UniProt (ang. *ID accession number*) oraz liczbą reszt aminokwasowych przedstawiono w tabeli 1.

Wybrane sekwencje białek pstrąga analizowano przy użyciu narzędzi informatycznych dostępnych w bazie BIOPEP. Wyznaczono biologiczną aktywność wybranych białek, czyli określono profil potencjalnej biologicznej aktywności definiowany jako rodzaj, liczba i położenie fragmentów bioaktywnych w białku oraz obliczono parametry A i B.

Parametr A wyznacza częstość występowania bioaktywnych fragmentów w sekwencji białka:

$$A = \frac{a}{N}$$

gdzie: a – liczba fragmentów o danej aktywności w łańcuchu białka;

N – liczba reszt aminokwasowych w danym białku.

Tabela 1. Informacje na temat analizowanych białek pstrąga tęczowego

Numer identyfikacyjny w bazie danych UniProt	Nazwa białka	Liczba reszt aminokwasowych
Q70Z26	Aktyna-β	375
P24722	Kinaza kreatynowa	383
O93484	Kolagen-α	1356
A5YVX7	Miozyna Va	848
P86431	Parwalbumina-β	108
Q7ZZB9	Troponina C	161
B2DBF2	Troponina I	171

Parametr B wyznacza powinowactwo fragmentów białka do określonego receptora, charakteryzuje ich potencjalną aktywność [mM^{-1}]:

$$B = \frac{\sum_{i=1}^k \frac{a_i}{EC_{50i}}}{N}$$

gdzie: a_i – liczba powtórzeń i-tego bioaktywnego fragmentu w łańcuchu białka,

EC_{50i} – stężenie i-tego peptydu bioaktywnego odpowiadające połowie jego maksymalnej aktywności, k – liczba różnych fragmentów o danej aktywności w białku.

W bazie BIOPEP dostępna jest także baza danych endopeptydaz, którą zastosowano do symulacji procesów proteolizy *in silico* białek pstrąga. Enzymy proteolityczne zastosowane w komputerowej symulacji proteolizy oraz ich charakterystykę przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Informacje na temat enzymów zastosowanych do symulowanej proteolizy wybranych białek pstrąga tęczowego z zastosowaniem narzędzi bioinformatycznych bazy danych BIOPEP [25]

Enzym	Źródło enzymu	Numer EC	Specyficzność działania	Zakres działania pH
Chymotrypsyna A	Bydło domowe	EC 3.4.21.1	Y-, W-, F-, L-	7,0–9,0
Trypsyna	<i>Bos taurus</i>	EC 3.4.21.4	K-, R-	8,0
Elastaza	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	EC 3.4.21.37	V-, A-, S-, C-	5,0–9,0
Pepsyna A	Dzik <i>Sus scrofa</i>	EC 3.4.23.1	F-, L-, W-, Y-, A-, E-, Q-	>2,0
Papaina	Melonowiec właściwy <i>Carica papaya</i>	EC 3.4.22.2	R-, K-, E-, H-, G-, Y-, A-	5,0–9,0
Ficyna	Figowiec pospolity <i>Ficus carica</i>	EC 3.4.22.3	K-, A-, Y-, G-, N-, L-, V-	5,0–9,0

WYNIKI

W wyniku analizy profilu biologicznej aktywności wybranych białek pstrąga tęczowego (tab.1), zidentyfikowano w ich sekwencjach aminokwasowych fragmenty o aktywności: inhibitorów ACE, przeciwkrzepliwej, antyamnezyjnej, antybakteryjnej, przeciwnowotworowej, antyoksydacyjnej, inhibitorów enzymów (poza ACE), regulującej aktywność błony śluzowej żołądka, immunostymulującej, aktywatora proteolizy ubikwityno-zależnej, anorektycznej, ligandu bakteryjnej permeazy, chemotaktycznej, embriotoksycznej, hipotensyjnej, opioidowej, neuropeptydu, stymulującej wychwyt glukozy czy uwalnianie substancji wazoaktywnych.

