



Biopeptydy pochodzące z białek mleka jako składniki żywności nutraceutycznej

Iwona Szerszunowicz

Katedra Biochemii Żywności
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

kontakt e-mail: iwona.szersz@uwm.edu.pl

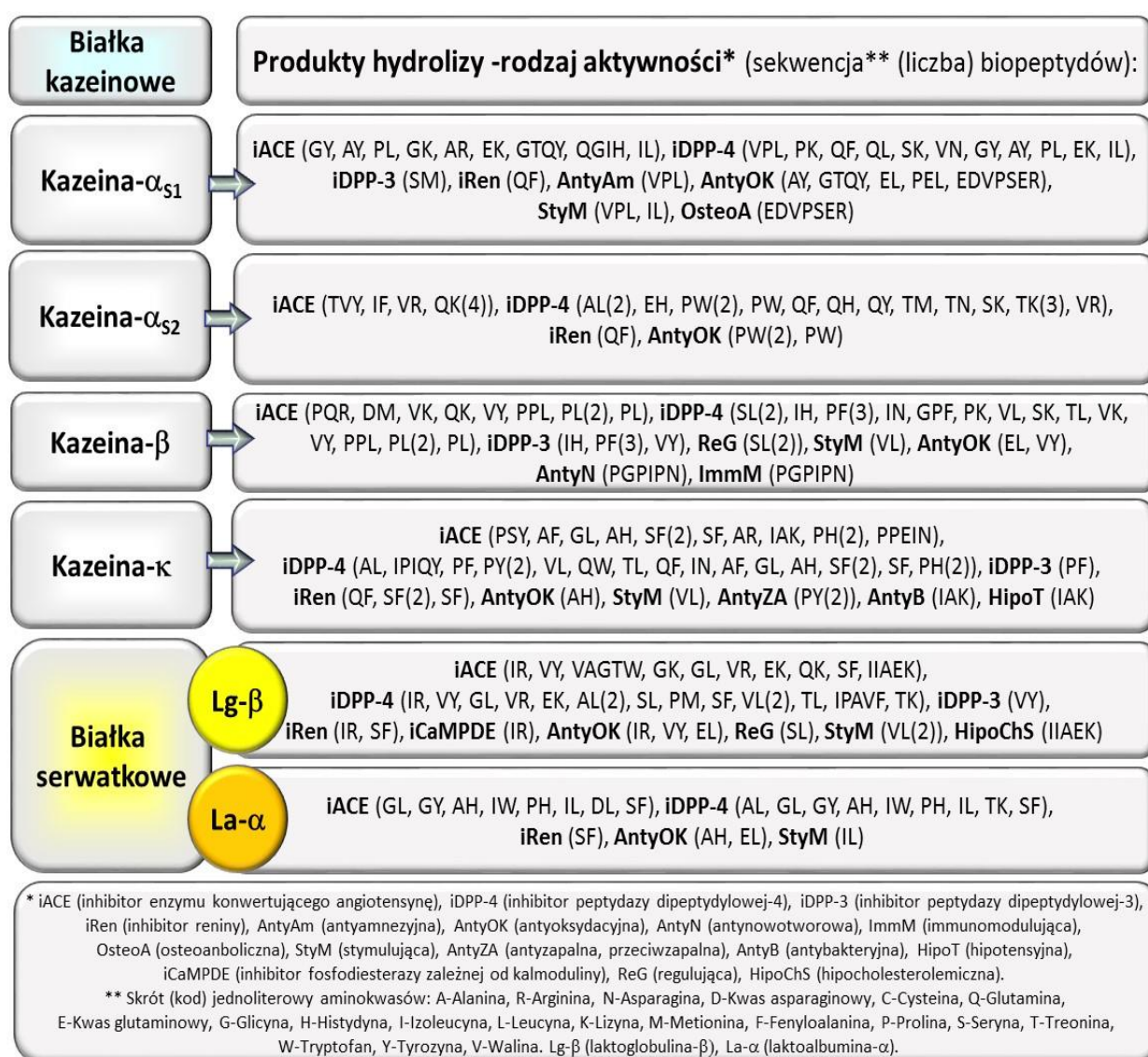
Związkami korzystnie wpływającymi na funkcjonowanie organizmu człowieka, w tym na jego układ krwionośny, immunologiczny, nerwowy lub opóźniającymi procesy starzenia organizmu, mogą być białka, a zwłaszcza produkty ich hydrolizy [5, 15, 21, 23, 24]. Wśród takich związków znajdują się peptydy, czyli fragmenty łańcucha/ów białkowego/ych uwolnione/ych ze struktur białek, spośród których, tylko niektóre wykazują aktywność biologiczną, dlatego nazywane są peptydami biologicznie aktywnymi (peptydami bioaktywnym lub biopeptydami). Aktywność biologiczna takich związków zależy od ich budowy chemicznej (składu aminokwasowego i kolejności ułożenia reszt aminokwasowych w peptydzie, określanych jako sekwencja aminokwasowa). Biopeptydy, jeśli wykazują korzystne oddziaływanie na organizm człowieka są określane również jako nutraceutyki [19, 23, 24, 26]. Nutraceutyki to określenie dotyczące związków biologicznie aktywnych (bioaktywnych), powstało w wyniku połączenia słów „żywienie” (nutrition) oraz „farmaceutyk” (pharmaceutical) [19]. Takie związki mogą być składnikami znajdującymi się w żywności lub mogą zostać z niej wyizolowane, a następnie dodane do innej żywności/produktów spożywczych i określenie nutraceutyk dotyczy również suplementów diety (tabletki, kapsułki) [19, 23]. Nutraceutyki mogą być składnikami żywności funkcjonalnej, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia medycznego, suplementów diet [19, 22, 23] i innych rodzajów żywności, różnie klasyfikowanych w różnych krajach [19].

Biopeptydy a białka mleka

Prekursorami (źródłem) peptydów bioaktywnych mogą być różnego pochodzenia białka mleka, w tym kazeina lub/i białka serwatkowe, których udział w mleku krowim wynosi odpowiednio 80% i 20% [11, 22]. Kazeina to mieszanina heterogennych białek, zróżnicowanych pod względem budowy chemicznej, w której znajduje się kazeina- α_{s1} (38%), - α_{s2} (10%), - β (35%), - κ (17%) [15]. Z białek kazeinowych, występujących w kilku wariantach genetycznych, podobnie jak i serwatkowych, w których dominuje laktoglobulina- β (Ig- β) i laktoalbumina- α (Ia- α) [15, 22], mogą zostać uwolnione peptydy o określonej – jednej aktywności biologicznej lub multiaktywne [15, 21, 22].

