



# Prozdrowotne właściwości biologicznie aktywnych peptydów (BAP) w produktach mlecznych – aspekty biotechnologiczne i medyczne

Health-promoting properties of bioactive peptides (BAP) in dairy products – biotechnological and medical aspects

Natalia Kordala<sup>1,A,D</sup>, Marta Bednarska<sup>2,B,D</sup>, Marek Adamczak<sup>1,E-F</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Polska

<sup>2</sup> Szpital im. św. Wojciecha w Gdańsku

A – Koncepcja i projekt badania, B – Gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – Analiza i interpretacja danych, D – Napisanie artykułu, E – Krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – Zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Kordala N, Bednarska M, Adamczak M. Prozdrowotne właściwości biologicznie aktywnych peptydów (BAP) w produktach mlecznych – aspekty biotechnologiczne i medyczne. Med Og Nauk Zdr. doi: 10.26444/monz/135545

## ■ Streszczenie

**Wprowadzenie i cel pracy.** Biologicznie aktywne peptydy (BAP) definiowane są jako fragmenty białek, które po uwolnieniu z ich sekwencji aminokwasowej stają się aktywne. Prekursorami tych peptydów mogą być białka mleka, głównie frakcje kazeiny i białek serwatkowych. Celem pracy jest omówienie procedur pozyskiwania oraz charakterystyka właściwości biologicznie aktywnych peptydów jako składników wspomagających leczenie chorób dietozależnych.

**Stan dotychczasowej wiedzy.** Korzystną aktywność BAP określono do tej pory w testach *in vitro*, a kilka pozytywnych właściwości potwierdzono w testach *in vivo*. Większość z nich reguluje odpowiedzi immunologiczne, żołądkowo-jelitowe, hormonalne i neurologiczne, odgrywając w ten sposób istotną rolę w zapobieganiu nowotworom, osteoporozie, nadciśnieniu i innym chorobom. Źródłem BAP mogą być bioprodukty, produkty żywnościowe lub frakcje wzbogacone o składniki aktywne, wydzielone i oczyszczone peptydy. W układzie krążenia i w układzie pokarmowym człowieka stwierdzono tylko w nielicznych analizowanych wariantach obecność BAP, przy czym były one głównie pochodnymi kazeiny mleka krowiego. Wskazano na znaczną różnorodność BAP w fermentowanych produktach mlecznych, takich jak jogurty, kefiry i sery. Ich skład i właściwości w dużym stopniu zależą od doboru drobnoustrojów oraz od zastosowanych operacji i procesów jednostkowych.

**Podsumowanie.** Zaprezentowany w niniejszym opracowaniu przegląd literatury wskazuje na liczne zależności determinujące aktywność BAP oraz sprzyja popularyzacji wiedzy o wartości żywieniowej wyrobów mlecznych, zawierających wiele pozytywnie oddziałujących na zdrowie człowieka składników. Zagadnieniem, które należy przeanalizować, jest ocena odpowiedniego stężenia BAP, ich biodostępność, zapewniająca aktywność *in vivo*.

## ■ Słowa kluczowe

białka mleka, biologicznie aktywne peptydy (BAP), właściwości funkcjonalne, bakterie kwasu mlekowego, właściwości prozdrowotne

## ■ Abstract

**Introduction and Objective.** Biologically active peptides (BAP) are fragments of amino acid sequences of food proteins that become active upon release. The precursors of these peptides can be milk proteins, mainly casein and whey protein fractions. The aim of this study is to discuss the possibilities of synthesis and properties of protein-derived biologically active peptides, as factors preventing diet-related diseases.

**Current state of knowledge.** Health-promoting BAP activity has been determined to-date in *in vitro* studies, and several of these beneficial properties have been confirmed in *in vivo* studies. The majority of these peptides regulate immunological, gastrointestinal, hormonal and neurological responses, thereby playing a vital role in the prevention of cancer, osteoporosis, hypertension and other diseases. Sources of BAP include bioproducts, food products, or fractions enriched with active ingredients or purified peptides. In the human circulatory and digestive systems, only a few analyzed variants of BAP have been found, which were mainly derived from bovine milk casein. A significant variety of naturally formed BAP have been identified in fermented dairy products, such as yoghurt, kefir and cheese. Their composition and properties depend, to a large extent, on the types of microorganisms used, and the technological procedures employed.

**Conclusions.** This review of the current knowledge of milk protein-derived bioactive peptides indicates many relationships and contributes to the promotion of the nutritional value of dairy products containing various health-promoting ingredients, including BAP. The issue that should be analyzed is the assessment of the appropriate concentration of BAP, their bioavailability, ensuring activity *in vivo*.

## ■ Key words

milk proteins, biologically active peptides (BAP), functionality, lactic acid bacteria, health-promoting properties

Adres do korespondencji: Natalia Kordala, Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Heweliusza 1, 10-718 Olsztyn, Polska  
E-mail: natalia.kordala@uwm.edu.pl

Nadesłano: 21.11.2020; zaakceptowano do publikacji: 07.04.2021; opublikowano online: 06.05.2011

## WPROWADZENIE

Mleko i produkty mleczne są źródłem wartościowych składników żywności, naturalnie występujących w mleku lub produktów biotransformacji składników mleka, np. kwasów tłuszczowych, w tym sprzężonych dienów kwasu linolowego (izomerów *cis*, *trans*-kwasu linolowego, 18:2, CLA, głównie rumenowego 18:2, *c9,t11*) [1], kwasu *trans*-palmitoleinowego (16:1, *n-7*) [2], witamin, galaktooligosacharydów (GOS) [3]. Zalicza się do nich także białka, w tym immunoglobuliny, laktoferynę, których całkowita zawartość w mleku krowim jest zmienna i wynosi od 3,2 do 3,8%. Dominującym białkiem mleka jest kazeina (26,0 g/dm<sup>3</sup>), w skład której wchodzi: α-kazeina (13,0 g/dm<sup>3</sup>), β-kazeina (9,3 g/dm<sup>3</sup>) oraz κ-kazeina (3,3 g/dm<sup>3</sup>). Grupą ważną pod względem żywieniowym są białka serwatkowe (6,3 g/dm<sup>3</sup>), do których zaliczamy biologicznie aktywne: β-laktoglobuliny (3,2 g/dm<sup>3</sup>), α-laktoalbuminy (1,2 g/dm<sup>3</sup>), immunoglobuliny (A, M, G; 0,7 g/dm<sup>3</sup>), laktoferynę (0,1 g/dm<sup>3</sup>), laktoperoksydazę (0,003 g/dm<sup>3</sup>) oraz lizozym (0,0004 g/dm<sup>3</sup>) [4]. Zarówno kazeina, jak i białka serwatkowe zawierają nieaktywne peptydy, które są uwalniane podczas enzymatycznej hydrolizy *in vivo* lub *in vitro*, biokonwersji z użyciem drobnoustrojów lub procesów chemicznych i fizycznych [5]. Jedynie procesy biologiczne zapewniają możliwość planowania i prowadzenia selektywnej oraz kontrolowanej biokatalizy w łagodnych warunkach środowiska, a otrzymane w ten sposób produkty można określać jako naturalne.

W zależności od rodzaju substratu po enzymatycznej hydrolizie białek mleka otrzymuje się peptydy o różnej masie cząsteczkowej, a skład i sekwencja aminokwasów determinują ich aktywność. Cechy funkcjonalne peptydów są podstawą ich podziału i oceny wartości żywieniowej. Należy jednak zwrócić uwagę na konieczność weryfikacji ich biodostępności i właściwości *in vivo*. W pozyskiwaniu BAP stosowane są różne techniki i technologie oraz wiedza o aktywności i specyficzności enzymów proteolitycznych, powszechnie określanych m.in. jako proteinyazy, proteazy, peptydazy [6]. Międzynarodowa Unia Biochemii i Biologii Molekularnej (IUBMB) oraz baza peptydaz i inhibitorów peptydaz (MEROPS, <https://www.ebi.ac.uk/merops/>) rekomenduje stosowanie określenia „peptydaza” dla enzymów katalizujących hydrolizę białek [7].

Przedstawiając omawianą problematykę, nie można pominąć znaczenia postępu technicznego i technologicznego w produkcji żywności, w tym w przemyśle mleczarskim. Stosowane są tzw. niekonwencjonalne metody obróbki mleka, np. przetwórstwo z użyciem: homogenizacji wysokociśnieniowej, wysokich ciśnień hydrostatycznych, ultradźwięków, mikrofal czy pulsacyjnego pola elektrycznego. Głównym celem tych innowacyjnych technik jest utrwalenie produktu i zachowanie w maksymalnym stopniu aktywności składników biologicznie aktywnych. Obróbka mleka z użyciem tych technik wpływa na zmiany jakościowe białek mleka, enzymów, umożliwiając modyfikację hydrolizy białek, selektywności biokatalizatorów [8]. Mogą być one także wykorzystane do niwelowania ograniczeń tradycyjnych metod pozyskiwania BAP, zwiększenia wydajności i efektywności bioproduktu. Techniki te umożliwiają zwiększenie atrakcyjności ekonomicznej przemysłowej produkcji BAP i są przedmiotem intensywnych prac badawczych [9]. Rozwój metod bioinformatycznych, technik biologii molekularnej w niedługim czasie umożliwi zastosowanie metod

ukierunkowanej ewolucji molekularnej w celu doskonalenia właściwości peptydaz, wydaje się także, że wkrótce możliwe będzie zastosowanie projekcji białek na powierzchni komórek drobnoustrojów do otrzymywania BAP.