Ze względu na obszerność uzyskanych danych, w tabeli 3. przedstawiono sumę sekwencji peptydów bioaktywnych oraz największe wartości parametrów A i B badanych białek pszczoły, natomiast szczegółowemu omówieniu poddane zostało białko o największej potencjalnej aktywności biologicznej.

Tabela 3. Liczba sekwencji peptydów bioaktywnych oraz maksymalne wartości parametru A i B badanych białek pszczoły

Białko	Liczba sekwencji peptydów bioaktywnych	Największa wartość parametru A	Największa wartość parametru B
Aktyna-β	227	0,4053*	0,0239*
Kinaza kreatynowa	218	0,3734*	0,0106*
Kolagen-α	1999	0,7316*	0,1651*
Miozyna Va	475	0,3373*	0,0156*
Parwalbumina-β	58	0,3519*	0,0063*
Troponina C	79	0,3106*	0,0084*
Troponina I	103	0,3392*	0,0044*

Parametr A – częstość występowania fragmentów o określonej aktywności biologicznej w łańcuchu białkowym; parametr B – potencjalna biologiczna aktywność białka.
* wartości dla fragmentów o aktywności inhibitora ACE

W tabeli 4. przedstawiono profil potencjalnej biologicznej aktywności wyznaczony dla kolagenu pszczoły, ponieważ w obrębie łańcucha aminokwasowego tego białka, stwierdzono obecność największej liczby sekwencji bioaktywnych peptydów o zdefiniowanej i potwierdzonej aktywności biologicznej, tj. 1999 fragmentów biologicznie aktywnych.

Tabela 4. Profil potencjalnej aktywności biologicznej kolagenu-α pszczoły

Aktywności	Liczba sekwencji peptydów bioaktywnych	Parametr A	Parametr B
aktywator ubikwityny pośredniczącej w proteolizie	10	0,0074	
anorektyczna	24	0,0177	
antyamnezyjna	215	0,1586	
antyoksydacyjna	25	0,0184	
chemotaktyczna	24	0,0177	
embriotoksyczna	4	0,0029	
hipotensyjna	4	0,0029	0,0002
inhibitor ACE	992	0,7316	0,1651
inhibitor neuropeptydu, aminopeptydazy IV dipeptydylowej (DPP IV), karboksypeptydazy dipeptydylowej, CaMPDE	226	0,1667	
ligand bakteryjnej permeazy	3	0,0022	
neuropeptydu	1	0,0007	
opiodowa	1	0,0007	
przeciwkrzepliwa	237	0,1748	
regulująca błonę śluzową żołądka	216	0,1593	
stymulująca wychwyt glukozy, uwalnianie substancji wazoaktywnych	17	0,0125	
RAZEM	1999		

Parametr A – częstość występowania fragmentów o określonej aktywności biologicznej w łańcuchu białkowym; parametr B – potencjalna biologiczna aktywność białka

Tabela 5. Liczba uwalnianych peptydów bioaktywnych z wybranych białek pszczoły, po przeprowadzeniu proteolizy *in silico*

Białko	Chymotrypsyna A	Trypsyna	Papaina	Ficyna	Elastaza	Pepsyna
Aktyna-β	4	4	28	27	8	22
Kinaza kreatynowa	5	3	23	27	3	24
Kolagen-α	7	3	246	249	43	58
Miozyna Va	14	9	52	51	23	64
Parwalbumina-β	4	0	8	10	3	12
Troponina C	2	1	15	8	0	8
Troponina I	0	3	12	10	2	15

Najwięcej z nich, tj. 992, wykazywało zdolność inhibicji enzymu konwertującego angiotensynę I. Spośród wszystkich przeanalizowanych białek, częstość występowania fragmentów o aktywności inhibitorów ACE (parametr A) również była największa dla kolagenu i wynosiła 0,7316. Według danych literaturowych prawdopodobieństwo uwolnienia