Biopeptydy to związki przede wszystkim składające się od 2 do 20 reszt aminokwasowych i przedstawiane są w formie sekwencji aminokwasowych, zapisywanych z wykorzystaniem kodu trój- lub jednoliterowego aminokwasów [11, 21-24]. Obecnie, sekwencje aminokwasowe biopeptydów są selekcjonowane, grupowane, gromadzone i udostępniane za pośrednictwem różnych baz danych [13, 14]. Jedną z takich baz jest baza

BIOPEP-UWM (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm>) – baza danych sekwencji aminokwasowych białek i peptydów biologicznie aktywnych, w której na dzień 23.05.2025 r. było dostępnych 5266 sekwencji biopeptydów różnego pochodzenia, w tym pochodzących z białek mleka i o różnej aktywności biologicznej (>90 aktywności) [2, 13, 14]. Sekwencje aminokwasowe biopeptydów oraz narzędzia bioinformatyczne dostępne w tej bazie, umożliwiają przewidywać aktywność biologiczną białek i/lub przeprowadzać hydrolizę białek z wykorzystaniem w niej dostępnych enzymów proteolitycznych (o określonych specyficznościach działania) [2, 7, 14]. Baza BIOPEP-UWM jest wykorzystywana przez społeczność naukową na całym świecie, która stosuje jej zasoby i możliwości nie tylko do badań naukowych, ale także w działalności dydaktycznej [7-9, 22-24]. Metody/techniki komputerowe (badania *in silico*), w tym z udziałem bazy BIOPEP-UWM, wykorzystywane są w badaniach naukowych jako pojedyncze metody badawcze [22-24] lub w połączeniu z innymi protokołami badawczymi stosującymi podejście hybrydowe (mieszane) prowadzonych badań [7-9].



Rysunek 1. Biopeptydy uwolnione w wyniku symulowanego trawienia białek mleka przez pepsynę (pH 1,3), trypsynę i chymotrypsynę A. Rysunek przygotowany na podstawie wyników badań opublikowanych w pracy Szerszunowicz [22]

Najlepszym procesem, w którym uwalniane są biopeptydy, zwłaszcza ze struktur białkowych (ale i peptydów) jest przerwanie (hydrolizowanie) wiązań peptydowych znajdujących się w białkach/peptydach z udziałem enzymów proteolitycznych (proteoliza) [4, 5, 7-11, 21-24]. Biopeptydy mogą powstawać także w produktach mleczarskich, m.in. w wyniku wykorzystania proteolitycznych kultur starterowych do przeprowadzenia np. fermentacji mleka; w wyniku proteolizy prowadzonej przez enzymy uwalniane z różnych mikroorganizmów, w tym mikroflory mleka; enzymy roślinne lub inne enzymy i/lub znajdujące się w preparatach enzymatycznych dodawanych podczas produkcji różnych wyrobów. Peptydy bioaktywne mogą również powstawać w warunkach fizjologicznych, w przewodzie pokarmowym człowieka, w wyniku zachodzących procesów trawienia, m.in. pod wpływem pepsyny, trypsyny, chymotrypsyny [1, 4, 5, 21, 22]. Nutraceutyki peptydowe otrzymane w wyniku symulowanego trawienia białek mleka (kazeinowych oraz serwatkowych) z udziałem w/w enzymów trawiennych, do przeprowadzenia którego wykorzystano zasoby i narzędzia dostępne w bazie BIOPEP-UWM, przedstawiono na rysunku 1 [4, 21, 22].

Wśród biopeptydów uwolnionych w wyniku symulowanego trawienia białek mleka (Rys. 1), najwięcej było peptydów o aktywności hamowania (inhibitorów) działania różnych enzymów, zwłaszcza enzymu konwertującego angiotensynę (angiotensin-1 converting enzyme, ACE) czy peptydazy dipeptydylowej-4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) i peptydów o takich aktywnościach także najwięcej było w różnych produktach mleczarskich [3-5, 8, 10, 22]. W mlecznych napojach fermentowanych, jogurtach, serach wykryto nie tylko inhibitory ACE i DPP-4, ale również stwierdzono obecność peptydów wykazujących szerokie spektrum aktywności biologicznej (antyoksydacyjne, immunomodulujące, osteoanaboliczne, przeciwzapalne) [1, 3, 8, 9, 12]. Inhibitory enzymów (ACE, DPP-4), peptydy hipocholesterolemiczne, peptydy antyoksydacyjne to potencjalne związki, które mogą zostać wykorzystane w leczeniu/prewencji zespołu metabolicznego, stanowiącego grupę zaburzeń metabolicznych obejmujących otyłość, cukrzycę typu 2, dyslipidemię i podwyższone ciśnienie krwi [6, 10].

Peptydy przeciwnadciśnieniowe

Peptydy przeciwnadciśnieniowe obniżają ciśnienie krwi w wyniku hamowania działania ACE (inhibitory ACE). ACE to enzym powodujący przekształcenie angiotensyny-1 do angiotensyny-2 i inaktywujący bradykininę, co w konsekwencji powoduje wzrost ciśnienia krwi, dlatego hamowanie działania tego enzymu umożliwia obniżenie ciśnienia krwi [4, 6, 8, 21, 22]. Aktywność inhibitorów ACE różnicowana jest na podstawie wartości parametru IC_{50} – parametru określanego jako stężeniu peptydu (inhibitora) powodującego zmniejszenie aktywności enzymu o 50% [6, 8, 10, 13, 21, 22]. W celu oznaczenia aktywności enzymu wykorzystywane są specyficzne substraty i ACE [8, 13]. Natomiast pomiar aktywności przeciwnadciśnieniowej peptydów, w układzie *in vivo*, prowadzony jest najczęściej na szczurach rasy Wistar (Wistar Kyoto rats, WKR) z normotensyjnym ciśnieniem krwi i szczurach z predyspozycjami do rozwoju nadciśnienia (spontaneously hypertensive rats, SHR). Zwierzętom podawane są różne dawki peptydów (przeliczone na kg ich masy ciała) w warunkach prowadzonego eksperymentu, bardzo często bezpośrednio do żołądka, a następnie ustalana jest dawka peptydu (stężenie) powodująca efekt terapeutyczny, umożliwiający obniżenie ciśnienia krwi [4, 13].

