

Bioaktivni peptidi mlijeka i mliječnih proizvoda

Janda, Dana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:643412>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**BIOAKTIVNI PEPTIDI MLIJEKA I MLIJEČNIH
PROIZVODA**

DIPLOMSKI RAD

Dana Janda

Zagreb, rujan, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Proizvodnja i prerada mlijeka

**BIOAKTIVNI PEPTIDI MLIJEKA I MLIJEČNIH
PROIZVODA**

DIPLOMSKI RAD

Dana Janda

Mentor: doc. dr. sc. Milna Tudor Kalit

Zagreb, rujan, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Dana Janda**, JMBAG 0066237463, rođena dana 14.10.1994. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

BIOAKTIVNI PEPTIDI MLIJEKA I MLIJEČNIH PROIZVODA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Dana Janda**, JMBAG 0066237463, naslova

BIOAKTIVNI PEPTIDI MLIJEKA I MLIJEČNIH PROIZVODA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. doc. dr. sc. Milna Tudor Kalit mentor

2. prof. dr. sc. Samir Kalit član

3. doc. dr. sc. Iva Dolenčić Špehar član

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Milni Tudor Kalit na trudu, vremenu i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem svim profesorima i docentima na Zavodu za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na predanom radu i znanju kojeg su mi prenijeli.

Hvala mojim kolegicama i kolegama s kojima se uvijek bilo zabavno družiti i koji su mi uljepšali ove godine studiranja.

Veliko hvala mojoj prijateljici Tihani s kojom sam prošla sve godine studiranja i došla do konačnog cilja. Zajedno smo učile, marljivo upijale znanje i polagale sve ispite. Bilo je tu puno odricanja, nekada tuge, ali najviše smijeha. Stekla sam puno predivnih uspomena i prijateljicu za cijeli život.

Hvala mojim prijateljicama, a posebno mojoj Lani na razumijevanju za sve odbijene izlaske ili kave onda kada je trebalo učiti.

Htjela bih se zahvaliti mojoj obitelji. Mojoj Sari, Luciji i Katarini. Na riječima utjehe i razumijevanja. Podrške i shvaćanja.

Posebno hvala mojoj baki i djedu kojih već dugo nema pored mene. Uvijek vas se sjetim, vaše upornosti i marljivosti. Cijeli život ste vjerovali da se pravednost i trud isplate. Ako i nije uvijek tako, meni je drago što te vrijednosti zahvaljujući vama nosim u srcu.

A najviše bih se zahvalila svojoj majci Silvani i ocu Mladenu. U životu previše toga uzimamo zdravo za gotovo, a nismo svijesni da nam naši najbliži pružaju snagu i hrabrost da idemo dalje i da stignemo tamo gdje želimo stići. Vi ste za mene bili moja snaga, moja hrabrost i moj oslonac. Ovaj rad od srca posvećujem vama!

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Nastanak bioaktivnih peptida mlijeka i mliječnih proizvoda.....	3
2.1. Enzimatska hidroliza djelovanjem probavnih enzima – <i>in vivo</i>	3
2.2. Enzimatska hidroliza djelovanjem probavnih enzima – <i>in vitro</i>	4
2.3. Mikrobna fermentacija s proteolitičkim starter kulturama	5
2.4. Enzimatska hidroliza enzimima izvedenim iz mikroorganizama i biljaka	11
2.5. Enzimatska hidroliza kombinacijom probavnih enzima i proteolitičkih starter kultura ili enzima izoliranih iz mikroorganizama i biljaka	12
3. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz mlijeka i mliječnih proizvoda	14
3.1. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz mlijeka.....	14
3.1.1. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz kravljeg mlijeka	15
3.1.2. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz kozjeg mlijeka	24
3.1.3. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz ovčjeg mlijeka	26
3.2. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz fermentiranog mlijeka	28
3.3. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz sira.....	31
3.3.1. Nastanak peptida tijekom zrenja sireva	31
3.3.2. Utjecaj uvjeta i dužine zrenja na nastanak bioaktivnih peptida u siru.....	32
3.3.3. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz sira.....	37
4. Bioaktivni peptidi i biološka aktivnost u humanom organizmu	40
4.1. ACE- inhibitorni peptidi	40
4.2. Antitrombotični peptidi.....	42
4.3. Opioidni peptidi	43
4.4. Antimikrobni peptidi	44
4.5. Imunomodulatorni peptidi i njihova aktivnost u humanom organizmu	45
4.6. Antioksidativni peptidi	47
4.7. Peptidi koji vežu mineralne tvari	48
5. Zaključak	49
6. Literatura	50
Životopis	56

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Dana Janda** naslova

BIOAKTIVNI PEPTIDI MLIJEKA I MLIJEČNIH PROIZVODA

Bioaktivni peptidi podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke najbrojnija su skupina bioaktivnih tvari sadržanih u mliječnim proizvodima. To su fragmenti nastali cijepanjem proteina sastavljeni od 3 do 20 aminokiselina, koji nastaju tijekom probave u humanom organizmu ili tijekom procesa prerade mlijeka. Iako mlijeko predstavlja dobar izvor proteina, većina bioaktivnih peptida prisutnih u mlijeku nalazi se u neaktivnom obliku unutar native proteinske sekvence te svoju aktivnost mogu ispoljiti tek nakon hidrolize proteina iz kojeg potječu. Fermentirana mlijeka i sirevi predstavljaju glavne izvore bioaktivnih peptida među komercijalnim mliječnim proizvodima. Oni mogu biti dobar izvor antihipertenzivnih, antitrombotičnih, opioidnih, antimikrobnih, imunomodulatornih, antioksidativnih peptida i peptida s učinkom vezanja minerala. Aminokiselinski sastav i sekvence određuju biološku aktivnost bioaktivnih peptida, a spomenuti peptidi mogu pozitivno djelovati na krvožilni, živčani, imunološki i probavni sustav. Cilj ovog rada je dati pregled najznačajnijih bioaktivnih peptida podrijetlom iz mlijeka i mliječnih proizvoda, prikazati njihovu biološku aktivnost u humanom organizmu te načine kako oni nastaju.

Ključne riječi: bioaktivni peptidi, kazein, proteini sirutke, aminokiselinski sastav i sekvence, biološka aktivnost

Summary

Of the master's thesis – student **Dana Janda**, entitled

BIOACTIVE PEPTIDES OF THE MILK AND MILK PRODUCTS

Bioactive peptides originated from casein and whey proteins make the majority of bioactive substances present in dairy products. They are fragments obtained by degradation of protein that consisted of 3 to 20 amino acids and are synthesised in the food digestion process in human body or during milk processing. In spite of milk being a great source of proteins, most bioactive peptides present in milk are in an inactive form within the native protein sequence and can be activated only by hydrolysis of the protein they originate from. Fermented milks and cheeses represent one of the main sources of bioactive peptides among commercially used dairy products. They can be a good source of antihypertensive, antithrombotic, opioid, antimicrobial, immunomodulatory and antioxidant peptides as well as mineral-binding peptides. Amino acid composition and sequences determine biological activity of bioactive peptides and mentioned peptides can have a positive influence on vascular, nervous, immune and digestive system. The aim of this paper is to give the overview of the most important bioactive peptides from the milk and dairy products, describe their biological activity in human organism and the ways they are formed.

Key words: bioactive peptides, casein, whey proteins, amino acid composition and sequences, biological activity

1. Uvod

Bioaktivni peptidi podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke najbrojnija su skupina bioaktivnih tvari prisutnih u mliječnim proizvodima. To su proteinski fragmenti sastavljeni od 3 do 20 aminokiselina, koji nastaju tijekom probave u humanom organizmu ili tijekom procesa prerade mlijeka. Bioaktivni peptidi su neaktivni unutar sekvence proteinske molekule i mogu se osloboditi iz proteinskog prekursora: enzimatskom hidrolizom djelovanjem probavnih enzima - *in vivo* ili *in vitro*, mikrobnom fermentacijom s proteolitičkim starter kulturama, enzimatskom hidrolizom enzimima izvedenim iz mikroorganizama i biljaka te enzimatskom hidrolizom kombinacijom probavnih enzima i proteolitičkih starter kultura ili enzima izvedenih iz mikroorganizama i biljaka (Korhonen i Pihlanto 2006., Korhonen 2009.). Iako svakim od spomenutih načina mogu nastati bioaktivni peptidi s potencijalnim ili stvarnim učinkom na humani organizam, od posebne važnosti za mljekarsku industriju predstavlja način nastanka bioaktivnih peptida mikrobnom fermentacijom korištenjem proteolitičkih starter kultura. Ovakav način podrazumijeva korištenje mljekarskih mikrobnih kultura, najčešće bakterija mliječne kiseline (BMK) i njihovih enzima gdje se u procesu fermentacije iz proteina mlijeka oslobađaju bioaktivni peptidi (Choi i sur. 2012.). U tvorbi bioaktivnih peptida koristi se široki spektar BMK, a u usporedbi s drugim BMK, sojevi vrste *Lactobacillus helveticus* posjeduju najučinkovitiji proteolitički sustav pa je njihova primjena u mljekarskoj industriji najučestalija. Proteolitičke starter kulture, s naglaskom na BMK imaju posebnu važnost u tvorbi bioaktivnih peptida u fermentiranom mlijeku i tijekom zrenja u nekim vrstama sireva (Griffiths i Tellez 2013., Pihlanto 2016.).

Kravlje, kozje i ovčje mlijeko spadaju u kazeinska mlijeka, gdje je udio kazeina u ukupnom udjelu proteina iznad 75 %. Kazein se u sve tri vrste mlijeka smatra dobrim izvorom bioaktivnih peptida, pa najčešće izolirane peptide iz kazeina kao glavnog prekursora čine antihipertenzivni, antitrombotični, opioidni, antimikrobni, imunomodulatorni, antioksidativni peptidi i peptidi koji vežu mineralne tvari (Akuzawa i sur. 2009., Tratnik i Božanić 2012.). Iako proteini sirutke čine oko 20 % proteina u ukupnom udjelu proteina kravljeg, ovčjeg i kozjeg mlijeka smatraju se dobrim izvorom bioaktivnih peptida pa mogu poslužiti kao izvor svih gore navedenih peptida, s izuzetkom antitrombotičnih peptida (Tratnik i Božanić 2012., Mann i sur. 2019.). Unatoč tome što mlijeko predstavlja dobar izvor proteina, većina bioaktivnih peptida prisutnih u mlijeku nalazi se u neaktivnom obliku unutar native proteinske sekvence te svoju aktivnost mogu iskazati tek nakon hidrolize proteina iz kojeg potječu. Enzimatska hidroliza proteina mlijeka, bilo da je riječ o kazeinu ili proteinima sirutke, najčešće se događa tijekom proizvodnje fermentiranih mlijeka i sireva, te stoga unutar skupine mliječnih proizvoda fermentirana mlijeka i sirevi predstavljaju glavne izvore bioaktivnih peptida. (Korhonen i Pihlanto 2006., Samaržija 2015., Pihlanto 2016.).

Brojna znanstvena istraživanja ukazuju na potencijalni ili stvarni učinak bioaktivnih peptida mlijeka u humanom organizmu kroz pozitivan utjecaj na krvožilni, živčani, imunološki i probavni sustav. U tom smislu, ACE-inhibitorni peptidi čine najveću i najznačajniju skupinu

bioaktivnih peptida. Među njima, posebno mjesto zauzimaju tripeptidi Val-Pro-Pro (VPP) i Ile-Pro-Pro (IPP) čiji je antihipertenzivni učinak dokazan u mnogim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima provedenim na humanim i životinjskim modelima. Zbog dokazanog pozitivnog učinka danas se mogu naći u mnogim komercijalno dostupnim proizvodima kao što su fermentirana mlijeka „Calpis“ i „Evolus“ (Korhonen i Pihlanto 2006., Pihlanto 2016.).

Potencijalna ili dokazan biološka aktivnost bioaktivnih peptida spominje se u brojnim istraživačkim i preglednim znanstvenim radovima, kao i u mnogim knjigama. Ipak, brojnost kao i različitost bioloških funkcija bioaktivnih peptida ostaje rasuta u stotinama spomenutih izvora literature. Iz tog razloga je stvorena baza bioaktivnih peptida podrijetlom iz mlijeka različitih sisavaca, uključujući kravlje, ovčje i kozje mlijeko. Spomenuta baza dostupna na <http://mbpdb.nws.oregonstate.edu/> sačinjena je temeljem 258 znanstvenih istraživanja sa ukupno do sada identificirana 944 bioaktivna peptida. Kako bi se pregledao ovaj veliki skup podataka bioaktivni peptidi navedeni u literaturi vizualno su preslikani na matične proteinske sekvence. Upisivanjem željene proteinske sekvence peptida u tražilicu, ukoliko je peptid prisutan u bazi, omogućen je uvid u neke od karakteristika traženog bioaktivnog peptida, kao što su vrsta mlijeka iz kojeg potječe, vrsta i interval proteina iz kojeg potječe, jedna ili više funkcija koje iskazuje, naziv i vrstu istraživanja u kojima je izoliran i identificiran, kao i nazive autora provedenih istraživanja (Nielsen i sur. 2017.).

Cilj ovog rada je dati pregled najznačajnijih bioaktivnih peptida podrijetlom iz mlijeka i mliječnih proizvoda, prikazati njihovu biološku aktivnost u humanom organizmu te načine kako oni nastaju.

2. Nastanak bioaktivnih peptida mlijeka i mliječnih proizvoda

Bioaktivni peptidi predstavljaju fragmente nastale cijepanjem proteina sastavljene od 3 do 20 aminokiselina, koji nastaju tijekom probave u humanom organizmu ili tijekom procesa prerade mlijeka. Bioaktivni peptidi su neaktivni unutar sekvence proteinske molekule i mogu se osloboditi iz proteinskog prekursora:

- enzimatskom hidrolizom djelovanjem probavnih enzima – *in vivo*
- enzimatska hidroliza djelovanjem probavnih enzima – *in vitro*
- mikrobnom fermentacijom s proteolitičkim starter kulturama
- enzimatskom hidrolizom enzima izvedenih iz mikroorganizama i biljaka
- enzimatskom hidrolizom kombinacijom probavnih enzima i proteolitičkih starter kutura ili enzima izvedenih iz mikroorganizama i biljaka
(Korhonen i Pihlanto 2006., Korhonen 2009.)

2.1. Enzimatska hidroliza djelovanjem probavnih enzima – *in vivo*

Nastanak bioaktivnih peptida djelovanjem probavnih enzima u humanom organizmu predstavlja jedini način nastanka bioaktivnih peptida u *in vivo* uvjetima. Nakon konzumacije hrane koja sadrži bjelanjčevine mlijeka, dolazi do njihovog miješanja s gotovo ekvivalentnom količinom endogenih enzima oslobođenih u probavnom sustavu. Sama probava bjelanjčevina započinje u želucu u prisutnosti klorovodične kiseline koju izlučuju parijetalne stanice želuca. U prisutstvu klorovodične kiseline dolazi do aktivacije pepsinogena u pepsin, koji posljedično razgrađuje bjelanjčevine do proteoza, peptona i većih polipeptida. Njihova razgradnja do manjih polipeptida i aminokiselina nastavlja se u tankom crijevu djelovanjem enzima gušterače – tripsina, kimotripsina i karboksipolipeptidaze (Boutrou 2013., Mohanty i sur. 2016., <http://www.enciklopedija.hr>). Mohanty i sur. (2016.) navode kako se nekoliko bioaktivnih peptida s antibakterijskim, imunomodulatornim, antihipertenzivnim i opioidnim svojstvima oslobađaju iz kazeina i/ili proteina sirutke tijekom procesa probave djelovanjem enzima pepsina, tripsina ili kimotripsina. Kako bi se utvrdio mehanizam nastanka bioaktivnih peptida u humanom organizmu tijekom probave potrebno je provesti *in vivo* istraživanja. Važnost *in vivo* istraživanja ogleda se u njihovoj mogućnosti da definiraju točne uvjete *in vivo* okoline koji uključuju: omjer enzim:supstrat, vrijeme reakcije, pH-vrijednost te njihov zajednički utjecaj na probavne varijable i promjene koje se odvijaju tijekom *in vivo* probave. Također, *in vivo* probava smatra se dinamičnom pojavom koja proizlazi iz kontinuiranog lučenja probavnih enzima u tanko crijevo, s crijevnom apsorpcijom nekih nutrijenata u gornjem dijelu probavnog trakta, dok se neki nutrijenti apsorbiraju u distalnom dijelu probavnog trakta. Zbog navedenog, *in vivo* istraživanja trebala bi pokazati pouzdane i točne rezultate u vidu otkrivanja vrste i količine oslobođenih bioaktivnih peptida, kao i njihov potencijalni učinak na zdravlje čovjeka (Boutrou i sur. 2013.). Boutrou i sur. (2013.) su proveli *in vivo* istraživanje o oslobađanju bioaktivnih peptida dobivenih iz proteina mlijeka u

jejunumu zdravih ljudi. Istraživanje je provedeno na 16 ispitanika u razdoblju od ožujka 2008. godine do lipnja 2010. godine. Ispitanici su podijeljeni u dvije grupe po osam članova, a u obzir su uzeti spol (10 muškaraca i 6 žena), dob ($30 \pm$ godina) i indeks tjelesne mase ($28,3 \pm 1,8$). Cilj istraživanja bio je opisati i odrediti brzinu stvaranja peptida prisutnih u jejunumu zdravih ljudi koji su probavili kazein ili proteine sirutke upotrebom metode masene spektrometrije te odrediti i kvantificirati nastale bioaktivne peptide. Rezultati su pokazali da se probavom kazeina u prvih 6 sati nakon njegova uzimanja oslobađaju veće količine srednje velikih peptida (750 -1050 kDa), dok se probavom proteina sirutke u prva 3 sata nakon njihova uzimanja oslobađaju manje količine većih peptida (1050 - 1800 kDa). Iz jejunuma zdravih ispitanika tijekom 6 sati probave prikupljeno je i identificirano 356 peptida izvedenih iz kazeina, od čega 61,2 % iz β -CN-a, 24,9 % iz α_{s1} -CN-a, 8,2 % iz α_{s2} -CN-a i 6,7 % iz κ -CN-a. U istim je uvjetima i kroz isto vrijeme trajanja probave prikupljeno i identificirano 146 peptida nastalih iz proteina sirutke, od čega 72 % iz β -laktoglobulina, 15,1 % iz α -laktalbumina, 11 % iz albumina krvnog seruma i 1,4 % iz laktoferina. Od svih ukupno identificiranih peptida u jejunumu prevladavaju peptidi bogati prolinom te peptidi bogatih glicinom, što je logična posljedica s obzirom na otpornost peptida koji sadrže prolin na želučane i pankreasne enzime te epitelne proteaze. Identificirani peptidi pokazuju široki raspon bioloških funkcija, uključujući antihipertenzivne (ACE-inhibitori), antitrombotične, imunomodulatorne, opioidne i antimikrobne funkcije. Međutim samo su određeni bioaktivni peptidi oslobođeni u količinama dovoljnim da izazovu biološki učinak. β -CN se pokazao kao najvažniji prekursor peptida, a upravo su iz njega izvedeni β -CN f(60-66) i f(108-113) u količinama dovoljnim da izazovu biološki učinak. Biološki učinak spomenutih peptida u *in vivo* uvjetima uspoređen je s njihovim učinkom u *in vitro* uvjetima korištenjem vrijednosti izraženih kao polovica maksimalne inhibicijske koncentracije (IC_{50}). IC_{50} je vrijednost definirana kao koncentracija određenog inhibitora koja je potrebna za inhibiciju određenog enzima za 50 % u *in vitro* uvjetima (<https://www.yourdictionary.com>). β -Kazomorfina-7, odnosno β -CN f(60-66) pripada skupini opioidnih peptida, a količina od $17 \mu\text{mol L}^{-1}$ utvrđena 2 sata nakon probave kompatibilna je s opioidnom aktivnošću *in vivo* jer IC_{50} spomenutog peptida za ovu aktivnost iznosi $3\text{-}100 \mu\text{mol L}^{-1}$. β -CN f(108-113) pripada skupini ACE-inhibitorskih peptida, a količina od $670 \mu\text{g mL}^{-1}$ utvrđena 30 minuta nakon probave viša je za 1,5 puta od IC_{50} spomenutog peptida koji za ovu aktivnost iznosi $423 \mu\text{g mL}^{-1}$.

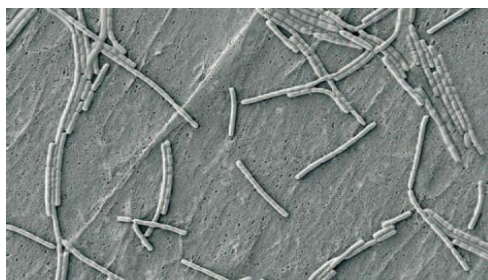
2.2. Enzimatska hidroliza djelovanjem probavnih enzima – *in vitro*

Ovakav način nastanka bioaktivnih peptida podrazumijeva korištenje izoliranih probavnih enzima u *in vitro* uvjetima gdje se u procesu enzimatske hidrolize iz proteina mlijeka oslobađaju bioaktivni peptidi. Najistaknutiji među njima, pepsin, tripsin i kimotripsin, za koje se pokazalo da sudjeluju u nastanku bioaktivnih peptida s antihipertenzivnim, antibakterijskim, imunomodulatornim i opioidnim svojstvima, čine prirodni dio procesa probave u zdravom humanom organizmu pa njihova djelotvornost u *in vitro* uvjetima

zadržava svojstva visoke proteolitičke aktivnosti. Kako bi se utvrdio mehanizam nastanka, vrsta i količina nastalih bioaktivnih peptida tijekom procesa probave u humanom organizmu, osim spomenutih *in vivo* istraživanja provode se i *in vitro* istraživanja koja simulacijom uvjeta prisutnih tijekom probave u gastrointestinalnom traktu daju uvid u nastanak bioaktivnih peptida (Korhonen 2009).

