

Wpływ peptydów bioaktywnych uwalnianych z białek mleka krowiego na układ krwionośny

Effects of bioactive peptides released from cow's milk on cardiovascular system

Iwona Szerszunowicz

Katedra Biochemii Żywności, Wydział Nauk o Żywności,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie

Obecnie na świecie wzrasta zainteresowanie składnikami bioaktywnymi, w tym peptydami biologicznie aktywnymi. Prekursorami takich peptydów mogą być białka roślinne i zwierzęce, w tym białka mleka (kazeina i białka serwatkowe). Peptydy bioaktywne mogą powstawać w wyniku ograniczonej proteolizy białek zachodzącej podczas różnych procesów technologicznych (np. zastosowanie proteolitycznych kultur starterych wykorzystywanych do przeprowadzenia fermentacji mleka). W przewodzie pokarmowym człowieka takie związki mogą powstawać podczas hydrolizy białek/peptydów prowadzonej przez enzymy trawienne (pepsynę, trypsynę i chymotrypsynę).

Peptydy bioaktywne wpływają na funkcjonowanie układu krwionośnego, układu nerwowego i pokarmowego oraz immunologicznego. Peptydy korzystnie wpływające na układ krążenia to peptydy obniżające ciśnienie krwi (peptydy przeciwnadciśnieniowe), hamujące agregację płytek krwi (peptydy przeciwkrzepliwie), zmniejszające rozpuszczalność cholesterolu, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia absorpcji jelitowej tego związku (peptydy hipocholesterolemiczne). Zidentyfikowano również peptydy hamujące enzymatyczną (hamowanie lipooksygenazy) i nieenzymatyczną peroksydację niezbędnych kwasów tłuszczowych (peptydy antyoksydacyjne). Peptydy bioaktywne są składnikami wielu produktów określanymi jako „żywność funkcjonalna” lub „nutraceutyki”.

Słowa kluczowe: peptydy bioaktywne • układ krwionośny

Summary

Currently, bioactive food ingredients, including biologically active peptides, became a subject of the growing interests of the scientists worldwide. The precursors of these peptides can be plant or animal proteins, including milk proteins (derived from casein and whey). Bioactive peptides can be released by limited enzymatic hydrolysis of proteins, which takes place during different technological processes (e.g. application of microbial proteolytic starter cultures used in milk fermentation processes). Peptides with biological activity can be formed in the gastrointestinal tract during hydrolysis of proteins/longer chain peptides by digestive enzymes (pepsin, trypsin, and chymotrypsin).

Bioactive peptides have impact on the cardiovascular, nervous, gastrointestinal, and immune systems. Peptides, which are beneficial to cardiovascular system possess blood pressure-lowering effect (antihypertensive peptides), inhibit blood platelet aggregation (antithrombotic peptides), and they can reduce the solubility of micellar cholesterol. The latter induce the decrease of the cholesterol intestinal absorption (hypocholesterolemic peptides). There were peptides identified in food proteins, which are responsible for enzymatic- and non-enzymatic inhibition of essential fatty acids peroxidation. Their activity was defined as lipooxygenase inhibitors and antioxidant peptides, respectively. Biologically active peptides are the components of many food products and/or ingredients described as „functional foods” and/or „nutraceuticals”.

Key words: bioactive peptides • functional foods • cardiovascular system

Wpłynęło: 14-10-2013

Zaakceptowano: 10-12-2013

Opublikowano on-line: 01-09-2014

Adres do korespondencji:

dr Iwona Szerszunowicz
Katedra Biochemii Żywności,
Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie
ul. Plac Cieszyński 1,
10-726 Olsztyn
e-mail: szersz@uwm.edu.pl

Wstęp

Peptydy bioaktywne (peptydy biologicznie aktywne) są specyficznymi fragmentami białek, korzystnie wpływającymi na funkcjonowanie organizmu, co w konsekwencji prowadzi do polepszenia stanu zdrowia [31]. Występują one jako nieaktywne sekwencje wewnątrz cząsteczek białek (związki zawierające powyżej 100 reszt aminokwasowych połączonych wiązaniami peptydowymi) i mogą zostać uwolnione w wyniku ich hydrolizy enzymatycznej. Peptydy ze względu na mniejszą masę cząsteczkową (zawierają <100 reszt aminokwasowych) są bardziej aktywnymi związkami niż ich prekursorzy (białka). Niektóre z nich mogą regulować różne procesy fizjologiczne, działając jako potencjalne modulatory fizjologiczne, uwalniane podczas trawienia. Wpływają one na funkcjonowanie układu krwionośnego (peptydy przeciwnadciśnieniowe, przeciwnadciśnieniowe, hipocholesterolemiczne, antyoksydacyjne), układu nerwowego (peptydy opioidowe wykazujące aktywność agonistyczną i antagonistyczną), układu pokarmowego (peptydy przenoszące składniki mineralne, obniżające apetyt, antimikrobiologiczne), układu immunologicznego (peptydy immunomodulacyjne – immunomodulatory, cytomodulacyjne – cytomodulatory) [6, 33]. Podstawą aktywności peptydów jest skład i sekwencja aminokwasowa. Peptydy biologicznie aktywne najczęściej zbudowane są od 2-20 reszt aminokwasowych, niektóre z nich wykazują właściwości wielofunkcyjne [35, 53, 59].

Prekursorami peptydów bioaktywnych mogą być białka roślinne i zwierzęce, w tym białka mleka [13]. Bioaktywne peptydy wyizolowano z wielu produktów mleczarskich tj. mleko, kefir, jogurty, sery [16, 23, 34, 50]. Źródłem bioaktywnych peptydów może być kazeina (-as, -b, -k) oraz białka serwatkowe, głównie laktoglobulina-b (lg-b), laktoalbumina-a (la-a), albumina serum (AS). Peptydy bioaktywne powstają w wyniku ograniczonej proteolizy białek zachodzącej podczas procesów technologicznych np. w wyniku zastosowanych proteolitycznych kultur starterowych wykorzystywanych do przeprowadzenia fermentacji mleka oraz proteolizy prowadzonej przez enzymy uwalniane z różnych mikroorganizmów lub roślin. W przewodzie pokarmowym człowieka takie związki mogą powstawać podczas hydrolizy białek/peptydów prowadzonej przez enzymy trawienne (pepsynę, trypsynę i chymotrypsynę) [34]. Peptydy bioaktywne wykazują wpływ fizjologiczny na organizm, jeżeli zostaną uwolnione podczas trawienia jelitowego (lub po wprowadzeniu do organizmu jako „peptydy bioaktywne” nie będą degradowane) i po wchłonięciu w świetle jelita będą docierać do miejsc docelowych (narządów, tkanek) [53].