Celem pracy jest przedstawienie współczesnego stanu wiedzy dotyczącej: klasyfikacji, właściwości oraz metod otrzymywania BAP w produktach mlecznych ze szczególnym uwzględnieniem procesów biokatalizy oraz fermentacji. Literaturę do przygotowania artykułu zebrano na podstawie bazy ScienceDirect. W celu identyfikacji artykułów badawczych o peptydach pochodzących z białek mleka wyszukiwanie przeprowadzono przy użyciu m.in. terminów „mleko” (ang. *milk*), „kazeina” (ang. *casein*), „serwatka” (ang. *whey*), „funkcja biologiczna” (ang. *biological function*), „bioaktywne peptydy” (ang. *bioactive peptides*).

## Otrzymywanie, klasyfikacja i właściwości bioaktywnych peptydów

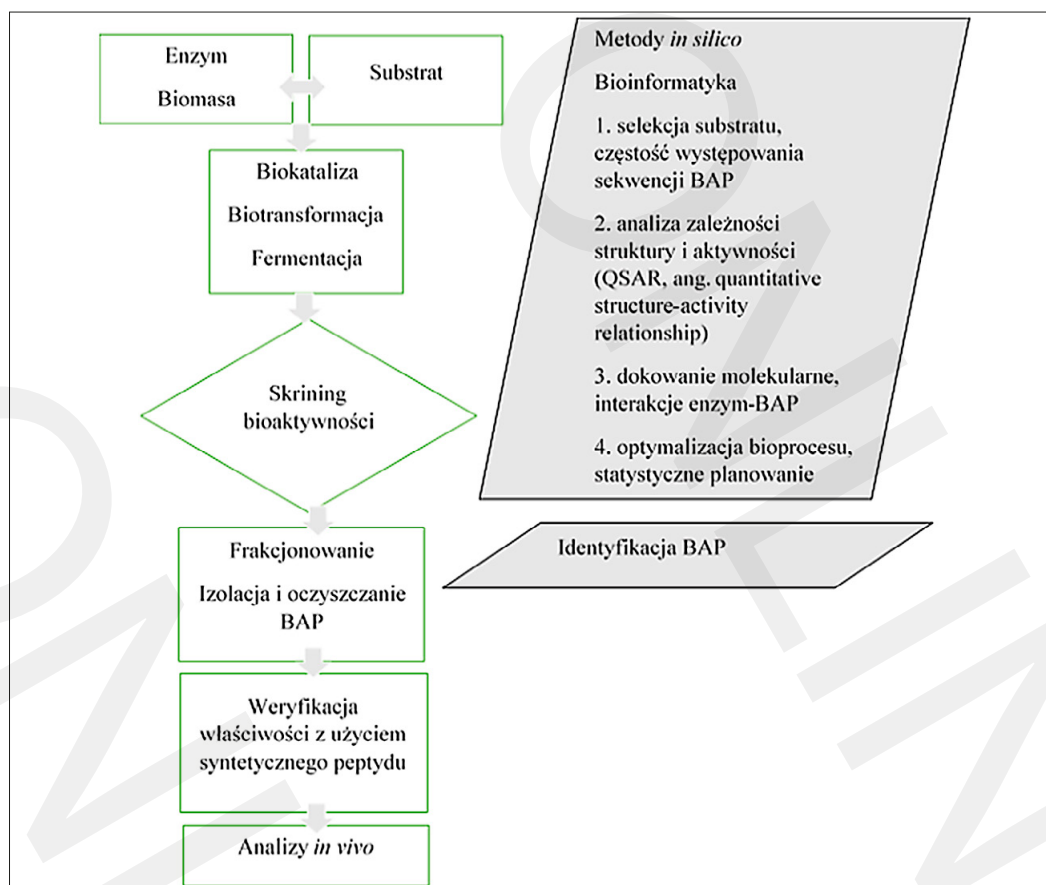
W skład proteomu mleka wchodzi peptydy, pochodne białek, o zróżnicowanej aktywności biologicznej. Peptydy biologicznie aktywne (BAP, ang. *bioactive peptide*) to sekwencje białek, które są nieaktywne w białku macierzystym, natomiast po uwolnieniu mogą oddziaływać z odpowiednimi receptorami oraz regulować funkcje fizjologiczne organizmu [10].

Schemat postępowania w celu otrzymania BAP przedstawiono na rys. 1, a główne etapy ich otrzymywania polegają na przeprowadzeniu:

- 1) hydrolizy *in vivo* katalizowanej przez enzymy trawienne w układzie pokarmowym człowieka (m.in.: pepsyny, trypsyny i chymotrypsyny);
- 2) procesów technologicznych, takich jak fermentacja, dzięki aktywności proteolitycznej mikroorganizmów;
- 3) procesów fizycznych i/lub chemicznych, np. działania ultradźwięków, mikrofal, kwasów lub związków alkalicznych;
- 4) enzymatycznej hydrolizy *in vitro* [11].

Dobór enzymów pochodzenia roślinnego, zwierzęcego lub mikrobiologicznego do katalizy hydrolizy białek prowadzi się na podstawie analizy selektywności enzymu oraz danych literaturowych wskazujących na możliwości jego zastosowania (tab. 1). Wydajność enzymatycznej hydrolizy białek mleka zależy od następujących czynników: rodzaju enzymu i substratu (sposobu jego wstępnej obróbki, w tym od zastosowania techniki wysokich ciśnień hydrostatycznych), warunków hydrolizy, tj. pH, temperatury, czasu, proporcji molowej enzym: substrat, ilości oraz rodzaju rozpuszczalnika i warunków mieszania. Proces można realizować w systemie okresowym lub ciągłym, najczęściej z zastosowaniem reaktorów membranowych lub z membraną enzymatyczną.

Oprócz wpływu na wydajność (aktywność enzymu), rodzaj zastosowanego enzymu, jego selektywność, decyduje o bioaktywności otrzymanego hydrolizatu. Z tego względu wybór odpowiedniego enzymu i substratu, a także warunków hydrolizy są kluczowymi zmiennymi w uzyskiwaniu hydrolizatów białkowych o pożądanym działaniu i właściwościach biologicznych [12]. Surowe hydrolizaty mogą być poddawane dalszej obróbce, np. inaktywacji termicznej enzymów, ultrafiltracji, filtracji, wirowaniu, zagęszczaniu z użyciem technik membranowych lub suszeniu. Zaproponowano klasyfikację BAP w zależności od ich funkcji (tab. 2). Niestety często występującą i największą wadą gotowego produktu są jego nieakceptowane właściwości sensoryczne, będące wynikiem



**Rysunek 1.** Schemat postępowania podczas doboru warunków uwalniania BAP i weryfikacji ich właściwości

Źródło:

**Tabela 1.** Charakterystyka peptydaz stosowanych do uwalniania BAP

Rodzaj enzymu	Selektywność substratowa	Wymagana kwasowość czynna środowiska	Pochodzenie enzymu
<b>Pochodzenia zwierzęcego</b>			
Pepsyna	Phe-, Leu-	1–4	Wieprzowa lub wołowa błona śluzowa żołądka
Chymozyna	Phe-Met	3–6	Żołądki cielęce, kozie lub owcze
Trypsyna	Arg-, Lys-	6–9	Trzustka wołowa lub wieprzowa
Chymotrypsyna	Tys-, Trp-, Phe-, Lys-	6–9	Trzustka wołowa lub wieprzowa
Elastaza	Leu-, Al-, Val-, Ile-	6–8	Trzustka wołowa lub wieprzowa
<b>Mikrobiologiczne</b>			
Bakteryjna neutralna	Phe-, Leu-, Val-	6–8	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefacines</i>
	Brak selektywności	6–9	<i>Bacillus subtilis</i>
	Brak selektywności	7–10	<i>Bacillus licheniformis</i>
Bakteryjna alkaliczna	Ile-Phe, Leu-Val	7–9	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>
	Brak selektywności	7–11	<i>Bacillus</i> spp.
Grzybowa kwasowa	Selektywność jak pepsyna	2–5	<i>Aspergillus niger</i>
	His-Leu, Phe-Phe	2–5	<i>Aspergillus niger</i>
	Selektywność jak chymozyna	4–6	<i>Rhizopus</i> spp.
	Selektywność jak chymozyna	3–7	<i>Cryphonectria parasitica</i>
Grzybowe alkaliczne	Brak selektywności	6–9	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Phe-Tyr	6–9	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Leu-Tyr	6–9	<i>Aspergillus oryzae</i>
<b>Pochodzenia roślinnego</b>			
Ficyna	Brak selektywności, Lys-, Ala-, Tyr-, Gly-	5–8	Owoce figi
Papaina	Brak selektywności, Arg-, Lys-, Phe-	5–9	Owoce papai
Bromelaina	Lys-, Tyr-, Gly-	5–8	Owoce ananasa

Źródło: [13]



otrzymywania produktów o niekorzystnym smaku. Enzymatyczną hydrolizę białek można kontrolować, wykorzystując metody inżynierii środowiska reakcji, aby zapobiec syntezie nieakceptowanych produktów.