Najbardziej poznanymi peptydami przeciwnadciśnieniowymi są peptydy zawierające reszty proliny (P). Do takich biopeptydów klasyfikowane są laktotripeptydy o sekwencjach aminokwasowych IPP, VPP i są one inhibitorami ACE [4, 6, 10, 12, 22]. Peptydy o sekwencji IPP (kod jednoliterowy aminokwasów podano na Rys. 1.), zostały wyizolowane z kazeiny- β (fragment, fr. 74–76) i - κ (fr. 108–110), a VPP pochodził tylko z kazeiny- β (fr. 84–86) [2, 10]. Parametr IC_{50} obliczony dla IPP oraz VPP wynosił odpowiednio 5 μ M i 9 μ M [10]. Takie peptydy znajdowały się w mleku kwaśnym otrzymanym z udziałem *Lactobacillus helveticus* (*L. helveticus*) i *Saccharomyces cerevisiae* oraz mlecznym napoju fermentowanym do produkcji którego wykorzystano *L. helveticus*. IPP oraz VPP były także uwalniane przez enzymy pochodzące z *L. helveticus* LBK-16H (ale także ATCC 12046, DSM13137), *L. casei* PRA205, *L. rhamnosus* PRA331 (a także LOC12, PRA231, PRA291, D55, D21, E24, E33, E31, PRA211, PRA313) [10]. Jednak podczas badań klinicznych przeprowadzonych na osobach ze stwierdzonym zespołem metabolicznym, po doustnym podaniu laktotripeptydów, obserwowano niewielki spadek skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi [5].

Na podstawie innych badań, przeprowadzonych na zwierzętach (SHR), po podaniu peptydu HLPLP (fr. 134—138 kazeiny- β), stwierdzono, że tylko 5,18% peptydów zostało przetransportowanych do naczyń krwionośnych i pomimo że związek ten był degradowany przez enzymy osocza zwierząt do LPLP, HLPL i HLP, to jednak te peptydy powodowały obniżenie ciśnienia krwi (15—21 mm Hg) u badanych zwierząt [5].

Inne peptydy przeciwnadciśnieniowe FFVAP, FALPQY mogą zostać uwolnione odpowiednio z kazeiny- α_{S1} , - α_{S2} , w tym peptyd FFVAP przez oligopeptydazę prolilową z kazeiny- α_{S1} (fr. 23—27). Peptydy o sekwencjach FFVAPFPEVFGK, FFVAP, TTMLPW identyfikowano w trypsynowych hydrolizatach kazeiny i pochodzą z kazeiny- α_{S1} (fr. 23—34, 23—27, 194—199) oraz z kazeiny- β (fr. 177—183, AVYPYQR) [21]. Inny peptyd LAYFYP (fr. 142—147 kazeiny- α_{S1}), o aktywności inhibitora ACE, identyfikowano w hydrolizatach otrzymanych z wykorzystaniem trypsyny lub proteazy z *L. helveticus* (również AYFYPE, fr. kazeiny- α_{S1}), a wśród termolizynowych (z *Bacillus thermoproteolyticus*) produktów hydrolizy kazeiny- β (wariant genetyczny A2) zidentyfikowano dwa peptydy przeciwnadciśnieniowe o dużej aktywności (fr. 58—76 i fr. 59—76 kazeiny- β) [21]. Peptydowe inhibitory ACE identyfikowano także w hydrolizatach białek serwatkowych. Z fermentowanej serwatki, po trawieniu pepsyną a następnie trypsyną, wyizolowano peptydowe inhibitory ACE o sekwencjach GLDIQK, VAGTWY, pochodzące z Ig- β (fr. 9—14, fr. 15—20) [21, 11]. Ten pierwszy biopeptyd to także peptyd hipocholesterolemiczny [2, 6], natomiast drugi związek – to inhibitor DPP-4 i peptyd wykazujący aktywność antyoksydacyjną, immunomodulującą i antibakteryjną [2, 6, 24].

W hydrolizatach trypsynowych la- α zidentyfikowano peptydy o sekwencjach VGINYWLAHK (fr. 99—108), WLAHK (fr. 104—108), a ten drugi związek to również peptyd o aktywności osteoanabolicznej [16, 21]. Natomiast w hydrolizatach termolizynowych (z *Bacillus thermoproteolyticus*) la- α zidentyfikowano fragmenty tego białka LKGYGGVSLPEW (fr. 15—26), ale także fr. 18—26, fr. 20—26, fr. 21—26 o aktywności inhibitorów ACE [21]. Wśród produktów hydrolizy la- α (w wyniku działania pepsyny, trypsyny i chymotrypsyny) był inhibitor ACE o sekwencji YGL (fr. 50—52), a z Ig- β uzyskano peptydy o takiej aktywności i sekwencjach VLDTDYK (fr. 94—100), CMENSA (fr. 106—111), ALPMH (fr. 142—146). Peptydowe inhibitory ACE zidentyfikowano w trypsynowych hydrolizatach Ig- β (LAMA, fr. 22—25, LDAQSAPLR, fr. 32—40, VFK, fr. 81—83). Z Ig- β można otrzymać ALPMHIR (fr. 142—148), YL i YLLF (fr. 102—103 oraz 102—105), IPA (fr. 78—80), w tym ten ostatni peptyd uwolniony przez proteinazę K, YLLF to także peptyd opioidowy, osteoanaboliczny, a wartość parametru IC_{50} dla ALPMHIR wynosiła 42,6 μ M [2, 17, 21]. Inhibitory ACE (sekwencje KDERF i LKKISQ) zostały zidentyfikowane w próbkach sera krowiego o zwiększonej i standardowej zawartości kazeiny- β [8]. Takie peptydy, jako fragmenty sekwencji aminokwasowych, pochodzące odpowiednio z kazeiny- κ (fr. 13—17) oraz pepsynowych hydrolizatów kazeiny- α_{S2} owczej (fr. 165—170), zostały zdeponowane w bazie BIOPEP-UWM (numer identyfikacyjny - ID 7627, IC_{50} =848,00 μ M oraz ID 8179, IC_{50} =2,60 μ M), a LKKISQ to także peptyd antibakteryjny (ID 3961) [2]. Niektóre inhibitory ACE (FGK, FFVAP) identyfikowano w serze Gouda na początku jego dojrzewania i mogły one zostać zhydrolizowane przez plazminę (enzym rodzimy występujący w mleku wykorzystanym do produkcji sera) oraz enzymy układu proteolitycznego bakterii kwasu mlekowego (lactic acid bacteria, LAB) dla których peptydy mogły być substratami, ponieważ takich związków nie wykryto w serach po 60 dniach dojrzewania [8].