Ostateczne trawienie białek pochodzących z pożywienia ma miejsce w jelicie cienkim. Peptydazy rąbka szczoteczki (rąbek wchłaniający) nabłonka jelita hydrolizują oligopeptydy uwalniając dipeptydy lub aminokwasy [14, 67]. Peptydy które nie są degradowane przez enzymy proteolityczne, w części jelitowej przewodu pokarmowego, mogą zostać bezpośrednio wchłonięte do krwiobie-

gu. Di- i tripeptydy tj. immunopeptydy, peptydy o aktywności inhibitora ACE, mogą przenikać do krwi i docierać bezpośrednio do miejsc docelowych. Mechanizmy związane z transportem tego typu związków uzależnione są od sekwencji di- i tripeptydów [10]. Po wchłonięciu peptydów w obszarze jelitowym następnie są hydrolizowane przez peptydazy występujące w serum. Dlatego istotnym warunkiem, niezbędnym do zachowania fizjologicznego działania peptydów bioaktywnych jest ich oporność na degradację przez te peptydazy po spożyciu pokarmu lub/ i dożylnym podaniu peptydów bioaktywnych/hydrolizatów [41, 53, 62].

Na rynku ogólnosiwiatowym dostępna jest żywność funkcjonalna i składniki żywnościowe zawierające bioaktywne peptydy pochodzące z białek mleka. Calpis AMEEL S (Japonia) lub Calpico (Europa) to handlowe nazwy mleka kwaśnego i Evolus (Finlandia) – mleko fermentowane z dodatkiem wapnia. Wszystkie te produkty zawierają tripeptydy bioaktywne (o sekwencjach VPP, IPP – skrót jednoliterowy aminokwasów podano pod rys. 1), wykazujące właściwości przeciwnadciśnieniowe, a pochodzące z kazeiny-b i -k. Podobne właściwości biologiczne wykazuje hydrolizat lg-b - produkt o nazwie BioZate (USA). Peption C12 (Holandia) i Casein DP Peptio Drink (Japonia) to produkty zawierające przeciwnadciśnieniowe dodekapeptydy (o sekwencji FFVAPFPEVFGK) uwalniane z kazeiny, stosowane są jako składnik lub napój bezalkoholowy. BioPURE-GMP (USA) to nazwa handlowa hydrolizatu białek serwatkowych zawierającego glikomakropeptyd (pochodzący z kazeiny-k). Ten handlowy hydrolizat wykazuje właściwości przeciwnadciśnieniowe, przeciwbakteryjne i przeciwnadciśnieniowe. Następnym produktem jest ProDiet F200 (Francja), zawierający bioaktywny fragment kazeiny-a_{s1} (fr. 91-100 o sekwencji YLGYLEQLLR) redukujących stres, stosowany jako składnik napojów mlecznych, wyrobów cukierniczych. Produkt handlowy o nazwie Capolac (Dania) zawiera kazeinofosfopeptydy -CPPs (CaseinoPhosphoPeptides). W Japonii dostępne są napoje bezalkoholowe (Tekkotsu inryou i Kotsu Kotsu Calcium) zawierające -CPPs, które umożliwiają lepsze wchłanianie składników mineralnych. Natomiast w Holandii produkowany jest CE90CPP zawierający CPP (20%) oraz Glutamin peptide (peptyd glutaminowy), WGE80GPA, WGE80GPN, WGE80GPU czyli hydrolizaty białek mleka wzbogacone peptydami zawierającymi glutaminę, wykazujące właściwości immunomodulacyjne [17, 25, 32, 33].

Peptydy bioaktywne wpływające na układ krwionośny

Obecnie na świecie wzrasta zainteresowanie składnikami bioaktywnymi, w tym peptydami biologicznie aktywnymi. Peptydy bioaktywne wpływające na funkcjonowanie układu krwionośnego to peptydy przeciwnadciśnieniowe (inhibitory ACE), przeciwnadciśnieniowe, hipocholesterolemiczne i antyoksydacyjne [6, 33].

Na rysunku 1 przedstawiono sekwencję aminokwasową jednego z białek serwatkowych -lg-b (po usunięciu 16-

aminokwasowego peptydu określanego jako peptyd sygnałowy) i wybrane sekwencje bioaktywne występujące w tym białku. Sekwencja białka prekursorowego Ig-b dostępna jest w bazie uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/P02754>, numer identyfikacyjny białka prekursorowego P02754) i w bazie BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>, numer identyfikacyjny białka ID 1116). BIOPEP to baza danych białek i bioaktywnych peptydów, która powstała w 1999 r. w Katedrze Biochemii Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. W bazie zgromadzone są informacje nt. ponad 700 białek (różnego pochodzenia) i ponad 2600 peptydów bioaktywnych. Informacje dostępne w tej bazie, pozwalają ocenić każde białko jako potencjalnego prekursora bioaktywnych peptydów [12, <http://www.uwm.edu.pl/biochemia>].

Laktoglobulina-b (Ig-b) zbudowana jest ze 162 reszt aminokwasowych (rys. 1). Sekwencję aminokwasową (czyli kolejność ułożenia reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym) tego białka przedstawiono uwzględniając kod jednoliterowy aminokwasów (wyjaśniono pod rysunkiem 1). Za pomocą takiego kodu przedstawione zostały wszystkie sekwencje peptydów bioaktywnych, podane w niniejszej publikacji. W białkach i peptydach wiązania peptydowe powstają w wyniku kondensacji grupy karboksylowej (-COOH) jednej cząsteczki aminokwasu z grupą aminową (-NH₂) drugiego aminokwasu. Pierwszy aminokwas znajdujący się w łańcuchu polipeptydowym posiada wolną (niezablokowaną wiązaniem peptydowym) grupę aminową (-NH₂), dlatego ta część łańcucha polipeptydowego nazywana jest N-końcem. Natomiast ostatni aminokwas występujący w tym łańcuchu posiada grupę karboksylową (-COOH), która nie jest zaangażowana w utworzenie wiązania peptydowego, stąd ta część łańcucha określana jest jako C-końiec (rys. 1).