**Tabela 2.** Przykład klasyfikacji BAP w zależności od ich właściwości i częstości występowania cechy

Często występujące cechy BAP	Sporadycznie identyfikowane cechy BAP	Unikalna aktywność BAP
Inhibicja ACE	Właściwości hipolipidemiczne	Przeciwdiabetyczna
Aktywność przeciwutleniająca	Wiązanie składników mineralnych	Przeciwsklerotyczna
Aktywność przeciwdrobnoustrojowa	Przeciwnowotworowa	Przeciwwirusowa
	Aktywność przeciwtrombotyczna	Przeciw wirusowi HIV
	Aktywność przeciwzapalna	Przeciw łaknieniu
	Immunomodulacja	Przeciw łysieniu plackowatemu
	Aktywność opioidowa	Przeciwbólowa

Źródło: [14].

Można projektować *in silico* otrzymanie frakcji o określonych masach cząsteczkowych, jak również pożądanej zawartości wolnych aminokwasów, weryfikować profil uzyskanych peptydów, dobierając właściwe preparaty enzymatyczne, analizując dane literaturowe. Stosując odpowiednie parametry procesu, można modelować właściwości funkcjonalne uzyskanych preparatów. Zastosowanie nowych technik separacji, np. chromatografii jonowymiennej, elektroforezy kapilarnej, ogniskowania izoelektrycznego, umożliwia utrzymanie frakcji BAP o większym stopniu czystości oraz określonym składzie i działaniu biologicznym [11]. Uzyskanie żywienia wymaganego stężenia BAP jest bardzo ważne dla zapewnienia ich pozytywnego oddziaływania na organizm człowieka, a otrzymane w ten sposób produkty są oddzielną kategorią produktów funkcjonalnych, suplementów diety.

Biologicznie aktywne peptydy wykazują różnorodne działanie: przeciwutleniające, antibakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, immunomodulujące, antyproliferacyjne, przeciwzakrzepowe, antykoagulacyjne, przeciwnadciśnieniowe, hemolityczne, opioidowe oraz wiążące wapń [11]. Niektóre BAP wykazują także aktywność antyamnezijną, chemotaktyczną, przeciwcukrzycową, hipocholesterolemiczną, hamują działanie niektórych enzymów oraz stymulują syntezę czerwonych krwinek [5, 15]. Regulują także czynność błony śluzowej żołądka, transport jonów, mogą łagodzić stany lękowe czy wpływać na wrażliwość sytości [15].

Peptydy, które wykazują biologiczną aktywność, zbudowane są najczęściej z 2 do 20 aminokwasów. Istnieją jednak także takie, które mogą się składać z większej liczby reszt aminokwasowych. Multifunkcyjny peptyd pochodzący z  $\kappa$ -kazeiny mleka, glikomakropeptyd, składa się z 64 reszt aminokwasowych [16]. Kazeina jest doskonałym substratem do produkcji różnorodnych BAP o działaniu hamującym enzym konwertujący angiotensynę I (ACE), immunologicznym, przeciwutleniającym, przeciwzakrzepowym lub opioidowym [11, 17]. Otrzymując peptydy w produktach żywnościowych, należy analizować aktywność biologiczną peptydów, ale również ich właściwości funkcjonalne, tj. rozpuszczalność, wodochłonność, właściwości emulgujące, zdolność tworzenia żeli.

Właściwości peptydów determinowane są jednak przede wszystkim przez skład i sekwencją aminokwasów (tab. 3). Kluczowymi dla aktywności peptydów są pierwszy i przedostatni aminokwas w sekwencji. Peptydy wykazujące aktywność *in vivo* zawierają przeciętnie dużo reszt proliny (67%), a na ich lokalizację ma wpływ długość sekwencji.

**Tabela 3.** Skład peptydów determinujący ich właściwości

Aktywność BAP	Charakterystyka składu BAP
Przeciwutleniająca	Grupy hydrofobowe i sulfhydrylowe
Przeciwdrobnoustrojowa	Krótkołańcuchowy peptyd, kationowy
Przeciwnadciśnieniowa	Sekwencje Pro-Val
Immunomodulacyjna	Sekwencje Gly-His
Opioidowa	Duży udział aminokwasów aromatycznych

Źródło: [18].

Dostępne są preparaty BAP wykazujące wskazane powyżej aktywności, a w badaniach klinicznych potwierdzono je dla przynajmniej trzech z nich o nazwach handlowych Calpis<sup>®</sup> i Ameal S<sup>®</sup> (Calpis Co, Japonia) oraz Evolus<sup>®</sup> (Valio Oy, Finlandia), zawierających peptydy Ile-Pro-Pro i Val-Pro-Pro z  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazeiny o działaniu hipotensyjnym [16]. Innymi przykładami produktów handlowych z BAP są: przykładowo białek serwatkowych „BioZate” (Davisco, USA), zawierający fragmenty pochodzące z  $\beta$ -laktoglobuliny ( $\beta$ -LG), oraz BioPURE-GMP (Davisco), zawierający glikomakropeptyd f(106–169) o aktywności przeciwwirusowej i przeciwbakteryjnej, wpływający na krzepliwość krwi oraz zapobiegający próchnicy. Preparat „C12 peptide” (DMV International, Holandia) stosowany jako dodatek do żywności i wzbogacony peptydem przeciwnadciśnieniowym o sekwencji Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Gln-Val-Phe-Gly-Lys, otrzymywany jest w wyniku hydrolizy kazeiny [19]. Niskotłuszczowy ser dojrzewający Festivo (MTT, Finlandia), produkowany z udziałem *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* spp., również zawiera peptydy przeciwnadciśnieniowe [16]. Hydrolizat kazeiny PeptoPro (DSM Food Specialties, Holandia) wpływa na kondycję i regenerację mięśni, a Vivinal Alpha (BDI, Holandia), zawierający peptydy serwatki, działa uspokajająco i usypiająco.

## BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ BIAŁEK MLEKA

### Inhibitory ACE – peptydy odpowiedzialne za obniżenie ciśnienia krwi

Jednym z ważnych regulatorów ciśnienia krwi i napięcia naczyniowego jest układ renina–angiotensyna (RAS, ang. *renin–angiotensin system*). Zgodnie ze szlakiem RAS nerki wydzielają enzym proteolityczny – reninę (EC 3.4.22.15), która przekształca obecne we krwi białko, angiotensynogen, w angiotensynę I. Reakcję hydrolizy decapeptydu do angiotensyny II katalizuje ACE (EC 3.4.15.1), która ma bardzo silne działanie zwężające naczynia krwionośne, reguluje bilans wodny i elektrolityczny, działa prozapalnie w ścianie naczyń [20]. Inhibitory konwertazy angiotensyny należą do farmaceutyków stosowanych w leczeniu nadciśnienia. Najlepiej poznane peptydy o aktywności inhibitora ACE pochodzą z białek mleka: Ile-Pro-Pro oraz Val-Pro-Pro, które wykazują właściwość obniżenia skurczowego ciśnienia krwi [21].

Najczęściej badane regiony o potencjalnej aktywności hamującej ACE znajdują się w krowiej  $\beta$ -kazeinie. Są to następujące fragmenty: 58–73 (Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn), 135–138 (Leu-Pro-Leu-Pro) i 197–204 (Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro). Regiony te cechuje duża zawartość reszt prolinowych, co zwiększa prawdopodobieństwo, że peptydy z nich wytworzone będą zawierać prolinę na C-końcu, co ułatwia wiązanie do ACE. Obecność prolina w sekwencji aminokwasowej zwiększa odporność peptydu na trawienie [22]. Z pozostałych frakcji kazeiny ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\kappa$ ) powstaje mniej unikalnych peptydów hamujących ACE.

Seppo i in. [23] w swoim doświadczeniu ocenili długoterminowe działanie mleka Evolus, otrzymanego w wyniku fermentacji z użyciem *Lactobacillus helveticus* LBK-16H, na obniżenie ciśnienia krwi u osób z nadciśnieniem. W randomizowanym badaniu realizowanym przez 21 tygodni wzięło udział 39 pacjentów z nadciśnieniem. Grupa eksperymentalna przyjmowała każdego dnia 150 cm<sup>3</sup> fermentowanego produktu, który w 100 g zawierał 2,0 mg i 1,5 mg, odpowiednio peptydu Val-Pro-Pro oraz Ile-Pro-Pro. Odnotowano u tych osób obniżenie skurczowego ciśnienia krwi o 14,4 mg Hg, natomiast rozkurczowego o 7,7 mg Hg. W grupie kontrolnej średnie zmiany skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi wyniosły odpowiednio: -8,5 i -3,8 mm Hg.