Tabela 6. Wyniki proteolizy *in silico* dla kolagenu-α pszczoły

Enzym	Liczba uwolnionych biologicznie aktywnych peptydów	Aktywności	Liczba sekwencji
Chymotrypsyna A	7	antyoksydacyjna	1
		inhibitor ACE	6
Trypsyna	3	inhibitor ACE	1
		przeciwkrzepliwa	2
Elastaza	43	inhibitor ACE	40
		inhibitor DPP IV	1
		przeciwkrzepliwa	2
Pepsyna A	58	aktywator ubikwityny pośredniczącej w proteolizie	3
		inhibitor ACE	52
		przeciwkrzepliwa	1
		stymulująca wychwyt glukozy	1
Papaina	246	antyamnezyjna	31
		antyoksydacyjna	2
		hipotensyjna	1
		inhibitor ACE	111
Ficyna	249	inhibitor DPP IV, CaMPDE	37
		opiodowa	1
		przeciwkrzepliwa	31
		regulująca przepływ jonów, błonę śluzową żołądka	32
Ficyna	249	aktywator ubikwityny pośredniczącej w proteolizie	5
		antyamnezyjna	33
		antyoksydacyjna	4
		inhibitor ACE	102
		inhibitor DPP IV	37
		przeciwkrzepliwa	33
Ficyna	249	regulująca przepływ jonów, błonę śluzową żołądka	34
		stymulująca wychwyt glukozy	1

bioaktywnych peptydów przez enzymy proteolityczne jest tym większe, im większy zasób takich fragmentów wykazuje profil peptydowy białka.

W wyniku symulowanej proteolizy kolagenu pstrąga uwolniono największą liczbę bioaktywnych fragmentów (tab.5). W tabeli 6. przedstawiono wynik proteolizy *in silico* kolagenu pod wpływem 6 różnych endopeptydaz. Po zastosowaniu ficyny oraz papainy zostało uwolnionych najwięcej biologicznie aktywnych peptydów, odpowiednio 249 i 246. Symulowana proteoliza z wykorzystaniem ficyny pozwoliła na uwolnienie 102 peptydów o aktywności inhibitora ACE. Z udziałem drugiej z proteaz cysteinowych – papainy, została uwolniona największa liczba fragmentów o tej aktywności – 111. Po zastosowaniu pepsyny, enzymu trawiennego przewodu pokarmowego, zostały uwolnione 52 sekwencje o aktywności inhibitora ACE. Najmniejszą liczbę peptydów o aktywności przeciwnadciśnieniowej wykryto po hydrolizie z udziałem chymotrypsyny i trypsyny. Podobne tendencje zaobserwowano po symulowanej proteolizie pozostałych przebadanych białek pstrąga.

DYSKUSJA

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie składnikami żywności łączącymi specyficzne funkcje biologiczne z prozdrowotnymi. Białka pochodzące z żywności, oprócz swojej podstawowej funkcji, mogą pełnić rolę prekursorów biologicznie aktywnych peptydów [11]. Na przełomie ostatnich dziesięciu lat liczba opublikowanych artykułów, indeksowanych w bazie Web of Science, związanych z tematem biologicznie aktywnych peptydów zwiększyła się prawie 3-krotnie [12]. Fragmenty białek, czyli peptydy, mogą korzystnie wpływać na organizm człowieka, wykazując m.in. funkcje przeciwbakteryjne, antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwnadciśnieniowe, a także immunomodulujące [11]. Bioaktywne peptydy mogą być uwolnione z białek macierzystych podczas: 1) hydrolizy z udziałem enzymów trawiennych w układzie pokarmowym człowieka, 2) fermentacji i dojrzewania w trakcie procesów technologicznych w obecności mikroorganizmów, 3) enzymatycznej proteolizy *in vitro*. Dzięki znajomości sekwencji aminokwasowej istnieje także możliwość otrzymania biopeptydów podczas syntezy chemicznej lub enzymatycznej, a także mikrobiologicznej na drodze rekombinacji DNA [2].