Peptydy przeciwnadciśnieniowe (inhibitory ACE)

Nadciśnienie stanowi główny czynnik ryzyka związany z chorobami układu krążenia. W takich przypadkach podawane są leki obniżające ciśnienie krwi. Wśród takich leków znajduje się kaptopryl, który jest inhibitorem enzymu konwertującego angiotensynę. Enzym konwertujący angiotensynę (ACE, Angiotensin-I-Converting Enzyme) to hydrolaza peptydyldipeptydowa, która występuje w wielu tkankach i płynach biologicznych. Pełni istotną rolę w regulacji ciśnienia krwi zarówno u zwierząt jak i ludzi. Enzym ten działa głównie w układzie renina-angiotensyna, w którym naturalnymi substratami są angiotensyna I i bradykinina. ACE hydrolizuje angiotensynę -I (dekapeptyd, uwalniany przez reninę z angiotensynogenu) do angiotensyny-II (oktapeptyd) oraz inaktywuje bradykininę, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu ciśnienia krwi [17, 38, 53, 68]. Hamowanie działania ACE powoduje obniżenie ciśnienia krwi. Działanie wielu leków podobne jest do działania peptydów, które wykazują aktywność inhibitora ACE. W Japonii stosowane są kapsułki obniżające ciśnienie krwi, w których składnikiem bioaktywnym jest „Oligopeptyd Katsuobushi” (LKPNM),

otrzymany z termolizynowego hydrolizatu mięśni ryb z rodziny tuńczyka. Peptyd ten po przekształceniu do formy aktywnej (LKP), hamuje działanie ACE [25]. Termolizynowy hydrolizat mięśni ryb (z rodziny tuńczyka) zawierający peptydowy inhibitor ACE (Oligopeptyd Katsuobushi) został zaakceptowany przez Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej Japonii i znajduje zastosowanie jako Żywność o Określonym Zdrowotnym Zastosowaniu (FOSHU - Foods for Specified Health Use) [20, 21, 38].

Naturalnie występujące peptydowe inhibitory ACE są obecne w białkach żywności, w tym w białkach mleka, z których uwalniane są po hydrolizie enzymatycznej [38, 40]. Peptydowe inhibitory ACE to przede wszystkim peptydy krótkołańcuchowe, zawierające dużo reszt proliny [19]. Najlepiej poznanymi przeciwnadciśnieniowymi produktami są produkty oparte na fermentowanym mleku Calpis i Evolus. Produkty te zawierają tripeptydy IPP i VPP, które obniżają ciśnienie krwi, co potwierdziły badania przeprowadzone na szczurach i zwierzętach [29, 40]. W tych produktach, system proteolitycznych bakterii kwasu mlekowego degradowe białka mleka do tri- i innych peptydów wykazujących aktywność inhibitorów ACE. Jakkolwiek, potencjalne peptydowe inhibitory ACE, mogą również powstawać w wyniku hydrolizy białek mleka *in vitro* prowadzonej przez enzymy pochodzenia mikrobiologicznego i enzymy trawienne [40, 52].

Aktywność peptydowych inhibitorów ACE różnicowana jest na podstawie wartości IC₅₀. IC₅₀ określa takie stężenie peptydu (inhibitora), które powoduje obniżenie aktywności enzymu (ACE) o 50% (mmol/l). Nie wszystkie peptydy, które wykazują aktywność przeciwnadciśnieniową *in vitro*, wykazują takie działanie *in vivo*. Niektóre peptydy (zwłaszcza o dłuższych sekwencjach) ulegają degradacji w przewodzie pokarmowym pod wpływem enzymów proteolitycznych lub enzymów wewnątrzkomórkowych. Mogą one również ulegać modyfikacjom w układzie krwionośnym [42, 43, 68]. Natomiast peptydy składające z dwóch lub trzech aminokwasów są odporniejsze na działanie endopeptydaz, występujących w przewodzie pokarmowym i mogą bezpośrednio przetrwać do krwioobiegu [31, 68].

Peptydy przeciwnadciśnieniowe wykryto w handlowych serach typu szwajcarskiego, serach cheddar, w serach modyfikowanych enzymatycznie oraz serach wyprodukowanych z dodatkiem kultur *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 [2, 9, 50, 56, 63]. W dziesięciu różnych serach typu szwajcarskiego wykryto dwa peptydy przeciwnadciśnieniowe o sekwencjach VPP, IPP [2, 44]. Te dwa tripeptydy uwalniane z białek prekursorowych (z kazeiny-b, -k) przez enzymy z *Lactobacillus helveticus* to peptydy przeciwnadciśnieniowe i immunomodulacyjne [26, 32].

Peptydy przeciwnadciśnieniowe (np. FVVAP, FALPQY, VPP) uwalniane z kazeiny (-a, -b, -k) nazywane są kazeokinami (-a, -b). Peptydy (np. WLAHK, LRP, LKP) pochodzące z białek serwatkowych określane są jako

1	10	20	30	40	50	60	70	80
LIVTQTMKGL	DIQKVAGTWY	<i>SLAMAASDJS</i>	LLDAQSAPLR	<i>VYVEELKPTP</i>	EGDLEILLQK	WENGECAQKK	IIAEKTRKIP	
	90	100	110	120	130	140	150	160
VFKIDALNEN	KVLVLDTDYK	<i>KYLLECMENS</i>	AEPEQSLACQ	CLVRTPEVDD	EALEKFDKAL	KALPMHIRLS	FNPTQLEEQC	
162								
HI								

Rys. 1. Sekwencja aminokwasowa krowiej Ig-b (wariant genetyczny A, ID 1116) zawierająca wybrane fragmenty o aktywności biologicznej. Fragmenty odpowiadające peptydom przeciwnadciśnieniowym (w tym inhibitorom ACE) i antyoksydacyjnym zapisano odpowiednio czcionką pogrubioną i kursywą. Natomiast sekwencje laktorfiny-b, czyli peptydu dwufunkcyjnego (wykazuje aktywność inhibitora ACE i opioidową) podkreślono. Źródło: baza danych sekwencji białek i bioaktywnych peptydów – BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>, dostęp: październik 2013).

Skrót (kod) jednoliterowy aminokwasów: A-Alanina, R-Arginina, N-Asparagina, D-Kwas asparaginowy, C-Cysteina, Q-Glutamina, E-Kwas glutaminowy, G-Glicyna, H-Histydyna, I-Izoleucyna, L-Leucyna, K-Lizyna, M-Metionina, F-Fenylalanina, P-Prolina, S-Seryna, T-Treonina, W-Tryptofan, Y-Tyrozyna, V-Walina.

