

UNIWERSYTET WARMIŃSKO – MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI



KATEDRA BIOCHEMII ŻYWNOŚCI

Rozprawa doktorska

Ser typu Gouda o zmodyfikowanej zawartości kazeiny- β jako źródło peptydów odgrywających rolę w profilaktyce zespołu metabolicznego – badania *in silico* oraz *in vitro*

mgr inż. Damir Mogut

Promotor: Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

Olsztyn, dnia 06 lutego 2019 roku

Streszczenie

Mianem syndromu metabolicznego definiuje się występowanie u pacjenta jednocześnie trzech z wymienionych dysfunkcji organizmu: otyłości brzusznej, dyslipidemii, podwyższonego ciśnienia tętniczego oraz podwyższonego poziomu glukozy we krwi. W świetle aktualnych badań, sojusznikiem w działaniach wspomagających profilaktykę syndromu metabolicznego mogą być peptydy o aktywnościach: inhibitora dipeptydylopeptydazy IV (EC 3.4.14.5), inhibitora α -glukozydazy (EC 3.2.1.20), inhibitora enzymu konwertującego angiotensynę (EC 3.4.15.1), inhibitora α -amylazy (EC 3.2.1.1) oraz peptydów przeciwutleniających i regulujących stężenie cholesterolu. Ich działanie związane jest z regulacją: stężenia glukozy we krwi, ciśnienia tętniczego krwi, równowagi pro- oraz antyoksydacyjnej i stężenia cholesterolu we krwi.

Produkty mleczarskie, w tym sery dojrzewające, mogą być uznawane za żywność funkcjonalną. Wynika to z obecności białek mleka, zawierających wartościowe składniki diety o potencjalnych właściwościach biologicznych. Tymi składnikami są m. in. peptydy o wymienionych wyżej aktywnościach biologicznych, czyli działających prewencyjnie w profilaktyce syndromu metabolicznego. Wśród białek mleka, kazeina- β jest potencjalnie najbogatszym źródłem peptydów o różnorodnych aktywnościach. Dane literaturowe wskazują również na potencjał serów dojrzewających jako źródła biopeptydów. Łącząc przedstawione powyżej informacje podjęto pracę, której celem głównym była analiza sera typu Gouda o zmodyfikowanej zawartości kazeiny- β jako źródła peptydów odgrywających rolę w profilaktyce zespołu metabolicznego.

W pracy przedstawiono wyniki badań eksperymentalnych prowadzonych w układzie zintegrowanym (in. hybrydowym), tj. *in silico* : *in vitro* dotyczących peptydów o aktywnościach: inhibicji ACE (przeciwdziałającej chorobom układu krążenia, m. in. nadciśnieniu tętniczemu), inhibicji dipeptydylopeptydazy IV (DPP4), inhibicji glukozydazy- α (peptydy przeciwdziałające cukrzycy typu 2) oraz przeciwutleniającej (peptydy antynowotworowe), potencjalnie występujących w serze typu Gouda o zmniejszonej, normatywnej oraz zwiększonej zawartości kazeiny- β .

Etap *in silico* dotyczył m. in. analizy porównawczej sekwencji kazein bydlęcych za pomocą m. in. profilu potencjalnej aktywności biologicznej ww. białek (wykorzystanie bazy danych BIOPEP-UWM) oraz badań chemometrycznych z zastosowaniem analizy głównych składowych (PCA) oraz regresji wielorakiej (MLR) do określenia zależności między strukturą (sekwencją) a aktywnością dipeptydów - inhibitorów DPP4 oraz przeciwutleniających. Etap *in vitro* był związany z produkcją trzech wariantów sera typu Gouda o: zmniejszonej,

normatywnej oraz zwiększonej zawartości kazeiny- β . Ser wyprodukowano w Katedrze Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie. Następnie z wymienionych wariantów sera (po 1-szym oraz 60-tym dniu dojrzewania) pozyskano wodne ekstrakty peptydowe, co dało łącznie 6 wariantów doświadczalnych, dla których oznaczono aktywność inhibitorową wobec ACE, DPP4, glukozydazy- α oraz przeciwutleniającą, a następnie dokonano próby identyfikacji peptydów o wyżej wymienionych aktywnościach biologicznych.