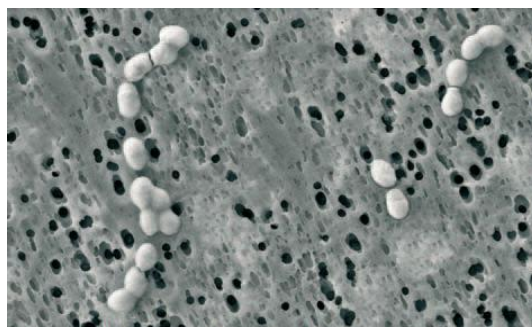
2.3. Mikrobna fermentacija s proteolitičkim starter kulturama

Nastanak bioaktivnih peptida mikrobnom fermentacijom s proteolitičkim starter kulturama podrazumijeva korištenje mljekarskih mikrobnih kultura, najčešće bakterija mliječne kiseline (BMK) i njihovih enzima gdje se u procesu fermentacije iz proteina mlijeka oslobađaju bioaktivni peptidi. BMK koriste proteine mlijeka kao primarni izvor esencijalnih i rast-stimulirajućih aminokiselina, a koncentracija aminokiselina u mlijeku niža od 1 mg L^{-1} dostatna je za rast i razmnožavanje samo 25 % stanica od najvećeg u kulturi prisutnog broja bakterija ($\sim 10^{11-12} \text{ cfu mL}^{-1}$) (Choi i sur. 2012., Samaržija 2015.). Zbog toga su BMK razvile vlastiti metabolički kapacitet razgradnje proteina mlijeka kojeg čine stanično vezane proteinaze i nekoliko različitih unutarstaničnih peptidaza, uključujući aminopeptidaze, dipeptidaze, tripeptidaze i endopeptidaze. Stanično vezane proteinaze razgrađuju proteine mlijeka do oligopeptida koji se potom unose u stanicu oligopeptidnim transportnim sustavom ili se razgrađuju do peptida malih molekularnih težina i slobodnih aminokiselina i potom unose u stanicu tripeptidnim, dipeptidnim i aminokiselinskim transportnim sustavom. Uneseni peptidi različitih molekularnih težina potom se djelovanjem različitih unutarstaničnih peptidaza razgrađuju do aminokiselina koje bakterije koriste za vlastiti rast (Korhonen i Pihlanto 2006., Samaržija 2015.). Tijekom procesa tvorbe aminokiselina esencijalnih za rast i razmnožavanje bakterijskih stanica, djelovanjem stanično vezanih proteinaza i unutarstaničnih peptidaza, dolazi do tvorbe bioaktivnih peptida. Tvorba bioaktivnih peptida ovisi o proteolitičkoj aktivnosti korištene mljekarske kulture, a u mljekarskoj industriji najznačajniji sojevi pripadaju bakterijama *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (slika 1.), *Lactococcus lactis* i *Streptococcus thermophilus* (slika 2.) (Korhonen i Pihlanto 2006., Pihlanto 2016.).



Slika 2.3.1. Morfološki prikaz bakterije *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Izvor : Samaržija 2015.



Slika 2.3.2. Morfološki prikaz bakterije *Streptococcus thermophilus*

Izvor: Samaržija 2015.

U usporedbi s drugim BMK, sojevi vrste *Lactobacillus helveticus* posjeduju najučinkovitiji proteolitički sustav pa je njihova primjena u prehrambenoj, a osobiti mljekarskoj industriji česta. Visoka učinkovitost njihovog proteolitičkog sustava proizlazi iz činjenice da se *L. helveticus* sojevi smatraju višestrukim aminokiselinskim auktotrofima te potrebe za podmiranjem aminokiselinskih zahtjeva putem mehanizma proteolize. Kao u većine BMK, proteolitički sustav bakterije *L. helveticus* sastoji se od stanično vezanih proteinaza, unutarstaničnih peptidaza te membranskog transportnog sustava s određenim specifičnostima koje doprinose većoj proteolitičkoj aktivnosti bakterije *L. helveticus* u odnosu na ostale BMK. Smještene na površini bakterijske stanice, stanično vezane proteinaze predstavljaju velike enzime (> 150 kDa) koji hidroliziraju kazeinske frakcije (uglavnom β -CN i α_{s1} -CN) do oligopeptida različitih molekularnih težina. Dok većina BMK posjeduju samo jednu stanično vezanu proteinazu, *L. helveticus* posjeduje najmanje dvije nazvane PrtH i PrtH2, a neki autori priznaju postojanje još dvije nazvane PrtH3 i PrtH4. Spomenute proteinaze kodirane su djelovanjem četiri gena: *prtH*, *prtH2*, *prtH3* i *prtH4*, od kojih je samo *prtH2* zajednički svim poznatim sojevima *L. helveticus*. Sveobuhvatnom studijom proteolitičkog sustava 51 soja *L. helveticus* dokazana je visoka intraspecifična raznolikost gena koji kodiraju stanično vezane proteinaze u analiziranim sojevima. Sva četiri gena utvrđena su u 12 % ispitanih sojeva, 3 gena u 8 % ispitanih sojeva, dok su dva gena utvrđena u 42 % ispitanih sojeva. Upravo bi prisutnost najmanje dvije stanično vezane proteinaze te intraspecifična raznolikost gena koji su zaslužni za njihovu aktivaciju mogla biti zaslužna za bolju proteolitičku učinkovitost sojeva *L. helveticus* u odnosu na druge BMK (Sadat-Mekmene i sur. 2011., Griffiths i Tellez 2013.). Prijenos oligopeptida, peptida manjih molekularnih težina i slobodnih aminokiselina unutar stanice djelovanjem različitih transportnih sustava predstavlja drugi korak u proteolitičkom sustavu svih BMK, pa tako i bakterije *L. helveticus*. Analizom sojeva *L. helveticus* DPC4571 i *L. helveticus* H10 utvrđeno je da soj DPC4571 posjeduje tri peptidna transportna sustava, oligopeptidni, dipeptidni i tripeptidni transportni sustav, dok soj H10 posjeduje dva peptidna transportna sustava, oligopeptidni i dipeptidni transportni sustav. Ovakvi rezultati ukazuju da se proteolitički transportni sustav može razlikovati između različitih sojeva vrste *L. helveticus* (Griffiths i Tellez 2013.). U stanicu uneseni oligopeptidi, peptidi manjih molekularnih težina i slobodne aminokiseline razlažu se djelovanjem unutarstaničnih peptidaza do aminokiselina esencijalnih za rast i razmnožavanje BMK, što

predstavlja treći korak u proteolitičkom sustavu svih BMK, pa tako i bakterije *L. helveticus*. Do 2003. godine samo je 11 peptidaza bilo identificirano kao dio proteolitičkog sustava bakterije *L. helveticus*: dvije prolin specifične endopeptidaze, PepE i PepO; tripeptidaza PepT, četiri aminopeptidaze, PepX, PepI, PepQ i PepR; i četiri dipeptidaze, PepD, PepV, PepC i PepN. Međutim, veći broj unutarstaničnih peptidaza, pa tako i veća složenost proteolitičkog sustava bakterije *L. helveticus* dokazana je kasnijom analizom soja *L. helveticus* CNRZ32 za kojeg je utvrđeno da posjeduje sedam oligoendopeptidaza, tri aminopeptidaze, pet prolin specifičnih peptidaza, ukupno osam dipeptidaza i tripeptidaza te najmanje šest drugih peptidaza. Veliku važnost za soj *L. helveticus* CNRZ32 pokazalo je nekoliko identificiranih peptidaza od kojih endopeptidaza Pep02 ima ključnu ulogu u smanjenju gorčine tijekom zrenja sireva koji se proizvode korištenjem navedenog soja, dok peptidaze PepC, PepN i PepX osiguravaju esencijalne aminokiseline za rast i razmnožavanje navedenog soja u mediju u kojem je prisutan. Biosinteza peptidaza bakterije *L. helveticus* regulirana je kemijskim sastavom i uvjetima medija u kojem raste, te vrstom sojeva koji se koriste tijekom proizvodnje fermentiranih mlijeka ili sireva. Povoljan kemijski sastav, odnosno dostupnost potrebnih peptida te povoljni uvjeti u mediju, poput željene temperature i kompatibilnosti s drugim korištenim sojevima, kao i vrsta soja kojoj najviše odgovaraju stvoreni uvjeti rezultirat će željenom biosintezom peptidaza bakterije *L. helveticus* te je dobar pokazatelj učinkovitosti i složenosti peptidaznog, odnosno proteolitičkog sustava bakterije *L. helveticus* (Kenny i sur. 2003., Griffiths i Tellez 2013).

Zbog visoke proteolitičke aktivnosti sojevi vrste *L. helveticus* imaju sposobnost tvorbe različitih bioaktivnih peptida s naglaskom na skupinu antihipertenzivnih peptida od kojih se ističu Val-Pro-Pro (VPP) i Ile-Pro-Pro (IPP) (Korhonen 2009., Griffiths i Tellez 2013.). U istraživanju kojeg su proveli Leclerc i sur. (2002.) proučen je bakterijski rast i proteolitička aktivnost sojeva *L. helveticus* R211 i R389 u različitim vrstama rekonstituiranog mlijeka te ACE- inhibitorna aktivnost stvorenih peptida nakon fermentacije mlijeka istim sojevima. Svaka od tri grupe, rekonstituirano mlijeko koje sadrži obrano mlijeko u prahu (12 %), obrano mlijeko u prahu (10 %) s dodanim natrijevim kazeinatom (5 %) ili izolatom proteina sirutke (5 %) fermentirana je zasebno sojevima *L. helveticus* R211 i R389 te potom testirana na bakterijski rast, proteolizu i ACE-inhibitornu aktivnost. Tijekom fermentacije provedene na 42 °C kroz 24 sata uz stalno miješanje, protok CO₂ i održavanje konstantnog pH 6, uzeti su uzorci u svrhu praćenja bakterijskog rasta (0, 3, 6, 9 i 24 sata) i proteolize (0, 9, 12 sati) navedenih sojeva. Bakterijski rast sojeva *L. helveticus* R211 i R389 u sve tri grupe fermentiranog mlijeka povećao se tijekom prvih 9 sati fermentacije, da bi se prema kraju i na samom kraju fermentacije broj živih bakterijskih stanica smanjio. Smanjenje broja živih bakterijskih stanica nakon prvih 9 sati fermentacije može se pripisati visokim koncentracijam mliječne kiseline nastale rastom bakterijskih sojeva prisutnih u mlijeku. U mlijeku obogaćenom natrijevim kazeinatom, stope rasta oba soja bile su više od onih promatranih u drugim grupama. Iako je najniži broj živih bakterijskih stanica sojeva *L. helveticus* R211 i R389 zabilježen na početku fermentacije u mlijeku obogaćenom natrijevim kazeinatom, tijekom prvih 9 sati fermentacije dosegno je vrijednost od oko 10⁹ cfu mL⁻¹, a na samom kraju fermentacije vrijednost od oko 5 x 10⁸ cfu mL⁻¹, što predstavlja najvišu stopu bakterijskog rasta u usporedbi s ostalim grupama. Proteolitička aktivnost sojeva *L. helveticus*

R211 i R389 utvrđena je identifikacijom slobodnih NH_3 grupa čija koncentracija raste s jačinom proteolize koja se odvija u fermentiranom mlijeku. Za oba soja *L. helveticus* najveća količina slobodnih NH_3 grupa utvrđena je u mlijeku obogaćenom natrijevim kazeinatom, potom u mlijeku obogaćenom izolatima proteina sirutke, dok je najniža količina NH_3 grupa utvrđena u mlijeku uz dodatak obranog mlijeka u prahu (12 %). Ovi podaci ukazuju na pojačano odvijanje proteolize u mlijeku s većim sadržajem proteina te na prednost kazeina kao supstrata za rast i razmnožavanje sojeva *L. helveticus* u odnosu na proteine sirutke. ACE-inhibitorna aktivnost peptida utvrđena u nefermentiranom mlijeku i mlijeku fermentiranom zasebno sojevima *L. helveticus* R211 i R389 u tri grupe rekonstituiranog mlijeka pokazala je različite vrijednosti IC_{50} . U sve tri grupe rekonstituiranog mlijeka fermentiranog zasebno dvama sojevima *L. helveticus* utvrđene su niže vrijednosti IC_{50} (0,6 - 3,5 mg mL^{-1}) u odnosu na vrijednosti IC_{50} (2,64 – 22,13 mg mL^{-1}) utvrđene u sve tri grupe rekonstituiranog nefermentiranog mlijeka, što posljedično dokazuje veću ACE-inhibitornu aktivnost peptida prisutnih u mlijeku fermentiranom sojevima *L. helveticus*. Usporedba tri različite grupe rekonstituiranog mlijeka fermentiranih zasebno dvama sojevima *L. helveticus* također je pokazala različite vrijednosti IC_{50} . Najviša ACE-inhibitorna aktivnost utvrđena je u mlijeku obogaćenom natrijevim kazeinatom, s vrijednostima IC_{50} između 0,6 i 1,1 mg mL^{-1} , nešto niža ACE-inhibitorna aktivnost utvrđena je u obranom mlijeku u prahu, s vrijednostima IC_{50} između 1,15-1,68 mg mL^{-1} , dok je najniža ACE-inhibitorna aktivnost utvrđena u mlijeku obogaćenom izolatima proteina sirutke, s vrijednostima IC_{50} između 2,24 i 3,51 mg mL^{-1} . Dobiveni rezultati ukazuju na važnost bakterijske proteolize i vrste proteinskog supstrata u mlijeku kao mediju za rast i razmnožavanje sojeva *L. helveticus*. Visoka proteolitička aktivnost sojeva *L. helveticus* tijekom fermentacije dovodi do razgradnje proteina prisutnih u mlijeku na manje peptidne fragmente, od kojih su neki prepoznati kao snažni ACE-inhibitorni peptidi što se smatra razlogom značajno veće ACE-inhibitorne aktivnosti fermentiranog mlijeka u odnosu na nefermentirano mlijeko. Mlijeko obogaćeno natrijevim kazeinatom prepoznato je kao bolji izvor proteinskog supstrata u usporedbi s mlijekom obogaćenim izolatima proteina sirutke te značajno viša ACE-inhibitorna aktivnost takvog mlijeka proizlazi iz kemijskog sastava kazeina čijom razgradnjom na kazeinske frakcije dolazi do oslobađanja snažnih ACE-inhibitornih peptida. Dobiveni rezultati prikazali su ACE-inhibitornu aktivnost mjerenu *in vitro*, dok se puno važnijom smatra ACE-inhibitorna aktivnost mjerena *in vivo*, odnosno u humanom ili životinjskom organizmu nakon konzumacije mliječnih proizvoda koji sadrže spomenute peptide. Stoga su isti autori proveli daljnje istraživanje ACE-inhibitorne aktivnosti u *in vivo* uvjetima korištenjem animalnog modela. Na temelju *in vitro* rezultata, odnosno najnižih vrijednosti IC_{50} , rekonstituirano mlijeko obogaćeno natrijevim kazeinatom, a fermentirano sojem *L. helveticus* R211, sojem *L. helveticus* R389 ili nefermentirano, davano je spontano hipertenzivnim štakorima podijeljenim u tri grupe po 10 jedinki. Značajni atihipertenzivni učinak nefermentiranog mlijeka *in vivo* zabilježen je kod konzumacije uzorka u većim dozama (1,0 i 2,5 g kg^{-1}) što se pripisuje većim koncentracijama kazeina dostupnog probavnim enzimima iz kojeg se potom razgradnjom oslobađaju ACE-inhibitorni peptidi. Značajni antihipertenzivni učinak mlijeka fermentiranog sojem *L. helveticus* R211 *in vivo* zabilježen je kod konzumacije sve tri doze uzorka (0,5, 1,0 i 2,5 g kg^{-1}) što se pripisuje ACE-inhibitornim peptidima nastalim razgradnjom kazeina

djelovanjem proteolitičkog sustava soja *L. helveticus* R211. Značajni antihipertenzivni učinak mlijeka fermentiranog sojem *L. helveticus* R389 *in vivo* zabilježen je kod konzumacije nižih doza uzorka (0,5 i 1,0 g kg⁻¹) već nakon 5, 6 i 7 sati, dok je kod konzumacije viših doza uzorka (2,5 g kg⁻¹) zabilježen tek nakon 7 sati, a u oba slučaja pripisuje se ACE-inhibitorskim peptidima nastalim razgradnjom kazeina djelovanjem proteolitičkog sustava soja *L. helveticus* R389. Smanjeni ili odgođeni antihipertenzivni učinak mlijeka fermentiranog spomenutim sojem kod konzumacije viših doza uzoraka možda može biti posljedica prisutnosti drugih tvari prisutnih u mlijeku. Tako bi spomenuti soj mogao promovirati oslobađanje većih količina opioidnih peptida (kazomorfina), a prisutnost kazomorfina može odgoditi prijelaz ACE-inhibitorskih peptida kroz gastrointestinalni trakt, a posljedično i njihovo djelovanje na krvni tlak. Ipak, ovo ostaje teorijska pretpostavka, jer nisu provedena mjerenja antihipertenzivnog učinka između 7 i 24 sata kako bi se potvrdila ova hipoteza. Osim snažne antihipertenzivne aktivnosti čije je postojanje dokazano u *in vitro* i *in vivo* uvjetima tijekom provedenog istraživanja, *L. helveticus* sojevi fermentacijom mlijeka mogu osloboditi imunomodulatorne, antimikrobne i antioksidativne peptide te peptide s drugim učinkom povoljnim za humani organizam (Korhonen i Pihlanto 2006., Griffiths i Tellez 2013.). Imunomodulatorna aktivnost sojeva *L. helveticus* 1188, 474 i 1315 očituje se sposobnošću njihovih proteinaza da stvore topljive bioaktivne peptide koji imaju pozitivan učinak na imunološki sustav čovjeka kroz stimulaciju perifernih mononuklearnih stanica krvi na proizvodnju interleukina-10 (IL-10) i interferona- γ (IFN- γ). Mlijeko fermentirano sojem *L. helveticus* R389 pokazuje imunomodulatornu i antimikrobnu aktivnost kroz stimulaciju imunološkog odgovora i zaštitu od bakterija *S. typhimurium* i *E. coli* O157, dok mlijeko fermentirano sojem *L. helveticus* LH-2 pokazuje imunomodulatornu i *in vivo* antimikrobnu aktivnost kroz stimulaciju imunološkog odgovora i zaštitu od infekcija uzrokovanih *Salmonellom* (Griffiths i Tellez 2013., Elfahri i sur. 2014.). Mlijeko fermentirano sojevima *L. helveticus* 953, 474, 1188 i 1315 pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost u vremenskom trajanju fermentacije od 12 sati, nakon čega dolazi do djelomične hidrolize antioksidativnih peptida, a posljedično i do značajnog pada antioksidativne aktivnosti mlijeka fermentiranog spomenutim sojevima. Međutim, antioksidativna aktivnost dokazana je i nakon 24 sata fermentacije (Elfahri i sur. 2016.)

Osim bakterije *L. helveticus*, mnoge druge industrijski korištene BMK imaju visoku proteolitičku moć i sposobnost tvorbe različitih bioaktivnih peptida, a kao i kod bakterije *L. helveticus* naglasak se stavlja na tvorbu ACE-inhibitorskih peptida (Korhonen 2009., Pihlanto 2016.). Gobetti i sur. (2000.) navode kako nakon zasebne fermentacije mlijeka kroz 72 sata, korištenjem soja podvrste *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* i soja podvrste *Lc. lactis subsp. cremoris*, dolazi do formiranja ACE-inhibitorskih peptida gdje IC₅₀ iznosi od 8,0 do 11,2 μ g mL⁻¹. Ashar i Chand (2004.) navode kako fermentacijom mlijeka bakterijom *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* dolazi do formiranja ACE-inhibitorskog peptida sekvence Ser-Liz-Val-Tir-Pro-Fen-Pro-Gli-Pro-Ile iz β -CN gdje IC₅₀ iznosi 1,7 mg mL⁻¹. Isti autori navode kako kombinacijom bakterija *S. thermophilus* i *Lc. lactis* biovar *diacetylactis* dolazi do formiranja peptidne sekvence Ser-Liz-Val-Tir-Pro iz β -CN gdje IC₅₀ iznosi 1,4 mg mL⁻¹. Zadnja dva spomenuta peptida pokazala su značajnu stabilnost prema probavnim enzimima, kiselim i alkalnom pH te tijekom pohrane na temperaturama od 5 do 10 °C kroz 4 dana. U istraživanju

kojeg su proveli Donkor i sur. (2007.) proučen je rast i proteolitička aktivnost nekoliko sojeva BMK, uključujući probiotičke sojeve, u mlijeku tijekom procesa fermentacije te ACE-inhibitorna aktivnost stvorenih peptida nakon fermentacije mlijeka istim sojevima. Prije procesa fermentacije mlijeko je podijeljeno u dvije grupe i fermentirano različitim mljekarskim kulturama. Prva grupa, ujedno i kontrolna, inokulirana je klasičnom jogurtom kulturom, točnije sojem *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb1466 i sojem *S. thermophilus* St1342, dok je druga grupa, ujedno i probiotička, uz navedene sojeve inokulirana probiotičkim sojevima *L. acidophilus* L10, *L. casei* L26 i *B. lactis* B94. Fermentacija je provedena na temperaturi od 42 °C do postizanja pH od 4.5, nakon čega su jogurti ohlađeni i pohranjeni na temperaturu od 4 °C kroz 28 dana. Proteolitička aktivnost i rast bakterijskih sojeva koji su fermentirali mlijeko, kao i ACE-inhibitorna aktivnost stvorenih peptida izmjereni su neposredno nakon fermentacije te na tjednoj bazi kroz 28 dana pohrane na temperaturama od 4 °C. Rast spomenutih bakterijskih sojeva tijekom i nakon procesa fermentacije ima utjecaj na jačinu i brzinu proteolize koja se odvija u inokuliranom mlijeku, dok proteolitička aktivnost spomenutih sojeva određuje vrstu i koncentraciju stvorenih ACE-inhibitornih peptida. *S. thermophilus* St1342 pokazuje dosljedno povećanje koncentracije stanica u kontrolnoj i probiotičkoj grupi za vrijeme skladištenja, dok *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb 1466 pokazuje pad koncentracije stanica u kontrolnoj grupi, s naglaskom na veći rast u probiotičkoj grupi u usporedbi s kontrolnom grupom. Preživljavanje probiotičkih sojeva ne razlikuje se značajno među sojevima tijekom procesa skladištenja, s izuzetkom *B. lactis* B94 kod kojeg je zabilježen pad koncentracije stanica na kraju procesa skladištenja. U obje grupe uočena je značajna proteolitička aktivnost spomenutih sojeva tijekom prva 24 sata skladištenja, koja se nastavila slabijim intenzitetom kroz preostalo vrijeme skladištenja. Međutim, zabilježena proteolitička aktivnost neposredno nakon fermentacije te tijekom skladištenja kroz 28 dana, bila je 35 %, odnosno 20 % veća u probiotičkom jogurtu u usporedbi s kontrolnim jogurtom. Ovi podaci ukazuju kako veća proteolitička aktivnost u probiotičkom jogurtu rezultira boljim preživljavanjem spomenutih probiotičkih sojeva u jogurtu za vrijeme skladištenja, a posljedično dovodi do veće količine oslobođenih bioaktivnih peptida u probiotičkom jogurtu u odnosu na kontrolni jogurt. Iako su u obje grupe jogurta izolirani ACE-inhibitorni peptidi, njihova vrsta i kvaliteta pokazala se drugačijom na što ukazuju različite IC₅₀ vrijednosti. ACE-inhibitorni peptidi izolirani iz kontrolne grupe pokazuju veće IC₅₀ vrijednosti što upućuje na njihov slabiji ACE-inhibitorni učinak. Osam ACE-inhibitornih peptida izoliranih iz probiotičke grupe, koji imaju značajan ACE-inhibitorni učinak s IC₅₀ vrijednostima između 1,56 mg mL⁻¹ i 12,41 mg mL⁻¹, čine α_{s1}-CN f(19-23), β-CN f(74-76), κ-CN f(108-110), β-CN f(193-198), β-CN f(25-29), β-CN f(69-73), β-CN f(84-86) i κ-CN f(96-100). Među izoliranim peptidima β-CN f(74-76), odnosno IPP i β-CN f(84-86), odnosno VPP, pokazuju veću *in vitro* ACE-inhibitornu aktivnost u odnosu na većinu drugih inhibitornih peptida izoliranih i identificiranih u ovom istraživanju, s IC₅₀ vrijednostima 3,77 ± 0,26 (IPP) i 2,6 ± 10,24 mg mL⁻¹ (VPP). ACE-inhibitorni peptidi izolirani iz probiotičke grupe ukazuju na zaključak da jogurt proizveden miješanjem jogurtne kulture i spomenutih probiotičkih sojeva sadrži širi spektar bioaktivnih peptida od jogurta proizvedenog djelovanjem samo jogurtne kulture, te bi redovita konzumacija takvog jogurta mogla imati koristan utjecaj na zdravlje konzumenta.