Fig. 1. The amino acid sequence of bovine lactoglobulin-b (gen. var. A, ID 1116) containing selected fragments with biological activity. Fragments corresponding to antihypertensive (including ACE-inhibitors) and antioxidant peptides are given in bold and italics, respectively. The sequence of b-lactorphin with encrypted difunctional peptides (demonstrating ACE-inhibitory and opioid activities) underlined. Source: the database of protein and bioactive peptide sequences – BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>, accessed: October 2013).

The single-letter amino acid code: A-Alanine, R-Arginine, N-Asparagine, D-Aspartic acid, C-Cysteine, Q-Glutamine, E-Glutamic acid, G-Glycine, H-Histidine, I-Isoleucine, L-Leucine, K-Lysine, M-Methionine, F-Phenylalanine, P-Proline, S-Serine, T-Threonine, W-Tryptophan, Y-Tyrosine, V-Valine.

laktokininy (laktokinina-a, -b). Laktokinina nazywany jest także peptyd o sekwencji ALKAWSVAR, otrzymany syntetycznie. Sekwencja tego peptydu odpowiada fragmentowi sekwencji albuminy serum [25, 46, 68, <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/>].

Prowadząc hydrolizę kazeiny- a_s przy wykorzystaniu trypsyny lub proteazy z *Lactobacillus helveticus* powstają kazokininy- a_s , czyli odpowiednio peptydy o sekwencjach FFVAPFPEVFGK (fragment 23-34 kazeiny- a_s) i LAYFYF (fr. 142-147). Natomiast oligopeptydaza prolilowa uwalnia z tej kazeiny bioaktywny fragment (fr. 23-27) o sekwencji FFVAP nazywany kazokininą- a_{s5} . Peptydy przeciwnadciśnieniowe określane jako inhibitory ACE to fragmenty 143-148, 157-164 kazeiny- a_s odpowiednio o sekwencjach AYFYPE i DAYPSGAW. Powstają one w wyniku hydrolizy proteazą z *Lactobacillus helveticus* lub w przypadku tego drugiego peptydu w wyniku fermentacji. Z kazeiny- a_s może zostać uwolniony peptyd o sekwencji TTMPLW, po trawieniu trypsyną, czyli fragment 194-199 kazeiny- a_s . Peptydy wyizolowane z trypsynowego hydrolyzatu kazeiny otrzymane z kazeiny- a_{s1} (fr. 23-34, 23-27, 194-199) o sekwencjach FFVAPFPEVFGK, FFVAP, TTMPLW oraz z kazeiny-b (fr. 177-183, AVYPYQR) – silnie hamowały ACE *in vitro* [68, <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/>].

Natomiast z czterech peptydowych inhibitorów ACE wyizolowanych z termolizynowych (z *Bacillus thermoproteolyticus*) hydrolyzatów kazeiny-b (wariant genetyczny A2) zidentyfikowano dwa peptydy przeciwnadciśnieniowe o dużej aktywności. Peptydy o masach cząsteczko-

wych ok. 2000 Da, odpowiadały fragmentowi 58-76 kazeiny-b (sekwencja LVYFPFGPIPNSLPQNIPP) i fragmentowi 59-76 tego białka. W obu przypadkach C-końcowe fragmenty peptydów odpowiadały sekwencji -IPP. Wartość IC_{50} dla tych peptydów wyniosła 4 i 5 mmol [51]. Fragment 58-76 tego białka zidentyfikowano także wśród produktów proteolizy kazeiny proteazą z *Lactobacillus helveticus* PR4 [45] i w fermentowanym mleku [57]. W przeprowadzonych badaniach na szczurach potwierdzono, że peptyd ten powodował obniżenie ciśnienia krwi u zwierząt [45, 58]. Wartość IC_{50} dla fragmentu kazeiny-b (wariant genetyczny A2) wyniosła 12 mmol [45] lub 5 mmol [58]. Dłuższy peptyd wyizolowany z tego białka (fr. 59-76) również wykazywał aktywność inhibitora ACE. Interesujące jest to, że te dwa peptydy o wysokiej aktywności inhibitora ACE, na C-końcach posiadały sekwencję aminokwasową -IPP, podobnie jak dwa dobrze wcześniej poznane peptydy przeciwnadciśnieniowe VPP i IPP, zidentyfikowane w fermentowanych produktach mleczarskich [29, 60]. Trzeci peptyd o niższej aktywności zidentyfikowany był jako fr. 59-81 o sekwencji VYFPFGPIPNSLPQNIPPLTQTP. Większość tych peptydów otrzymanych z kazeiny-b, prawdopodobnie w przewodzie pokarmowym będzie hydrolizowana przez pepsynę i chymotrypsynę, w rezultacie dając krótsze peptydy (fr. 61-76, ewentualnie fr. 63-76 i ostatecznie fr. 71-76). Jednak w tych fragmentach na C-końcach występuje sekwencja -IPP, która odpowiedzialna jest za aktywność inhibitora ACE. Najprawdopodobniej te peptydy będą aktywne *in vivo* [51].

W wyniku przeprowadzonej fermentacji, z kazeiny-b może zostać uwolniona kazokinina-b, czyli fragment 84-86 (VPP). Natomiast fragment (fr. 57-64) kazeiny-b uwolniony przez proteazę z *Lactobacillus helveticus* to peptyd o sekwencji SLVLPVPE, wykazujący aktywność inhibitora ACE. Z kazeiny-k (po fermentacji) może zostać uwolniony fragment 108-110 (IPP) tego białka, także wykazujący aktywność inhibitora ACE [68, <http://www.uwm.edu.pl/biochemia>].

Potencjalnymi peptydami wykazującymi aktywność np. inhibitorów ACE mogą być również peptydy, które otrzymane zostały w sposób syntetyczny, a których sekwencje aminokwasowe występują w sekwencji aminokwasowej badanego białka. Taki bioaktywny fragment może zostać uwolniony w wyniku hydrolizy białka przez enzym proteolityczny o odpowiedniej specyficzności działania. Syntetycznymi peptydami o aktywności inhibitorów ACE są np. peptydy o sekwencji, FVAP, VAP, FGK, PLW, LW. Takie sekwencje znajdują się w strukturze pierwszorzędowej kazeiny-a₈ i odpowiadają kolejno fragmentom tego białka (fr. 24-27, 25-27, 32-34, 197-199, 198-199). Do grupy peptydów otrzymanych syntetycznie należy również kazokinina-b₁₀, peptyd o sekwencji YQQPVLGPVR, taka sekwencja występuje w kazeinie-b (fr. 193-202). W kazeinie-k występuje fragment 25-34, który odpowiadał peptydowi syntetycznemu, a wykazywał aktywność inhibitora ACE [68, <http://www.uwm.edu.pl/biochemia>].