Peptydy przeciwrzepliwie i hipocholesterolemiczne

Peptydy przeciwrzepliwie hamują proces krzepnięcia krwi, w którym kluczową rolę pełni trombina. Ten enzym osocza krwi hydrolizuje wiązania peptydowe w fibrynogenie, uwalniając fibrynopeptydy i nierozpuszczalne cząsteczki fibryny, które łącząc się ze sobą tworzą skrzep. Peptydy hamujące przyłączanie łańcuchów fibryny-y do miejsc receptorowych na powierzchni płytek krwi wykryto w trypsynowych hydrolizatach kazeinomakropeptydu, czyli hydrolizatach fragmentu kazeiny- κ (fr. 106—169) i były to peptydy: MAIPPKKNQDK (fr. 106—116), fr. 106—111, fr. 106—112, fr. 112—116, fr. 113—116. Peptydy hamujące proces krzepnięcia krwi (fr. 113—116 kazeiny- κ) zidentyfikowano również w napojach fermentowanych, w których były obecne także peptydy multiaktywne, w tym przeciwrzepliwie (fr. 152—160 i 155—160 kazeiny- κ) [21].

Natomiast wśród produktów hydrolizy jednego z białek serwatkowych – Ig- β , zidentyfikowano peptydy hipocholesterolemiczne IIAEK, HIRL [5, 6, 21, 22]. To peptydy o potencjale terapeutycznym, ponieważ mogą zostać

wykorzystane w procesie leczenia osób ze zdiagnozowaną dyslipidemią, która jest istotnym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (cardiovascular disease, CVD). Na podstawie przeprowadzonych badań klinicznych stwierdzono, że laktostatyna- β – peptyd o aktywności hipocholesterolemicznej i sekwencji IIAEK (fr. 71–75 Ig- β), powodował obniżenie stężenia cholesterolu w surowicy krwi badanych ludzi [5]. Taki peptyd (IIAEK) wykryto w hydrolizatach otrzymanych z bydlęcej Ig- β i z zastosowaniem trypsyny wieprzowej, również w wyniku symulowanego trawienia tego białka [6, 22, Rys. 1]. Związek ten powodował zmniejszenie rozpuszczalności micelnego cholesterolu oraz hamował wchłanianie cholesterolu przez nabłonek jelita cienkiego i/lub zwiększał zdolności wiązania kwasów żółciowych w przewodzie pokarmowym. Peptyd IIAEK wywoływał największy efekt hipocholesterolemiczny w modelu zwierzęcym (badania z udziałem szczurów), w porównaniu z sitosterolem- β , czyli związkiem roślinnym, podobnym pod względem budowy chemicznej do cholesterolu i znanym ze swojego potencjału terapeutycznego [6, 21]. Inny bioaktywny fragment Ig- β (fr. 146–149), określany jako laktotensyna- β (HIRL), obniżał poziom cholesterolu we krwi, zmniejszał wrażliwość na ból, ale pełnił również rolę agonisty neurotensyny, a został zidentyfikowany wśród produktów trawienia chymotrypsyną, wyizolowanych z jelita krętego świnki morskiej [5, 11, 21]. Inne peptydy pochodzące z Ig- β , takie jak GLDIQK, VYVEELKPTPEGDLLEILLQK i ALPMH, powodowały hamowanie wchłaniania cholesterolu podczas badań prowadzonych z wykorzystaniem linii komórkowych Caco-2 [6]. Komórki Caco-2 otrzymywane są z ludzkich komórek nowotworowych jelita grubego i ze względu na ich podobieństwo morfologiczne oraz nabłonkowe do komórek błony śluzowej jelita cienkiego (enterocytów), są najczęściej wykorzystywanymi komórkami w badaniach, zwłaszcza w badaniach *ex vivo* [10].

Peptydy przeciwcukrzycowe (antydiabetyczne)

Wśród najczęściej identyfikowanych peptydów o aktywności przeciwcukrzycowej są inhibitory enzymów takich jak DPP-4, amylazy- α oraz glukozydazy- α . DPP-4 to kluczowy enzym pełniący istotną rolę w regulacji metabolizmu węglowodanów [6]. Hamowanie aktywności DPP-4 uniemożliwia degradację dwóch hormonów jelitowych (inkretyn), glukagonopodobnego peptydu-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) oraz glukozależnego polipeptydu insulinotropowego (glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GIP). Te inkretyny stymulują produkcję insuliny w sposób zależny od stężenia glukozy we krwi [6, 22]. Inhibicja amylazy- α oraz glukozydazy- α (enzymów trawiennych), występujących w przewodzie pokarmowym, powoduje blokowanie hydrolizy wiązań glikozydowych w węglowodanach i uwolnienia molekuł glukozy, które jako związki małocząsteczkowe mogą zostać wchłonięte z przewodu pokarmowego do naczyń krwionośnych [6].