2.4. Enzimatska hidroliza enzima izvedenim iz mikroorganizama i biljaka

Ovakav način nastanka bioaktivnih peptida podrazumijeva korištenje enzima izoliranih iz mikroorganizama i biljaka, s naglaskom na enzime izolirane iz BMK, gdje se u procesu enzimatske hidrolize iz proteina mlijeka oslobađaju bioaktivni peptidi (Korhonen i Pihlanto 2006).

Zbog najučinkovitijeg proteolitičkog sustava bakterije *L. helveticus* u usporedbi s ostalim BMK, enzimi izolirani iz različitih sojeva ove bakterije pokazuju visoku proteolitičku aktivnost i sposobnost tvorbe bioaktivnih peptida, najviše iz skupine antihipertenzivnih peptida. Yamamoto i sur. (1994.) navode kako enzimatskom hidrolizom kazeina djelovanjem stanično vezane proteinaze izolirane iz soja *L. helveticus* CP790 dolazi do tvorbe nekoliko ACE-inhibitornih peptida, a ACE-inhibitorna aktivnost stvorenih peptida dokazana je na uzorku spontano hipertenzivnih štakora. Maeno i sur. (1996.) navode kako je korištenjem iste proteinaze iz hidroizolata β -kazeina izoliran antihipertenzivni peptid Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln, čiji se učinak u spontano hipertenzivnih štakora očituje na razini doziranja između 0,2 i 2 mg kg⁻¹ tjelesne mase ispitanika.

Iako se visoka proteolitička aktivnost stanično vezanih proteinaza u odnosu na peptidaze bakterije *L. helveticus* smatra važnijom tijekom proizvodnje bioaktivnih peptida, važnost peptidaza također je dokazana. Endopeptidaza izolirana iz soja *L. helveticus* CM4 pokazuje sposobnost enzimatske hidrolize peptida Val-Pro-Pro-Phe-Leu i Ile-Pro-Pro-Leu-Thr do Val-Pro-Pro i Ile-Pro-Pro, tripeptida visoke antihipertenzivne aktivnosti (Ueno i sur. 2004.).

Enzimatskom hidrolizom obranog mlijeka djelovanjem više različitih enzima izoliranih iz soja *L. helveticus* JCM1004 sintetiziraju se tripeptidi VPP i IPP vrijednošću IC₅₀ 9,13 ± 0,21 i 5,15 ± 0,12 μM te značajnom antihipertenzivna aktivnošću spomenutih peptida *in vivo* u spontano hipertenzivnih štakora. Tijekom enzimatske hidrolize optimalna pH vrijednost iznosi 6,5-7,0 dok je optimalno vrijeme trajanja hidrolize 6-10 sati, a osigurvanjem ovih uvjeta stvorena je željena i maksimalna količina ACE-inhibitornih peptida (Pan i sur. 2005.).

2.5. Enzimatska hidroliza kombinacijom probavnih enzima i proteolitičkih starter kultura ili enzima izoliranih iz mikroorganizama i biljaka

Ovakav način nastanka bioaktivnih peptida podrazumijeva korištenje probavnih enzima (najčešće pepsina i tripsina) u kombinaciji s proteolitičkim starter kulturama ili enzimima izoliranim iz mikroorganizama (najčešće BMK) i biljaka, gdje se u procesu enzimatske hidrolize iz proteina mlijeka oslobađaju bioaktivni peptidi (Korhonen i Pihlanto 2006.). Oslobađanje bioaktivnih peptida u *in vivo* uvjetima djelovanjem probavnih enzima nakon konzumacije mliječnih proizvoda fermentiranih proteolitičkim starter kulturama ili izloženih enzimatskoj hidrolizi djelovanjem enzima izoliranih iz mikroorganizama ili biljaka, također se smatra značajnim, iako je manji broj studija proveden kako bi se dokazala i ispitala ova tvrdnja.

Mnoga *in vitro* istraživanja dokazala su da fermentacija mlijeka djelovanjem mliječnih kultura ili proteoliza enzimima izoliranim iz tih kultura prije ili nakon tretiranja mlijeka izoliranim probavnim enzimima povećava i mijenja profil stvorenih bioaktivnih peptida (Korhonen 2009.).

Kombinacija mliječnih kultura i probavnih enzima smatra se učinkovitom u proizvodnji različitih vrsta bioaktivnih peptida, a u nekim istraživanjima upravo se učinak probavnih enzima na proteine mlijeka pokazao ključnim za tvorbu bioaktivnih peptida. U istraživanju kojeg su proveli Pihlanto-Leppälä i sur. (1998.) fermentacijom mlijeka korištenjem komercijalnih starter kultura u proizvodnji jogurta i kiselog mlijeka izostaje ACE-inhibitorna aktivnost takvog mlijeka. Daljnjom enzimatskom hidrolizom supstrata djelovanjem pepsina i tripsina u uzorcima dolazi do oslobađanja nekoliko snažnih ACE-inhibitornih peptida, pa se nastala antihipertenzivna aktivnost pripisuje djelovanju spomenutih enzima na proteine mlijeka. Lorenzen i Meisel (2005.) navode kako nakon enzimatske hidrolize mlijeka za proizvodnju jogurta izolatom tripsina dolazi do tvorbe CPP sekvenci β -CN f(1-25)-4P i α_{s1} -CN f(43-79)-7P kojima se pripisuje povećanje biodostupnosti određenih minerala, dok daljnja fermentacija supstrata djelovanjem jogurtne kulture nije značajna za tvorbu bioaktivnih peptida.

Kombinacija enzima izoliranih iz mljekarskih kultura i probavnih enzima smatra se učinkovitom u proizvodnji različitih vrsta bioaktivnih peptida, a u nekim istraživanjima upravo se učinak probavnih enzima pokazao ključnim kako bi stvoreni peptidi iskazali svoja bioaktivna obilježja. Sütas i sur. (1996.) navode kako uzastopnom hidrolizom kazeina pepsinom i tripsinom dolazi do nastanka peptida sa imunostimulirajućim i imunosupresivnim učinkom na limfocite izolirane iz ljudske krvi. Nakon enzimatske hidrolize kazeina djelovanjem enzima izoliranih iz probiotičkog soja *Lactobacillus* GG var. *casei* dolazi do tvorbe hidroizolata s imunosupresivnom aktivnošću, a dodatnim izlaganjem supstrata djelovanju pepsina i tripsina nastaju hidroizolat koji sadrži i imunostimulirajuće peptide. Ovakvi rezultati sugeriraju mogućnost smanjenja alergijskih svojstava proteina mlijeka upotrebom prethodno spomenutog dvostrukog enzimatskog modela.

Nastanak bioaktivnih peptida u *in vivo* uvjetima isključivim djelovanjem probavnih enzima dokazan je davanjem nefermentiranog mlijeka ili kazeina kao supstrata ispitanicima gdje potom u procesu probave dolazi do oslobađanja spomenutih peptida s različitim bioaktivnim učinkom (Leclerc i sur. 2002., Boutrou i sur. 2013.). Također, davanjem mlijeka prethodno fermentiranog određenim sojevima BMK ili njihovim enzimima zabilježena je bioaktivna aktivnost koja se smatra posljedicom bioaktivnih peptida stvorenih prije samog unosa u organizam, a njihovim unosom u organizam, prolaskom kroz gastrointestinalni trakt te ulaskom u krv dolazi do iskazivanja pozitivnog učinka na organizam ispitanika (Leclerc i sur. 2002.) Kada određena bioaktivna komponenta prestaje biti proizvod isključivog djelovanja probavnih enzima ili mliječnih kultura i njihovih enzima i postaje proizvod simultanog djelovanja jednih i drugih čimbenika u *in vivo* uvjetima teško je utvrditi. Prethodno opisana *in vitro* istraživanja koja uključuju simultani učinak jednih i drugih čimbenika možda mogu poslužiti kao pretpostavka nastanka sličnih bioaktivnih komponenti u *in vivo* uvjetima tijekom procesa probave.

3. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz mlijeka i mliječnih proizvoda

3.1. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz mlijeka

Mlijeko je najkompletnija prirodna tekućina, jer sadržava sve tvari neophodne za očuvanje zdravlja i normalnu funkciju ljudskog organizma. Visoku prehrambenu i zdravstvenu vrijednost mlijeko duguje omjeru i kvaliteti svojih sastojaka, među kojima se ističu proteini. Proteini mlijeka sadržavaju sve esencijalne aminokiseline potrebne za građu tkiva, enzima i hormona u ljudskom organizmu, a jedna od najvažnijih uloga je što sudjeluju kao prekursori u tvorbi bioaktivnih peptida. Iako mlijeko predstavlja dobar izvor proteina, a samim time i bioaktivnih peptida, većina bioaktivnih peptida nalaze se u neaktivnom obliku unutar nativnog proteinskog slijeda te svoju aktivnost mogu iskazati tek nakon hidrolize proteina iz kojeg potječu. Enzimatska hidroliza proteina mlijeka, bilo da je riječ o kazeinu ili proteinima sirutke, najčešće se događa tijekom proizvodnje fermentiranih mlijeka ili sireva, te tijekom probave mlijeka u humanom organizmu. Također, bioaktivni peptidi mogu biti oslobođeni enzimatskom hidrolizom komercijalnim enzimima, najčešće probavnim – pepsinom ili tripsinom, gdje se raznim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima nastoji utvrditi njihova vrsta i količina te potencijalna ili stvarna bioaktivnost u humanom organizmu (Silva i Malcata 2005., Tratnik i Božanić 2012., Mohanty i sur. 2016.,).

Kravlje, kozje i ovčje mlijeko spadaju u kazeinska mlijeka, gdje se udio kazeina u ukupnom udjelu proteina iznosi iznad 75 %. Kazein kao glavni protein mlijeka predstavlja dobar izvor esencijalnih aminokiselina što utječe na njegovu hranidbenu vrijednost, ali njegova bioaktivnost u humanom organizmu dolazi do izražaja tek nakon enzimatske hidrolize gdje se iz kazeinskih frakcija oslobađaju bioaktivni peptidi s različitim biološkim učinkom. Provedena *in vitro* i *in vivo* istraživanja stavila su veliki naglasak na tvorbu bioaktivnih peptida iz kazeina kravljeg mlijeka kao glavnog prekursora, dok se značajno manji dio istraživanja usmjerio na tvorbu bioaktivnih peptida iz kazeina ovčjeg i kozjeg mlijeka (Silva i Malcata 2005., Recio i sur. 2009., Tratnik i Božanić 2012.). Najčešće izolirane peptide iz kazeina kravljeg mlijeka čine antihipertenzivni (3.1.1.1.), antitrombotični (3.1.1.2.) opioidni (3.1.1.3.), antimikrobni (3.1.1.4.), imunomodulatorni peptidi (3.1.1.5.) i kazeinofosfopeptidi (3.1.1.6.), dok najčešće izolirane peptide iz kazeina kozjeg i ovčjeg mlijeka čine antihipertenzivni (tablice 3.1.2.1. i 3.1.3.1.) i antimikrobni peptidi (tablica 3.1.2.1. i 3.1.3.1.). Proteini sirutke predstavljaju još bolji izvor esencijalnih aminokiselina od kazeina što se pripisuje većem udjelu lizina i tioaminokiselina, pa je i njihova hranidbena vrijednost znatno veća u odnosu na kazein. Osim toga, njihova bioaktivnost u humanom organizmu može biti izražena u nativnom obliku pa mnoge prirodno prisutne tvari kao što su imunoglobulini, laktoferin, transferin, laktoperoksidaza, lizozim i proteini koji vežu važne vitamine i minerale bez enzimatske hidrolize proteina iskazuju svoj biološki učinak, prvenstveno utjecajem na povećanje otpornosti humanog organizma prema štetnim bakterijama, virusima, toksinima, zaraznim bolestima i alergijskim reakcijama. Međutim, isto kao i kazein, proteini sirutke najviše izražavaju svoju bioaktivnost kroz tvorbu bioaktivnih peptida s različitim biološkim

učinkom. Provedena *in vivo* i *in vitro* istraživanja stavila su veliki naglasak na tvorbu bioaktivnih peptida iz proteina sirutke kravljeg mlijeka kao glavnih prekursora, dok se značajno manji dio usmjerio na tvorbu bioaktivnih peptida iz proteina sirutke kozjeg i ovčjeg mlijeka (Recio i sur. 2009., Tratnik i Božanić 2012.). Najčešće izolirane peptide iz proteina sirutke kravljeg mlijeka čine antihipertenzivni (3.1.1.7), opioidni (3.1.1.8.), antimikrobni (3.1.1.9.), antioksidativni peptidi (3.1.1.10.) i peptidi koji vežu mineralne tvari (3.1.1.11.), dok najčešće izolirane peptide iz proteina sirutke kozjeg i ovčjeg mlijeka čine antihipertenzivni (3.1.2.2. i 3.1.3.2.) i antimikrobni peptidi (3.1.2.2. i 3.1.3.2.).

Važno je napomenuti da mnogi od navedenih peptida izoliranih iz kazeina ili proteina sirutke mogu imati više potencijalnih ili dokazanih bioloških funkcija odjednom, a često puta je teško utvrditi koja funkcija se smatra najvažnijom. Ukupno gledano za kravlje, kozje i ovčje mlijeko karakteristična je raznolikost prisutnih bioaktivnih peptida pa stoga ne čudi tvrdnja da se smatraju najvažnijim izvorom prirodnih bioaktivnih komponenti (Smacchi i Gobetti 2004., Park i Nam 2015.).

3.1.1. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz kravljeg mlijeka

Kravlje mlijeko u prosjeku sadrži 3,5 % proteina, od čega oko 80 % čini kazein, a 20 % proteini sirutke. Kazein je kao najsloženiji protein mlijeka podijeljen u nekoliko kazeinskih frakcija: α_{s1} -CN (38 %), α_{s2} -CN (10 %), β -CN (33-39 %) i κ -CN (11-13 %). Prisutne frakcije γ -CN uglavnom su rezultat proteolize β -CN, jer on u usporedbi s drugim frakcijama kazeina ima 3 veze osjetljive na prirodni enzim mlijeka - plazmin, koji se nalazi povezan s micelama (Tratnik i Božanić 2012., Biadala i Konieczny 2018.). Bioaktivni peptidi izolirani su i identificirani iz svih kazeinskih frakcija, što nam govori o važnosti svake kazeinske frakcije u iskazivanju potencijalne ili dokazane bioaktivnosti u humanom organizmu. Najveći je dio izoliran i identificiran iz β i α_{s1} kazeinskih frakcija što uz njihov sastav, možda može biti posljedica najvećeg udjela ovih frakcija u ukupnom sadržaju kazeina. Koliko će određena kazeinska frakcija biti pogodna za tvorbu bioaktivnih peptida ovisi o vrsti bioaktivnog učinka pa su se tako u tvorbi peptida s antihipertenzivnim učinkom pokazale važne sve kazeinske frakcije, dok se u tvorbi peptida s antitrombotičnim učinkom pokazao važan κ -CN kao jedini prekursor koji sudjeluje u njihovoj tvorbi. Navedena opažanja o bioaktivnim peptidima izoliranim i identificiranim iz kazeina kravljeg mlijeka donesena su na temelju literature koja se spominje u nastavku teksta u obliku tablica.

Antihipertenzivni peptidi (tablica 3.1.1.1.) spadaju u najveću i najznačajniju skupinu bioaktivnih peptida podrijetlom iz kazeina kravljeg mlijeka. Nose naziv kazokinini, a u njihovoj tvorbi kao prekursor mogu poslužiti sve kazeinske frakcije, s posebnim naglaskom na tvorbu β -CN f(84-86), odnosno VPP-a i β -CN f(74-76) ili κ -CN f(108-110), odnosno IPP-a. Prikazani peptidi najčešće nastaju u *in vitro* uvjetima enzimatskom hidrolizom probavnim enzimima (pepsinom i tripsinom), fermentacijom BMK ili proteolizom njihovim enzimima te

kombinacijom enzimatske hidrolize probavnim enzimima (pepsinom i tripsinom) i fermentacije BMK (Akuzawa i sur. 2009., Pihlanto 2016.).

Tablica 3.1.1.1. Antihipertenzivni peptidi podrijetlom iz kazeina kravljeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Biološka aktivnost	Izvor
α_{s1} -CN f(1-9)	RPKHPIKHQ	ACE-inhibitorna	Ryhänen i sur. (2001)
α_{s1} -CN f(23-24)	FF	ACE-inhibitorna	Maruyama i Suzuki (1982)
α_{s1} -CN f(23-34)	FFVAPFPEVFGK	ACE-inhibitorna	Maruyama i sur.(1985)
α_{s1} -CN f(28-34)	FPEVFGK	ACE-inhibitorna	Maruyama i sur.(1987)
α_{s1} -CN f(90-94)	RYLGY	ACE-inhibitorna	Conteras i sur. (2009)
α_{s1} -CN f(102-109)	KKYKVPQ	ACE-inhibitorna	Gomez–Ruiz i sur. (2002)
α_{s1} -CN f(104-109)	YKVPQL	ACE-inhibitorna	Maeno i sur. 1996
α_{s1} -CN f(142-147)	LAYFYP	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppälä i sur. (1998)
α_{s1} -CN f(143-148)	AYFYPE	ACE-inhibitorna	Yamamoto i sur. (1994)
α_{s1} -CN f(157-164)	DAYPSGAW	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppälä i sur. (1998)
α_{s1} -CN f(194-199)	TTMPLW	ACE-inhibitorna	Maruyama i Suzuki (1982)
α_{s2} -CN(174-179)	FALPQY	ACE-inhibitorna	Tauzin i sur. (2002)
α_{s2} -CN f(174-181)	FALPQYLK	ACE-inhibitorna	Tauzin i sur. (2002)
β -CN f(6-14)	LNVPGEIVE	ACE-inhibitorna	Gobbetti i sur. (2000)
β -CN f(7-14)	NVPGEIVE	ACE-inhibitorna	Gobbetti i sur. (2000)
β -CN f(60-66)	YFPFGPI	ACE-inhibitorna	Brantl i sur.(1981)
β -CN f(74-76)	IPP	ACE-inhibitorna	Nakamura i sur. (1995)
β -CN f(73-82)	NIPPLTQTPV	ACE-inhibitorna	Gobbetti i sur. (2000)
β -CN f(84-86)	VPP	ACE-inhibitorna	Nakamura i sur. (1995)
β -CN f(169-174)	KVLPVPQ	ACE-inhibitorna	Maeno i sur. (1996)
β -CN f(177-183)	AVPYPQR	ACE-inhibitorna	Maruyama i sur.(1985)
β -CN f(193-198)	YQEPVL	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppälä i sur. (1998)
β -CN f(198-202)	TKVIP	ACE-inhibitorna	Maeno i sur. (1996)
β -CN f(199-204)	GPVRGPFPIIV	ACE-inhibitorna	Gomez-Ruiz i sur. (2002)
κ -CN f(22-24)	IAK	ACE-inhibitorna	Miguel i sur. (2010)
κ -CN f(108-110)	IPP	ACE-inhibitorna	Nakamura i sur. (1995)
γ -CN f(108-113)	EMPFPK	ACE-inhibitorna	Perpetuo i sur. (2003)
γ -CN f(114-121)	YPVEPFTE	ACE-inhibitorna	Perpetuo i sur. (2003)

Izvor: Gobbetti i sur. 2004., Akuzawa i sur. 2009., Hernandez-Ledesma i sur. 2014.