Peptydy przeciwnadciśnieniowe uwalniane są nie tylko z kazeiny, ale również z białek serwatkowych. Peptydowe inhibitory ACE identyfikowano w hydrolizatach białek serwatkowych, la-a i lg-b. Wśród produktów proteolizy fermentowanej serwatki, poddanej hydrolizie enzymatycznej do przeprowadzenia której wykorzystano pepsynę a następnie trypsynę zidentyfikowano aktywne fragmenty pochodzące z lg-b (fr. 9-14, GLDIQK; fr. 15-20, VAGTWY) [55].

W hydrolizatach trypsynowych la-a stwierdzono obecność peptydów o sekwencjach VGINYWLAHK (fr. 99-108), WLAHK (fr. 104-108) [54]. Natomiast fragment tego białka LAHKAL (fr. 105-110), zidentyfikowano wśród produktów proteolizy fermentowanej serwatki, którą hydrolizowano pepsyną a następnie trypsyną [55]. Wśród produktów hydrolizy la-a, do przeprowadzenia której wykorzystano termolizynę z *Bacillus thermoproteolyticus*, zidentyfikowano cztery fragmenty tego białka wykazujące aktywność inhibitorów ACE: fr. 20-26 (GVSLPEW), fr. 21-26 (VSLPEW), fr. 15-26 (LKGYGGSVSLPEW) i fr. 18-26 (YGGVSLPEW). Wszystkie wyizolowane peptydy o masach cząsteczkowych ok. 1000 Da i IC₅₀ w zakresie 1-5 mmol, na C-końcach posiadały sekwencję -PEW, odpowiadającą fragmentowi 24-26 la-a [51].

Fragmenty sekwencji aminokwasowych odpowiadające la-a (fr. 50-51, 50-53) odpowiednio YG, YGLF nazwane są laktokininami-a (otrzymane syntetycznie) [68]. Przeprowadzając hydrolizę la-a wykorzystując pepsynę następnie trypsynę oraz chymotrypsynę, otrzymano peptyd

(inhibitor ACE) o sekwencji YGL (fr. 50-52). Wykorzystując takie same enzymy proteolityczne do przeprowadzenia proteolizy lg-b otrzymano peptydy (inhibitory ACE) o sekwencji VLDTDYK (fr. 94-100), CMENSA (fr. 106-111), ALPMH (fr. 142-146). Trypsyna uwalniała z lg-b peptydy (inhibitory ACE) o aktywności umiarkowanej (IC₅₀ w zakresie 1029-556 mmol): LAMA (fr. 22-25), LDAQSA-PLR (fr. 32-40), VFK (fr. 81-83) [54]. Największą aktywność (IC₅₀ 42,6 mmol) wykazywał fragment lg-b (fr. 142-148) o sekwencji ALPMHIR określane jako laktokinina-b. Laktokinina-b i laktorfina-b to peptydy o sekwencjach odpowiednio YL i YLLF, odpowiadające fragmentom 102-103 oraz 102-105 lg-b. Ten drugi peptyd jest również peptydem opioidowym. Wśród produktów proteolizy lg-b do przeprowadzenia której wykorzystano proteinazę K, zidentyfikowano peptyd bioaktywny o sekwencji IPA (fr. 78-80) [68, <http://www.uwm.edu.pl/biochemia>].

Peptydy przeciwkrzepliwie (antytrombotyczne)

Powstawanie zakrzepów w tętnicach, żyłach lub komorach serca określane jest jako zakrzepica, która prowadzi do powstawania arteriosklerozy. Najczęstszą przyczyną stwardnienia tętnic jest miażdżyca (zmiany zwyrodnieniowe błony wewnętrznej i środkowej aorty, tętnic wieńcowych i mózgowych), dlatego określana jest jako arterioskleroza (*łac. arteriosclerosis*) [11].

W leczeniu zakrzepicy stosowane są leki zapobiegające łączeniu trombocytów (płytek krwi) w naczyniach krwionośnych. W procesie powstawania skrzepów istotną rolę pełni aktywna forma protrombiny, czyli trombina. Trombina to enzym - proteaza serynowa, która w wyniku hydrolizy wiązań peptydowych (czterech wiązań R-G) w fibrynogenie uwalnia fibrynopeptydy i nierozpuszczalne monomery fibryny, które agregując tworzą skrzep [11].

Inhibitorami agregacji płytek krwi mogą być również peptydy. Peptydy hamujące agregację płytek krwi i utrudniające wiązanie fibrynogenu do receptorów na powierzchni płytek zostały wykryte w surowicy krwi noworodków żywionych mlekiem matki [4]. Peptydy przeciwkrzepliwie uwalniane są z kazeiny-k, zwłaszcza z C-końcowego fragmentu kazeiny-k, uwolnionego po hydrolizie wiązania peptydowego Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶. Ten fragment (fr. 106-169) kazeiny-k nazywany jest kazeinomakropeptydem (lub kazeinoglikomakropeptydem jeżeli posiada reszty cukrowe). Z kazeinomakropeptydu mogą zostać uwolnione kazoplateliny, czyli peptydy przeciwkrzepliwie [11]. W trypsynowych hydrolizatach kazeinomakropeptydu zidentyfikowano peptydy hamujące przyłączanie łańcuchów g-fibryny do miejsc receptorowych na powierzchni płytek krwi (peptydy przeciwkrzepliwie). Były to fragmenty: 106—116, 106-111, 106-112, 112-116, 113-116 kazeiny-k o następujących sekwencjach aminokwasowych MAIPPKKNQDK, MAIPPK, MAIPPK, KNQDK, NQDK [11, 18, <http://www.uwm.edu.pl/biochemia>].

Peptydy bioaktywne wyizolowane zostały także z napojów fermentowanych. Wykryte peptydy przeciwkrzepliwe odpowiadały fragmentowi 113-116 kazeiny-k [27]. Zidentyfikowano również peptydy wielofunkcyjne a wśród nich peptydy wykazujące aktywność przeciwkrzepliwą. Ich sekwencje aminokwasowe odpowiadały fragmentom 152-160 i 155-160 kazeiny-k. Agregację płytek krwi hamował także fragment 39-42 laktoferyny o sekwencji KRDS [11].