Peptydowe inhibitory DPP-4 wykryto w krowich, trypsynowych hydrolizatach białek serwatkowych, otrzymanych z koncentratów białek wzbogaconych w Ig- β (peptydy IPAVF, IPAVFK o wartościach IC_{50} odpowiednio 44,7 μ M i 143,0 μ M), a także trypsynowych hydrolizatach Ig- β : LIVTQTM, LIVTQTMK, VAGTWY, AGTWY, EILLQK, TPEVDDEALEK, LSFNPT, MAASDISLL, DISLL, TKIPAVF, VLVLDTDY, VLVLDTDYK, VLVLDTDYKK i ALPMHIR. W hydrolizatach pepsynowych otrzymanych z izolatów białek serwatkowych zidentyfikowano inhibitory DPP-4 pochodzące z Ia- α i Ig- β , a wśród produktów hydrolizy pochodzących z Ig- β były peptydy LKPTPEGDL (IC_{50} =45,0 μ M) oraz LKPTPEGDLLEIL (IC_{50} =57,0 μ M) [6]. Peptydy o aktywności antydiabetycznej znajdowały się w jednym z najbardziej znanych serów na świecie – serze Gouda [6] oraz w tym gatunku sera wyprodukowanego z różną zawartością kazeiny- β (sery z obniżoną lub podwyższoną lub standardową zawartością tej frakcji kazeiny) i po różnych okresach jego dojrzewania (1 lub 60 dni) [8]. W ekstraktach wodnych pochodzących z badanych serów oznaczono aktywność hamowania peptydów wobec DPP-4 i ACE [8], wykorzystując standardowe metody [8, 13]. Największą aktywność hamującą DPP-4 zaobserwowano dla próbek serów ze zwiększoną zawartością kazeiny- β (IC_{50} =9,174 mg/ml roztworu). W serze Gouda, niezależnie od zawartości kazeiny- β oraz etapu dojrzewania sera, zidentyfikowano inhibitor DPP-4 (peptyd WIQP), a na podstawie przeprowadzonych badań *in silico* stwierdzono, że był to fragment pochodzący z kazeiny- α_{s2} (wariant genetyczny A, fr. 208–211). Natomiast peptydy (TF, AA), wykazujące podwójną aktywność (inhibitory DPP-4 i ACE), nie zostały wykryte w serze na początku dojrzewania, ale były identyfikowane w końcowej fazie tego procesu [8]. Na podstawie przeprowadzonych innych badań, peptydowe inhibitory DPP-4 (LPQNIPPL oraz LPQ) wykryto w serze Gouda dojrzewającym przez 12 miesięcy

i dla odpowiedników syntetycznych tych peptydów wartości parametrów IC_{50} wynosiły odpowiednio $46,0 \mu M$ i $82,0 \mu M$. W badaniach, w których wykorzystano model zwierzęcy, po podaniu peptydu (LPQNIPPL) w dawce 300 mg/kg masy szczurów, po 30 i 60 minutach obserwowano obniżenie poziomu glukozy w osoczu tych zwierząt, podobnie jak u myszy (modelu C57BL/6) karmionych peptydem VAGTWY pochodzącym z Ig- β . Inne inhibitory, peptydowe inhibitory glukozydazy- α , zidentyfikowano w hydrolizatach otrzymanych z koncentratu białek serwatkowych (whey protein concentrate, WPC-80) i Ig- β oraz z zastosowaniem niekomercyjnej proteazy serynowej otrzymanej z dyni azjatyckiej (*Cucurbita ficifolia*). W tych hydrolizatach 13 frakcji peptydowych hamowało działanie glukozydazy- α , a frakcje peptydowe hydrolizatu WPC-80 o masie cząsteczkowej mniejszej niż 3 kDa , wykazały podwójną aktywność hamującą wobec DPP-4 i ACE [6].

Peptydy osteoanaboliczne, antyoksydacyjne i przeciwzapalne

Peptydy osteoanaboliczne pobudzają różnicowanie osteoblastów, czyli komórek pełniących istotną rolę podczas formowania oraz wewnętrznej przebudowy kości i taką aktywność wykazywały odpowiedniki syntetyczne peptydów, które wcześniej otrzymano z pepsynowo-trypsynowych hydrolizatów kazeiny bawolej (VLPVPQK, EDVPSER, NAVPITPTL, HPHPHLSF) i co istotne, nie wykazywały efektu cytotoksycznego [18]. Peptydy o takiej aktywności mogą zostać wykorzystane w prewencji choroby układu kostnego – osteoporozy, objawiającej się zmniejszoną masą kostną i pogorszeniem mikroarchitektury tkanki kostnej, co prowadzi do kruchości oraz podatności kości na złamania. Takie zmiany w układzie kostnym zachodzą również w osteoporozie pomenopauzalnej, występującej z powodu niedoboru estrogenów [18]. Peptydy VLPVPQK, EDVPSER, NAVPITPTL, HPHPHLSF to nie tylko peptydy osteoanaboliczne, których sekwencje zostały zdeponowane w bazie BIOPEP-UWM (numery identyfikacyjne – ID 10244, 10249, 10250, 10251), ale te cztery peptydy wykazują również aktywność antyoksydacyjną, a VLPVPQK także hamuje działanie DPP-4 i lipooksygenazy, wykazuje aktywność przeciwbakteryjną, antyapoptyczną, jest peptydem stymulującym migrację fibroblastów i wykazuje działanie przeciwstarzeniowe. Natomiast peptyd HPHPHLSF to inhibitor ACE i peptyd hipotensyjny [2]. Peptydowe inhibitory ACE (VPP, IPP) również aktywowały tworzenie kości, a IPP poprawiał masę oraz strukturę kości, poprzez wzrost proliferacji i różnicowania osteoblastów, czyli procesów uczestniczących podczas prawidłowego rozwoju oraz naprawy kości [10].