Bioaktywne peptydy żywności, po uwolnieniu z sekwencji białka przez enzymy proteolityczne, mają możliwość oddziaływania na odpowiednie receptory w komórkach organizmu, regulując w ten sposób jego funkcje fizjologiczne [11]. Sposób działania biopeptydów porównywany jest z działaniem takich związków jak neurotransmitery, hormony lub antybiotyki [12]. Najlepiej poznaną grupą bioaktywnych peptydów są fragmenty o właściwościach przeciwnadciśnieniowych, będące głównie inhibitorami enzymu konwertującego angiotensynę I (inhibitory ACE) [1]. Pełnią one rolę w obniżaniu podwyższonego ciśnienia krwi oraz regulują pracę całego układu krwionośnego. Peptydowe inhibitory ACE mogą być uzupełnieniem dla leków przeciwnadciśnieniowych, których stosowanie może wywoływać działania niepożądane [13].

Ryby są źródłem nie tylko niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, składników mineralnych, ale również pełnowartościowego i wysokostrawnego białka. Peptydowe inhibitory ACE zostały zidentyfikowane w hydrolizatach

białek wielu ryb, m.in. pstrąga tęczowego (np. KVNGPAM-SPNAN), mintaja (np. FGASTRGA), tuńczyka (np. GDLGKTTTWSNWSPPKYKDTP), ryby keta (tzw. łososa pacyficznego, np. WA, VW, WM, MW, IW, LW), tuńczyka wielkookiego (np. WPEAAELMMEVDP) czy rekina (np. EY, FE, CF) [14].

W prezentowanych badaniach zastosowano narzędzia bioinformatyczne, które są wykorzystywane w identyfikacji oraz ocenie możliwości uwalniania bioaktywnych peptydów z białek żywności, w tym z białek pstrąga tęczowego. Analizy *in silico* są traktowane jako badania wstępne, które powinny być weryfikowane w laboratorium [15,16]. W przeprowadzonych analizach sprawdzono występowanie bioaktywnych fragmentów w wybranych sekwencjach aminokwasowych białek pstrąga oraz przeprowadzono symulowaną hydrolizę wiązań peptydowych pod wpływem 6 enzymów proteolitycznych. Wśród otrzymanych fragmentów białek zidentyfikowano sekwencje wykazujące aktywność biologiczną m.in. przeciwnadciśnieniową (w tym inhibitory ACE).

Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wykazała, że białka jednej z najpopularniejszych w polskiej akwakulturze ryby – pstrąga tęczowego, mogą być źródłem peptydów o potwierdzonej i zdefiniowanej aktywności biologicznej. Zidentyfikowano fragmenty o aktywności: inhibitorów ACE, przeciwwkrzepliwej, antyamynezyjnej, antybakteryjnej, przeciwnowotworowej, antyoksydacyjnej, inhibitorów enzymów (poza ACE), regulującej aktywność błony śluzowej żołądka, immunostymulującej, aktywatora proteolizy ubikwityno-zależnej, anorektycznej, ligandu bakteryjnej permeazy, chemotaktycznej, embriotoksycznej, hipotensyjnej, opioidowej, neuropeptydu czy stymulującej wychwyt glukozy bądź uwalnianie substancji wazoaktywnych.

Podczas poszukiwań sekwencji o aktywności biologicznej potwierdzona została reguła, że im dłuższa sekwencja białka, tym większe prawdopodobieństwo znalezienia fragmentu bioaktywnego. Podobne obserwacje poczynili także Dziuba i Darewicz [17]. W omawianych badaniach w obrębie łańcucha kolagenu zidentyfikowano największą liczbę sekwencji bioaktywnych peptydów (1999) oraz największą liczbę fragmentów o aktywności inhibitora ACE (992). Białko to charakteryzowało się także największą wartością parametru A oraz parametru B. Co więcej, wynik proteolizy *in silico* tego białka wskazuje na możliwość uwolnienia największej liczby biopeptydów oraz sekwencji peptydów-inhibitorów ACE, przede wszystkim z udziałem proteaz cysteinowych: papainy i ficyny, ale też z zastosowaniem pepsyny. Także Minkiewicz i in. [18] w badaniach *in silico* białek wołowych zaobserwowali, że kolagen stanowi najbogatsze źródło biopeptydów ogółem, w tym peptydowych inhibitorów ACE.