Peptydy przeciwnadciśnieniowe uwalniane są nie tylko z kazeiny, ale również z białek serwatkowych. Peptydowe inhibitory ACE zidentyfikowano w hydrolizatach białek serwatkowych,  $\alpha$ -laktoalbuminy i  $\beta$ -laktoglobuliny [24, 25]. Badania z udziałem szczurów z nadciśnieniem wykazały, że peptydy o sekwencjach Tyr-Gly-Leu-Phe i Tyr-Leu-Phe-Phe ( $\beta$ -laktorfiny), pochodzące z  $\beta$ -laktoglobuliny, poprawiały relaksację tętnic, a peptyd o sekwencji Ala-Leu-Pro-Met, zwany  $\beta$ -laktozyną, obniżał ciśnienie krwi u szczurów z wrodzonym nadciśnieniem [26].

### Peptydy antyamnezyczne

Ze względu na brak skutecznej terapii demencji coraz więcej uwagi poświęca się profilaktyce. Badania epidemiologiczne sugerują, że spożywanie niektórych produktów mlecznych może zmniejszyć ryzyko pogorszenia funkcji poznawczych u osób starszych i zapobiegać chorobie Alzheimera. Crichton i in. [27] wykazali, że osoby spożywające raz w tygodniu niskotłuszczowe produkty mleczne, w tym jogurty i sery, charakteryzowały się lepszą sprawnością procesów poznawczych w porównaniu do osób, których dieta była uboga we wspomniane produkty. Białka serwatkowe bogate w  $\alpha$ -laktoalbuminę, wpływając na poziom tryptofanu w mózgu, poprawiają zdolności poznawcze [28], a włączenie do jadłospisu mleka oraz jego fermentowanych produktów zmniejsza ryzyko demencji oraz poprawia pamięć krótkotrwałą [29, 30]. Ano i in. [31] w swoim doświadczeniu przeprowadzonym na myszach z amnezją indukowaną skopolaminą analizowali wpływ peptydów z fermentowanych produktów mleczarskich na poprawę funkcji pamięci. Autorzy stwierdzili, że bioaktywne peptydy pochodzące z białek serwatkowych poprawiły funkcję pamięci u myszy, a efekty potwierdzono u starszych osobników. Peptydy zawierające sekwencję Trp-Tyr bezpośrednio hamowały aktywność monoaminoooksydazy-B (MAO-B) i wpływały na zwiększenie poziomu dopaminy w tkance mózgowej. Monoaminoooksydazy to enzymy katalizujące przemianę monoamin, w następstwie której powstają aldehyd, nadtlenek wodoru

i amoniak. Synteza tych metabolitów prowokuje stres oksydacyjny i proces apoptozy, leżącej u podstaw etiopatogenezy chorób neurodegeneracyjnych [32]. Metabolizując głównie serotoninę i dopaminę, MAO-B odgrywa ważną rolę w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych [33].

### Peptydy przeciwutleniające (antyoksydacyjne)

Brak równowagi między powstawaniem wolnych rodników a mechanizmami zaangażowanymi w ich eliminację skutkuje stresem oksydacyjnym. Leży on u podstaw wielu tzw. chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworów, chorób układu krwionośnego, cukrzycy czy chorób reumatycznych [34, 35]. Mleko i produkty mleczarskie są podstawowym źródłem peptydów o aktywności przeciwutleniającej. Większość peptydów antyoksydacyjnych zawiera hydrofobowe aminokwasy na N-końcu i/ lub C-końcu oraz Pro, His lub Tyr w sekwencji [36]. Heksapeptyd z  $\alpha$ s1-kazeiny (fragment 144–149) o sekwencji Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu charakteryzuje się dużą zdolnością wychwytywania rodników ponadtlenkowych, a peptydy pochodzące z trawienia  $\beta$ -kazeiny trypsyną silnie hamują aktywności lipooksygenazy [34]. Fragment  $\beta$ -kazeiny o sekwencji Lys-Val-Leu-Pro-Val-Glu-Lys, otrzymany po hydrolizie białka trypsyną i/ lub subtylizyną, zapobiegał utlenianiu kwasu linolenowego. Właściwości antyoksydacyjne wykazywały także fragmenty białka o sekwencjach Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys, Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg i Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Lys [37].

W peptydach z białek serwatkowych aktywność antyoksydacyjna związana jest z dużą zawartością reszt cysteiny wspomagającej syntezę glutationu – wewnątrzkomórkowego przeciwutleniacza [12]. Zdolność neutralizowania wolnych rodników i hamowania reakcji enzymatycznych i nieenzymatycznego utleniania lipidów wykazywał fragment  $\beta$ -laktoglobuliny o sekwencji Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile. Peptyd ten, otrzymany w wyniku przeprowadzonej proteolizy korolazą PP, charakteryzował się większą aktywnością neutralizacji wolnych rodników niż BHA (butylowany hydroksyanizol). Właściwości antyoksydacyjne posiadają także peptydy o sekwencjach Met-His-Ile-Arg-Leu, Tyr-Val-Glu-Glu-Lys uwolnione z  $\alpha$ -laktoalbuminy i  $\beta$ -laktoglobuliny [37].

### Peptydy antydrobnoustrojowe

Peptydy pochodzące z żywności mogą zawierać nawet do 50 reszt aminokwasowych. W warunkach naturalnych występują zazwyczaj w formie kationowej, zawierają aminokwasy hydrofobowe i wykazują szerokie spektrum działania w stosunku do bakterii, wirusów i grzybów [35].

Wśród najważniejszych efektów działania peptydów o aktywności antydrobnoustrojowej wymieniane są: zmiany przepuszczalności błony komórkowej, destabilizacja jej struktury lipidowej, tworzenie micel lub kanałów w błonie, wiązanie z lipopolisacharydem, zatrzymywanie replikacji DNA, zakłócenie oddychania sprzężonego z błoną komórkową, hamowanie ekspresji białek oraz uwalnianie ATP, a w rezultacie tych zmian – liza komórek [34, 35].

Pierwszym peptydem przeciwdrobnoustrojowym wyizolowanym z mleka w następstwie działania podpuszczki była laktenina, zidentyfikowana przez Simmesa i Jonesa w 1930 roku [34]. Peptyd ten wykazywał działanie przeciwko patogennym szczepom paciorkowców. Polipeptydy obronne o masie 5 kDa, zwane kazecydynamy, wyizolowano z kazeiny mleka krowiego poddanej hydrolizie chymozyną, wykazując



ich hamujące działanie na wzrost *Staphylococcus aureus* [38]. Dowiedziono, że pepsynowy hydrolizat laktoferyny, zawierający w pozycjach od 17 do 41 fragment, zwany laktoferycyną, odznaczał się większą aktywnością antydrobnoustrojową niż peptyd macierzysty [15, 39]. Bydłęca laktoferyna i będące jej pochodnymi peptydy wykazują znaczące działanie hamujące na wzrost wybranych patogenów w warunkach *in vitro*, takich jak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Listeria monocytogenes* [40, 41]. Van der Kraan i in. [42] wyizolowali i scharakteryzowali nowy peptyd pochodzący z laktoferyny – laktoferrampinę (aminokwasy 268–284). Peptyd ten wykazywał aktywność bakterioobójczą wobec *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Fragment  $\beta$ -kazeiny zawierający aminokwasy 184–210, otrzymany w wyniku częściowej hydrolizy kazeinianu sodu katalizowanej przez proteinazą *L. helveticus* PR4, wykazywał działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii potencjalnie chorobotwórczych, takich jak *S. aureus*, *Enterobacter faecium*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus megaterium*, *L. innocua* oraz *Salmonella* spp. [43].

### Peptydy przeciwnowotworowe

Działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych wykazuje kompleks ludzkiej  $\alpha$ -laktoalbuminy i kwasu oleinowego o nazwie HAMLET (ang. Human Alpha-lactal-bumin Made Lethal to Tumor cells) oraz bydłczej  $\alpha$ -laktalbuminy i kwasu oleinowego o nazwie BAMLET (ang. Bovine Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) [44]. Co istotne, HAMLET działa selektywnie wobec szerokiego zakresu transformowanych linii komórkowych *in vitro*, natomiast zdrowe (normalne) komórki są odporne na jego działanie [45]. El-Fakharany i in. [46] wykazali, że interakcja kwasu oleinowego z albuminami izolowanymi z mleka ludzkiego, krowiego i wielbłądziego skutkuje powstaniem kompleksów o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej wobec komórek nowotworowych Caco-2, HepG-2, PC-3 i MCF-7, tj. ludzkich komórek nowotworów okrężnicy, wątroby, prostaty i piersi. Obiecujące wyniki uzyskano podczas leczenia ludzkiego glejaka implantowanego bezgranicznie szczurom z wykorzystaniem kompleksu HAMLET. Wpłynęło ono na redukcję masy guza oraz opóźnienie wystąpienia objawów ciśnieniowych wewnątrz mózgowia [47]. Wspomniany kompleks z pozytywnym wynikiem zastosowano także w leczeniu raka pęcherza moczowego [48]. Zdaniem autorów HAMLET działa toksycznie na komórki nowotworowe, indukując w nich mechanizm przypominający apoptozę. Fang i in. [49] w swoich badaniach wykazali, że kompleks ten może wywołać stan, w którym produkcja ATP przewyższa zapotrzebowanie komórek na energię, co doprowadza do zwiększenia stężenia reaktywnych form tlenu i aktywacji apoptozy. Inne prawdopodobne mechanizmy działania peptydów antyproliferacyjnych to: hamowanie migracji komórek lub angiogenezy guza, hamowanie transkrypcji genów/ proliferacji komórek, dezorganizacja struktury tubuliny, cytotoxyczność [50]. Właściwości przeciwnowotworowe wykazują także laktoferyna i jej fragmenty [51–53], które modyfikują działanie układu odpornościowego, mogą polepszyć skuteczność działania konwencjonalnej chemioterapii i radioterapii w leczeniu chorób nowotworowych.