Stres oksydacyjny i stan zapalny są procesami patofizjologicznymi, ściśle ze sobą powiązanymi, z których jeden może być łatwo wywołany przez drugi [20]. W wyniku przemian metabolicznych zachodzących w organizmie człowieka powstają wolne rodniki i jako produkty takich przemian są one usuwane przez antyoksydanty, wytwarzane z udziałem komórkowych mechanizmów obronnych organizmu. Jednak nadmiar powstających reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species, RAS), przy jednoczesnym braku możliwości ich neutralizowania przez enzymy antyoksydacyjne (dysmutazę ponadtlenkową, katalazę) i glutation, wywołuje stres oksydacyjny [20]. RAS powodują utlenianie białek, lipidów, kwasów nukleinowych – istotnych składników struktur komórek organizmu, tkanek, co może inicjować powstawanie wielu chorób cywilizacyjnych, zwłaszcza układu krążenia, nadciśnienia, miażdżycy, nowotworów, cukrzycy czy związanych z dysfunkcją układu nerwowego, w tym chorób neurodegeneracyjnych [6, 20, 21, 23, 26]. Peptydy antyoksydacyjne wyizolowano z kazeiny- β bydlęcej: (fr. 177–183, AVPPYQR), (fr. 169–176, KVLPVPEK) oraz kazeiny- κ (fr. 96–106, ARHPHLSFM), a także kazeiny- κ pochodzącej z mleka kobecego (fr. 53–58, NPYVPR). Tonolo i in. [25], w celu określenia aktywności biologicznej powyższych związków, przeprowadzili badania z udziałem ich syntetycznych odpowiedników. Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdzono, że peptydy chroniły komórki Caco-2 przed stresem oksydacyjnym, pobudzając je do produkcji cytozolowych enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutazy ponadtlenkowej (superoxide dismutase, SOD1), reduktazy tioredoksyny (thioredoxin reductase, TrxR1), tioredoksyny 1 (thioredoxin 1, Trx1), reduktazy glutationu (glutathione reductase, GR) i dehydrogenazy NAD(P)H (chinon 1) (NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, NQO1) [25]. Jednak, spośród badanych biopeptydów największą aktywność antyoksydacyjną wykazywał peptyd KVLPVPEK, który zmniejszał ekspresję genu cytokin prozapalnych (interleukin (IL1B, IL6)), czynnika

martwicy nowotworów (tumor necrosis factor, TNF) oraz zwiększał ekspresję genu cytokin przeciwzapalnych (IL1RN) w komórkach Caco-2 [25, 26]. Inny peptyd (LLY) został wyizolowany oraz oczyszczony z kazeiny- β bydlęcej (fr. 191—193) trawionej trypsyną i był określany jako peptyd immunomodulacyjny, ponieważ wykazywał zdolności do zwiększania fagocytozy czerwonych krwinek owiec przez makrofagi otrzewnowe myszy. Sekwencja LLY znajduje się również w kazeinie- β owczej, koziej, a także w białku jaka [20]. Na podstawie przeprowadzonych badań z udziałem syntetycznego peptydu LLY, stwierdzono, że związek ten wykazywał aktywność immunomodulującą, antyoksydacyjną przy odpowiedniej jego biodostępności, jak również odpowiedź przeciwzapalną w warunkach *ex vivo* poprzez hamowanie proliferacji splenocytów myszy i modulowanie ich cytokin z odpowiednią fagocytozą makrofagów otrzewnowych. Fagocytoza makrofagów to jedna z kluczowych cech wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, która niszczy patogeny i usuwa je z organizmu. Natomiast LLY, jako peptyd antyoksydacyjny, hamował wewnątrzkomórkową produkcję ROS i zmniejszał powstawanie produktów utleniania tłuszczów i białek, zwiększał aktywność katalazy [20]. Przeciwuutleniaczami były także peptydy otrzymane z koncentratu białek serwatkowych (krowich) i z udziałem kilku różnych enzymów: trypsyny, papainy, Alcalase 2.4L, Protamex, Flavourzyme oraz Proteazy N. Takimi związkami były peptydy o sekwencjach aminokwasowych: AHLW, GTSV, VF, YSL, LAHL, LF i WYSL. Peptyd YFYPEL otrzymany z pepsynowego hydrolizatu kazeinowego „wymiałał wolne rodniki”, co stwierdzono na podstawie testu przeprowadzonego z udziałem 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH), wykorzystywanym podczas oznaczania aktywności antyoksydacyjnej, a parametr $IC_{50}=98,0$ μ M. Aktywność antyoksydacyjną wykazywały również fragmenty tego peptydu (EL, PEL, YPEL oraz FYPEL), a wśród nich największą aktywność – peptyd EL [6].

Niektóre peptydy pochodzące z białek mleka wykazywały aktywność antyoksydacyjną i osteoanaboliczną, przeciwzapalną, inne były inhibitorami ACE lub peptydami antyoksydacyjnymi oraz antyzapalnymi [16, 17, 20, 25, 26]. Pandey i in. [16] badali wpływ peptydów antyoksydacyjnych (MHIRL, YVEEL) i inhibitorów ACE (YLLF, ALPMHIR, IPA, WLAHK), pochodzących z serwatki, na proliferację oraz różnicowanie pierwotnych komórek osteoblastów wyizolowanych z czaszki szczura. Osteoblasty traktowane peptydami wykazywały znaczący wzrost gęstości żywych komórek i proliferację, ale największy wpływ miały peptydy w kolejności YVEEL>WLAHK>YLLF [16]. Peptyd WLAHK został wykryty w trypsynowych hydrolizatach la- α jako inhibitor ACE, ale był także peptydem immunomodulującym (BIOPEP-UWM, ID 10859) [2, 21]. Na podstawie innych badań przeprowadzonych na szczurach z osteoporozą i po owariektomii, stwierdzono, że peptydy pochodzące z serwatki, antyoksydacyjny (YVEEL) i inhibitor ACE (YLLF), wykazywały działanie osteoanaboliczne. Zwierzętom podawano odpowiednio 0,5 mg (YVEEL) oraz 0,05 mg peptydów (YLLF)/kg masy/dzień przez 8 tygodni, a następnie oznaczono parametry mikroarchitektury beleczkowej kości udowej i piszczelowej wykorzystując technikę obrazowania 3D (Micro computed tomography, micro-CT). Peptydy (YVEEL, YLLF) tłumiły stan zapalny (pomiar cytokin zapalnych) oraz zaobserwowano podwyższenie poziomu markerów tworzenia kości, ale peptyd antyoksydacyjny (YVEEL) wykazywał większy potencjał osteoprotekcyjny niż inhibitor ACE (YLLF) [17]. Peptyd YLLF, określany jako laktorfina- β , to inhibitor ACE, peptyd opioidowy, osteoanaboliczny, immunomodulujący (BIOPEP-UWM, ID 3255, 3256, 10409, 10855) [2, 21]. Inne peptydy pochodzące z białek mleka (KEDVPSER, HKEMPFKP, YPSYG, EDVPSE, VPQLE i IPAVF), zwłaszcza YPSYG, znacząco zwiększały wskaźnik masy kostnej u szczurów z osteoporozą ($p<0,05$) oraz zmniejszały liczbę osteoklastów w przynasadzie kości udowej i piszczelowej u szczurów z osteoporozą, a także łagodziły uszkodzenia mikrostrukturalne. Te peptydy promowały tworzenie kości oraz poprawiały mikrostrukturę kości u szczurów z osteoporozą, a peptyd YPSYG znacząco promował proliferację komórek preosteoblastycznych MC3T3-E1 zarówno w obecności, jak i bez $CaCl_2$, poprawiał proliferację komórek po uszkodzeniu oksydacyjnym wywołanym przez H_2O_2 [27].