Peptydy hipocholesterolemiczne

W trypsynowych hydrolizatach Ig-b zidentyfikowano peptyd o sekwencji IIAEK (laktostatynę, fr. 71-75 Ig-b) o aktywności hipocholesterolemicznej. Najprawdopodobniej aktywność hipocholesterolemiczna peptydu (IIAEK) wynikała ze zmniejszenia rozpuszczalności micelnego cholesterolu lub zwiększonej zdolności wiązania kwasów żółciowych. Interakcje zachodzące pomiędzy micelami cholesterolu a peptydem uniemożliwiały wchłanianie tego związku przez nabłonek jelita cienkiego. W przeprowadzonych badaniach na zwierzętach wykryto wysoki poziom steroli fekalnych u szczurów żywionych trypsynowymi hydrolizatami Ig-b, w porównaniu grupy zwierząt żywionych hydrolizatami kazeinowymi. Najprawdopodobniej obniżenie wchłaniania cholesterolu oraz wchłaniania zwrotnego kwasów żółciowych powodowało zwiększone ich wydalanie z kałem [5, 33, 48].

Wśród produktów trawienia chymotrypsyną, wyizolowanych z jelita krętego świnki morskiej, zidentyfikowano bioaktywną laktotensynę-b (HIRL) [49, 66]. Ten tetrapeptyd (fragment 146-149 Ig-b) zmniejszał wrażliwość na ból i obniżał poziom cholesterolu we krwi, pełnił również rolę agonisty neurotensyny. Neurotensyna to oligopeptyd endogenny, występujący w układzie pokarmowym oraz pełniący rolę neuromodulatora (neurotransmitter, neuromediator, neuroprzekaznik) w ośrodkowym układzie nerwowy (OUN). W układzie pokarmowym peptyd ten stymuluje wydzielanie soku trzustkowego i jelitowego, hamuje wydzielanie soków żołądkowych, stymuluje motorykę jelitową [64, 65, 66].

Naturalnymi neuroprzekaznikami przynoszącymi sygnały pomiędzy neuronami (komórkami nerwowymi) za pośrednictwem synaps w organizmie są m.in.: dopamina, serotonina, acetylocholina, histamina. Sygnały są przesyłane również z komórek nerwowych do komórek gruczołowych i mięśniowych. Istnieją trzy podtypy receptorów neurotensynowych (NT₁, NT₂, NT₃). Tylko do niektórych z nich może zostać przyłączona laktotensyna-b [3, 22, 61]. Peptyd ten zarówno wiąże się z receptorem NT₁ i NT₂, wykazując 50-krotnie większe powinowactwo w stosunku do tego drugiego receptora [66]. Laktotensyna-b jest pierwszym, naturalnym ligandem selektywnym w stosunku do receptora NT₂. Oddziałując z receptorem NT₂, zmniejsza wrażliwość na ból i wykazuje wpływ hipocholesterolemiczny [64]. Peptyd ten może również poprawiać pamięć poprzez aktywowanie receptora dopaminy D₂ [49].

Peptydy hipocholesterolemiczne uwalniane z Ig-b (IIAK, HIRL) wykazywały większy wpływ hipocholesterolemiczny, w porównaniu do jednego ze steroli roślinnych czyli b-sitosterolu [5, 48]. b-sitosterol pod względem budowy chemicznej wykazuje duże podobieństwo do cholesterolu. Związek ten wbudowywany jest w strukturę micel, powstających w świetle jelita cienkiego, zamiast cholesterolu pokarmowego i pochodzącego z dróg żółciowych. To prowadzi do zmniejszenia rozpuszczalności cholesterolu, a w konsekwencji do obniżenia jego absorpcji jelitowej [47].

Peptydy przeciwutleniające (antyoksydacyjne)

Brak równowagi pomiędzy reaktywnymi formami tlenu (RFT) powstającymi w komórkach organizmu a możliwością ich usuwania przez organizm powoduje powstawanie tzw. stresu oksydacyjnego. W wyniku takiego stresu, w komórkach organizmu (zaburzenia w organizmie) powstają nadtlarki i wolne rodniki, które powodują zmiany w strukturach białek, tłuszczów, kwasów tłuszczowych oraz kwasów nukleinowych. Zmiany zachodzące w komórce prowadzą do powstawania wielu chorób cywilizacyjnych, w tym chorób związanych z układem krążenia, chorób reumatologicznych, nowotworowych, cukrzycy oraz chorób neurodegradacyjnych [8, 24, 37, 39].

Peptydy antyoksydacyjne wyizolowane z trzech australijskich, handlowych serów Cheddar, hamowały wolne rodniki 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) [56]. DPPH stosowany jest do określenia aktywności antyoksydacyjnej peptydów. Do ich różnicowania wyznaczany jest parametr IC₅₀. Określa on stężenie antyoksydanta powodujące spadek początkowego stężenia wolnego rodnika DPPH o 50% [7]. Inne badania potwierdziły, że ser cheddar wzbogacony ziołami lub owocami wykazywał silniejsze właściwości przeciwutleniające, a zakres aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów wodnych uzyskanych z sera uzależniony był od stanu jego dojrzewania [1, 23].

Peptydy antyoksydacyjne zostały wyizolowane z kazeiny i białek serwatkowych [8, 28]. Związki te hamują enzymatyczną (hamowanie lipooksygenazy) i nieenzymatyczną peroksydację niezbędnych kwasów tłuszczowych [17]. Z kazeiny mogą zostać uwolnione kazeinofosopeptydy hamujące oksydację lipidów. Usuwają one wolne rodniki, chelatując jony metali tworząc kompleksy z wapniem, żelazem, cynkiem [30].

Peptydy o właściwościach antyoksydacyjnych zostały wyizolowane z kazeiny-a_{s1} (fr. 59-79, 1-21, 46-70). Zdolność usuwania wolnych rodników wykazuje także peptyd o sekwencji YFYPEL otrzymany z tej kazeiny [8]. Fragment 1-25 kazeiny-b, otrzymany w wyniku hydrolizy trypsyną, chelatując jony żelaza, chronił wielonienasycone kwasy tłuszczowe przed ich utlenianiem [30]. Natomiast peptyd, fragment kazeiny-b o sekwencji KVL-PVEK, otrzymany po hydrolizie białka trypsyną i/lub subtylizyną, zapobiegał utlenianiu kwasu linolenowego.