Prikazani antitrombotični peptidi (tablica 3.1.1.2.) spadaju u skupinu bioaktivnih peptida podrijetlom iz κ -CN, nose naziv kazoplatelini, a nastaju enzimatskom hidrolizom djelovanjem tripsina (Akuzawa i sur. 2009.).

Tablica 3.1.1.2. Antitrombotični peptidi podrijetlom iz kazeina kravljeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Izvor
κ -CN f(106-110)	MAIPP	Fiat i sur. (1993)
κ -CN f(103-111)	LSFMAIPPK	Fiat i sur. (1993)
κ -CN f(106-112)	MAIPPKK	Schlimme i Meisel (1995)
κ -CN f(106-116)	MAIPPKKNQDDK	Schlimme i Meisel (1995)
κ -CN f(113-116)	NQDK	Schlimme i Meisel (1995)

Izvor: Akuzawa i sur. 2009.

Opioidne peptide (tablica 3.1.1.3.) obzirom na vrstu prekursora iz kojeg nastaju dijelimo na: opioidne agoniste podrijetlom iz α -CN (tzv. egzorfini) i β -CN (tzv. β -kazomorfini) te na opioidne antagoniste podrijetlom iz κ -CN (kazokini). Prikazani peptidi nastaju u *in vitro* uvjetima enzimatskom hidrolizom pepsinom ili tripsinom (Akuzawa i sur. 2009., Pihlanto 2016.).

Tablica 3.1.1.3. Opioidni peptidi podrijetlom iz kazeina kravljeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Izvor
α_{s1} -CN f(90-95)	RYLGYL	Loukas i sur. (1983)
α_{s1} -CN f(91-95)	YLGYL	Loukas i sur. (1983)
α_{s1} -CN f(90-96)	YLGYLE	Loukas i sur. (1983)
β -CN f(60-64)	YPPFG	Henschen i sur. (1979)
β -CN f(60-66)	YPPFGPI	Henschen i sur. (1979)
κ -CN f(25-34)	YIPQYVLSR	Meisel i FitzGerald (2000)
κ -CN f(35-42)	YPSYGLNY	Meisel i FitzGerald (2000)
κ -CN f(58-61)	YPYY	Meisel i FitzGerald (2000)
γ -CN f(114-121)	YPVEPFTE	Perpetuo i sur. (2003)

Izvor: Akuzawa i sur. 2009.

Prikazani antimikrobni peptidi (tablica 3.1.1.4.) spadaju u skupinu bioaktivnih peptida podrijetlom iz α_{s1} -CN (npr. isracidin), α_{s2} -CN (npr. kazocidin-I) i κ -CN (npr. kapacin), a nastaju enzimatskom hidrolizom pepsinom, tripsinom ili kimozinom (Gobbetti i sur. 2004., Akuzawa i sur. 2009.).

Tablica 3.1.1.4. Atimikrobni peptidi podrijetlom iz kazeina kravljeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Izvor
α_{s1} -CN f(6-15)	IKHQGLPQEV	Elbarbary i sur. (2012)
α_{s1} -CN f(1-23)	RPKHPIKHQGLPQEVLENL-LRF	Hill i sur. (1974)
α_{s1} -CN f(99-109)	LRLKKYKVPQL	Tang i sur. (2015)
α_{s2} -CN f(164-179)	LKKISQRYQKFALPQY	Recio i Visser (1999)
α_{s2} -CN f(150-188)	KTKLTEEEKNRLNFLKKISQ- RYQKFALPQYLKTVYQHQQK	Zucht i sur.(1995)
α_{s2} -CN f(165-188)	KKISQRYQKFALPQYLKTV- YQHQQK	Elbarbary i sur. (2012)
α_{s2} -CN f(180-207)	LKTVYQHQQKAMKPWIPK- TKVIPYVRYL	McCann i sur. (2005)
α_{s2} -CN f(181-207)	KTVYQHQQKAMKPWIPK- TKVIPYVRYL	McCann i sur. (2005)
α_{s2} -CN f(183-207)	VYQHQQKAMKPWIPKTK- VIPYVRYL	Recio i Visser (1999)
κ -CN f(1-3)	MMK	Sedaghati i sur. (2014)
κ -CN f(17-21)	FFSDK	Sedaghati i sur. (2014)
κ -CN f(22-24)	IAK	Sedaghati i sur. (2014)
κ -CN f(136-146)	TEAVESTVATL	Elbarbary i sur. (2012)
κ -CN f(106-169)	MAIPPKKNQDKTEIPTINTIAS* GEPTSTPTTEAVESTVATLEDS *PEVIESPPEINTVQVTSTAV	Zucht i sur. (2014)
β -CN f(193-209)	YQEPVLGPVRGPFPIIV	Migliore-Samour i sur. (1989)

Izvor: Gobbetti i sur. 2004., Akuzawa i sur. 2009., Sah i sur. 2016.

Imunomodulatorni peptidi (tablica 3.1.1.5.) spadaju u veliku skupinu bioaktivnih peptida podrijetlom iz kazeina kravljeg mlijeka. U njihovoj tvorbi kao prekursor mogu poslužiti sve kazeinske frakcije, a poseban naglasak se stavlja na tvorbu kazeinofosfopeptida koji nastaju iz α_{s1} , α_{s2} i β -CN. Prikazani peptidi nastali su enzimatskom hidrolizom pepsinom, tripsinom ili kimozinom (Akuzawa i sur. 2009., Reyes-Diaz 2017.).

Tablica 3.1.1.5. Imunomodulatorni peptidi podrijetlom iz kazeina kravljeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Izvor
α_{s1} -CNf(1-23)	RPKHPIKHQGL	Minkiewicz i sur. (2000)
α_{s1} -CN f(17-33)	NENLLRFFVAPFPEVFG	Juillerat-Jeanneret i sur. (2011)
α_{s1} -CN f(59-79)	QMEAESISSEEIVPNSVEQK	Hata i sur. (1998)
α_{s1} -CN f(142-149)	LAYFYPEL	Totsuka i sur. (1998)
α_{s1} -CN f(194-199)	TTMPLW	Migliore-Samour i sur. (1989)
α_{s2} -CN f(1-32)	KNTMEHVSSEESIISQETYK- QEKMAINPSK	Hata i sur. (1999)
α_{s2} -CN f(164-179)	LKKISQRYQKFALPQY	Recio i Visser (1999)
α_{s2} -CN f(165-203)	KKISQRYQKFALPQYLKTVY- QHQAAMKPWIQPKTKVIPY	Zucht i sur. (1995)
α_{s2} -CN f(183-207)	VYQHQAAMKPWIQPKTKVI- PYVRYL	Recio i Visser (1999)
β -CN f(1-25)	RELEELNVPGEIVESLSSEES- ITR	Hata i sur. (1998)
β -CN f(1-28)	RELEELNVPGEIVESLSSEES- ITRINK	Hata i sur. (1999)
β -CN f(54-59)	VEPIPY	Parker i sur. (1984)
β -CN f(60-66)	YPFPGPI	Kayser i Meisel (1996)
β -CN f(63-68)	PGIPN	Migliore-Samour i sur. (1989)
β -CN f(191-193)	LLY	Migliore-Samour i sur. (1989)
β -CN f(193-202)	YQEPVLGPVR	Kayser i Meisel (1996)
β -CN f(192-209)	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	Coste i sur. (1992)
β -CN f(193-209)	YQEPVLGPVR	Migliore-Samour i sur. (1989)
κ -CN f(38-39)	YG	Kayser i Meisel (1996)

Izvor: Akuzawa i sur. 2009., Reyes-Diaz 2017.

Prikazani kazeinofosfopeptidi (tablica 3.1.1.6.) spadaju u skupinu bioaktivnih peptida podrijetlom iz α_{s1} , α_{s2} i β -CN, a nastaju enzimatskom hidrolizom probavnim enzimima u *in vivo* ili *in vitro* uvjetima. Njihova biološka aktivnost očituje se u vezanju mineralnih tvari (Silva i Malcata 2005.).

Tablica 3.1.1.6. Kazeinofosfopeptidi podrijetlom iz kazeina kravljeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Biološka aktivnost	Izvor
α_{s1} -CN f(45-55)	GSESTEDQAME	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
α_{s1} -CN f(43-58)	DIGSESTEDQAMEDIK	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
α_{s1} -CN f(66-74)	SSSEEIVPN	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
α_{s1} -CN f(59-79)	QMEAESISSSEEIVPNSVEQK	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
α_{s1} -CN f(106-119)	VPQLEIVPNSAEER	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
α_{s2} -CN f(2-21)	NTMEHVSSEESIISQETKY	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
α_{s2} -CN f(46-70)	NANEEYSIGSSSEESAEEVAT- žEEVK	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
α_{s2} -CN f(55-75)	GSSSEESAEEVATEEVKITVDD	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
α_{s2} -CN f(126-136)	EQLSTSEENSK	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
α_{s2} -CN f(138_149)	TVDMESTEVEFTK	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
β -CN f(1-25)	RELEELNVPGEIVESLSSEE- SITR	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
β -CN f(1-28)	RELEELNVPGEIVESLSSEES- ITRINK	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)
β -CN f(2-28)	ELEELNVPGEIVESLSSEESIT- RINK	Vežanje minerala	Smacchi i Gobbetti (2000)

Izvor: Silva i Malcata 2005.

Proteine sirutke kravljeg mlijeka čine: β -Lg (50 %), α -La (22 %), albumini krvnog seruma (12 %), proteoze-peptoni (10 %), imunoglobulini (5 %) te mnogi drugi „minorni“ proteini i enzimi koji se nalaze u tragovima (Tratnik i Božanić 2012.). Velik broj bioaktivnih peptida izoliranih i identificiranih iz β -Lg, α -La, albumina krvnog seruma i imunoglobulina, govori nam o važnosti spomenutih proteina sirutke u iskazivanju potencijalne i dokazane bioaktivnosti u humanom organizmu. Ipak, među prikazanim peptidima značajno veći dio je izoliran i identificiran iz β -Lg i α -La što uz njihov sastav, možda može biti posljedica značajno većeg omjera ovih skupina proteina u ukupnom udjelu proteina sirutke. Koliko će određena skupina proteina sirutke biti pogodna za tvorbu bioaktivnih peptida ovisi o vrsti bioaktivnog učinka pa se tako u tvorbi peptida s antimikrobnim učinkom uz α -La i β -Lg pokazao važnim laktoferin, u tvorbi peptida s opioidnim učinkom uz α -La i β -Lg pokazao važnim albumin krvnog seruma, dok su se u tvorbi peptida s antihipertenzivnim, antioksidativnim i učinkom vežanja mineralnih tvari značajnim pokazali α -La i β -Lg. Navedena opažanja o bioaktivnim peptidima izoliranim i identificiranim iz proteina sirutke kravljeg mlijeka donesena su na temelju literature koja se spominje u nastavku teksta u obliku tablica.

Prikazani antihipertenzivni peptidi (tablica 3.1.1.7.) spadaju u skupinu bioaktivnih peptida podrijetlom iz α -La i β -Lg, a neki od njih nose naziv laktokinini. Nastali su enzimatskom hidrolizom tripsinom ili sintetskim enzimima te kombinacijom pepsinom, tripsinom i kimotripsinom ili kombinacijom tripsinom, kimotripsinom i fermentacijom (Pihlanto-Leppala 2001., Gobbetti i sur. 2004., Madureira 2010.).

Tablica 3.1.1.7. Antihipertenzivni peptidi podrijetlom iz proteina sirutke kravljeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Biološka aktivnost	Izvor
α -La f (50-52)	YGL	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2000)
α -La f(99-108)	VGINYWLAHK	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2000)
α -La f(104-108)	WLAHK	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2001)
α -La f(105-110)	LAHKAL	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (1998)
β -Lg f(15-19)	VAGTW	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2000)
β -Lg f(22-25)	LAMA	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2000)
β -Lg f(32-40)	LDAQSAPLR	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2000)
β -Lg f(71-75)	IIAEK	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2000)
β -Lg f(78-83)	IPAVFK	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2000)
β -Lg f(81-83)	VFK	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2000)
β -Lg f(94-100)	VLDTDYK	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2000)
β -Lg f(102-103)	YL	ACE-inhibitorna	Mullally i sur. (1996)
β -Lg f(102-105)	YLLF	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2001)
β -Lg f(104-105)	LF	ACE-inhibitorna	Mullally i sur. (1996)
β -Lg f(106-111)	CMENSA	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2000)
β -Lg f(142-146)	ALPMH	ACE-inhibitorna	Pihlanto-Leppala i sur. (2001)
β -Lg f(142-148)	ALPMHIR	ACE-inhibitorna	Mullally i sur. (1997)

Izvor: Pihlanto-Leppala i sur. 2001., Madureira, 2010., Mann i sur. 2019.

Prikazani opioidni peptidi (tablica 3.1.1.8.) spadaju u skupinu bioaktivnih peptida podrijetlom iz α -La (tzv. α -laktorfini), β -Lg (tzv. β -laktorfini) i albumina krvnog seruma (tzv. serofin). Nastali su enzimatskom hidrolizom pepsinom ili tripsinom te u kombinaciji pepsinom i tripsinom ili tripsinom i kimotripsinom (Pihlanto-Leppala 2001., Madureira 2010.).

Tablica 3.1.1.8. Opioidni peptidi podrijetlom iz proteina sirutke kravljeg mlijekaPeptidni fragment

Peptidni fragment	Sekvenca	Izvor
α -La f(50-53)	YGLF	Pihlanto-Leppala i sur. (2001)
β -Lg f(102-105)	YLLF	Pihlanto-Leppala i sur. (2001)
β -Lg f(146-149)	HIRL	Pihlanto-Leppala i sur. (2001)
Albumin krvnog seruma f(399-404)	YGFGNA	Tani i sur. (1993)

Izvor: Pihlanto-Leppala 2001., Madureira 2010., Mann i sur. 2019.

Prikazani antimikrobni peptidi (tablica 3.1.1.9.) spadaju u skupinu bioaktivnih peptida podrijetlom iz α -La, β -Lg i Lf (tzv. laktofericini), a nastaju pojedinačnom enzimatskom hidrolizom pepsinom, tripsinom, kimotripsinom ili kimozinom (Gobbetti i sur., 2004., Mann i sur. 2019.).

Tablica 3.1.1.9. Antimikrobni peptidi podrijetlom iz proteina sirutke kravljeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Izvor
α -La f(1-5)	EQLTK	Pellegrini i sur. (1999)
α -La f(61-68)S-S(75-80)	CKDDQNPH/ISCDKF	Pellegrini i sur. (1999)
α -La f(17-31)S-S(109-114)	GYGGVSLPEWVCTTF/ ALCSEK	Pellegrini i sur. (1999)
β -Lg f(15-20)	VAGTWY	Pellegrini i sur. (2001)
β -Lg f(25-40)	AASDISLLDAQSAPLR	Pellegrini i sur. (2001)
β -Lg f(78-83)	IPAVFK	Pellegrini i sur. (2001)
β -Lg f(84-91)	IDALNENK	Demers-Mathieu i sur. (2013)
β -Lg f(92-100)	VLVLDTDYK	Pellegrini i sur. (2001)
β -Lg f(125-135)	TPEVDDEALEK	Demers-Mathieu i sur. (2013)
LF f(17-30)	FKCRRWQWRMKKLG	Groenink i sur. (1999)
LF f(19-37)	CRRWQWRMKKLGAPSICV	Groenink i sur. (1999)
LF f(17-41/42)	FKCRRWQWRMKKLGAPSI- CVRRAF/A	Bellamy i sur. (1992)
LF f(1-11)S-S(17-47)	APRKNVRWCTIFKCRRWQWRM- KKLGAPSITCVRRFALECIRA	Recio i Visser (1999)
LF f(1-16)S-S(17-48)	APRKNVRWCTISQPEWFKCRRWQW- RMKKLGAPSITCVRRFALECIRA	Hoek i sur. (1997)
LF f(1-16)S-S(45-48)	APRKNVRWCTISQPEWCIRA	Recio i Visser (1999)

Izvor: Madureira 2010., Mann i sur. 2019.

Prikazani antioksidativni peptidi (tablica 3.1.1.10.) spadaju u skupinu bioaktivnih peptida podrijetlom iz α -La i β -Lg, a nastaju u *in vitro* uvjetima pojedinačnom enzimatskom hidrolizom komercijalnim enzimima: termolizinom, korolazom PP ili alkalazom (Mann i sur. 2014., Mann i sur. 2019.).

Tablica 3.1.1.10. Antioksidativni peptidi podrijetlom iz proteina sirutke kravljeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Izvor
α -La f(21-26)	VSLPEW	Sadat i sur. (2011)
α -La f(36-40)	YDTQA	Sadat i sur. (2011)
α -La f(59-71)	IWCKDDQNPSSN	Sadat i sur. (2011)
α -La f(100-103)	INY	Sadat i sur. (2011)
α -La f(101-104)	INYW	Sadat i sur. (2011)
α -La f(99-108)	VGINYWLAHK	Mann i sur. (2015)
α -La f(115-118)	LDQW	Sadat i sur. (2011)
β -Lg f(15-20)	VAGTWY	Power i sur. (2014)
β -Lg f(19-22)	WYSL	Zhang i sur. (2013)
β -Lg f(24-32)	MAASDISLL	Hernández-Ledesma i sur. (2005)
β -Lg f(72-79)	IAEKTIP	Sadat i sur. (2011)
β -Lg f(75-82)	KTKIPAVF	Mann i sur. (2015)
β -Lg f(123-131)	VRTPEVDDE	Athira i sur. (2015)
β -Lg f(145-149)	MHIRL	Hernández-Ledesma i sur. (2005)
β -Lg f(146-150)	HIRLS	Hernández-Ledesma i sur. (2005)
β -Lg f(151-155)	FNPTQ	Contreras i sur. (2011)

Izvor: Sadat-Mekmene i sur. 2011., Mann i sur. 2014., Mann i sur. 2019.

Prikazani peptidi koji vežu mineralne tvari (tablica 3.1.1.11.) spadaju u skupinu bioaktivnih peptid podrijetlom iz α -La i β -Lg, a nastali su enzimatskom hidrolizom pankreatina (Caetano-Silva i sur. 2015., Mann i sur. 2019.,)

Tablica 3.1.1.11. Peptidi koji vežu mineralne tvari podrijetlom iz proteina sirutke kravljeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Izvor
α -La f(61-68)	CKDDQNP	Caetano-Silva i sur. (2015)
α -La f (82-89)	DDDLTDD	Caetano-Silva i sur. (2015)
β -Lg f(43-56)	VEELKPTPEGDLEI	Caetano-Silva i sur. (2015)
β -Lg f(94-100)	VLDTDYK	Caetano-Silva i sur. (2015)
β -Lg f(125-131)	TPEVDDE	Caetano-Silva i sur. (2015)
β -Lg f(126-138)	FD	Caetano-Silva i sur. (2015)

Izvor: Caetano-Silva i sur. 2015., Mann i sur. 2019.

3.1.2. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz kozjeg mlijeka

Kozje mlijeko spada u visokovrijednu namirnicu, a zbog visoke prehambene, terapijske i biološke vrijednosti sve se više koristi u ljudskoj prehrani. Najvažnije prednosti kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje mlijeko su svojstva hipoalergenosti i lakše probavljivosti, pa se preporuča kao zamjena za kravlje mlijeko u osoba alergičnih na proteine kravljeg mlijeka te kod starijih osoba i djece s problemom crijevne malapsorpcije (Antunac i sur. 2000., Filipović Dermić i sur. 2014.). Iako kozje mlijeko sadrži uglavnom iste sastojke kao i kravlje mlijeko, udjeli i odnosi tih sastojaka, kao i njihova struktura i kvaliteta djelomično se razlikuju, a to može dovesti do iskazivanja drugačijih bioaktivnih vrijednosti i tvorbe različitih bioaktivnih komponenti u kozjem mlijeku u odnosu na kravlje mlijeko (Tratnik i Božanić 2012., Biadala i Konieczny 2018.). Različit kemijski sastav kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje mlijeko, s naglaskom na različit udio i sastav pojedinih proteina može dovesti do nastanka različitih bioaktivnih peptida u spomenutim vrstama mlijeka. Kozje mlijeko sadrži oko 3,5 % proteina, od čega 80 % čini kazein, a 20 % proteini sirutke. Kazein je kao glavni protein mlijeka podijeljen u četiri kazeinske frakcije: α_{s1} -CN (5 %), α_{s2} -CN (25 %), β -CN (50-64 %) i κ -CN (10-20 %). Sve kazeinske frakcije mogu poslužiti kao prekursori u tvorbi bioaktivnih peptida, s naglaskom na tvorbu ACE-inhibitornih i antimikrobnih peptida (tablica 3.1.2.1.). Međutim, viši udio β -kazeina u kozjem mlijeku u odnosu na kravlje mlijeko ako gledamo udio pojedinih frakcija u ukupnom udjelu kazeina, te njegova dominacija u ukupnom udjelu kazeinskih frakcija kozjeg mlijeka zaslužni su za to što veliki dio bioaktivnih peptida (možda i najveći) potječe iz spomenute frakcije (Park 2009., Biadala i Konieczny 2018.).