Biopeptydy w produktach mleczarskich

W produktach mleczarskich wykryto biopeptydy o różnej aktywności biologicznej, a ich aktywność, zwłaszcza w serach długodojrzewających, była uzależniona od okresu ich dojrzewania [1, 8, 9]. W mleku krowim zidentyfikowano inhibitory ACE, peptydy antyoksydacyjne, które były uwolnione z białek mleka przez enzymy rodzime

występujące w mleku (enzymy endogenne). Peptydy przeciwnadciśnieniowe znajdowały się w napojach fermentowanych i zostały uwolnione z kazein- α_{s1} i - β (krowiej), kazein- α_{s1} oraz - α_{s2} (owczej), a także z kazein- α_{s2} oraz - β (koziej) przez enzymy pochodzące z *L. helveticus* PR4 [1].

W serach szwajcarskich półtwardych (Appenzeller, Tilsiter, Tête de Moine, Vacherin fribourgeois) oraz ekstraktach twardej i twardej Berner Hobelkäse, Le Gruyère i Emmentaler wykryto peptydy przeciwnadciśnieniowe IPP oraz VPP, których stężenie wzrastało w trakcie procesu dojrzewania i wynosiło >100 mg/kg w odmianach serów półtwardych po okresach dojrzewania trwających około od 4 do 7 miesięcy [12]. W niektórych serach szwajcarskich wykryto peptydy o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, przeciwnadciśnieniowej oraz immunostymulującej, będącej efektem działania plazminy oraz katepsyny D (enzymów endogennych mleka), jak i enzymów proteolitycznych pochodzących z kultur starterowych, a te związki bioaktywne były fragmentami kazein- α_{s1} oraz - β [1].

Peptydowe inhibitory ACE wyizolowano z włoskich serów (Crescenza i Gorgonzola), a także z sera Gouda, Blue, Edam i Havarti, jak również z serów brazylijskich otrzymywanych z surowego mleka owczego typu Roquefort, Feta oraz Pecorino Toscano, dojrzewających przez 60, 180 i 270 dni. Biopeptydy o takiej aktywności znajdowały się także w serach urugwajskich, takich jak Pecorino Sardo dojrzewających przez 80, 120 i 160 dni oraz Cerrilano dojrzewającym przez 90 i 120 dni [3]. Peptydowe inhibitory (ACE, DPP-4) oraz peptydy antyoksydacyjne wykryto w serach Gouda o zmodyfikowanych udziałach kazeiny- β [8, 9]. Największą aktywność hamowania ACE stwierdzono w serze Gouda dojrzewającym przez 3 miesiące, a w serze Manchego, wyprodukowanym z mleka owczego, obserwowano spadek aktywności przez pierwsze cztery miesiące dojrzewania, następnie wzrost i ponowny spadek tej aktywności po 12 miesiącach, a peptydowe inhibitory ACE pochodziły z kazeiny- β (fr. 199—204), kazeiny- α_{s1} (fr. 102—109) oraz kazeiny- α_{s2} (fr. 205—208) [1, 3]. Po piętnastodniowym okresie dojrzewania sera funkcjonalnego Scamorza, otrzymanego z mleka owczego i z udziałem *Bifidobacterium longum* (*B. longum*), *B. lactis*, *L. acidophilus*, identyfikowano peptydy o potencjalnych właściwościach przeciwnadciśnieniowych, przeciwdrobnoustrojowych, immunomodulujących. Peptydowe inhibitory ACE wykryto także w serach Festivo i Manchego, do produkcji których zastosowano kultury starterowe oraz *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. [1]. Aktywność antyoksydacyjną obserwowano w serach Cheddar, Fresco, Parmigiano-Reggiano, serach wytwarzanych z surowego mleka owczego i dojrzewających (Feta, Pecorino Toscano, Roquefort, Pecorino Sardo, Cerrilano) oraz w meksykańskim serze białym [3]. Potencjał antyoksydacyjny oraz przeciwnadciśnieniowy badano również w ekstraktach wodnych otrzymanych z rzemieślniczego sera brazylijskiego Artisanal Coalho. Ser został wyprodukowany z surowego mleka i po dwóch godzinach po dojeniu, a potencjał biologiczny badano po 30, 45 i 60 dniach dojrzewania. Spadek aktywności antyoksydacyjnej, a także przeciwnadciśnieniowej obserwowano po 60 dniach. Jednak w tym serze obserwowano wzrost aktywności antibakteryjnej przeciwko bakteriom Gram(+) i Gram(-) wraz z wydłużeniem jego okresu dojrzewania [3].

Podsumowanie

Biopeptydy znajdujące się w wyrobach mleczarskich, to bioaktywne produkty hydrolizy białek mleka, które powstają w wyniku aktywności enzymów endogennych występujących w mleku lub innych enzymów pochodzenia mikrobiologicznego, zastosowanych podczas ich wytwarzania w procesie technologicznym. Bioaktywne peptydy pochodzące z białek mleka, to związki nutraceutyczne, które mogą zostać wykorzystane w leczeniu nadciśnienia tętniczego, osteoporozy czy zespołu metabolicznego, cukrzycy typu-2 i takie związki mogą być również uwalniane w wyniku procesów trawienia, zachodzących w przewodzie pokarmowym człowieka. Jednak ich biodostępność uzależniona jest od budowy peptydów i ich odporności na hydrolizę w przewodzie pokarmowym, a także w surowicy krwi oraz ich zdolności do wchłaniania przez nabłonek jelitowy. To powoduje, że projektowanie i produkowanie żywności funkcjonalnej, żywności nutraceutycznej, nadal są wyzwaniem dla wielu ośrodków badawczych i producentów żywności, pomimo że na rynkach ogólnosiatawowych znajdują się produkty mleczarskie, w których znajdują się biopeptydy.