Właściwości antyoksydacyjne wykazywały także fragmenty białka o sekwencjach VKEAMAPK, AVPYYPQR, VL-PVPEK [8].

W obecności peptydu antyoksydacyjnego o sekwencji ARHPHPLSFM (fragment kazeiny-k) stabilność b-karotenu była większa, w porównaniu do BHT (**B**utylo**H**ydrok**S**y**T**oluen). Peptyd ten został wyizolowany z produktów fermentowanych z udziałem *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* [8, 36].

O właściwościach antyoksydacyjnych białek serwatkowych decyduje m.in. obecność aminokwasów siarkowych

w ich strukturze [15]. Reszty cysteiny (aminokwas siarkowy) występujące w Ig-b i Ia-a, wzmagają syntezę glutationu - antyoksydanta naturalnie występującego w komórce [42]. Zdolność neutralizowania wolnych rodników i hamowania reakcji enzymatycznych i nieenzymatycznego utleniania lipidów wykazywał fragment Ig-b, peptyd o sekwencji WYSLAMAASDI. Peptyd ten otrzymany w wyniku przeprowadzonej proteolizy korolazą PP wykazywał większą zdolność neutralizacji wolnych rodników niż BHA (**B**utylo**H**ydrok**S**y**A**nizol). Z Ig-b i Ia-a mogą zostać także uwolnione peptydy o sekwencjach MHIRL, YVEEL, wykazujące właściwości antyoksydacyjne [8].

Literatura:

1. Apostolidis E., Kwon Y.I., Shetty K. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innov. Food Sci. Emer. Technol.*, 2007, 8, 46-54
2. Bütikofer U., Meyer J., Sieber R., Walther B., Wechsler D. Occurrence of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *J. Dairy Sci.*, 2008, 91, 29-38
3. Caceda R., Kinkead B., Nemeroff C.B. Neurotensin: role in psychiatric and neurological diseases. *Peptides*, 2006, 27, 2385-2404
4. Chabance B., Jollès P., Izquierdo C., Mazoyer E., Francoual C., Drouet L., Fiat A.M. Characterization of an antithrombotic peptide from kappa-casein in newborn plasma after milk ingestion. *Br. J. Nutr.*, 1995, 73, 583-590
5. Chatterton D.E.W., Smithers G., Roupas P., Brodkorb A. Bioactivity of b-lactoglobulin and a-lactalbumin – Technological implications for processing. *Int. Dairy J.*, 2006, 16, 1229-1240
6. Clare D.A., Swaisgood H.E. Bioactive milk peptides: A prospectus. *J. Dairy Sci.*, 2000, 83, 1187-1195
7. Cybul M., Nowak R. Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. *Herba Polonica*, 2008, 54, 68-78
8. Darewicz M., Dziuba J. 2009. Biologicznie i funkcjonalnie aktywne peptydy. Peptydy funkcjonalnie aktywne. Peptydy antyoksydacyjne. W: Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności. Red. Dziuba J., Fornal Ł. WNT, Warszawa. 79-84
9. Dionysius D.A., Marschke R.J., Wood A.J. Milne J., Beattie T.R., Jiang H., Treloar T., Alewood P.F., Grieve P.A. Identification of physiologically functional peptides in dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.*, 2000, 55, 103
10. Döring F., Will J., Amasheh S., Clauss W., Ahlbrecht H., Daniel H. Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 23211-23218
11. Dziuba J. 2009. Biologicznie i funkcjonalnie aktywne peptydy. Peptydy przeciwnkrzepliwne. W: Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności. Red. Dziuba J., Fornal Ł. WNT, Warszawa, 22-26
12. Dziuba M., Dziuba B. 2009. Bazy danych białek i bioaktywnych peptydów – BIOPEP. W: Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności. Red. Dziuba J., Fornal Ł. WNT, Warszawa, 141-175
13. Dziuba J., Fornal Ł. 2009. Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności. WNT, Warszawa, 1-480
14. Erickson R.H., Song J.S., Yoshioka M., Gulli R., Miura S., Kim Y.S. Identification of proline-specific carboxypeptidase localized to brush border membrane of rat small intestine and its possible role in protein digestion. *Digest. Diseases Sci.*, 1989, 34, 400-406
15. Farnfield M.M., Smith S., Stockmann R. Antioxidant activity of b-lactoglobulin and its modified derivatives. *Aust. J. Dairy Technol.*, 2003, 58, 186-194
16. Fitzgerald R.J., Murray B.A. Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol.*, 2006, 59, 118-125
17. Fitzgerald R.J., Murray B.A., Walsh D.J. Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nut.*, 2004, 134, 980S-988S
18. Fosset S., Tome D. Dietary protein-derived peptides with antithrombotic activity. *Bull. IDF*, 2000, 353-358, 65-68
19. Fuglsang A., Rattray F.P., Nilsson D., Nyborg N.C.B. Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *Anton. Leeuw. Int. J.G.*, 2003, 83, 27-34
20. Fujita H., Yamagami T., Ohshima K. Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutr. Res.*, 2001, 21, 1149-1158
21. Fujita H., Yoshikawa M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharm.*, 1999, 44, 123-127
22. Geisler S., Berod A., Zahm D.S., Rostene W. Brain neurotensin, psychostimulants, and stress – emphasis on neuroanatomical substrates. *Peptides*, 2006, 27, 2364-2384
23. Gupta A., Mann B., Kumar R., Sangwan R.B. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *Int. J. Dairy Technol.*, 2009, 63, 339-347
24. Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Brit. J. Pharmacol.*, 2004, 142, 231-255
25. Hartmann R., Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opinion Biotech.*, 2007, 18, 163-169
26. Hata Y., Yamamoto M., Ohni M., Nakajima K., Nakamura Y., Takano T. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996, 64, 767-771
27. Hayes M., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross R.P. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptides functions. *Biotechnol. J.*, 2007, 2, 435-449