Tablica 3.1.2.1. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz kazeina kozjeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Biološka aktivnost	Izvor
Kozji α_{s1} -CN f(24-30)	VVAPFPE	Antimikrobna	Rizzello i sur. (2005)
Kozji α_{s1} -CN f(143-146)	AYFY	ACE-inhibitorna	Lee i sur. (2005)
Kozji α_{s2} -CN f(4-8)	HPIKH	ACE-inhibitorna	Minervini i sur. (2003)
Kozji α_{s2} -CN f(174-179)	KFAWPQ	ACE-inhibitorna	Quiros i sur. (2005)
Kozji α_{s2} -CN f(203-208) (ujedno i ovčji)	PYVRYL	Antimikrobna ACE- inhibitorna Antioksidativna	Quiros i sur. (2005)
Kozji β -CN f(58-65)	LVYPFPGP	ACE-inhibitorna	Minervini i sur. (2003)
Kozji β -CN f(78-83)	TGPIP	ACE-inhibitorna	Greerlings i sur. (2006)
Kozji β -CN f(84-87)	SLPQ	ACE-inhibitorna	Greerlings i sur. (2006)
Kozji β -CN f(181-184)	SQPK	ACE-inhibitorna	Greerlings i sur. (2006)
Kozji β -CN f(60-68)	YPFTGPIP	Antimikrobna	Rizzello i sur. (2005)
Kozji β -CN f(183-187)	MPIQA	Antimikrobna	Rizzello i sur. (2005)
Kozji β -CN f(47-51) (ujedno i ovčji)	DKIHP	ACE-inhibitorna	Gomez-Ruiz i sur. (2005, 2006)
Kozji κ -CN f(59-61)	PYY	ACE-inhibitorna	Lee i sur. (2005)
Kozji κ -CN f(106-111) (ujedno i ovčji)	MAIPPK	ACE-inhibitorna	Manso i sur. (2003)
Kozji κ -CN f(106-112) (ujedno i ovčji)	MAIPPKK	ACE-inhibitorna	Manso i sur. (2003)

Izvor: Park 2009., Park i Nam 2015.

Proteine sirutke u kozjem mlijeku čine: β -laktoglobulini (40 %), α -laktalbumini (40 %), imunoglobulini IgA, IgM, IgG, albumini krvnog seruma, laktoferini i lizozim. Nešto niži udio β -laktoglobulina u kozjem mlijeku u odnosu na kravlje mlijeko ne umanjuje njegov bioaktivni učinak, pa osim prirodno prisutne biološke vrijednosti može poslužiti kao prekursor u tvorbi bioaktivnih peptida (tablica 3.1.2.2.). Od ostalih proteina sirutke u tvorbi bioaktivnih peptida može poslužiti laktoferin koji predstavlja prekursor za tvorbu antimikrobnih peptida (tablica 3.1.2.2.) (Park 2009., Biadala i Konieczny 2018.).

Tablica 3.1.2.2. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz proteina sirutke kozjeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Biološka aktivnost	Izvor
Kozji β -Lg f(46-53)	LKPTPEGD	ACE-inhibitorna	Hernández-Ledesma i sur. (2002)
Kozji β -Lg f(58-61)	LQKW	ACE-inhibitorna	Hernández-Ledesma i sur. (2002)
Kozji β -Lg f(103-105)	LLF	ACE-inhibitorna	Hernández-Ledesma i sur. (2002)
Kozji β -Lg f(122-125)	LVRT	ACE-inhibitorna	Hernández-Ledesma i sur. (2002)
Kozji LF f(17-41) (ujedno i ovčji)	ATKCFQWQRNMRK-VRGPPVSCIQRD	Antimikrobna	Vorland i sur. (1998)
Kozji LF f(14-42) (ujedno i ovčji)	QPEATKCFQWQRNM-RKVRGPPVSCIQRDS	Antimikrobna	Recio i Visser (2000)

Izvor: Park 2009., Park i Nam 2015.

3.1.3. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz ovčjeg mlijeka

Ovčje mlijeko je visokovrijedna namirnica, a zbog višeg udjela hranjivih tvari u odnosu na kravlje i kozje mlijeko posebno se ističe njegova nutritivna vrijednost. Zbog znatno višeg udjela masti i proteina u odnosu na kozje mlijeko uglavnom se koristi za proizvodnju sireva, od kojih se posebno ističu tvrdi ovčji sirevi, a ovakvim načinom iskorištavanja ovčjeg mlijeka postižu se najveći prinosi (Tratnik, Božanić 2012.). Iako ovčje mlijeko sadrži uglavnom iste sastojke kao kravlje i kozje mlijeko, udjeli i odnosi tih sastojaka, kao i njihova struktura i kvaliteta djelomično se razlikuju, a to može dovesti do iskazivanja drugačijih bioaktivnih vrijednosti i tvorbe različitih bioaktivnih komponenti u ovčjem mlijeku u odnosu na kravlje i kozje mlijeko (Park i sur. 2007., Tratnik i Božanić 2012.). Također, različit kemijski sastav ovčjeg mlijeka u odnosu na kravlje i kozje mlijeko, s naglaskom na različit udio i sastav pojedinih proteina može dovesti do nastanka različitih bioaktivnih peptida u spomenutim vrstama mlijeka. Ipak, razlika u tvorbi bioaktivnih peptida između kozjeg i ovčjeg mlijeka najviše je uvjetovana količinom pojedinih sastojaka u mlijeku, pa veći udio masti i proteina ovčje mlijeko čine izvrsnom sirovinom za tvorbu različitih vrsta sireva, a posljedično sirevi mogu biti dobar izvor bioaktivnih peptida, s naglaskom na ACE-inhibitorne i antimikrobne peptide koji se oslobađaju tijekom procesa zrenja. Ovčje mlijeko sadrži oko 5,8 % proteina, od čega 80% čini kazein, a 20 % proteini sirutke. Kazein je kao glavni protein mlijeka podijeljen u četiri kazeinske frakcije: α_{s1} -CN (16 %), α_{s2} -CN (15 %), β -CN (39-47 %) i κ -CN (7-10 %). Sve kazeinske frakcije mogu poslužiti kao prekursori u tvorbi bioaktivnih peptida, s naglaskom na tvorbu ACE-inhibitornih i antimikrobnih peptida (tablica 3.1.3.1.). Iako ovčje mlijeko sadrži niži udio α_{s1} -CN i viši udio β -CN u ukupnom udjelu kazeinskih frakcija u usporedbi s kravljim mlijekom, spomenute frakcije smatraju se podjednako dobrim prekursorom za tvorbu bioaktivnih peptida, s naglaskom na tvorbu ACE-inhibitornih peptida (Recio i sur. 2009., Biadala i Konieczny 2018.).

Tablica 3.1.3.1. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz kazeina ovčjeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Biološka aktivnost	Izvor
Ovčji α_{s1} -CN f(1-3)	RPK	ACE-inhibitorna	Silva i sur. (2006)
Ovčji α_{s1} -CN f(10-21)	GLSPEVLNENLL	Antimikrobna	Rizzello i sur. (2005)
Ovčji α_{s1} -CN f(27-29)	PFP	ACE-inhibitorna	Gómez-Ruiz i sur. (2006)
Ovčji α_{s1} -CN f(22-30)	RFVVAPFPE	Antimikrobna	Rizzello i sur.(2005)
Ovčji α_{s1} -CN f(24-31)	VVAPFPEV	Antimikrobna	Rizzello i sur.(2005)
Ovčji α_{s1} -CN f(86-92)	VPSELYL	ACE-inhibitorna	Gómez-Ruiz i sur. (2004)
Ovčji α_{s1} -CN f(102-109)	KKYNVPQL	ACE-inhibitorna	Gómez–Ruiz i sur. (2002)
Ovčji α_{s1} -CN f(109-114)	LEIVPK	ACE-inhibitorna	Gómez-Ruiz i sur. (2004)
Ovčji α_{s2} -CN f(165-170)	LKKISQ	Antimikrobna	López-Expósito i sur. (2006)
Ovčji α_{s2} -CN f(165-181)	LKKISQYYQKFAW-PQYL	Antimikrobna	López-Expósito i sur. (2006)
Ovčji α_{s2} -CN f(202-204)	IPY	ACE-inhibitorna	Gómez-Ruiz i sur. (2004)
Ovčji α_{s2} -CN f(184-208)	VDQHQAMKPWTQ-PKTKAIPYVRYL	Antimikrobna	López-Expósito i sur. (2006)
Ovčji α_{s2} -CN f(203-208) (ujedno i kozji)	PYVRYL	Antimikrobna ACE-inhibitorna Antioksidativna	Quiros i sur. (2005)
Ovčji α_{s2} -CN f(205-208)	VRYL	ACE-inhibitorna	Gómez-Ruiz i sur. (2002)
Ovčji β -CN f(47-51) (ujedno i kozji)	DKIHP	ACE-inhibitorna	Gómez-Ruiz i sur. (2006)
Ovčji β -CN f(58-68)	LVYPFTGPIPN	ACE-inhibitorna	Quiros i sur. (2005)
Ovčji β -CN f(84-86)	VPP	ACE-inhibitorna	Bütikofer i sur. (2007)
Ovčji β -CN f(95-99)	VPKVK	ACE-inhibitorna	Silva i sur. (2006)
Ovčji β -CN f(114-121)	YPVEPFTE	ACE-inhibitorna Opoidna	Papadimitriou i sur. (2007)
Ovčji β -CN f(155-163)	RFVVAPFPE	Antimikrobna	Rizzello i sur.(2005)
Ovčji β -CN f(199-204)	VRGPFP	ACE-inhibitorna	Gómez-Ruiz i sur. (2004)
Ovčji κ -CN f(12-17)	EKDERF	ACE-inhibitorna	Gómez-Ruiz i sur. (2007)
Ovčji κ -CN f(22-24)	IAK	ACE-inhibitorna	Gómez–Ruiz i sur. (2007)
Ovčji κ -CN f(98-105)	HPHPHLSF	Antioksidativna	Gómez-Ruiz i sur. (2008)
Ovčji κ -CN f(108-110)	IPP	ACE-inhibitorna	Bütikofer i sur. (2007)
Ovčji κ -CN f(106-112) (ujedno i kozji)	MAIPPKK	ACE-inhibitorna	Manso and López-Fandiño (2003)
Ovčji κ -CN f(112-116)	KDQDK	Antitrombotična	Qian i sur. (1995)

Izvor: Izvor: Recio i sur. 2009., Park i Nam 2015.

Proteine sirutke u ovčjem mlijeku čine: β -laktoglobulini (51 %), α -laktoglobulini (25 %), imunoglobulini IgA, IgM, IgG, albumini krvnog seruma, proteoze-peptoni i laktoferini. Od spomenutih proteina sirutke, ističu se β -laktoglobulin koji može poslužiti kao prekursor u tvorbi ACE-inhibitornih peptida, te laktoferin koji može poslužiti kao prekursor u tvorbi antimikrobnih peptida (tablica 3.1.3.2.) (Park i sur. 2007., Recio i sur. 2009., Biadala i Konieczny 2018.).

Tablica 3.1.3.2. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz proteina sirutke ovčjeg mlijeka

Peptidni fragment	Sekvenca	Biološka aktivnost	Izvor
Ovčji β -Lg f(1-8)	IIVTQTMK	ACE-inhibitorni	Chobert i sur. (2005)
Ovčji β -Lg f(58-61)	LQKW	ACE-inhibitorni	Hernández-Ledesma i sur. (2002)
Ovčji β -Lg f(103-105)	LLF	ACE-inhibitorni	Hernández-Ledesma i sur. (2002)
Ovčji β -Lg f(142-148)	ALPMHIR	ACE-inhibitorni	Chobert i sur. (2005)
Ovčji LF f(17-41) (ujedno i kozji)	ATKCFQWQRNMRK-VRGPPVSCIKRD	Antimikrobni	Vorland i sur. (1998)
Ovčji LF f(14-42) (ujedno i kozji)	QPEATKCFQWQRNM-RKVRGPPVSCIKRDS	Antimikrobni	Recio i Visser (2000)
Ovčji kolostrin	-	Imunomodulatorni	Zimecki (2008)

Izvor: Izvor: Recio i sur. 2009., Park i Nam 2015.

3.2. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz fermentiranog mlijeka

Fermentirana mlijeka predstavljaju jedan od glavnih izvora bioaktivnih peptida među komercijalnim mliječnim proizvodima, a do njihovog nastanka u različitim vrstama fermentiranog mlijeka dolazi zbog fermentacije djelovanjem dodane mljekarske mikrobne kulture, najčešće BMK ili bifidobakterija. Fermentirana mlijeka mogu biti dobar izvor antihipertenzivnih, antitrombotičnih, antimikrobnih, opioidnih, imunomodulatornih, antioksidativnih peptida i kazeinofosfopeptida (Korhonen 2009., Choi i sur. 2012., Samaržija 2015., Pihlanto 2016.).

Dobar izvor antihipertenzivnih peptida, s naglaskom na prisutnost ACE-inhibitornih peptida, mogu biti različite vrste fermentiranog mlijeka. Među njima, japansko kiselo mlijeko „Calpis“ i finsko kiselo mlijeko „Evolus“ predstavljaju komercijalno dostupne proizvode koji sadrže značajne količine VPP-a i IPP-a, a čiji je antihipertenzivni učinak višestruko dokazan u *in vivo* istraživanjima provedenim na životinjskim i humanim modelima. Prisutnost VPP-a i IPP-a u japanskom „Calpisu“ pripisuje se fermentaciji obranog mlijeka sojevima *L. helveticus* CP790 i *Saccharomyces cerevisiae*, dok se prisutnost istih tripeptida u finskom „Evolusu“ pripisuje fermentaciji mlijeka sojem *L. helveticus* LBK-16 H (Korhonen i Pihlanto 2006., Choi i sur. 2012.). Kao dobar izvor ACE-inhibitornih peptida mogu poslužiti mlijeka fermentirana različitim mljekarskim mikrobnim kulturama. U istraživanju koje su proveli

Gobbetti i sur. (2000) ispitana je prisutnost ACE-inhibitornih peptida u mlijeku fermentiranom zasebno sojevima *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 i *Lac. lactis* subsp. *cremoris* FT4. ACE- inhibitorne peptide izolirane i identificirane iz mlijeka fermentiranog sojem *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* čine: LNVPGEIVE [β – CN f(6 – 14)], NVPGEIVE [β – CN f(7 – 14)], NIPPLTQTPV [β – CN f(73 – 82)], IPPLTQTPV [β – CN f(74 – 82)] i PPLTQTPV [β – CN f(75 – 82)], dok ACE-inhibitorne peptide izolirane i identificirane iz mlijeka fermentiranog sojem *Lac. lactis* subsp. *cremoris* FT4 čine: NVPGEIVE [β – CN f(7 – 14)], DKIHPPF [β – CN f(47 – 52)], VIGSPPEIN [β – CN f(152 – 160)], SPPEIN [β – CN f(155 – 160)] i KVLVPVE [β – CN f(169 – 175)]. Dobar izvor ACE-inhibitornih peptida mogu biti fermentirana mlijeka proizvedena iz kozjeg ili ovčjeg mlijeka. Tako su Quiros i sur. (2005) dokazali prisutnost nekoliko potencijalnih ACE-inhibitornih peptida u komercijalnom kefiru proizvedenom iz kozjeg mlijeka. Od 16 izoliranih i identificiranih peptida, 6 ih pokazuje potencijalnu ACE-inhibitornu aktivnost: ENLLRF [α_{s1} – CN f(18 – 23)], KFAWPQ [α_{s2} – CN f(75 – 82)], PYVRYL [α_{s2} – CN f(75 – 82)], KIHPPF-AQAQ [β – CN f(48 – 56)], LVYPFTGPIPN [β – CN f(58 – 68)] i GVPKVKETMVPKH [β – CN f(94 – 106)]. U istraživanju kojeg su proveli Papadimitriou i sur. (2007) ispitana je prisutnost ACE-inhibitornih peptida u probiotičkom ovčjem jogurtu, a od nekoliko peptida koji su izolirani i identificirani, peptid YPVEPFTE [β – CN f(114 – 121)] je iskazao ACE-inhibitorni učinak.

Različite vrste fermentiranog mlijeka mogu biti izvor antitrombotičnih peptida, a među njima jogurt i neka komercijalno dostupna španjolska fermentirana mlijeka. Tako Choi i sur. (2012.) navode kako je iz jogurta izoliran i identificiran antirombotični peptid NQDK [κ – CN f(113 – 116)], dok je iz dva španjolska fermentirana mlijeka izoliran i identificiran peptid PPK [κ – CN f(109 – 111)] koji dijeli homolognu strukturu s ranije utvrđenim antimikrobnim peptidom MAIPPK [κ – CN f(106 – 112)]. Antimikrobni peptidi osim antitrombotične aktivnosti mogu paralelno iskazati antihipertenzivnu aktivnost u humanom organizmu. U istraživanju koje su proveli Rojas-Ronquillo i sur. (2012.) ispitana je ACE-inhibitorna i antitrombotična aktivnost u komercijalnom meksičkom Sofulu fermentiranom zasebno sojevima *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus casei* Shirota. Dok mlijeko fermentirano sojem *Streptococcus thermophilus* ne iskazuje antitrombotičnu aktivnost, iz mlijeka fermentiranog sojem *Lactobacillus casei* Shirota izoliran je i identificiran peptid YQEPVLGPVRGPFPIIV [β – CN f(193 – 209)] koji osim ranije utvrđene ACE-inhibitorne aktivnosti ima utvrđenu potencijalnu antirombotičnu aktivnost.

Neke vrste fermentiranog mlijeka mogu biti izvor opioidnih peptida, a među njima probiotički ovčji jogurt i mlijeko fermentirano sojem *Lb. helveticus* L89. Tako su Papadimitriou i sur. (2007.) iz ovčjeg mlijeka fermentiranog klasičnom jogurnom kulturom uz dodatak soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DC412 izolirali i identificirali peptid YPVEPFTE [β – CN f(114 – 121)] za koji je osim ranije spomenute ACE-inhibitorne aktivnosti utvrđena opioidna aktivnost. Iako β -kazomorfini čine važnu skupinu opioidnih peptida podrijetlom iz kazeina mlijeka, njihova prisutnost u fermentiranom mlijeku smatra se rijetkom ili nepostojećom. Jedan od razloga je njihova razgradnja na manje peptide enzimatskom hidrolizom peptidnih veza između prolina i drugih aminokiselinskih ostataka djelovanjem

enzima bakterija mliječne kiseline, među kojima se ističe PepX (Nguyen i sur. 2015). Međutim, u istraživanju kojeg su proveli Matar i Goulet (1996.) iz mlijeka fermentiranog sojem *Lb. helveticus* L89 s nedostatkom PepX, izoliran je i identificiran opioidni peptid YPFP [β – CN f(60 – 63)], a njihovo istraživanje ukazuje na mogućnost tvorbe opioidnih peptida korištenjem genetički promijenjenih sojeva sa željenim karakteristikama.

Fermentirana mlijeka mogu biti izvor antimikrobnih peptida, a dio peptida s potencijalnim ili dokazanim antimikrobnim učinkom izoliran je iz hidroizolata proteina mlijeka djelovanjem BMK. U istraživanju kojeg su proveli Hayes i sur. (2006.) iz natrij kazeinata podrijetlom iz kravljeg mlijeka, a fermentiranog sojem *Lb. acidophilus* DPC6026 izolirana su i identificirana 3 antimikrobna peptida: IKHQGLPQE [α_{s1} – CN f(21 – 29)], VLNENLLR [α_{s1} – CN f(30 – 37)] i SDIPNPIGSENSEK [α_{s1} – CN f(195 – 208)]. U skupini antimikrobnih peptida važno mjesto zauzima kazocidin-I čiji je antimikrobni učinak na bakterije *Escherichia coli* i *Staphylococcus carnosus*-a višestruko dokazan. Tako su Zucht i sur. (1995.) iz toplinski obrađenog mlijeka kojemu je dodana 10 % - tna otopina octene kiseline izolirali i identificirali kazocidin-I, čija sekvenca i proteinski fragment glase: KTKLTEEEKNRLNFLKKISQRYQ-KFALPQYLKTVYQHQQK [α_{s2} – CN f(165 – 203)].

Različite vrste fermentiranog mlijeka mogu biti dobar izvor imunomodulatornih peptida, a među njima već spomenuto komercijalno fermentirano mlijeko prisutno u velikim količinama na španjolskom tržištu i mlijeko fermentirano vrstom *Lb. helveticus*. Tako su Hernández-Ledesma i sur. (2005.) iz komercijalnog fermentiranog mlijeka konzumiranog u Španjolskoj izolirali i identificirali peptide KTTMPLW [α_{s1} – CN f(193 – 199)] i GPVRGPFPII [β – CN f(199 – 208)] za koje je utvrđeno da dijele homolognu strukturu s ranije opisanim imunomodulatornim peptidima TTMPLW [α_{s1} – CN f(194 – 199)] i YQEPVLGPVRGPFPIIV [β – CN f(193 – 209)]. Sposobnost BMK da tijekom fermentacije stvore peptide s potencijalnim ili stvarnim imunomodulatornim učinkom višestruko je dokazana. Tako su Tellez i sur. (2010) iz mlijeka fermentiranog vrstom *Lb. helveticus* izolirali i identificirali 5 imunomodulatornih peptida: WMHQPHQPLPPT [β – CN f(143 – 154)], HQPHQPLPPT [β – CN f(143 – 154)], HQPHQPLPPTVMFPPQ [β – CN f(145 – 160)], LYQEPVLGPVR [β – CN f(192 – 202)] i LDQWLCEK [α – La f(115 – 122)], a njihov imunomodulatorni učinak dokazan je u animalnom *in vitro* istraživanju.

Različite vrste fermentiranog mlijeka mogu biti dobar izvor antioksidativnih peptida, a među njima komercijalno fermentirano mlijeko prisutno u velikim količinama na španjolskom tržištu i jogurt. Tako su Hernández-Ledesma i sur. (2005.) iz komercijalnog fermentiranog mlijeka konzumiranog u Španjolskoj izolirali i identificirali peptid KVLVPVQ [β – CN f(169 – 175)] koji dijeli homolognu strukturu s ranije utvrđenim antioksidativnim peptidom VLPVPQ [β – CN f(170 – 175)]. U istraživanju kojeg su proveli Sabeena Farvin i sur. (2010) dokazana je antioksidativna aktivnost jogurta obogaćenog ribljim uljem, a od 44 izolirana i identificirana peptida, nekoliko ih je iskazalo potencijalnu antioksidativnu aktivnost: KAVPYPQ [β – CN f(176 – 182)], VPYPQ [β – CN f(178 – 182)] i IPIQY [κ – CN f(26 – 30)].