### WŁAŚCIWOŚCI PROTEOLITYCZNE BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ

Produkcja wyrobów mlecznych charakteryzujących się wysoką zawartością BAP wymaga opracowania optymalnych warunków fermentacji oraz wyboru właściwych gatunków i szczepów drobnoustrojów. Obecnie stosuje się w tym celu głównie szczepy bakterii kwasu mlekowego (LAB) z gatunku *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i bakterii kwasu octowego, ale także różne rodzaje drożdży lub tzw. grzybki kefirowe, mikrobiotę stosowaną do produkcji klasycznego kefiru [54]. System proteolityczny LAB składa się z trzech głównych elementów i był analizowany względem uwalniania BAP:

- 1) jednej lub więcej proteaz związanych ze ścianą komórkową, zwanej proteinazą ściany komórkowej (CEP, ang. *cell envelope proteinase*), która katalizuje hydrolizę białka mleka do peptydów składających się z 4–30 aminokwasów;
- 2) systemu transportu peptydów do wnętrza komórki, składającego się z białka wiążącego oligopeptydy, dwóch permeaz tworzących pory i dwóch ATPaz, dostarczających energię do aktywnego transportu;
- 3) wewnątrzkomórkowych peptydaz niezbędnych do rozkładu peptydów do krótszych peptydów i aminokwasów [55].

Proteinazy związane ze ścianą komórkową bakterii LAB, odpowiedzialne za początkowe etapy hydrolizy białek mleka, są pierwszym i głównym elementem systemu uwalniania BAP. Syntetyzowane są jako pre-proteiny zbudowane z ok. 2000 aminokwasów (180–200 kDa) i składające się z kilku (od 6 do 8) różnych funkcjonalnie domen [55].

Agyei i in. [56] wykazali, że wydajność syntezy CEP przez szczep *L. delbrueckii* subsp. *lactis* zależy od temperatury fermentacji oraz od kwasowości środowiska. Najkorzystniejszą uzyskano w 45°C i kwasowości między 5,5 a 6,5 pH.

Warunki fermentacji mlekowej, tj. temperatura, kwasowość, a także czas, decydują o zakresie autolizy komórek bakterii. Uwolnione peptydazy wewnątrzkomórkowe kontynuują proteolizę zapoczątkowaną przez proteazy zewnątrzkomórkowe. Powstające w tym etapie peptydy wykazują wysoką aktywność biologiczną. Przykładem może być silnie aktywny peptyd hamujący ACE, uwolniony przez wewnątrzkomórkową aminopeptydazę wydzieloną po lizie komórek *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* i *Lactobacillus helveticus* [12]. Bakterie stosowane w produkcji napojów fermentowanych i serów wykazują zróżnicowaną aktywność proteolityczną. Zależy ona od rodzaju, gatunku oraz szczepu.

W porównaniu z innymi bakteriami kwasu mlekowego szczepy *Lactobacillus helveticus* wykazują silną aktywność proteolityczną, dlatego są szeroko stosowane w przemyśle mleczarskim [57]. Bioaktywne peptydy zidentyfikowano w napojach mlecznych fermentowanych z udziałem szczepów *L. helveticus* R211, R389 i potwierdzono ich znaczący efekt hamujący aktywność ACE [58].

Znaczenie doboru szczepów bakterii z uwzględnieniem ich specyficznej aktywności proteolitycznej potwierdzono m.in. w badaniach Aguilar-Toala i in. [59]. Wykazano w nich, że wyizolowane z mleka cztery szczepy bakterii *Lactobacillus plantarum* katalizują uwalnianie z białek mleka wielofunkcyjnych peptydów (frakcja mniejsza niż 3kDa i 3–10 kDa) o aktywnościach: antymutagennej, przeciwzapalnej, przeciwdrobnoustrojowej i przeciwutleniającej. W tym zakresie na uwagę zasługują proteazy probiotycznego szczepu

*Lactobacillus casei*, uwalniające wielofunkcyjne peptydy zmniejszające stężenie cholesterolu, wspomagające działania przeciwnowotworowe oraz zmniejszające ryzyko osteoporozy. W badaniach *in vitro* wykazano także, że uwalniane przez układ enzymatyczny tego szczepu peptydy są aktywne przeciwoksydacyjnie, przeciwproliferacyjnie oraz hamują aktywność ACE [60].

## WŁAŚCIWOŚCI BIOAKTYWNYCH PEPTYDÓW W FERMENTOWANYCH PRODUKTACH MLECZNYCH

Postęp w produkcji fermentowanych napojów mlecznych związany jest głównie z selekcją i poznanie predyspozycji bakterii, a także grzybów do biosyntezy żywnościowo wartościowych metabolitów, a także możliwości zasiedlania przewodu pokarmowego ludzi lub zwierząt. BAP mogą być składnikiem produktu mleczarskiego (przykłady przedstawiono poniżej). Podczas trawienia głównych frakcji kazeiny mleka może być uwalnianych ok. 10–60 mg bioaktywnych peptydów [38]. Wykazano, że fermentowana przy udziale *L. helveticus* serwatka zawierała 26 mg/dm<sup>3</sup> tripeptydów Val-Pro-Pro i Ile-Pro-Pro [61]. BAP mogą być także wydzielone i/lub oczyszczone z produktu fermentowanego lub ich synteza może być katalizowana przez wydzielone peptydazy związane ze ścianą komórkową bakterii fermentacji mlekowej. Każda z wymienionych metod ma wady i zalety. Główny problem tradycyjnej metody otrzymywania produktu zawierającego BAP polega na uzyskaniu wymaganego efektywnego stężenia peptydów oraz możliwości oddziaływania składników innych niż BAP, w tym produktów uwalnianych w wyniku aktywności enzymów i mikrobioty przewodu pokarmowego. Ważnym zagadnieniem jest opracowanie i stosowanie metod wydzielania i oczyszczania enzymów i BAP. Przykłady syntezy BAP w produktach mleczarskich przedstawiono w tab. 4.

### BAP w kefirze

Kefir jest produktem probiotycznym powstającym przy udziale tzw. ziaren kefirowych. Mikrobiocenoza ta składa się kilkunastu gatunków drobnoustrojów, kilkudziesięciu szczepów, żyjących w złożonym związku symbiotycznym. Są to bakterie kwasu mlekowego (10<sup>8</sup> JTK/g), bakterie kwasu

octowego (10<sup>5</sup> JTK/g), drożdże (10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> JTK/g) oraz inne grzyby, które są ze sobą połączone polisacharydową matrycą, zwaną kefiranem [62].

Korzyści zdrowotne wynikające ze spożycia kefiru wiążą się z obecnością w nim mikroorganizmów probiotycznych, kefiranu (egzopolisacharyd o działaniu bifidogennym, przeciwzapalnym, antyproliferacyjnym, przeciwdrobnoustrojowym) oraz produktów ubocznych mikrobiologicznego metabolizmu fermentacyjnego. Dotyczy to głównie peptydów powstałych po proteolizie białek mleka wykazujących właściwości immunomodulujące, przeciwnowotworowe, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnadciśnieniowe lub przeciwtleniające [64, 65]. Bioaktywne peptydy kefiru mogą także zapobiegać inicjacji procesu nowotworzenia, hamując aktywność niektórych enzymów zaangażowanych w konwersję prokarcynogenów w substancje rakotwórcze [66].