28. Hernández-Ledesma B., Davalos A., Bartolome B., Amigo L., Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 588-593
29. Jauhainen T., Vapaatalo H., Poussa T., Kyrönpalo S., Rasmussen M., Korpela R. *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. *Amer. J. Hypert.*, 2005, 18, 1600-1605
30. Kansci G., Genot C., Meynier A., Gaucheron F., Chobert J.M. b-Caseinophosphopeptide (f1-25) confers on b-casein tryptic hydrolysate an antioxidant activity during iron/ascorbate-induced oxidation of liposomes. *Lait*, 2004, 84, 449-462
31. Kitts D.D., Weiler K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.*, 2003, 9, 1309-1323
32. Korhonen H., Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides – opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.*, 2003, 9, 1297-1308
33. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.*, 2006, 16, 945-960
34. Korhonen H.J. Bioactive milk proteins and peptides: From science to functional applications. *Austr. J. Dairy Technol.*, 2009a, 64, 16-25
35. Korhonen H.J. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Funct. Foods*, 2009b, 1, 177-187
36. Kudoh Y., Matsuda S., Igoshi K., Oki T. Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* IFO 13953. *J. Japan Soc. Food Sci.*, 2001, 48, 44-50
37. Kulbacka J., Saczko J., Chwiłkowska A. Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek. *Pol. Merk. Lek.*, 2009, 157, 44, 44-47
38. Li G.-H., Le G.-W., Shi Y.-H., Shrestha S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr. Res.*, 2004, 24, 469-486
39. Liu Q., Raina A.K., Smith M.A., Sayre L.M., Perry G. Hydroxynonenal, toxic carbonyls, and Alzheimer disease. *Mol. Aspects Med.*, 2003, 24, 305-313
40. Lopez-Fandiño R., Otte J., van Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *Int. Dairy J.*, 2006, 16, 1277-1293
41. Masuda O., Nakamura Y., Takano T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.*, 1996, 126, 3063-3068
42. Meisel H. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12, 1905-1919
43. Meisel H., Walsh D.J., Murray B.A., Fitzgerald R.J. 2006. ACE inhibitory peptides. In: *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*. Edited by Mine V., Shahidi F., Taylor and Francis. 269-315
44. Meyer J., Bütikofer U., Walther B., Wechsler D., Sieber R. Hot topic: Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro during ripening of different Swiss cheese varieties. *J. Dairy Sci.*, 2009, 92, 826-836
45. Minervini F., Algaron F., Rizzello C.G., Fox P.F., Monnet V., Gobetti M. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolysed caseins of milk from six species. *Appl. Environ. Microb.*, 2003, 69, 5297-5305
46. Mizushima S., Ohshige K., Watanabe J., Kimura M., Kadowaki T., Nakamura Y., Tochikubo O., Ueshima H. Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *Am. J. Hypertens.*, 2004, 17, 701-706
47. Moreau R.A., Whitaker B.D., Hicks K.B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.*, 2002, 41, 457-500
48. Nagaoka S., Futamura Y., Miwa K., Awano T., Yamauchi K., Kanamaru Y., Tadashi K., Kuwata T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 281, 11-17
49. Ohinata K., Sonoda S., Inoue N., Yamauchi R., Wada K., Yoshikawa M. b-lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from bovine b-lactoglobulin, enhances memory consolidation in mice. *Peptides*, 2007, 28, 1470-1474
50. Ong L., Shah N.P. Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2008, 41, 1555-1566
51. Otte J., Shalaby S.M.A., Zakora M., Nielsen M.S. Fractionation and identification of ACE- inhibitory peptides from a-lactalbumin and b-casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *Int. Dairy J.*, 2007a, 17, 1460-1472
52. Otte J., Shalaby S.M., Zakora M., Pripp A.H., El-Shabrawy S.A. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates. Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *Int. Dairy J.*, 2007b, 17, 488-503
53. Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, 2001, 11, 347-356
54. Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Piilola K., Tupasela T., Korhonen H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digest: concentration and characterization of active peptides. *J. Dairy Res.*, 2000, 67, 53-64
55. Pihlanto-Leppälä A., Rokka T., Korhonen H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int. Dairy J.*, 1998, 8, 325-331
56. Pritchard S.R., Phillips M., Kailasapathy K. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Res. Int.*, 2010, 43, 1545-1548
57. Quirós A., Hernández-Ledesma B., Ramos M., Amigo L., Recio I. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine Kefir. *J. Dairy Sci.*, 2005, 88, 3480-3487
58. Quirós A., Ramos M., Maguerza B., Delgado M.A., Miguel M., Aleixandre A., Recio I. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int. Dairy J.*, 2007, 17, 33-41
59. Rutherford-Markwick K.J., Moughan P.J. Bioactive peptides derived from food. *J. AOAC Int.*, 2005, 88, 955-966
60. Seppo L., Jauhainen T., Poussa T., Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 77, 326-330
61. St-Gelais F., Jomphe C., Trudeau L.E. The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J. Psych. Neur.*, 2006, 31, 229-245
62. Teschemacher H., Umbach M., Hamel U., Praetorius K., Ahnert-Hilger G., Brantl V., Lottspeich F., Henschen A. No evidence for the presence of b-casomorphins in human plasma after ingestion of cow's milk or milk products. *J. Dairy Res.*, 1986, 53, 135-138

63. Tonouchi H., Suzuki M., Uchida M., Oda M. Antihypertensive effect of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from enzyme modified cheese. *J. Dairy Res.*, 2008, 75, 284-290
64. Yamauchi R., Ohinata K., Yoshikawa M. Beta-lactotensin and neurotensin rapidly reduce serum cholesterol via NT₂ receptor. *Peptides*, 2003a, 24, 1955-1961
65. Yamauchi R., Sonoda S., Jinsmaa Y., Yoshikawa M. Antinociception induced by beta-lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from beta-lactoglobulin, is mediated by NT₂ and D₁ receptors. *Life Sci.*, 2003b, 73, 1917-1923
66. Yamauchi R., Usui H., Yunden J., Takenaka Y., Tani F., Yoshikawa M. Characterization of beta-lactotensin, a bioactive peptide derived from bovine beta-lactoglobulin, as a neurotensin agonist. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003c, 67, 940-943
67. Yoshioka M., Erickson R.H., Woodley J.F., Gulli R., Guan D., Kim Y.S. Role of rat intestinal brush border membrane angiotensin converting enzyme in dietary protein digestion. *Am. J. Physiol.*, 253, 1987, G781-G786
68. Zdybel E. 2009. Biologicznie i funkcjonalnie aktywne peptydy. Peptydy przeciwnadciśnieniowe. W: *Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności*. Dziuba J., Fornal Ł. WNT, Warszawa. 14-22
- <http://www.uwm.edu.pl/biochemia> (dostęp: październik 2013r.)
- <http://www.uniprot.org/> (dostęp: październik 2013r.)