Spośród analizowanych sekwencji białek pstrąga także miozyna i aktyna okazały się być bogatym źródłem biopeptydów, a zwłaszcza inhibitorów ACE. Publikowane wyniki identyfikowania sekwencji peptydów przeciwnadciśnieniowych w hydrolizatach białek ryb wskazują, że w większości fragmenty te pochodzą z białek miofibrylarnych i kolagenu. Przykładowo, Enari i in. [19] zidentyfikowali 20 peptydów o aktywności inhibitorów ACE w papainowym hydrolizacie tkanki mięśniowej gorboszy – ryby z rodziny łososiowatych. Natomiast w hydrolizacie ekstraktu kolagenu ze skóry łososia Gu i in. [20] zidentyfikowali 11 sekwencji o aktywności inhibitorów ACE. Z kolei Mendis i in. [21] zidentyfikowali 2 antyoksydacyjne peptydy pochodzące z kolagenu w hydrolizacie trypsynowym żelatyny ze skóry kałamarnicy Humboldta.

Biorąc pod uwagę fakt, że kolagen i białka miofibrylarne są dominujące w tkance mięśniowej pstrąga, można wysnuć wniosek, że tkanka ta może być źródłem peptydów biologicznie aktywnych, a przede wszystkim peptydowych inhibitorów ACE. Potwierdzeniem mogą być wyniki badań eksperymentalnych prowadzonych przez różne zespoły badawcze. Na przykład w próbkach strawionych gotowanych filetów pstrąga pobranych z jelita cienkiego świni domowej (*Sus scrofa*) zidentyfikowano peptydy o aktywności inhibitorów ACE [22]. Kim i Byun [14] udowodnili, że hydrolizaty tkanki mięśniowej pstrąga wykazują aktywność inhibitorów ACE. Spośród 6 analizowanych przez nich hydrolizatów otrzymanych po zastosowaniu Alcalase, Neutrase (Novo Co., Dania), α -chymotrypsyny, papainy, pepsyny i trypsyny (Sigma Chemical Co., USA) hydrolizat pepsynowy charakteryzował się największą aktywnością hamowania ACE.

Przeprowadzona proteoliza *in silico* wykazała, że ficyna, papaina oraz pepsyna uwalniały największą liczbę bioaktywnych fragmentów. Obserwowane różnice związane są ze specyficznością zastosowanych enzymów. Im szersza specyficzność enzymu, tym potencjalnie więcej wiązań peptydowych jest hydrolizowanych, co sprzyja uwalnianiu większej liczby peptydów, w tym biopeptydów [23]. Także Minkiewicz i in. [18] opublikowali wyniki, które pokazują, że zastosowanie w badaniach *in silico* enzymu z szeroką specyficznością działania, tj. proteinazy K, wpływa na zwiększenie liczby uwalnianych bioaktywnych fragmentów w porównaniu do proteinazy P1 – enzymu z wąską specyficznością.

Wszystkie wybrane do analiz *in silico* białka pstrąga okazały się źródłem peptydowych inhibitorów konwertazy angiotensyny. Były to głównie fragmenty zbudowane z dwóch lub trzech reszt aminokwasowych. W wykorzystanej do badań bazie danych BIOPEP spośród 2609 biologicznie aktywnych peptydów 556 (21%) to sekwencje o aktywności inhibitorów ACE (dane na dzień 06.04.2014 r.). Duża część tych peptydów to sekwencje dwuaminokwasowe i trójaminokwasowe. W związku z tym prawdopodobieństwo wykrycia w sekwencji aminokwasowej białka peptydów inhibitorów ACE jest znacznie większe niż peptydów o aktywnościach rzadziej występujących w bazie oraz zbudowanych z większej liczby aminokwasów. Vercauteren i in. [24] omówili efektywność i sprawdzalność wyników analiz *in silico* w przewidywaniu możliwości uwalniania bioaktywnych peptydów z białek żywności. Czynnikiem decydującym o poziomie efektywności i możliwości uwalniania biopeptydów jest nagromadzenie jak największej ilości danych (sekwencji biopeptydów) w bazach danych oraz ich stała aktualizacja, obejmująca uzupełnienie informacji na temat specyficzności działania enzymów. Aktywność hydrolizatów otrzymanych w warunkach *in vitro* może się różnić od wyników przewidywanych na podstawie badań *in silico*, nawet jeśli użyto tych samych substratów i enzymów. Wpływ na to mają warunki przeprowadzenia procesu hydrolizy.