Amorim i in. [64] zidentyfikowali w kefirze 35 peptydów o potencjalnej aktywności inhibitora ACE. Podawanie kefiru przez 21 dni szczurom z wywołanym nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym w dawce 0,3g/100g masy ciała spowodowało zmniejszenie skurczowego ciśnienia tętniczego o 37 mmHg. Przeciwnadciśnieniowe działanie kefiru (0,3 cm<sup>3</sup>/100 g masy ciała) wykazali także Friques i in. [67], którzy podczas 60-dniowego eksperymentu odnotowali zmniejszenie średniego ciśnienia tętniczego krwi u szczurów z samoistnym nadciśnieniem (SHR) o 24 mmHg. Ebner i in. [65] przeprowadzili kompleksową analizę profilu peptydowego kefiru z mleka krowiego i zidentyfikowali 257 peptydów, głównie uwolnionych z β-kazeiny oraz α<sub>s1</sub>-, κ- i α<sub>s2</sub>-kazeiny. Wykazywały one aktywność przeciwdrobnoustrojową, immunomodulującą, opioidową, wiązania jonów metali, przeciwtleniającą, przeciwzakrzepową oraz hamującą aktywność ACE. Khoury i in. [68] wykazali *in vitro* zdolność kefiru do hamowania proliferacji i indukowania apoptozy komórek raka jelita grubego linii HT-29 i Caco-2. Jego antynowotworowe działanie polegało na zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G1, zmniejszeniu ekspresji mRNA transformującego czynnika wzrostu α (TGF-α) i transformującego czynnika wzrostu β1 (TGF-β1) w komórkach HT-29 oraz regulowaniu ekspresji genów białek Bax:Bcl-2 zaangażowanych w proces apoptozy. Zdaniem autorów regularne spożywanie kefiru może chronić przed rozwojem raka jelita grubego.

**Tabela 4.** Przykłady produktów mleczarskich zawierających BAP otrzymanych z mleka krowiego z udziałem bakterii fermentacji mlekowej

Rodzaj produktu	Zastosowany szczep LAB	Rodzaj zidentyfikowanej aktywności biologicznej
Mleko fermentowane	<i>L. helveticus</i>	Inhibicja ACE
	<i>L. helveticus</i>	Immunomodulacja
	<i>L. helveticus</i>	Mineralizacja kości
	<i>L. casei</i>	Inhibicja ACE
	<i>L. casei</i>	Mineralizacja kości
BAP wydzielone z mleka lub serwatki	<i>L. helveticus</i>	Inhibicja ACE, aktywność przeciwnowotworowa
BAP wydzielone z mleka	<i>L. plantarum</i>	Aktywność przeciwzapalna, przeciwhemolityczna, przeciwtleniająca, przeciwmutagenna i przeciwdrobnoustrojowa
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i>	Inhibicja ACE, α-glukozydazy, α-amylazy, aktywność przeciwtleniająca
BAP wydzielone z kazeinianu sodu	<i>L. acidophilus</i>	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa
Hydrolizat β-kazeiny otrzymany z udziałem wydzielonych peptydaz związanych ze ścianą komórkową	<i>L. acidophilus</i>	Inhibicja ACE
Hydrolizat mleka otrzymany z udziałem wydzielonych peptydaz związanych ze ścianą komórkową	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Inhibicja ACE

Źródło: [63].



## BAP w jogurtach

Produkcja jogurtów to kontrolowany proces, w którym stosowane są wyselekcjonowane, specyficzne, często probiotyczne czyste kultury bakterii kwasu mlekowego. Jogurtowa kultura starterowa zwykle zawiera nieproteolityczny szczep *Streptococcus thermophilus* oraz wysoce proteolityczny *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*), bytujące w układzie symbiotycznym. Przyjmuje się, że w mieszaninie starterowej *L. bulgaricus* jest odpowiedzialny za zakwaszenie mleka sprzyjające koagulacji kazeiny, z kolei *S. thermophilus* przyczynia się do uwolnienia składników aromatu [69].

Stosując ultrafiltrację połączoną z wysokosprawną chromatografią ciecząową w układzie odwróconych faz, Sah i in. [70] wydzielili BAP z probiotycznego jogurtu uzupełnionego proszkiem ze skórki ananasa. Zidentyfikowano peptydy oznaczone odpowiednio jako P17 i P19, pochodzące z kazeiny<sup>193</sup>: Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val<sup>209</sup> oraz<sup>69</sup> Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe<sup>87</sup> i oceniono ich działanie przeciwutleniające oraz przeciwnowotworowe. Peptyd P17 wykazywał większą aktywność zmiatania kationorodnika ABTS ( $IC_{50} = 29,88 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ), porównywalną z właściwościami kwasu L-askorbinowego ( $IC_{50} = 12,77 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ), niż peptyd P19 ( $IC_{50} = 1,44 \text{mg}/\text{cm}^3$ ). Dodatkowo cechowała go aktywność wychwytywania rodników hydroksylowych ( $34,97 \pm 1,61\%$ ). Autorzy udowodnili także, że analizowane peptydy wpłynęły hamująco na proces proliferacji linii komórkowej raka okrężnicy HT-29 (41,49% i 38,55%, odpowiednio przez P17 i P19 w dawce  $3 \text{mg}/\text{cm}^3$ ) w następstwie indukcji apoptozy i zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M. Trawienie, hydroliza obu peptydów w przewodzie pokarmowym w warunkach *in vitro* spowodowały zwiększenie ich aktywności biologicznej.

Theodorou i Politis [71] badali immunomodulujący wpływ peptydów pochodzących z tradycyjnego greckiego jogurtu na dwie immunokompetentne populacje komórek – owce monocyty i neutrofile. Wykazano, że peptydy działały modulująco na ekspresję genów zarówno pro-, jak i przeciwzapalnych, przy czym efekt przeciwzapalny był większy.

Wśród mlecznych napojów fermentowanych można także wyróżnić biojogurty. Charakteryzują się one dodatkiem szczepów (probiotycznych) o potwierdzonych korzystnych cechach, nadającym jogurtom dodatkowe wartości zdrowotne. Probiotyki to żywe szczepy drobnoustrojów, które spożywane w odpowiednich dawkach ( $10^6$ – $10^7$  jtk/ $\text{cm}^3$ ), korzystnie wpływają na konsumenta, poprawiając równowagę mikrobiologiczną w jelitach [72].

## BAP w serach dojrzewających

W produkcji serów BAP są uwalniane z białek mleka już podczas koagulacji tych białek. W tym etapie z udziałem chymozyny uwalniany jest z  $\kappa$ -kazeiny bioaktywny glikopeptyd. Na kolejnych etapach peptydy uwalniane są z udziałem enzymów proteolitycznych, pochodzących głównie z namnażanych w procesie technologicznym bakterii fermentacji mlekowej.

Biopeptydy wytwarzane podczas dojrzewania sera mogą zapobiegać tworzeniu się wolnych rodników, wymiatać reaktywne formy tlenu, ograniczając uszkodzenia oksydacyjne biomolekuł, które powodują choroby serca, udary, miażdżycę oraz procesy starzenia i nowotworzenia. Wiadomo także o związku między aktywnością przeciwutleniającą a stężeniem peptydów o małej masie cząsteczkowej, udziałem histydyny oraz hydrofobowych aminokwasów [73]. Wykazano,

że aktywność przeciwutleniająca peptydów uwalnianych z kazeiny może być związana z jej wysoką tendencją do chelatowania jonów metali.

Gupta i in. [74] zidentyfikowali dwa peptydy pochodzące z bydlęcej  $\beta$ -kazeiny (Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys) i  $\alpha_{s1}$ -kazeiny (His-Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg), o silnej zdolności wymiatania wolnych rodników i aktywności antyoksydacyjnej serów Cheddar. Zdaniem Higurashi i in. [75] peptydy przeciwutleniające w serze mogą wywierać korzystny efekt supresyjny na akumulację tkanki tłuszczowej w jamie brzusznej i zapobiegać rozwojowi zespołu metabolicznego.

Peptydy o aktywności inhibitorów ACE zidentyfikowano w wodnych wyciągach serów Gouda, Cheddar, Gamalost, Gorgonzola, Grana Padano, Gruyere de Comté, Maasdam czy Manchego [21, 76]. Peptydy przeciwnadciśnieniowe Val-Pro-Pro i Ile-Pro-Pro z  $\beta$ -kazeiny zidentyfikowano m.in. w takich serach jak: Appenzeller, Brie, Caprine, Cheddar, Edam, Fontina, Gouda, Gorgonzola i Gruyere [76]. Peptydy Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu i Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr pochodzące z  $\alpha_{s1}$ -kazeiny o działaniu hipotensyjnym, zidentyfikowane i scharakteryzowane przez Contreras i wsp. [77], znaleziono w kilku odmianach sera, takich jak Brie, Caprino, Cheddar, Gorgonzola i Maasdam [76]. Obecne w serach  $\beta$ -kazomorfiny (BCM, ang.  $\beta$ -casomorphins) są peptydami pochodzącymi z  $\beta$ -kazeiny, charakteryzującymi się obecnością N-końcowej tyrozyny oraz innego aromatycznego aminokwasu w trzeciej lub czwartej pozycji, co jest ważnym motywem strukturalnym, warunkującym wiązanie do receptorów opioidowych [78]. Odpowiedzialne są one za wrażenie sytości i dobrego samopoczucia, działają przeciwłękowo, poprawiają pamięć, zmniejszają wrażliwość na ból. U dorosłych stymulują funkcje mózgu, a u dzieci działają nasennie [79, 80]. Oprócz wpływu na ośrodkowy układ nerwowy, BCM indukują wydzielanie śluzu jelitowego, zwiększają poziom insuliny w osoczu, obniżają poziom glukagonu oraz podnoszą aktywność dysmutazy nadtlenkowej i katalazy [81].