Fermentirana mlijeka mogu biti izvor kazeinofosfopeptida, a dio peptida s potencijalnim ili dokazanim učinkom vezanja mineralnih tvari izoliran je iz hidroizolata proteina mlijeka djelovanjem probavnih enzima u *in vitro* istraživanjima. Tako su Miquel i sur. (2006.) iz hidroizolata kravljeg kazeina izloženog simuliranim uvjetima probave u gastrointestinalnom traktu izolirali i identificirali 19 kazeinofosfopeptida, a neke od izoliranih i identificiranih peptida čine: DIGSESTEDQ [α_{s1} – CN f(43 – 52)]2P, KNTMEHVSSSEESIISQET [α_{s2} – CN f(1 – 19)]4P, KNTMEHVSSSEESIISQETKEK [α_{s2} – CN f(1 – 24)]4P, RELEENVPGEIVESLSSEESIT [β – CN f(1 – 24)]4P, RELEENVPGEIVESLSSEESITR [β – CN f(1 – 25)]4P, RELEENVPGEIVESLSSEESITRINK [β – CN f(1 – 28)]4P i RELEENVPGEIVESLSSEESITRINKKIEK [β – CN f(1 – 32)]4P. Prisutnost navedenih peptida tijekom spomenutog animalnog *in vitro* istraživanja sugerira oslobađanje i prisutnost kazeinofosfopeptida u humanom probavnom sustavu nakon konzumacije mlijeka i mliječnih proizvoda. Zbog proteolitičke aktivnosti mikroorganizama jogurt se smatra boljim izvorom kazeinofosfopeptida od mlijeka (Choi i sur. 2012.). Tako su Kunda i sur. (2012.) iz komercijalnog funkcionalnog jogurta izolirali i identificirali peptid s učinkom vezanja mineralnih tvari: VVRNAN [α_{s2} – CN f(43 – 48)].

3.3. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz sira

3.3.1. Nastanak peptida tijekom zrenja sireva

Sirevi predstavljaju jedan od glavnih izvora bioaktivnih peptida među komercijalnim mliječnim proizvodima. Do nastanka bioaktivnih peptida tijekom procesa zrenja sira dolazi zbog složenih proteolitičkih promijena djelovanjem sirišnih enzima, prirodnih proteinaza mlijeka, proteolitičkih enzima bakterija mliječne kiseline i proteolitičkih enzima nestarterskih bakterija mliječne kiseline (Havranek i sur. 2014., Pihlanto 2016.).

Proteolitička aktivnost sirišnih enzima velikim djelom je određena svojstvom termolabilnosti kimošina, a posljedično i tehnologijom proizvodnje sira. U proizvodnji sireva kod kojih se sirno zrno dogrijava na visokoj temperaturi (~ 55 °C) većina sirišnog enzima dodanog u mlijeko za sirenje odlazi sirutkom ili je denaturirana i gubi svoju aktivnost, dok u proizvodnji sireva kod kojih se sirno zrno dogrijava na nižoj temperaturi (< 40 °C) većina sirišnog enzima dodanog u mlijeko odlazi sirutkom, ali preostalih 3-10 % zaostaje u grušu i ima utjecaj na proteolitičku aktivnost tijekom zrenja sira. Aktivnošću kimošina dolazi do intenzivne razgradnje α_{s1} -CN, pri čemu u najvećoj količini nastaju α_{s1} -CN f(1-23) i α_{s1} -CN f(24-199), a u nešto manjoj mjeri α_{s1} -CN f(24-199) (Havranek i sur. 2014).

Plazmin se smatra najvažnijim i najproučavanijim prirodno prisutnim enzimom u mlijeku, a njegova važnost za pravilan tijek zrenja svih sireva, s naglaskom na polutvrde i tvrde sireve, najvećim djelom proizlazi iz svojstva termostabilnosti. Aktivnošću plazmina dolazi do intenzivne razgradnje β -CN, pri čemu u najvećoj količini nastaju β -CN f(29-209), β -CN

f(106-209) i β -CN f(108-209), dok se djelovnje plazmina na α_{s1} -CN i α_{s2} -CN smatra vrlo ograničenim, a nije zabilježeno djelovanje na κ -CN (Havranek i sur. 2014.).

Proteolitička aktivnost bakterija mliječne kiseline proizlazi iz složenog proteolitičkog sustava koji se sastoji od jedne ili rijeđe dvije stanično vezane proteinaze (PrtP) te nekoliko unutarstaničnih peptidaza koje uključuju aminopeptidaze, dipeptidaze, tripeptidaze i endopeptidaze. Enzim PrtP pridonosi nastajanju malih peptida u siru hidrolizom velikih peptida, nastalih razgradnjom α_{s1} -CN djelovanjem kimoza ili β -CN djelovanjem plazmina, dok unutarstanične peptidaze oslobođene nakon lize bakterijske stanice sudjeluju u nastanku kratkolančanih peptida i aminokiselina zaslužnih za aromu sira. Neki od nastalih kratkolančanih peptida smatraju se bioaktivnima (Choi i sur. 2012., Havranek i sur. 2014., Samaržija 2015.).

Tijekom zrenja sira dolazi do primarne proteolize proteina (kazeina) djelovanjem kimoza i plazmina u sirevima kod kojih se sirno zrno dogrijava na nižim temperaturama (do 40 °C), te primarne proteolize djelovanjem plazmina u sirevima kod kojih se sirno zrno dogrijava na višim temperaturama (višim od 50 °C), nakon čega slijedi daljna proteoliza manjih fragmenata kazeina djelovanjem složenog proteolitičkog sustava BMK. Upravo sinergijski učinak stanično vezanih proteinaza i unutarstaničnih peptidaza BMK dovodi do nastanka kratkolančanih peptida te se BMK smatraju važnima za tvorbu bioaktivnih peptida u siru (Choi i sur. 2012., Havranek i sur. 2014.).

3.3.2. Utjecaj uvjeta i dužine zrenja na nastanak bioaktivnih peptida u siru

Vrsta i količina bioaktivnih peptida prisutnih u nekom siru velikim djelom ovisi o uvjetima tijekom zrenja, dužini trajanja zrenja te karakteristikama mlijeka iz kojeg je sir proizveden. U istraživanju kojeg su proveli Bütikofer i sur. (2007.) dokazana je pozitivna korelacija između dužine trajanja zrenja pojedinih vrsta sireva i količine stvorenih antihipertenzivnih peptida VPP-a i IPP-a te se sugerira važnost termički neobrađenog mlijeka u proizvodnji sireva s većim koncentracijama VPP-a i IPP-a. Istraživanje provedeno na 44 uzorka sira, od kojih su 36 sirevi švicarskog podrijetla, a preostalih 8 (gouda, allgäuer, limburg, münster, reblochon, gorgozola, roquefort, manchego i feta) sirevi podrijetlom iz drugih zemalja, uključilo je u analizu najpopularnije vrste sireva konzumirane u Švicarskoj. Metodom HPLC-MS3 utvrđena je koncentracija VPP-a i IPP-a u sva 44 uzorka sira, dok je ACE-inhibitorna aktivnost izmjerena određivanjem vrijednosti IC_{50} . S obzirom na sadržaj vode u suhoj bezmasnoj tvari (Sbm) sirevi su podijeljeni u kategorije tvrdih, polutvrdih i mekih sireva.

U kategoriji tvrdih sireva (tablica 3.3.2.1.) prosječan zbroj VPP-a i IPP-a iznosi 100 mg kg⁻¹. U svim sirevima zabilježena je značajno veća količina VPP-a u odnosu na IPP, što pokazuje da tijekom zrenja tvrdih sireva nastaju veće količine ovog tripeptida ili da je VPP otporniji na daljnju degradaciju tijekom zrenja tvrdih sireva. Najveće ukupne količine VPP-a i IPP-a izmjerene su u hobelkäseu, starom siru gouda i 4 mjeseca starom emmentaleru proizvedenom na organski način. Analizom klasično proizvedenog emmentalera starosti 4, 8 i 12 mjeseci

utvrđena je pozitivna korelacija između trajanja zrenja i količine stvorenih tripeptida, pa je u 4 mjeseca starom emmentaleru utvrđena najmanja količina VPP-a i IPP-a, dok je u 12 mjeseci starom emmentaleru utvrđena najveća količina VPP-a i IPP-a. Međutim, analizom gruyera starosti 5, 8, 10 i 12 mjeseci nije utvrđena pozitivna korelacija između trajanja zrenja i količine stvorenih peptida, pa je u 10 mjeseci starom gruyeru utvrđena najmanja količina VPP-a i IPP-a, dok je u 8 mjeseci starom gruyeru utvrđena najveća količina VPP-a i IPP-a. Ovi rezultati upućuju na važnost proteolize tijekom zrenja tvrdih sireva, ali navode na zaključak da razlike u količini stvorenih tripeptida mogu biti posljedica individualnih razlika u zrenju između različitih vrsta tvrdih sireva i da u jednom trenutku tijekom zrenja nakon postignute maksimalne količine VPP-a i IPP-a može doći do daljnje razgradnje spomenutih tripeptida djelovanjem proteolitičkih čimbenika prisutnih u siru. Prosječna vrijednost IC_{50} u tvrdim sirevima iznosi $13,5 \text{ mg ml}^{-1}$. Najniže vrijednosti IC_{50} izmjerene su u staroj gaudi i 2 godine starom hobelkäseu što se poklapa s najvećom izmjerenom količinom VPP-a i IPP-a u spomenutim vrstama sireva (Bütikofer i sur. 2007.).

Tablica 3.3.2.1. Utvrđena koncentracija VPP-a, IPP-a i vrijednost IC_{50} u tvrdim sirevima

Naziv sira	VPP (mg kg^{-1})	IPP (mg kg^{-1})	IC_{50} ACE-aktivnost (mg sira ml^{-1} testne otopine)
Sbrinz	28.0	9.4	16.4 ± 75.5
Parmino	2.0	0.8	28.6 ± 74.2
Hobelkäse	224.1	95.4	2.6 ± 0.2
Emmentaler, klasični, 4 mjeseca starosti	42.6	4.6	10.5 ± 0.6
Emmentaler, organski, 4 mjeseca starosti	153.7	35.8	7.5 ± 1.8
Emmentaler, 8 mjeseci starosti	68.6	13.2	9.9 ± 0.2
Emmentaler, 12 mjeseci starosti	100.1	23.5	7.1 ± 0.2
Gruyere, 5 mjeseci starosti	53.0	9.3	14.9 ± 0.7
Gruyere, 8 mjeseci starosti	22.7	14.9	18.7 ± 6.1
Gruyere, 10 mjeseci starosti	68.7	20.4	14.2 ± 0.9
Gruyere, 12 mjeseci starosti	13.7	7.9	29.4 ± 16.8
Gouda, stara	97.7	90.1	2.0 ± 0.3

Val-Pro-Pro (VPP), Ile-Pro-Pro (IPP), maksimalna inhibicijska koncentracija (IC_{50}) Izvor: Bütikofer i sur. 2007.

U kategoriji polutvrdih sireva (tablica 3.3.2.2.) prosječan zbroj VPP-a i IPP-a iznosi 51,6 mg kg⁻¹. U svim sirevima zabilježena je značajno veća količina VPP-a u odnosu na IPP, što se prispisuje istim razlozima kao i kod tvrdih sireva. Najveće ukupne količine VPP-a i IPP-a izmjerene su u četvrtmasnom appenzelleru starosti 7-10 mjeseci, tilsitu proizvedenom iz sirovog mlijeka i winzerkäseu. Analizom appenzellera starosti 3, 4, 6-7, i 7-10 mjeseci starosti nije u potpunosti utvrđena pozitivna korelacija između trajanja zrenja i količine stvorenih tripeptida, pa je tako u četvrtmasnom appenzelleru starosti 3 mjeseca utvrđena značajno veća količina VPP-a i IPP-a u odnosu na 4 i 6-7 mjeseci stari appenzeller. Ipak, utvrđena razlika u količini stvorenih tripeptida mogla bi biti posljedica različitog kemijskog sastava između spomenutih sireva, jer je veća količina VPP-a i IPP-a zabilježena u appenzelleru sa značajno manjim udjelom masti nego što je slučaj kod 4 i 6-7 mjeseci starog appenzellera. Prosječna vrijednost IC₅₀ u polutvrdim sirevima iznosi 11,6 mg ml⁻¹. Najniže vrijednosti IC₅₀ izmjerene su u četvrtmasnom apenzelleru starosti 7-10 mjeseci i tilsitu proizvedenom iz sirovog mlijeka što se poklapa s najvećom izmjerenom količinom VPP-a i IPP-a u spomenutim vrstama sireva. Važnost termički neobrađenog mlijeka u tvorbi sireva s većim količinama VPP-a i IPP-a uočena je na primjeru tilsita i raclettea proizvedenih iz sirovog i pasteriziranog mlijeka. U tilsitu i racletteu proizvedenim iz sirovog mlijeka izmjerene su značajno veće količine VPP-a i IPP-a u odnosu na iste sireve proizvedene iz pasteriziranog mlijeka. Sirovo mlijeko u svojem sastavu uz dodane bakterije mliječne kiseline sadrži i prirodno prisutnu nestartersku mikrofloru bakterija mliječne kiseline (NSLAB), a upravo proteinaze i peptidaze NSLAB-a mogu biti zaslužne za tvorbu znatno većih količina bioaktivnih peptida u nekim sirevima, pa tako i VPP-a i IPP-a u tilsitu i racletteu (Bütikofer i sur. 2007.).

Tablica 3.3.2.2. Utvrđena koncentracija VPP-a i IPP-a i vrijednost IC₅₀ u polutvrdim sirevima

Naziv sira	VPP (mg kg ⁻¹)	IPP (mg kg ⁻¹)	IC ₅₀ ACE-aktivnost (mg sira ml ⁻¹ testne otopine)
Appenzeller, 3 mjeseca starosti	22.0	8.5	17.6±7.6
Appenzeller, 4 mjeseca starosti	26.7	17.8	8.0±1.0
Appenzeller, 6-7 mjeseci starosti	29.3	14.5	16.8±1.1
Appenzeller, četvrtmasni, 3mjeseca starosti	56.0	10.5	7.1±1.9
Appenzeller, četvrtmasni, 7-10 mjeseci starosti	94.4	64.9	4.2±1.6
Tilsit, sirovo mlijeko	120.2	30.0	4.4±0.2
Tilsit, pasterizirano mlijeko	1.2	0.1	18.0±6.3
Winzerkäse	97.7	27.1	9.9±1.8
Planinski sir Graubünden, punomasni	25.1	4.3	9.2±1.4
Planinski sir Graubünden, polumasni	10.4	7.1	8.9±4.1
Planinski sir Graubünden, četvrtmasni	32.0	22.7	4.8
Raclette, sirovo mlijeko	12.6	2.6	8.8
Raclette, pasterizirano mlijeko	1.0	0.1	9.0±0.3
Edam	1.0	0.1	13.3±70.4
St. Paulin	5.2	1.0	23.5±6.3
Küsnachter	25.7	18.0	19.6±2.4
Wangener Geissmutschli (kozje mlijeko)	33.2	0.0	7.9±0.5
Tête de Moine	98.0	15.5	7.1±1.9
Vacherin fribourgeois	62.1	46.7	5.0±0.3
Roquefort	35.4	2.1	10.2±2.4
Manchego	1.0	0.0	29.5±1.5

Val-Pro-Pro (VPP), Ile-Pro-Pro (IPP), maksimalna inhibitorna koncentracija (IC₅₀) Izvor: Bütikofer i sur. 2007.

U kategoriji mekih sireva (tablica 3.3.2.3.) prosječan zbroj VPP-a i IPP-a iznosi je 3,4 mg kg⁻¹. U svim sirevima zabilježena je veća količina VPP-a u odnosu na IPP, što se pripisuje istim razlozima kao i kod tvrdih i polutvrdih sireva. Najveće ukupne količine VPP-a i IPP-a izmjerene su u limburgeru i gorgonzoli, dok mozzarella proizvedena od kravljeg mlijeka i tomme vaudoise ne sadrži VPP i IPP. Limurger i gorgonzola spadaju u skupinu sireva koji su podvrgnuti zrenju, a intenzivne biokemijske promijene do kojih dolazi tijekom zrenja djelomično se mogu pripisati djelovanju bakterije *Brevibacterium linens* kod limburgera i plavoj plijesni *Pencillium roqueforti* kod gorgonzole. Iako spomenuti sirevi nemaju dugačak period zrenja, izražene proteolitičke i lipolitičke promijene do kojih dolazi u kratkom vremenskom periodu određuju njihovu teksturu i aromu, a vjerojatno su odgovorne i za prisutnost značajno većih količina VPP-a i IPP-a u ovim sirevima u odnosu na mozzarelu. Mozzarella spada u skupinu sireva koji nisu podvrgnuti zrenju, a upravo to je razlog izostanka VPP-a i IPP-a u spomenutom siru. Nadalje, daleko najniža količina VPP-a i IPP-a u mekim sirevima u odnosu na tvrde i polutvrde sireve koji zriju u rasponu od 10 tjedana pa do 18 mjeseci navodi na utjecaj trajanja zrenja i proteolitičkih promjena koje se odvijaju tijekom zrenja. Prosječna vrijednost IC₅₀ u mekim sirevima iznosi 17 mg ml⁻¹, a najniže vrijednosti IC₅₀ izmjerene su u limburgeru i feti (Bütikofer i sur. 2007.).

Tablica 3.2.2.3. Utvrđena koncentracija VPP-a i IPP-a i vrijednost IC₅₀ u mekim sirevima

Naziv sira	VPP (mg kg ⁻¹)	IPP (mg kg ⁻¹)	IC ₅₀ ACE-aktivnost (mg sira ml ⁻¹ testne otopine)
Tomme vaudoise	0.0	0.0	14.9±3.7
Vacherin Mont d'Or	0.2	0.1	21.4±9.6
Brie	0.4	0.3	25.9±3.0
Camembert	0.2	0.2	Vrlo slaba inhib. aktivnost
Mozzarella (bivolje mlijeko)	0.1	0.0	Bez inhib. aktivnosti
Mozzarella (kravlje mlijeko)	0.0	0.0	Bez inhib. aktivnosti
Limburger	10.9	6.0	6.4±1.6
Munster	1.4	1.7	14.1±0.2
Reblochon	0.5	0.0	17.0±0.8
Gorgonzola	4.2	11.1	21.8±4.6
Feta	0.5	0.0	14.3±1.2

Val-Pro-Pro (VPP), Ile-Pro-Pro (IPP), maksimalna inhibitorna koncentracija (IC₅₀) Izvor: Bütikofer i sur. 2007.

3.3.3. Bioaktivni peptidi podrijetlom iz sira

Sir može biti dobar izvor antihipertenzivnih, antimikrobnih, opioidnih, imunomodulatornih, antioksidativnih peptida i kazeinofosfopeptida (Akuzawa i sur. 2009., Choi i sur. 2012., Samaržija 2015., Pihlanto 2016.).