Obecny trend w badaniu bioaktywnych peptydów podkreśla ich wielofunkcyjne właściwości, które mogą być wykorzystywane do rozwiązywania aktualnych problemów zdrowotnych (na skalę globalną) takich jak zaburzenia metaboliczne, nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemia, hiperlipidemia oraz otyłość. Zastosowanie metod komputerowych ma na celu wytypowanie białek macierzystych będących źródłem bioaktywnych peptydów, określenie ich sekwencji oraz enzymów uwalniających największą liczbę biopeptydów lub tworzących najbardziej aktywne hydrolizaty. Perspektywa połączenia

metod komputerowych (*in silico*) i laboratoryjnych (*in vitro*) może usprawnić procesy pozyskiwania bioaktywnych peptydów z żywności, a także wyeliminować niepożądane cechy gotowych produktów, wpływając na ich jakość, bezpieczeństwo oraz aprobatę konsumentów [16].

WNIOSKI

1. Analiza *in silico* wykazała, że białka pstrąga tęczowego mogą być źródłem biologicznie aktywnych peptydów. Jednak pełna ich ocena wymaga przeprowadzenia badań w warunkach laboratoryjnych.
2. Kolagen jest potencjalnie najbogatszym źródłem biopeptydów wśród badanych białek pstrąga, a przede wszystkim peptydowych inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE).
3. Proteoliza *in silico* z udziałem ficyny i papainy wskazuje na możliwość uwolnienia potencjalnie największej liczby biologicznie aktywnych peptydów, w tym peptydowych inhibitorów ACE.

PIŚMIENNICTWO

1. Lee JK, Jeon JK, Byun HG. Antihypertensive effect of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats. *J Funct Foods*. 2014; 7: 381–389.
2. Darewicz M, Borawska J, Minkiewicz P, Iwaniak A. Peptydy biologicznie aktywne jako składniki żywności funkcjonalnej. *Przem Spoż.* 2013; 67: 38–41.
3. Chalamaiah M, Dinesh Kumar B, Hemalatha R, Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chem*. 2012; 135: 3020–3038.
4. Mohamed S. Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends Food Sci Technol*. 2014; 35: 114–128.
5. Chen J, Wang Y, Zhong Q, Wu Y, Xia W. Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. *Peptides* 2012; 33: 52–58.
6. Tkaczewska J, Migdał W. Porównanie wydajności rzeźnej, zawartości podstawowych składników odżywczych oraz poziomu metali ciężkich w mięśniach pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) pochodzącego z różnych rejonów Polski. *Żywność Nauk Technol Jakość*. 2012; 5: 177–186.
7. Lirski A, Szarowski L, Turkowski K, Seremak-Bulge J, Białowąs H, Żelazny J i wsp. *Strategia Karp 2020*. Wyd. PHU SZOSTAK DRUK; 2013.
8. Gawęcki J, Woźniewicz M. Ryby, przetwory rybne i owoce morza. W: Gawęcki J (red.). *Żywność człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*. Warszawa: PWN; 2010: 347–348.
9. Łuczynska J, Tońska E, Borejszo Z. Zawartość makro- i mikroelementów oraz kwasów tłuszczowych w mięśniach łosia (*Salmo salar* L.), pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss* Walb.) i karpia (*Cyprinus carpio* L.). *ŻYWNOSĆ Nauk Technol Jakość*. 2011; 3: 162–172.
10. Carrera M, Cañas B, Gallardo JM. The sarcoplasmic fish proteome: pathways, metabolic networks and potential bioactive peptides for nutritional inferences. *J Proteomics*. 2013; 78: 211–220.
11. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J*. 2006; 16: 945–960.
12. 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.
13. Bougateg A, Nedjar-Arroume N, Ravallec-Plé R, Leroy Y, Guillochon D, Barkia A i wsp. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products fish hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. *Food Chem*. 2008; 111: 350–356.