Literatura

1. Albenzio M., Santillo A., Caroprese M., Della Malva A., Marino R. (2017). Bioactive peptides in animal food products. *Foods*, 6, 35.
2. Baza danych sekwencji aminokwasowych białek i biologicznie aktywnych peptydów (BIOPEP-UWM). <https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm> [data dostępu 23.05.2025].
3. Bezerra D.A.F.V.A., Souza K.M.S., Sales D.C., Araújo E.O.M., Urbano S.A., Cipolat-Gotet C., Anaya K., Ribeiro C.V.D.M., Porto A.L.F., Rangel A.H.N. (2024). Effect of ripening time on the content of bioactive peptides and fatty acids profile of Artisanal *Coalho* cheese. *PLoS One*, 19, e0306552.
4. Darewicz M., Borawska J., Minkiewicz P., Iwaniak A., Starowicz P. (2015). Biologicznie aktywne peptydy uwalniane z białek żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3, 26–41.
5. Egger L., Ménard O. (2017). Update on bioactive peptides after milk and cheese digestion. *Current Opinion in Food Science*, 14, 116–121.
6. Iwaniak A., Darewicz M., Minkiewicz P. (2018). Peptides derived from foods as supportive diet components in the prevention of metabolic syndrome. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 63–81.
7. Iwaniak A., Minkiewicz P., Darewicz M. (2024). BIOPEP-UWM database — present and future. *Current Opinion in Food Science*, 55, 101108.
8. Iwaniak A., Mogut D., Minkiewicz P., Żulewska J., Darewicz M. (2021). Gouda cheese with modified content of β -casein as a source of peptides with ACE- and DPP-IV-inhibiting bioactivity: a study based on *in silico* and *in vitro* protocol. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2949.
9. Iwaniak A., Mogut D., Minkiewicz P., Żulewska J., Darewicz M. (2022). An integrated approach to the analysis of antioxidative peptides derived from Gouda cheese with a modified β -casein content. *Scientific Reports*, 12, 13314.
10. Li S., Bu T., Zheng J., Liu L., He G., Wu J. (2019). Preparation, bioavailability, and mechanism of emerging activities of Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 1097–1110.
11. Li W., Xi Y., Wang J., Zhang Y., Li H., Liu X. (2024). Food-derived protein hydrolysates and peptides: anxiolytic and antidepressant activities, characteristics, and mechanisms. *Food Science and Human Wellness* 13, 1168–1185.
12. Meyer J., Bütikofer U., Walther B., Wechsler D., Sieber R. (2009). 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. *Journal of Dairy Science*, 92, 826–836.
13. Minkiewicz P., Darewicz M., Iwaniak A., Borawska J., Bucholska J., Hryniewicz M. (2015). Biologicznie aktywne peptydy pochodzące z białek żywności: Badania *in silico*, *in vitro* i *in vivo*, aspekty aplikacyjne oraz ocena bezpieczeństwa. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 5, 5–22.
14. Minkiewicz P., Iwaniak A., Darewicz M. (2019). BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: current opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 5978.
15. Nadugala B.H., Pagel Ch.N., Raynes J.K., Ranadheera C.S., Logan A. (2022). The effect of casein genetic variants, glycosylation and phosphorylation on bovine milk protein structure, technological properties, nutrition and product manufacture. *International Dairy Journal*, 133, 105440, 1–18.
16. Pandey M., Kapila R., Kapila S. (2018). Osteoanabolic activity of whey-derived anti-oxidative (MHIRL and YVEEL) and angiotensin-converting enzyme inhibitory (YLLF, ALPMHIR, IPA and WLAHK) bioactive peptides. *Peptides*, 99, 1–7.
17. Pandey M., Kapila S., Kapila R., Trivedi R., Karvande A. (2018). Evaluation of the osteoprotective potential of whey derived-antioxidative (YVEEL) and angiotensin-converting enzyme inhibitory (YLLF) bioactive peptides in ovariectomised rats. *Food and Function*, 9, 4791–4801.

- 18.Reddi S., Shanmugam V.P., Tanedjeu K.S., Kapila S., Kapila R. (2018). Effect of buffalo casein-derived novel bioactive peptides on osteoblast differentiation. *European Journal of Nutrition*, 57, 593–605.
- 19.Singh J., Sinha S. (2012). Classification, regulatory acts and applications of nutraceuticals for health. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2, 177–187.
- 20.Sowmya K., Mala D., Bhat M.I., Kumar N., Bajaj R.K., Kapila S., Kapila R. (2018). Bio-accessible milk casein derived tripeptide (LLY) mediates overlapping anti-inflammatory and anti-oxidative effects under cellular (Caco-2) and *in vivo* milieu. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 62, 167–180.
- 21.Szerszunowicz I. (2014). Wpływ peptydów bioaktywnych uwalnianych z białek mleka krowiego na układ krwionośny. *Innowacyjne Mleczarstwo*, 2, 4–12.
- 22.Szerszunowicz I. (2023). Białkowe składniki suplementów diet i żywności specjalnego przeznaczenia oraz ich modyfikacje w warunkach symulujących przewód pokarmowy. W: Janiszewska M, red. *Najnowsze trendy w dietetyce i technologii żywności*. Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., 91–117.
- 23.Szerszunowicz I., Kłobukowski J. (2020). Characteristics of potential protein nutraceuticals of plant origin with antioxidant activity. *Molecules*, 25, 1621.
- 24.Szerszunowicz I., Kozicki S. (2024). Plant-derived proteins and peptides as potential immunomodulators. *Molecules*, 29, 209.
- 25.Tonolo F., Folda A., Cesaro L., Scalcon V., Marin O., Ferro S., Bindoli A., Rigobello M.P. (2020). Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 64, 103696.
- 26.Tonolo F., Folda A., Scalcon V., Marin O., Bindoli A., Rigobello M.P. (2022). Nrf2-activating bioactive peptides exert anti-inflammatory activity through Inhibition of the NF-κB pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 4382.
- 27.Zhang Y., Niu Y., Fu C., Zhu L., Wang H., Yi Y., Xu W., Guo D. (2024). Preparation, identification and screening of anti-osteoporosis milk-derived peptides: Intervention effects in osteoporosis rats. *Food Bioscience*, 62, 105120.