Fosfopeptydy (CPP) kazeiny są bioaktywnymi peptydami o różnych stopniach fosforylacji. Mają duży ładunek ujemny, dzięki czemu skutecznie wiążą dwuwartościowe kationy w postaci rozpuszczalnych kompleksów. Związki te zwiększają biodostępność niektórych makro- i mikroelementów, np. wapnia, cynku, miedzi i żelaza, ułatwiając ich transport przez ściany jelita oraz zapobiegając tworzeniu nierozpuszczalnych połączeń [16]. Oprócz właściwości wiązania jonów metali, CPP mają inne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, immunostymulujące [5, 16], przeciwutleniające oraz mogą brać udział w remineralizacji podpowierzchniowych uszkodzeń szkliwa zębów [82]. Fosfopeptydy pochodzące z  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - i  $\beta$ -kazeiny zidentyfikowano w różnych typach sera, m.in. Parmigiano Reggiano i Grana Padano [83] czy w estońskim Old Saare [84].

## PODSUMOWANIE

Wartość żywieniowa mleka i jego przetworów w dużym stopniu zależy od zawartości oraz przyswajalności białek. Wśród nich są białka biologicznie aktywne, np. immunoglobuliny i laktoferyna. Białka mleka są także matrycą do pozyskiwania handlowo dostępnych preparatów BAP. Hydrolizaty są frakcjonowane, oczyszczane, utrwalane i stosowane jako nutraceutyki lub jako preparaty farmaceutyczne.



Alternatywą jest hydroliza białek w procesie przetwarzania mleka. W przetwórstwie mleka, np. produkcji napojów fermentowanych i serów, dominujące białka mleka, np. kazeina i  $\beta$ -laktoglobuliny oraz  $\alpha$ -laktoalbuminy, podlegają modyfikacji enzymatycznej z udziałem stosowanych enzymów oraz LAB i ich enzymów. Ich dobór jest niezbędny w celu uzyskania produktów o pożądanych walorach organoleptycznych i żywieniowych. W doborze drobnoustrojów stosowane są różne kryteria, m.in. predyspozycje do biosyntezy określonych metabolitów, np. kwasów organicznych, a także, jak w przypadku bakterii probiotycznych, predyspozycje do zasiedlania przewodu pokarmowego ludzi lub zwierząt.

W opracowaniu przedstawiono przykłady możliwości technologicznych wzbogacania produktów mlecznych w BAP. Wskazano na znaczenie zdolności drobnoustrojów do biosyntezy enzymów proteolitycznych aktywnych w uwalnianiu BAP w procesie technologicznym, np. kefiru, jogurtu i serów. Zwrócono uwagę na zależności właściwości BAP od ich prekursorów, a także od wielkości i struktury cząsteczek. Szerokie spektrum prozdrowotnego oddziaływania BAP obecnych w powszechnie dostępnych produktach mlecznych powinno sprzyjać ich żywieniowo uzasadnionej popularyzacji. W prezentowanym opracowaniu na podstawie dostępnej literatury wskazano, że biologicznie aktywne peptydy mogą wpływać na stan fizjologiczny organizmu człowieka, zwiększając skuteczność leczenia chorób dietozależnych, takich jak nadciśnienie tętnicze, choroby nowotworowe czy neurodegeneracyjne.

## PIŚMIENNICTWO

- Adamczak M, Bornscheuer UT, Bednarski W. Properties and biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2008; 110(6): 491–504.
- Kleber ME, Delgado GE, Lorkowski S, et al. Trans fatty acids and mortality in patients referred for coronary angiography: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Eur Heart J.* 2016; 37(13): 1072–1078.
- Adamczak M, Charubin D, Bednarski W. Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate. *Chem Papers.* 2009; 63(2): 111–116.
- Mills S, Ross RP, Hill C, et al. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int Dairy J.* 2011; 21: 377–401.
- Nongonierma AB, FitzGerald RJ. The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: a review. *J Funct Foods.* 2015; 17: 640–656.
- Razaq A, Shamsi S, Ali A, et al. Microbial proteases applications. *Frontiers Bioeng Biotechnol.* 2019; 7(110). doi: 10.3389/fbioe.2019.00110
- Rawlings ND. Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. *BBA – Proteins Proteom.* 2020; 1868(2): 140345.
- De Maria S, Ferrari G, Maresca P. Effects of high hydrostatic pressure on the conformational structure and the functional properties of bovine serum albumin. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2016; 33: 67–75.
- Tadesse SA, Emire SA. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. *Heliyon.* 2020; 6(8): e04765–e04765. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04765
- Tagliacozzi D, Martini S, Shamsia S, et al. Biological activities and peptidomic profile of in vitro-digested cow, camel, goat and sheep milk. *Int Dairy J.* 2018; 81: 19–27.
- Saadi S, Saari N, Anwar F, et al. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnol Adv.* 2015; 33: 80–116.
- Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J.* 2006; 16: 945–960.
- Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Enzymes exogenous to milk in dairy technology. Proteinases. In: Fuquay JW, editor. *Encyclopedia of dairy sciences.* San Diego: Academic Press; 2011. p. 289–296.
- Maestri E, Pavlicevic M, Montorsi M, et al. Meta-analysis for correlating structure of bioactive peptides in foods of animal origin with regard to effect and stability. *Comp Rev Food Sci F.* 2019; 18(1): 3–30.
- Hernández-Ledesma B, García-Nebot MJ, Fernández-Tomé S, et al. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *Int Dairy J.* 2014; 38: 82–100.
- Thomä-Worringer C, Sørensen J, López-Fandiño R. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *Int Dairy J.* 2006; 16: 1324–1333.
- Szołtyś M, Niedbalska J, Dąbrowska A, et al. Zastosowanie enzymatycznej hydrolizy kazeiny do otrzymywania peptydów o aktywności przeciwtleniującej. *Przem Chem.* 2012; 91: 1014–1019.
- Gnasegaran GK, Agvei D, Pan S, et al. Process development for bioactive peptide production. In: Puri M, editor. *Food bioactives: extraction and biotechnology applications.* Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 91–110.
- Udenigwe CC, Aluko RE. Food-protein derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *J Food Sci.* 2012; 71: R11–R24.
- Majumder K, Wu J. Molecular targets of antihypertensive peptides: understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. *Int J Mol Sci.* 2014; 16(1): 256–283.
- Cicero AFG, Aubin F, Azais-Braesco V, et al. Do the lactotriptides isoleucine – proline – proline and valine – proline – proline reduce systolic blood pressure in European subjects? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Hypertens.* 2013; 26(3): 442–449.
- Nielsen SD, Beverly RL, Qu Y, et al. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chem.* 2017; 232: 673–682.
- Seppo L, Jauhainen T, Poussa T, et al. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77(2): 326–330.
- Fluegel S, Shultz TT, Powers JR, et al. Whey beverages decrease blood in prehypertensive and hypertensive young men and women. *Int Dairy J.* 2010; 20: 753–760.
- Yadov JSS, Van S, Pilli S, et al. Chesse whey: A potential resource to transform into bioprotein functional /nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnol Adv.* 2015; 33: 756–774.
- Jäkälä P, Vapaatalo H. Antihypertensive peptides from milk proteins. *Pharmaceuticals.* 2010; 3: 251–272.
- Crichton GE, Bryan J, Murphy KJ, et al. Review of dairy consumption and cognitive performance in adults: findings and methodological issues. *Dement. Geriatr Cogn Disord.* 2010; 30(4): 352–361.
- van de Rest O, van der Zwaluw NL, de Groot LCPGM. Literature review on the role of dietary protein and amino acids in cognitive functioning and cognitive decline. *Amino Acids.* 2013; 45: 1035–1045.
- Ozawa M, Ninomiya T, Ohara T, et al. Dietary patterns and risk of dementia in an elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Am J Clin Nutr.* 2013; 97: 1076–1082.
- Ogata S, Tanaka H, Omura K, et al. Association between intake of dairy products and short-term memory with and without adjustment for genetic and family environmental factors: a twin study. *Clin Nutr.* 2016; 35: 507–513.
- Ano Y, Ayabe T, Kutsukake T, et al. Novel lactopeptides in fermented dairy products improve memory function and cognitive decline. *Neurobiol. Aging.* 2018; 72: 23–31.
- Ramsay RR, Albrecht A. Kinetics, mechanism, and inhibition of monoamine oxidase. *J Neural Transm.* 2018; 125: 1659–1683.
- Borroni E, Bohrmann B, Grueninger F, et al. Selective monoamine oxidase type B inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017; 362(3): 413–423.
- Hayes M, Stanton C, Fitzgerald GF, et al. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. *Biotechnol J.* 2007; 2: 435–449.
- Darewicz M, Borawska J, Minkiewicz P, et al. Biologicznie aktywne peptydy uwalniane z białek żywności. *Żywność Nauka Technologia Jakość.* 2015; 3: 26–41.
- Li Y-W, Li B. Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. *J Theor Biol.* 2013; 318: 29–43.
- Darewicz M, Dziuba J. Biologicznie i funkcjonalnie aktywne peptydy. Peptydy funkcjonalnie aktywne. Peptydy antyoksydacyjne. In: Dziuba J, Fornal Ł, editor. *Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności.* Warszawa: WNT; 2009. p. 79–84.
- Lahov E, Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol.* 1996; 34: 131–145.