Sir se smatra dobrim izvorom antihipertenzivnih peptida, točnije ACE-inhibitornih peptida. Iako velika većina sireva može biti izvor ACE- inhibitornih peptida koji iskazuju potencijalni ili dokazani bioaktivni učinak, zbog dokazane važnosti trajanja zrenja na količinu i vrstu stvorenih ACE-inhibitornih peptida, ekstratvrđi, tvrdi i polutvrđi sirevi smatraju se boljim izvorom spomenutih peptida. U kategoriji ekstratvrđih sireva, dobar izvor snažnih ACE-inhibitornih peptida su talijanski sirevi parmiggiano reggiano i grano padano. Basiricio i sur. (2015.) ispitali su prisutnost 8 snažnih ACE-inhibitornih peptida (VPP, IPP, RYLGY, RYLG, AYFYPEL, AYFYPE, LHLPLP i HLPLP) u uzorcima parmigiano reggiana prije i nakon izlaganja *in vitro* uvjetima probave. Iz uzoraka, prije nego su izloženi *in vitro* uvjetima probave, izolirani su i identificirani sljedeći ACE-inhibitorni peptidi: VPP [β – CN f(84 – 86)], IPP [β – CN f(74 – 76)], LHLPLP [β – CN f(133 – 138)] i HLPLP [β – CN f(134 – 138)]. Iz uzoraka, izloženih *in vitro* uvjetima probave, izolirana su i identificirana još dva ACE-inhibitorna peptida: AYFYPEL [α_{s1} – CN f(143 – 149)] i AYFYYPE [α_{s1} – CN f(143 – 148)]. U uzorcima prije i nakon izlaganja *in vitro* uvjetima probave nisu nađeni ACE-inhibitorni peptidi RYLG [α_{s1} – CN f(90 – 93)] i RYLGY [α_{s1} – CN f(90 – 94)]. Stuknyte i sur. (2015.) ispitali su prisutnost ACE-inhibitornih peptida u uzorcima grano padana prije i nakon izlaganja *in vitro* uvjetima probave. Iz uzoraka, prije nego su izloženi *in vitro* uvjetima probave, izolirani su i identificirani sljedeći ACE-inhibitorni peptidi: VPP [β – CN f(84 – 86)], IPP [β – CN f(74 – 76)], HLPLP [β – CN f(134 – 138)] i LHLPLP [β – CN f(133 – 138)]. Iz uzoraka, izloženih *in vitro* uvjetima probave u želudcu, izolirani su i identificirani peptidi: VPP, IPP, HLPLP i novonastali RYLG [α_{s1} – CN f(90 – 93)]. Iz uzoraka, izloženih *in vitro* uvjetima probave u crijevima, izolirani su i identificirani peptidi: HLPLP i LHLPLP. Nadalje, u kategoriji tvrdih sireva dobrim izvorom antihipertenzivnih peptida pokazali su se emmentaler i cheddar. U istraživanju kojeg su proveli Gagnaire i sur. (2001.) od 91 peptida utvrđenog u emmentaleru, 28 ih je pokazalo različite biološke učinke, među kojima su neki iskazali antihipertenzivni učinak u *in vitro* uvjetima. Stepaniak i sur. (1995.) navode kako se cheddar pokazao kao izvor antihipertenzivne frakcije β -CN f(58-72) koja uključuje nadaleko poznati peptid β -CM-7. Saito i sur. (2000.) navode kako se u kategoriji polutvrđih sireva gauda pokazala kao izvor nekoliko bioaktivnih peptida od kojih su α_{s1} -CN f(1-9) i β -CN f(60-68) pokazali ACE-inhibitornu aktivnost, a uz gaudu ACE-inhibitornu aktivnost iskazali su i edam i havarti. Antihipertenzivne peptide podrijetlom iz proteina sirutke, a izolirane i identificirane iz cheddara i fete čine: β -Lg f(147-148), Lf f(288-289) i Lf f(319-320) (Pripp i sur. 2006.). Osim sireva proizvedenih iz kravljeg mlijeka, kao dobar izvor antihipertenzivnih peptida mogu poslužiti sirevi proizvedeni iz ovčjeg i kozjeg mlijeka. Tako je iz šest španjolskih sireva, od koji cabrales, idiazàbal, roncal, manchego i mahon pripadaju ovčjim sirevima i siru od kozjeg mlijeka, izoliran i identificiran 41 peptid s velikim rasponom ACE-inhibitorne aktivnosti. Većina spomenutih peptida nastala je iz β i

α_{s1} -CN kao prekursora, a ACE-inhibitorni peptid DKIHHP [β – CN f(47 – 51)], izoliran je i identificiran u svim sirevima s izuzetkom mahona (Gomez-Ruiz i sur. 2006.). Iz manchega pripremljenog inokulacijom ovčjeg mlijeka s bakterijama *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *Leuconostoc mesenteroides* izolirano je i identificirano 11 peptida s različitim ACE-inhibitornim učinkom: VPSERY [α_{s1} – CN f(86 – 91)], VPSERYL [α_{s1} – CN f(86 – 92)], KKYNVPQ [α_{s1} – CN f(102 – 108)], KKYNVPQL [α_{s1} – CN f(102 – 109)], LEIVPK [α_{s1} – CN f(109 – 114)], TQPKTNAIPY [α_{s2} – CN f(195 – 204)], IPY [α_{s2} – CN f(202 – 204)], VRYL [α_{s2} – CN f(205 – 208)], PVRGPF [β – CN f(198 – 203)] i VRGPFP [β – CN f(199 – 204)]. Od spomenutih peptida značajnu ACE-inhibitornu aktivnost iskazuju VRYL i KKYNVPQL, s vrijednostima IC_{50} od 24,1 μ M i 71,1 μ M (Gomez Ruiz i sur. 2004.).

Različite vrste sireva mogu biti dobar izvor opioidnih peptida, a među njima i sirevi s plemenitim plijesnima i polutvrđi sirevi. Iako se njihova prisutnost u siru smatra poželjnom, kod previsokih koncentracija učinak nekih opioidnih peptida na tvorbu različitih vrsta bioaktivnih peptida sličan je učinku nekih imunomodulatornih peptida. Tako je tijekom zrenja cheddara i crescenza nastaje frakcija β -CN f(58-72) koja uključuje opioidni peptid β -CM-7 zaslužan za selektivni inhibitorni utjecaj na endopeptidaze i aminopeptidaze bakterija mliječne kiseline prisutnih tijekom zrenja u spomenutim vrstama sira (Smacchi i Gobbetti 2000., Sienkiewicz-Sz1apka i sur. 2009.). U istraživanju koje su proveli Sienkiewicz-Sz1apka i sur. (2009.) dokazana je prisutnost opioidnih peptida s agonističkim i antagonističkim učinkom u tri polutvrda sira (gauda, edam i kasztelan) te u dva sira s plemenitim plijesnima (brie i rokol). Izolirane i identificirane peptide s agonističkim učinkom čine: YPFPG [β – CN f(60 – 64)] i YPFPGPI [β – CN f(60 – 66)], dok one s antagonističkim učinkom čine: YIPIQYVLSR [κ – CN f(25 – 34)] i SRYPY [κ – CN f(33 – 38)]. Iako su spomenuti peptidi pronađeni u svim vrstama sireva, značajno viša koncentracija peptida s agonističkim učinkom pronađena je u sirevima s plemenitim plijesnima, dok je značajno viša koncentracija peptida s antagonističkim učinkom pronađena u polutvrđim sirevima.

Različite vrste sireva mogu biti dobar izvor antimikrobnih peptida, a među njima se posebno važnima smatraju peptidi koji iskazuju potencijalni ili dokazani antibakterijski učinak. U istraživanju kojeg su proveli Rizzello i sur. (2005.) ispitana je prisutnost antibakterijskih peptida u 9 vrsta talijanskih sireva (parmigiano reggiano, caciocavallo, gorgonzola, crescenza, pecorino romano, fossa, canestrato pugliese, mozzarella, caprino del piemont) koji su se razlikovali po vrsti mlijeka za sirenje, korištenoj starter kulturi i vrsti sirila te trajnu zrenja. Među spomenutim sirevima u parmigiano reggiano, gorgonzoli i fossi nisu nađeni antibakterijski peptidi što se možda može pripisati intenzivnoj proteolizi koja se odvija tijekom zrenja ovih sireva. U ostalim sirevima pronađene su različite vrste i količine pojedinih antibakterijskih peptida, a neke od izoliranih i identificiranih peptida čine: GLSPEVLNENLL [ovčji α_{s1} – CN f(10 – 21)] i RFVVAPFPE [ovčji α_{s1} – CN f(22 – 30)] iz pecorino romana, MAIPPKKNQD [κ – CN f(106 – 115)] i FVAPFPEVFG [α_{s1} – CN f(24 – 33)] iz canestrato pugliesea, RPKHPIK [α_{s1} – CN f(1 – 7)] i GLPQE [α_{s1} – CN f(10 – 14)] iz caciocavalloa, YQEPVLGPVRGPFPIIV [β – CN f(183 – 199)] i MPIQAFLL [β –

CN f(175 – 182] iz crescenze te YPFTGPIPN [kozi β – CN f(60 – 68] i MPIQA [kozi β – CN f(183 – 187] iz caprino del piemontea.

Dobar izvor imunomodulatornih peptida predstavljaju sirevi s dugim trajanjem zrenja, a među njima i parmigiano reggiano. Iako se njihova prisutnost u siru smatra poželjnom, kod previsokih koncentracija određeni imunomodulatorni peptidi mogu imati inhibitorni utjecaj na proteolitičku aktivnost bakterija mliječne kiseline, a samim time i negativan utjecaj na tvorbu ostalih vrsta bioaktivnih peptida u siru (Smacchi i Gobbetti 2000., Summer i sur. 2017.). Neke od imunomodulatornih peptida izoliranih i identificiranih iz parmigiano reggiana različite starosti čine: RPKHPIKHQGL [α_{s1} – CN f(1 – 23], FFVAPFPEVFGK [α_{s1} – CN f(23 – 34)] i YQEPVLGPVR [β – CN f(193 – 209)] (Summer i sur. 2017.).

Izvor antioksidativnih peptida najčešće predstavljaju sirevi sa srednjim ili dugim trajanjem zrenja i sirevi s plemenitim plijesnima. Tako Akuzawa i sur. (2009.) navode kako je dobra antioksidativna aktivnost, a samim time i prisutnost antioksidativnih peptida zabilježena u goudi, parmesanu i camembertu nakon predviđenog vremena zrenja za svaku od navedenih vrsta sireva, pri čemu se nastali antioksidativni učinak pripisuje proteolitičkoj aktivnosti koja se odvija tijekom zrenja. Isti autori navode kako je iz goude izoliran i identificiran peptid HPIKHQGLPQ [α_{s1} – CN f(4 – 13)], dok je iz bluea izoliran i identificiran peptid FQSEE [β – CN f(33 – 37)].

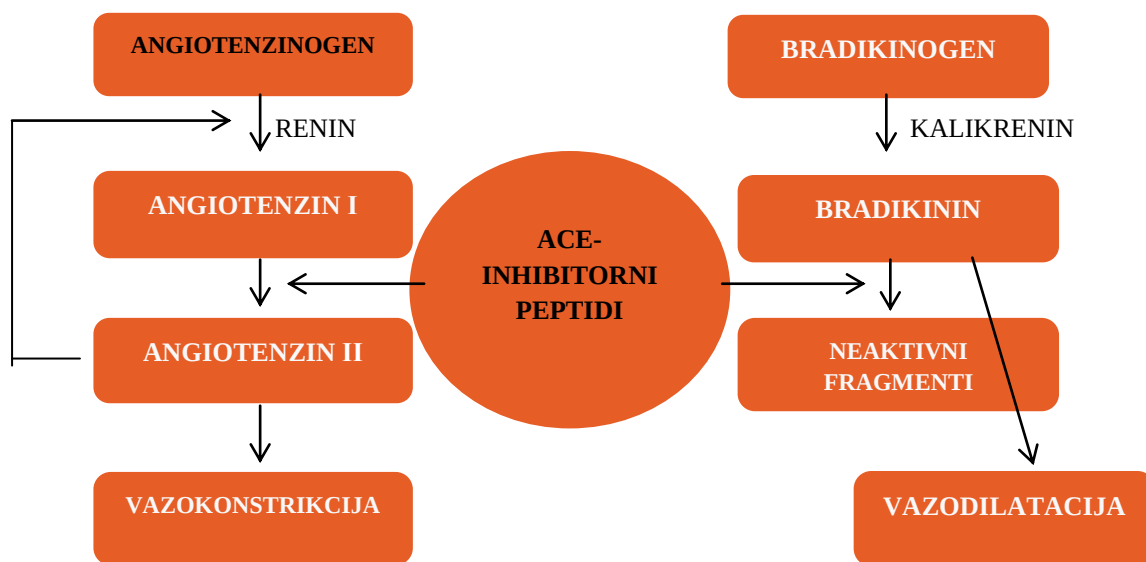
Dobar izvor kazeinofosfopeptida predstavljaju sirevi s dugim trajanjem zrenja, kao što su parmigiano reggiano i grano padano. Nastanak i postojanost spomenutih peptida pripisuje se prisutnosti fosforilnih klastera u peptidonoj sekvenci što čini peptide otpornima na daljnju enzimatsku hidrolizu tijekom dugog trajanja zrenja (Cattaneo i sur. 2016., Summer i sur. 2017.). Cattaneo i sur. (2016.) su ispitali prisutnost kazeinofosfopeptida oslobođenih tijekom *in vitro* uvjeta probave u uzorcima grano padana starosti 13, 19 i 26 mjeseci. Istraživanje je provedeno tako da su uzorci starosti 13, 19 i 26 mjeseci podijeljeni u dvije grupe od kojih je svaka podvrgnuta drugačijim uvjetima *in vitro* probave, a u svakoj grupi zabilježen je nastanak kazeinofosfopeptida. Kazeinofosfopeptide prisutne u obje grupe i u svim uzorcima sira (13, 19, 26 mjeseci) čine: ISSSEEIVPN [α_{s1} – CN f(65 – 74)], ISSSEEIVPNSVEQK [α_{s1} – CN f(65 – 79)], VSSSEES [α_{s2} – CN f(7 – 13)], SLSSEESIT [β – CN f(15 – 24)], LSSSEESIT [β – CN f(16 – 24)] i SSSEESIT [β – CN f(17 – 24)].

4. Bioaktivni peptidi i biološka aktivnost u humanom organizmu

Važnost korištenja animalnih modela u *in vivo* istraživanjima je značajna upravo iz razloga nemogućnosti provođenja istraživanja na humanim modelima u pojedinim vrstama istraživanja. No kako bi podaci bili primjenjivi te kako bi se mogli donijeti određeni zaključci za ljude, rezultati istraživanja na animalnim modelima se ekstrapoliraju na ljude korištenjem različitih faktora korekcije. Stoga će u nastavku rada biti prikazana aktivnost pojedinih bioaktivnih peptida korištenjem ne samo humanog modela, već i animalnog.

4.1. ACE- inhibitorni peptidi

Angiotenzin-konverzijski enzim (ACE, peptidil-dipeptidaza A) spada u jedan od ključnih regulatora krvnog tlaka kojeg regulira preko renin-angiotenzinskog sustava. Enzim je odgovoran za porast krvnog tlaka pretvaranjem angiotenzina I u angiotenzin II, koji je jak vazokonstriktor, te istovremenom razgradnjom bradikininina, koji je vazodilatator. Angiotenzin II djeluje na nadbubrežnu žlijezdu, što uzrokuje lučenje aldosterona koji pospješuje izlučivanje K^+ i H^+ iona iz bubrega uz istovremeni unos Na^+ iona u bubrež. Takva izmjena iona uzrokuje lučenje enzima renina, koji ima utjecaj na pretvorbu angiotenzinogena u angiotenzin I. ACE-inhibitorni peptidi sprječavaju pretvorbu angiotenzina I u angiotenzin II, kao i razgradnju bradikininina, čime značajno mogu utjecati na snižavanje krvnog tlaka (slika 4.1.1.) (Gobbetti i sur. 2004., Samaržija 2015.).



Slika 4.1.1. Način djelovanja ACE-inhibitornih peptida

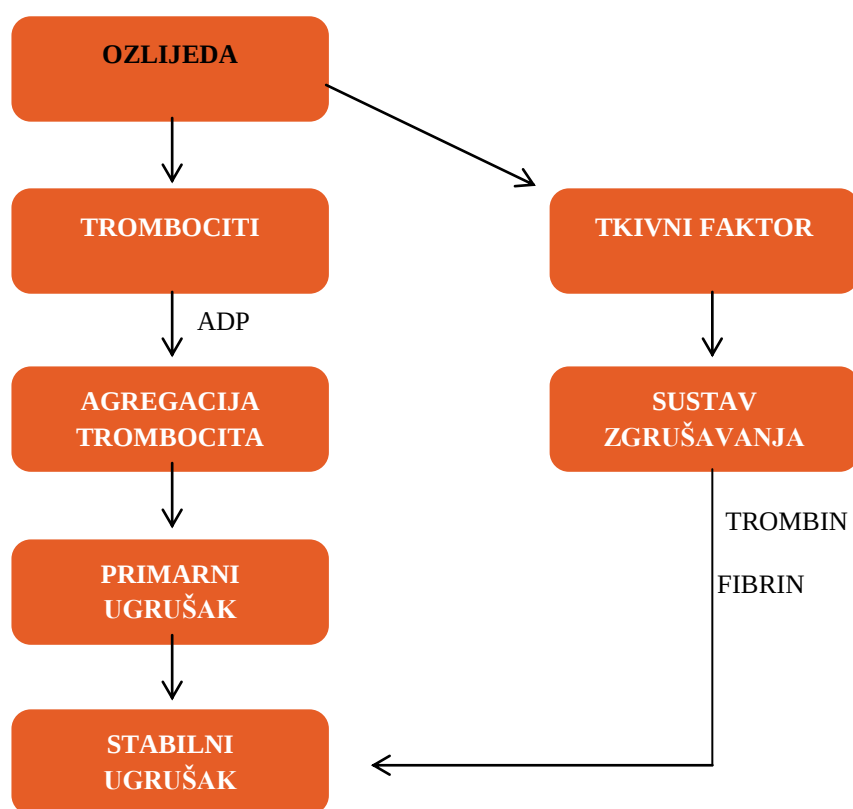
Izvor: Gobbetti i sur. 2004., Madureira i sur. 2010. (modificirani prikaz)

Iako puni mehanizam interakcije između ACE-inhibitornih peptida i ACE-a nije poznat, vrlo je moguće da do njihove interakcije dolazi preko C-terminalnog dijela oba sudionika, gdje C-terminalni dio ACE-a preferira hidrofobne (aromatske ili razgranate bočne lance) aminokiselinske ostatke na tri položaja C-terminalnog djela ACE-inhibitornog peptida. Tome u prilog idu rezultati istraživanja o inhibitornom učinku aminokiselinskih ostataka na ACE, gdje su aromatske i cikličke aminokiseline Trp, Tyr, Phe i Pro, Pro bile najdjelotvornije u vezanju na ACE (Gobbetti i sur. 2004., Pihlanto 2016.). Iako je do danas poznat veliki broj ACE-inhibitornih peptida s potencijalnim i dokazanim ACE-inhibitornim učinkom, samo je manji dio njih iskazao svoju djelotvornost u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima provedenim na animalnim ili humanim modelima. Za postizanje antihipertenzivnog učinka nakon oralne primjene mlijeka ili mliječnih proizvoda, aktivni peptidi moraju biti rezistentni na uvjete probave u gastroinestinalnom traktu i plazmične peptidaze u krvi kako bi postigli svoj učinak. Razgradnja ACE-inhibitornih peptida djelovanjem probavnih enzima u humanom organizmu djelomično je pod utjecajem aminokiselinskog slijeda svakog pojedinačnog peptida, a za peptide koji sadrže prolin pokazalo se da su rezistentni na razgradnju djelovanjem spomenutih enzima (Korhonen i Pihlanto 2006.). Upravo iz tog razloga, najpoznatije peptide s bioaktivnim učinkom u humanom organizmu čine β -CN f(84-86), odnosno Val-Pro-Pro (VPP) i β -CN f(74-76) ili κ -CN f(108-110), odnosno Ile-Pro-Pro (IPP). Navedeni peptidi spadaju u skupinu ACE-inhibitornih peptida podrijetlom iz kazeina, a nose naziv kazokinini. Antihipertenzivni učinak spomenutih peptida dokazan je u mnogim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima provedenim na animalnim i humanim modelima. Ipak, najtočniji rezultati dobiveni su nakon *in vivo* istraživanja provedenih na humanim modelima. U istraživanju kojeg su proveli Mizushima i sur. (2004.) proučen je antihipertenzivni učinak spomenutih peptida na granično hipertenzivnim muškarcima nakon svakodnevne oralne primjene 160 g fermentiranog mlijeka „Calpis“ tijekom 4 tjedna. Rezultati su pokazali značajno smanjenje sistoličkog krvnog tlaka u testiranoj skupini, dok u placebo skupini, kojoj je svakodnevno davano nefermentirano zakiseljeno mlijeko, nije došlo do značajnih promjena u krvnom tlaku. Nadalje, antihipertenzivni učinak spomenutih peptida na blago hipertenzivne ispitanike proučen je nakon svakodnevne oralne primjene 150 ml fermentiranog mlijeka „Evolus“ tijekom 8 tjedana. Rezultati su pokazali značajno smanjenje sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka u testiranoj skupini nakon 3. i 8. tjedna, dok takav učinak nije zabilježen u skupini koju su činili ispitanici s normalnim krvnim tlakom (Seppo i sur. 2002., Seppo i sur. 2003.). Ova istraživanja ukazuju na dokazani antihipertenzivni učinak IPP-a i VPP-a u humanom organizmu, a svakodnevna konzumacija mliječnih proizvoda koji sadrže spomenute peptide može imati pozitivan učinak na smanjenje krvnog tlaka u blago hipertenzivnih osoba (Korhonen i Pihlanto 2006., Pihlanto 2016.). U drugu skupinu ACE-inhibitornih peptida spadaju laktokinini podrijetlom iz proteina sirutke. Iako je do danas izoliran i identificiran veliki broj potencijalnih ACE-inhibitornih peptida podrijetlom iz hidroizolata proteina sirutke, treba naglasiti da visoka ACE-inhibitorna aktivnost koja je dokazana za spomenute peptide u *in vitro* uvjetima, ne znači uvijek i visoku antihipertenzivnu aktivnost u *in vivo* uvjetima. Neke od prihvaćenih i dokazanih peptida s antihipertenzivnim učinkom u humanom organizmu čine: α -LA f(50-53) (α -laktorfin), α -LA (78-80) (laktosin A) i β -LG f(142-145) (laktosin B). Također, fragmenti β -LG dobiveni iz hidoizolata proteina sirutke, a plasirani na

tržište pod nazivom Bio Zate smatraju se komercijalno dostupnim proizvodom s dokazanim antihipertenzivnim učinkom (Madureira i sur. 2010.).

4.2. Antitrombotični peptidi

Za mehanizme koji sudjeluju u zgrušavanju mlijeka, definirane kao interakcija κ -kazeina s koagulacijskim enzimom, i u zgrušavanju krvi, definirane kao interakcija fibrinogena s trombinom, dokazano je da su slični. Prvi korak u zgrušavanju krvi predstavlja agregacija trombocita, odnosno njihovo sljepljivanje u „mrežu“ koja prijanja na mjesto rane. Drugi korak predstavlja interakcija između trombina i fibrinogena (slika 4.2.2.) u kojoj trombin cijepa fibrinogen na fibrin koji se potom veže na „mrežu“ (specifično mjesto vezanja na ADP-aktiviranoj površini trombocita) kako bi se stvorio krvni ugrušak (Silva i Malcata 2005., Akuzawa i sur. 2009.).



Slika 4.2.1. Mehanizam zgrušavanja krvi

Izvor: <https://slideplayer.gr/slide/14557058/> (modificirani prikaz)

Sličnost između mehanizma zgrušavanja mlijeka i mehanizma zgrušavanja krvi vidljiva je po strukturnoj homologiji između peptidnog fragmenta kravljeg κ -CN f(106-116) i γ -lanca f(400-411) humanog fibrinogena, a tri aminokiselinska ostatka (Ile₁₀₈, Lys₁₁₂ i Asp₁₁₅)

kravlje κ -CN f(106-116) nalaze se u homolognom položaju s γ -lancem f(400-411) humanog fibrinogena. Iz tog razloga važne antitrombotične peptide čine kazoplatelini podrijetlom iz κ -CN kravlje κ mlijeka. Neki kazoplatelini kao što su κ -CN f(106-112,) κ -CN f(106-116) i κ -CN f(113-116) iskazuju svoj antitrombotični učinak inhibicijom agregacije ADP-aktiviranih trombocita u „mrežu“ i inhibicijom vezanja γ -lanca humanog fibrinogena na specifične receptorske regije na površini trombocita. Antitrombotični učinak kazoplatelina κ -CN f(103-111) ogleda se kroz inhibiciju agregacije trombocita, ali nije u mogućnosti inhibirati vezanje fibrinogena na površinu trombocita. Potencijalni ili dokazani učinak nekih od spomenutih peptida dokazan je u *in vitro* istraživanjima korištenjem animalnog modela pa je za potvrdu o pozitivnom učinku na humani organizam potrebno provesti dodatna istraživanja na humanom modelu (Silva i Malcata 2005., Akuzawa i sur. 2009., Pihlanto 2016.).