14. Kim SR, Byun HG. The Novel Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Rainbow Trout Muscle Hydrolysate. *Fish Aquat Sci.* 2012; 15: 183–190.
15. Udenigwe CC, Gong M, Wu S. In silico analysis of the large and small subunits of cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. *Process Biochem.* 2013; 48: 1794–1799.
16. Udenigwe CC. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends Food Sci Technol.* 2014; 36: 137–143.
17. Dziuba M, Darewicz M. Food Proteins as Precursors of Bioactive Peptides – Classification Into Families. *Food Sci Technol Int.* 2007; 13: 393–404.
18. Minkiewicz P, Dziuba J, Michalska J. Bovine meat proteins as potential precursors of biologically active peptides – a computational study based on the BIOPEP database. *Food Sci Technol Int.* 2011; 17: 39–45.
19. Enari H, Takahashi Y, Kawarasaki M, Tada M, Tatsuta K. Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from salmon muscle and their antihypertensive effect. *Fish Sci.* 2008; 74: 911–920.
20. Gu RZ, Li CY, Liu WY, Yi WX, Cai MY. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin. *Food Res Int.* 2011; 44: 1536–1540.
21. Mendis E, Rajapakse N, Kim SK. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 581–587.
22. Bauchart C, Morzel M, Chambon C, Mirand PP, Reynès C, Buffière C i wsp. Peptides reproducibly released by in vivo digestion of beef meat and trout flesh in pigs. *Br J Nutr.* 2007; 98: 1187–1195.
23. Cao W, Zhang C, Hong P, Ji H, Hao J. Purification and identification of an ACE inhibitory peptide from the peptic hydrolysate of *Acetes chinensis* and its antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *Int J Food Sci Technol.* 2010; 45: 959–965.
24. Vercruyse L, Smagghe G, van der Bent A, van Amerongen A, Onge-naert M, Van Camp J. Critical evaluation of the use of bioinformatics as a theoretical tool to find high-potential sources of ACE inhibitory peptides. *Peptides* 2009; 30: 575–582.
25. Informacje na temat enzymów zastosowanych do symulowanej proteolizy wybranych białek pstrąga tęczowego z zastosowaniem narzędzi bioinformatycznych bazy danych BIOPEP. www.uwm.edu.pl/biochemia; www.blast.ncbi.nlm.nih.gov (dostęp: 2014. 12.01).

Rainbow trout proteins as potential source of biologically active peptides

Abstract

Introduction and objective. Bioactive peptides derived from food proteins are considered as regulators of the cardiovascular, nervous, and digestive systems. Peptides with antihypertensive activity are the best recognized bioactive peptides, of which angiotensin I-converting enzyme inhibitors (ACE inhibitors) are the most known. The aim of presented study was to determine the profile of the potential biological activity of a selected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) protein using bioinformatics tools from the Bioactive Proteins and Peptides database – BIOPEP.

Material and methods. Amino acid sequences of 7 proteins originated from trout meat tissue were taken from the UniProt database. The frequency of occurrence of bioactive fragments in protein sequence (parameter A) and potential biological activity of protein (parameter B) were determined for all selected proteins using a procedure built into the BIOPEP database. Then, *in silico* proteolysis was performed using 6 proteolytic enzymes, which acted separately.

Results. It was found that the largest number of bioactive peptides sequences (1,999) was hidden in trout collagen, including the largest number of ACE inhibitors. Collagen was characterized by the highest value of the parameter A (0.7316) and B (0.1651) for fragments with ACE inhibitory activity. Ficin and papain released the largest number of bioactive fragments from the trout proteins tested.

Conclusions. Based on these results, it can be concluded that collagen is the richest source of bioactive peptides when compared with the trout proteins studied. Ficin and papain can be used to produce hydrolysates or peptides with potential biological activity from trout meat tissue.

Key words

trout, bioactive peptides, ACE inhibitors, *in silico* hydrolysis