Na podstawie badań *in silico* stwierdzono, że: wszystkie sekwencje kazein są potencjalnym źródłem peptydowych inhibitorów ACE i dipeptydylopeptydazy IV oraz peptydów przeciwutleniających. Wśród nich kazeina- β była potencjalnie najbogatszym źródłem inhibitorów ACE oraz dipeptydylopeptydazy IV, zaś kazeina- α_{S1} jest najlepszym źródłem peptydów przeciwutleniających. W wyniku analiz chemometrycznych, tj. PCA i MLR stwierdzono, że „idealny“ dipeptydowy inhibitor DPP4 powinien charakteryzować się obecnością: Pro, Trp, His, Phe, Tyr, Ile, Leu lub Val. W przypadku dipeptydów przeciwutleniających powinny być to reszty: Pro, His, Leu lub Val.

W wyniku badań *in vitro* stwierdzono, że wodne ekstrakty peptydowe pozyskane ze wszystkich wariantów sera typu Gouda charakteryzowały się zdolnością inhibicji ACE i DPP4 oraz aktywnością przeciwutleniającą, natomiast żaden z nich nie hamował glukozydazy- α . Ponadto, najwyższą aktywność hamowania ACE stwierdzono w próbkach pozyskanych z sera typu Gouda o normatywnej zawartości kazeiny- β po 60-tym dniu dojrzewania. Próbki sera typu Gouda o zwiększonej zawartości kazeiny- β po 1-szym i 60-tym dniu dojrzewania wykazywały najwyższą aktywność względem hamowania dipeptydylopeptydazy IV. Najwyższą aktywnością przeciwutleniającą (test z udziałem ABTS) charakteryzowały się wodne ekstrakty peptydowe pozyskane z sera Gouda o zwiększonej zawartości kazeiny- β po 60-tym dniu dojrzewania. W przypadku pomiaru aktywności antyoksydacyjnej próbek za pomocą testu z wykorzystaniem DPPH, najlepsze wyniki uzyskano dla ekstraktów peptydowych sera o zwiększonej zawartości kazeiny- β po 1-szym dniu dojrzewania.

Identyfikacja *in silico* pozwoliła na zdefiniowanie we wszystkich analizowanych sekwencjach kazein łącznie: 232 inhibitorów ACE, 201 inhibitorów dipeptydylopeptydazy IV oraz 77 peptydów przeciwutleniających. Na podstawie badań *in vitro* (LC-MS) zidentyfikowano łącznie: 81/61 inhibitorów ACE, 18/21 inhibitorów DPP4 oraz 35/23 peptydów przeciwutleniających w próbkach sera o zmniejszonej zawartości kazeiny- β (1-szy/60-ty dzień dojrzewania). W przypadku sera Gouda o normatywnej zawartości

kazeiny- β (odpowiednio 1-szy i 60-ty dzień dojrzewania) zidentyfikowano: 79/47 inhibitorów ACE, 16/19 inhibitorów DPP4, 37/19 peptydów przeciwutleniających. Natomiast w przypadku próbek pozyskanych z sera o zwiększonej zawartości kazeiny- β (odpowiednio 1-szy i 60-ty dzień dojrzewania) zidentyfikowano: 68/57 inhibitorów ACE, 18/19 inhibitorów DPP4, 36/25 peptydów przeciwutleniających.

Podsumowując, na podstawie analizy identyfikacyjnej peptydów oraz pomiarach aktywności biologicznej wodnych ekstraktów peptydowych, nie można jednoznacznie stwierdzić, że ser Gouda o zwiększonej zawartości kazeiny- β jest lepszym źródłem peptydów wspomagających profilaktykę chorób syndromu metabolicznego niż sery o obniżonej oraz normalnej zawartości wymienionej frakcji białkowej. Jednoznacznie można stwierdzić, że bez względu na „wariant“ sera Gouda - stanowią one potencjał w przeciwdziałaniu schorzeniom syndromu metabolicznego. Niemniej zagadnienie to wymaga bardziej pogłębionych badań obejmujących m. in. symulację procesów hydrolizy sera za pomocą enzymów trawiennych oraz ocenę bioaktywności powstałych hydrolizatów.