39. Jrad Z, El-Hatmi H, Adt A, et al. Antilisterial activity of dromedary lactoferrin peptic hydrolysates. *J Dairy Sci.* 2019; 102: 4844–4856.
40. Ripolles D, Harouna S, Parron JA, et al. Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin and its hydrolysate prepared with pepsin, chymosin and microbial rennet against foodborne pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Int Dairy J.* 2015; 45: 15–22.
41. Iglesias-Figueroa BF, Espinoza-Sánchez EA, Siqueiros-Cendón TS, et al. Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview. *Int Dairy J.* 2019; 89: 37–41.
42. Van der Kraan MI, Groenink J, Nazmi K, et al. Lactoferrampin – novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides.* 2004; 25: 177–183.
43. Minervini F, Algaron F, Rizzello CG, et al. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 5297–5305.
44. Brinkmann CR, Thiel S, Otzen DE. Protein-fatty acid complexes: Biochemistry, biophysics and function. *FEBS J.* 2013; 280: 1733–174935.
45. Ho JCS, Nadeem A, Svanborg C. HAMLET – A protein-lipid complex with broad tumoricidal activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 482: 454–458.
46. El-Fakharany EM, Abu-Serie MM, Litus EA, et al. The use of human, bovine, and camel milk albumins in anticancer complexes with oleic acid. *Protein J.* 2018; 37(3): 203–215.
47. Fischer W, Gustafsson L, Mossberg AK, et al. Human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival. *Cancer Res.* 2004; 64: 2105–2112.
48. Xiao Z, Mak A, Koch K, et al. A molecular complex of bovine milk protein and oleic acid selectively kills cancer cells in vitro and inhibits tumour growth in an orthotopic rat bladder tumour model. *BJU Int.* 2013; 112(2): E201–210.
49. Fang B, Zhang M, Ge KS, et al.  $\alpha$ -Lactalbumin-oleic acid complex kills tumor cells by inducing excess energy metabolism but inhibiting mRNA expression of the related enzymes. *J Dairy Sci.* 2018; 101(6): 4853–4863.
50. Blanco-Míguez A, Gutiérrez-Jácome A, Pérez-Pérez M, et al. From amino acid sequence to bioactivity: The biomedical potential of antitumor peptides. *Protein Sci.* 2016; 25(6): 1084–1095.
51. Zhang Y, Lima CF, Rodrigues LR. Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. *Nutr Rev.* 2014; 72: 763–773.
52. Wang J, Li Q, Ou Y, et al. Recombination adenovirus-mediated human lactoferrin cDNA inhibits the growth of human MCF-7 breast cancer cells. *J Pharm Pharmacol.* 2012; 64(3): 457–63.
53. Pereira CS, Guedes JP, Gonçalves M, et al. Lactoferrin selectively triggers apoptosis in highly metastatic breast cancer cells through inhibition of plasmalemmal V-H<sup>+</sup>-ATPase. *Oncotarget.* 2016; 7(38): 62144–62158.
54. Garcia-Tejedor A, Padilla B, Salom JB, et al. Dairy yeasts produce milk protein derived antihypertensive hydrolysates. *Food Res Int.* 2013; 53: 203–208.
55. Brown L, Pingitore EV, Mozzi F, et al. Lactic acid bacteria as cell factories for the generation of bioactive peptides. *Protein Pept Lett.* 2017; 24(2): 146–155.
56. Agyei D, Potumarthi R, Danquah MK. Optimisation of batch culture conditions for cell-envelope-associated proteinase production from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC® 7830TM. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012; 168: 1035–1050.
57. Wakai T, Yamamoto N. Antihypertensive peptides specific to *Lactobacillus helveticus* fermented milk. *InTech.* 2012; 159–172.
58. Lopez-Fandino 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.
59. Aguilar-Toala JE, Santiago-Lopez L, Peres CM, et al. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *J Dairy Sci.* 2016; 100: 65–75.
60. Abdel-Hamid M, Romei E, Gamba RR, et al. The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. *Int Dairy J.* 2019; 91: 1–8.
61. Narva M, Halleen J, Väänänen K, et al. Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on bone cells in vitro. *Life Sci.* 2004; 75: 1727–1734.
62. Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe LP, et al. Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1177.
63. Raveschot C, Cudennec B, Coutte F, Flahaut C, et al. Production of bioactive peptides by *Lactobacillus* species: from gene to application. *Front Microbiol.* 2018; 9: 2354. doi: 10.3389/fmicb.2018.02354
64. Amorim FG, Coitinho LB, Dias AT, et al. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food Chem.* 2019; 282: 109–119.
65. Ebner J, Aşçı Arslan A, Fedorova M, et al. Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *J Proteomics.* 2015; 117: 41–57.
66. Ahmed Z, Wang Y, Ahmad A, et al. Kefir and health: a contemporary perspective. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013; 53: 422–434.
67. Friques AG, Arpini CM, Kalil IC, et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med.* 2015; 13: 390.
68. Khoury N, El-Hayek S, Tarras O, et al. Kefir exhibits antiproliferative and proapoptotic effects on colon adenocarcinoma cells with no significant effects on cell migration and invasion. *Int J Oncol.* 2014; 45: 2117–2127.
69. Settachaimongkon S, Nout MJR, Antunes Fernandes EC, et al. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *Int J Food Microbiol.* 2014; 177: 29–36.
70. Sah BNP, Vasiljevic T, McKechnie S, et al. Antioxidant peptides isolated from synbiotic yoghurt exhibit antiproliferative activities against HT-29 colon cancer cells. *Int Dairy Sci.* 2016; 63: 99–106.
71. Theodorou G, Politis I. Effects of peptides derived from traditional Greek yoghurt on expression of pro- and anti-inflammatory genes by ovine monocytes and neutrophils. *Food Agr Immunol.* 2016; 27(4): 484–495.
72. El-Dieb SM, Abd Rabo FHR, Badran SM, et al. The growth behaviour and enhancement of probiotic viability in bioyoghurt. *Int Dairy Sci.* 2012; 22: 44–47.
73. Nielsen SD, Beverly RL, Qu Y, et al. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chem.* 2017; 232: 673–682.
74. Gupta A, Mann B, Kumar R, et al. Identification of antioxidant peptides in cheddar cheese made with adjunct culture *Lactobacillus casei* ssp. *casei* 300. *Milchwissenschaft.* 2010; 65(4): 396–399.
75. Higurashia S, Kunieda Y, Matsuyama H, et al. Effect of cheese consumption on the accumulation of abdominal adipose and decrease in serum adiponectin levels in rats fed a calorie dense diet. *Int Dairy J.* 2007; 17: 1224–1231.
76. Stuknytė M, Cattaneo S, Masotti F, et al. Occurrence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and in their digestates following in vitro static gastrointestinal digestion. *Food Chem.* 2015; 168: 27–33.
77. Contreras MM, Carrón R, Montero MJ, et al. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int Dairy J.* 2009; 19: 566–573.
78. Jarmołowska B, Teodorowicz M, Fiedorowicz E, et al. Glucose and calcium ions may modulate the efficiency of bovine  $\beta$ -casomorphin-7 permeability through a monolayer of Caco-2 cells. *Peptides.* 2013; 49: 59–67.
79. Thiruvengadam M, Venkidasamy B, Thirupathi P, et al.  $\beta$ -Casomorphin: A complete health perspective. *Food Chem.* 2021; 127765.
80. Zhang W, Miao J, Ma C, et al.  $\beta$ -Casomorphin-7 attenuates the development of nephropathy in type I diabetes via inhibition of epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells. *Peptides.* 2012; 36: 186–191.
81. Han D-N, Zhang D-H, Wang L-P, et al. Protective effect of  $\beta$ -casomorphin-7 on cardiomyopathy of streptozotocin-induced diabetic rats via inhibition of hyperglycemia and oxidative stress. *Peptides.* 2013; 44: 120–126.
82. Caira S, Pinto G, Vitaglione P, et al. Identification of casein peptides in plasma of subjects after a cheese-enriched diet. *Food Res Int.* 2016; 84: 108–112.
83. Summer A, Formaggioni P, Franceschi P, et al. Cheese as functional food: The example of Parmigiano Reggiano and Grana Padano. *Food Technol Biotechnol.* 2017; 55(3): 277–289.
84. Taivosalo A, Kriščiunaite T, Seiman A, et al. Comprehensive analysis of proteolysis during 8 months of ripening of high-cooked Old Saare cheese. *J Dairy Sci.* 2018; 101(2): 944–967.