4.3. Opioidni peptidi peptidi

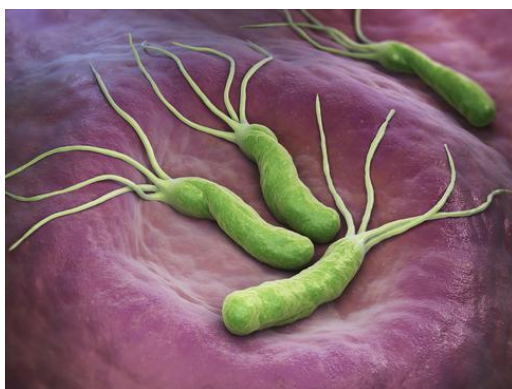
Prvi opioidni peptidi podrijetlom iz hrane nazvani su „egzorfinima“ zbog njihove strukturne sličnosti s endogenim ligandama – endorfinima i enkefalinima. Za iskazivanje opioidnog učinka u humanom organizmu važnu ulogu igra aminokiselinski slijed prisutan kod svakog opioidnog peptida. One peptide koji sadrže aminokiselinsku sekvencu Tyr-Gly-Gly-Phe na N-terminalnom djelu nazivamo tipičnim opioidnim peptidima, dok one peptide koji sadrže različite aminokiselinske sekvence na N-terminalnom djelu nazivamo atipičnim opioidnim peptidima. Većina do danas poznatih peptida spada u tipične opioidne peptide, a svoj učinak iskazuju povezivanjem na μ , σ ili κ -receptore preko spomenutog slijeda, gdje prisutnost aminokiseline kod treće ili četvrte pozicije u slijedu čini važan strukturni motiv koji se uklapa u mjesto vezanja opioidnih receptora. Sposobnost vezanja opioidni peptida na specifični receptor uvjetuje njihov učinak u humanom organizmu. Opioidni peptidi koji se vežu na μ -receptor mogu iskazati svoj učinak kroz utjecaj na emocionalno ponašanje i motilitet crijeva, oni koji se vežu na σ -receptor mogu iskazati svoj učinak kroz utjecaj na emocionalno ponašanje, dok oni koji se vežu na κ -receptore mogu iskazati svoj učinak kroz utjecaj na unos hrane i sedaciju (Pihlanto 2011.). Opioidni peptidi mogu biti podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke, a s obzirom na vrstu potencijalnog ili dokazanog bioaktivnog učinka u humanom organizmu dijelimo ih na opioidne agoniste i opioidne antagoniste. Opioidni agonisti podrijetlom iz α -CN-a i okarakterizirani kao σ -receptori nose naziv egzorfini, a neke od poznatih egzorfini čine: α_{s1} -CN f(90-95), α_{s1} -CN f(90-96) i α_{s1} -CN f(91-95). Opioidni agonisti podrijetlom iz β -CN-a i okarakterizirani kao μ -receptori nose naziv β -kazomorfini, a neke od poznatih β -kazomorfina čine: β -kazomorfin-7, odnosno β f(60-66) i β -kazomorfin-5, odnosno β f(60-64). Opioidni agonisti podrijetlom iz α -La i β -Lg nose naziv laktorfini, a neke od poznatih laktorfina čine: α -laktorfin, odnosno α -La f(50-53) i β -laktorfin, odnosno β -Lg f(102-115) (Akuzawa i surr. 2009., Mann i sur. 2019.). Važnost opioidnih agonista ogleda se u sposobnosti da reguliraju rast i funkciju stanica uključenih u središnji živčani sustav, a među spomenutim agonistima najznačajniju skupinu čine β -kazomorfini. β -Kazomorfini mogu iskazati svoj biološki učinak kroz interakciju s opijatnim receptorima smještenim na seroznoj

strani crijevnog epitela te kroz utjecaj na regulaciju transporta elektrolita, izlučivanje inzulina i apsorpciju hrane. Također, njihova sposobnost prolaska kroz sluznicu crijeva novorođenčadi utječe na fiziološke reakcije što posljedično rezultira smirenošću i snom u novorođenčadi. Trenutno, rezultati provedenih istraživanja sugeriraju da kazomorfini djeluju antisekretorno, analgetski te stimulativno na izlučivanje inzulina i somatostatina (Mohanty i sur. 2016.). Važnu skupinu opioidnih agonista čine laktorfini, a među njima se posebno ističe α -laktorfin koji može iskazati svoj opioidni učinak kroz poticanje lučenja mucina i ekspresije mucinskih gena u vrčastim stanicama humanog organizma (Mann i sur. 2019.). Nadalje, opioidni antagonisti podrijetlom iz κ -CN-a i okarakterizirani kao κ -receptori nose naziv kazokini, a neke od poznatih kazokina čine: kazokin A, odnosno κ -CN f(35-42), kazokin B, odnosno κ -CN f(58-61) i kazokin C, odnosno κ -CN f(25-34). Važnost opioidnih antagonista ogleda se u sposobnosti da suzbiju agonističku aktivnost enkefalina, a među spomenutim agonistima naj snažniju antagonističku aktivnost ima kazokin C (Akuzawa i sur. 2009., Mohanty i sur. 2016.).

4.4. Antimikrobni peptidi

Mehanizam djelovanja antimikrobnih peptida povezuje se s aktivnošću na membrani bakterija, odnosno narušavanju normalne propusnosti membrane bakterijskih stanica formiranjem ionskih kanala kroz membranske dvosloje bakterijske stanice. Većina antimikrobnih peptida ima kationsku amfipatsku α -spiralnu strukturu, dok manji dio antimikrobnih peptida ima hidrofobnu α -spiralnu strukturu. Upravo je svojstvo pozitivnog naboja predloženo za pokretača interakcije peptida s negativno nabijenom površinom bakterije, dok izvjesni hidrofobni karakter možda može biti odgovoran za ulazak peptida u unutrašnjost membrane (Gobbetti i sur. 2004., Pihlanto 2011.). Iako većina antimikrobnih peptida ima svojstvo pozitivnog naboja, njihova specifičnost u pogledu antimikrobnog djelovanja nije ograničena samo na gram-pozitivne bakterije, već često uključuje i antimikrobni učinak na gram-negativne bakterije. Antimikrobni učinak pojedinog peptida na određeni broj bakterija smatra se složenim procesom, a upravo bi razlika u raspodjeli naboja, veličini i aminokiselinskom slijedu, sekundarnoj strukturi i svojstvu amfipatičnosti među peptidima mogla biti razlogom njihovog različitog antimikrobnog učinka na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije (Mann i sur. 2019.). Ipak, razlike koje postoje u sastavu membrane između gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija imaju posljedice na način djelovanja i bakterijsku specifičnost antimikrobnih peptida, pa je kod nekih antimikrobnih peptida uočen jak antimikrobni učinak na jednu skupinu bakterija, a značajno slabiji učinak na drugu skupinu bakterija (Gobbetti i sur. 2004., Mann i sur. 2019.). Antimikrobni peptidi podrijetlom iz mlijeka i mliječnih proizvoda mogu iskazati svoj učinak na mnoge gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija kao što su: *Escherichia coli* MTCC82, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, *Salmonella typhi* MTCC3216, *Bacillus cereus* ATCC10702, *Salmonella typhimurium* SB300, *S. enteritidis* 125109, *Staphylococcus aureus* MTCC 96. Neke od najpoznatijih peptida s antimikrobnim učinkom čine: kazocidin-I, odnosno α_{s2} -CN f(150-188), isracidin, odnosno α_{s1} -CN f(1-23) i laktofericini kao skupina peptida podrijetlom iz

kravljeg laktoferina (Mohanty i sur. 2016., Mann i sur. 2019.). Iako je potencijalni ili stvarni učinak antimikrobnih peptida dokazan u brojnim *in vitro* istraživanjima, samo nekoliko *in vivo* istraživanja provedenih kliničkim ispitivanjima na ljudima govori o njihovom bioaktivom učinku. Antimikrobni učinak laktoferina i peptida koji nastaju njegovom razgradnjom protiv bakterije *Helicobacter pylori* (slika 4.4.1.), kada se koriste kao dodatak liječenju antibioticima, dokazan je u *in vivo* uvjetima korištenjem humanog modela te je dokazan i u *in vivo* uvjetima korištenjem animalnih modela na meticilin-rezistentih bakterija *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. Antimikrobni učinak isracidina na bakterije *Listeria monocytogenes* i *Streptococcus pyogenes* dokazan je u *in vivo* uvjetima korištenjem animalnih modela, odnosno na miševima, zečevima, svinjama i ovcama (Zsuzsanna 2008.)

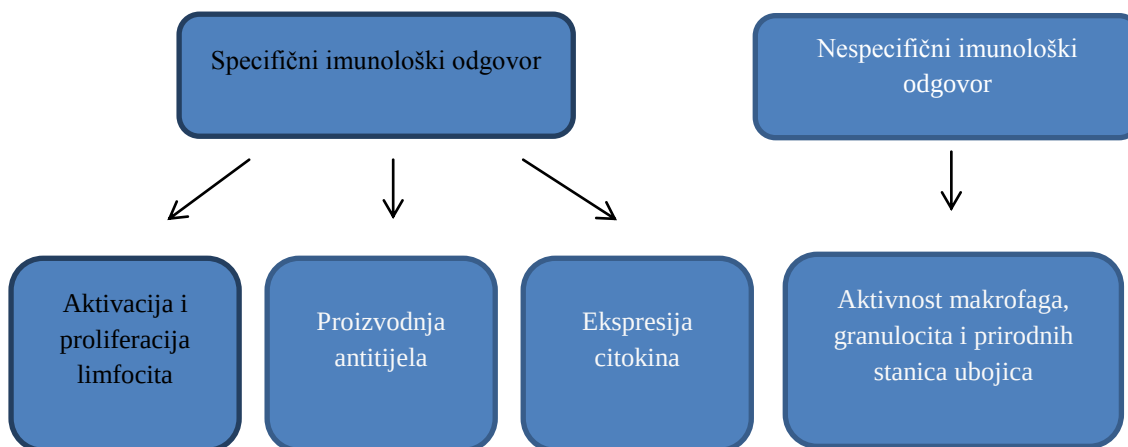


Slika 4.4.1. Morfološki prikaz bakterije *Helicobacter pylori*

Izvor: <https://www.ueg.eu/education/latest-news/article/article/mistakes-in-the-management-of-helicobacter-pylori-infection-and-how-to-avoid-them/>

4.5. Imunomodulatorni peptidi i njihova aktivnost u humanom organizmu

Pravilno funkcioniranje imunološkog sustava ključno je za održavanje zdravlja. Međutim, strategije za učinkovito moduliranje imunološkog odgovora nisu u potpunosti istražene. Iako danas na tržištu postoje različiti lijekovi koji usporavaju napredovanje određenih bolesti nastalih kao posljedica nepravilnog funkcioniranja imunološkog sustava, ponekad njihove nuspojave nadmašuju njihove prednosti. U tom kontekstu dokazano je da neki peptidi imaju sposobnost stimulacije ili inhibicije određenih funkcija u imunološkom sustavu, ovisno o primjenjenoj dozi, eksperimentalnim uvjetima i njihovom funkcioniranju u tijelu. Važnu skupinu imunomodulatornih peptida čine peptidi podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke, a svoj učinak iskazuju vezanjem na specifični receptor čime potiču imunološki odgovor te tako djeluju na određene funkcije ciljanih stanica. Posljedično, a ovisno o vrsti imunološkog učinka peptida, dolazi do potiskivanja ili stimulacije ili specifičnog imunološkog odgovora (aktivacija i proliferacija limfocita, proizvodnja antitijela, ekspresija citokina) ili/i nespecifičnog imunološkog odgovora (aktivnost makrofaga, granulocita i prirodnih stanica ubojica) (slika 4.5.1.) (Reyes-Diaz i sur. 2017.).



Slika 4.5.1. Shematski prikaz aktivnosti koju mogu iskazati imunomodulatorni peptidi

Izvor: Reyes-Diaz i sur. 2017 (modificirani prikaz)

Kazein se pokazao kao dobar izvor imunomodulatornih peptida s potencijalnim i stvarnim učinkom u humanom organizmu. Zaštitni učinak peptida podrijetlom iz β -CN na infekcije uzrokovane bakterijom *Klebsiella pneumoniae* dokazan je u *in vivo* uvjetima korištenjem animalnog modela, odnosno na miševima (Migliore-Samour i Jollès 1988.). Isti autori navode potencijalni imunomodulatorni učinak β -CN f(63-68) i β -CN f(191-193) na fagocitozu unutar humanog organizma, a rezultati se temelje na *in vitro* istraživanju korištenjem humanog modela. Proteini sirutke također su se pokazali kao dobar izvor imunomodulatornih peptida s potencijalnim i stvarnim učinkom u humanom organizmu. Saint-Sauveur i sur. (2009.) navode kako je imunomodulatorni učinak hidroizolata proteina sirutke dokazan u *in vivo* uvjetima korištenjem animalnog modela. Tako peptidi dobiveni hidrolizom proteina sirutke djelovanjem tripsina i kimotripsina iskazuju svoj imunomodulatorni učinak na neinficiranim i *Escherichia coli*-inficiranim miševima stimulacijom izlučivanja serumskog TGF- β 1, što se poklapa sa značajnim porastom razine Ig A. Nadalje, imunomodulatorni učinak hidroizolata proteina sirutke dokazan je u *in vitro* uvjetima korištenjem različitih enzima. Tako peptidi dobiveni hidrolizom proteina sirutke djelovanjem pepsina i corolaze PP ili humanih želučanih i duodenalnih sokova iskazuju svoj imunomodulatorni učinak inhibicijom proliferacije humanih mononuklearnih stanica periferne krvi (Eriksen i sur. 2008.). Kao što je prikazano, imunomodulatorni učinak peptida podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke istražen je u mnogim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima korištenjem animalnih i humanih modela. Ipak, značajno veći dio istraživanja proveden je u *in vitro* uvjetima, dok je dio istraživanja provedenih u *in vivo* uvjetima stavio naglasak na korištenje animalnog modela. Stoga, potencijalni i dokazani učinak mnogih imunomodulatornih peptida na zdravlje čovjeka treba biti dodatno ispitan.

4.6. Antioksidativni peptidi

Oksidacijski mehanizam, koji podrazumijeva oksidacijske promjene stvarajući slobodne radikale, ključan je za normalno funkcioniranje organizma i opstanak stanica. Međutim, oksidacijski stres, odnosno oslobađanje viška slobodnih radikala uzrokuje oksidaciju staničnih proteina, membranskih lipida, DNK-a i enzima, a oštećene stanične strukture više ne vrše svoju, za život stanice važnu funkciju. Oštećenja nastala u napadnutoj stanici mogu biti značajan čimbenik za pokretanje bolesti kao što su ateroskleroza, dijabetes, reumatoidni artritis ili oksidativna oštećenja DNA koja vode do razvoja raka. Veliki utjecaj na smanjenje oksidativnog stresa u humanom organizmu može imati pravilna prehrana, koja uključuje redoviti unos namirnica za koje je dokazano da su prirodni antioksidansi. Uporaba sintetskih antioksidanasa, kao što su butilirani hidroksitoluen, butilirani hidroksianizol, propil galat i tert-butilhidrokinon, u mnogim zemljama je ograničena zbog njihovog potencijalnog toksičnog djelovanja na ljude. Upravo iz tog razloga, antioksidativni peptidi podrijetlom iz mlijeka i mliječnih proizvoda, kao siguran i dostupan proizvod sve više privlače pozornost javnosti. Antioksidativni peptidi podrijetlom iz mlijeka sastoje se od pet do jedanaest hidrofobnih aminokiselina, uključujući prolin, histidin, tirozin ili triptofan, a pretpostavlja se da svoj antioksidativni učinak iskazuju uklanjanjem slobodnih radikala ili sprječavanjem njihovog nastanka te inhibicijom enzimatske i neenzimatske peroksidacije lipida (Mohanty i sur. 2016., Mann i sur. 2019.). Iako mehanizam koji se odnosi na antioksidativnu aktivnost peptida do danas nije u potpunosti shvaćen, neke od teorija ukazuju da je za iskazivanje antioksidativnog učinka u humanom organizmu pored prisutnosti relevantnih aminokiselina važno njihovo ispravno pozicioniranje u slijedu pepida. Tako bilo kakva promjena u tripeptidnom nizu aminokiselina rezultira različitom antioksidativnom aktivnosti. Druga moguća teorija ukazuje da je za iskazivanje antioksidativnog učinka u humanom organizmu važna peptidna veza i strukturna konformacija peptida koja se ponaša kao dvosjekli mač, odnosno može iskazati sinergistički i antagonistički učinak naspram antioksidativne aktivnosti slobodnih aminokiselina. Također, strukturna konfiguracija peptida ima direktan utjecaj na antioksidativnu aktivnost kroz pravilno pozicioniranje imidazolne skupine pa zamjena L-His s D-His u antioksidativnom peptidu dovodi do smanjenja antioksidativne aktivnosti peptida. Antioksidativna aktivnost peptida smatra se složenim procesom, a njihova aktivnost treba se pripisati integriranom učinku gore spomenutih akcija (Mann i sur. 2019.). Antioksidativni peptidi mogu biti podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke, a neke od peptida s učinkom uklanjanja slobodnih radikala ili inhibicije enzimatske i neenzimatske peroksidacije lipida čine: α_1 -CN f(144-149), β -CN f(98-105) i β -Lg f(19-29). Spomenuti peptidi, kao i mnogi drugi iskazali su svoj učinak u *in vitro* uvjetima pa je za daljnju potvrdu o stvarnom učinku na humani organizam potrebno provesti dodatna istraživanja u *in vivo* uvjetima na humanom modelu (Pihlanto 2006.).

4.7. Peptidi koji vežu mineralne tvari

Najvažniju skupinu peptida koji vežu mineralne tvari čine kazeinofosfopeptidi (CPP). Sposobnost vezanja raznih mineralnih tvari proizlazi iz složenosti strukture CPP-a, a zajednički strukturni motiv kojeg dijele svi CPP-i predstavlja visoko polarna kiselinska sekvenca od tri fosfoserina i dva ostatka glutaminske kiseline (SpSpSpEE) koja su mjesto vezanja mineralnih tvari. CPP-i imaju sposobnost povećanja stabilnosti hrane i promicanja zdravlja, što ih čini potencijalnim višenamjenskim sastojcima hrane. Njihova sposobnost da održe mineralne tvari (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+}) u topljivom obliku u crijevima dovodi do sprječavanja taloženja i olakšane apsorpcije spomenutih minerala u crijevima. (Mann i sur. 2017., Park i Nam 2015.). Iako afinitet CPP-a prema mineralnim tvarima kao što su Mg, Fe, Zn, Ba, Cr, Ni, Co i Se postoji, daleko je najviši za Ca^{2+} . Tako otprilike 1 mol CPP može vezati 40 mol Ca^{2+} . Zbog anionskog kakaktera CPP-i se smatraju otpornim na uvjete probave u gastrointestinalnom traktu, pa je njihova prisutnost nakon *in vivo* i *in vitro* uvjeta probave potvrđena (Akuzawa i sur. 2009., Park i Nam 2015.). Ipak, iako su mnoga *in vivo* istraživanja provedena na animalnim i humanim modelima dokazala prisutnost CPP nakon probave mlijeka, fermentiranog mlijeka i sireva, njihov učinak na povećanje biodostupnosti Ca^{2+} i ostalih minerala nije potvrđen. Rezultati koji su dobiveni na ovu temu na animalnim modelima dali su konfliktne rezultate, što se možda može pripisati činjenici da su korištene različite metodologije kvantificiranja vanjske i unutrašnje apsorpcije Ca^{2+} (Meisel i FitzGerald 2003.). Proteini sirutke mogu biti izvor peptida koji vežu mineralne tvari, iako se njihova važnost u usporedbi s kazeinofosfopeptidima smatra manjom. U istraživanju koje su proveli Caetano-Silva i sur. (2015.) proučen je učinak vezanja željeza u *in vitro* uvjetima korištenjem enzima pankreatina, a svih 28 identificiranih frakcija podrijetlom iz β -Lg iskazuje pozitivan učinak. Također, uočena je prisutnost aminokiselina Glu i Asp u svim frakcijama, a njihove karboksilne grupe su među glavnim mjestima vezanja željeza. Ovo možda sugerira važnost funkcionalnih grupa aminokiselina u povezivanju peptida sa željezom, a time i drugim metalima.

5. Zaključak

- Bioaktivni peptidi nastaju tijekom procesa probave u humanom organizmu ili tijekom procesa prerade mlijeka.
- Mikrobna fermentacija s proteolitičkim starter kulturama predstavlja način nastanka bioaktivnih peptida koji je od posebne važnosti za mljekarsku industriju.
- Tvorba bioaktivnih peptida ovisi o proteolitičkoj aktivnosti korištene mljekarske kulture, a u mljekarskoj industriji najznačajniji sojevi pripadaju bakterijama *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactococcus lactis* i *Streptococcus thermophilus*.
- Većina bioaktivnih peptida prisutnih u mlijeku nalazi se u neaktivnom obliku unutar native proteinske sekvence, a svoju aktivnost iskazuju tek nakon hidrolize proteina iz kojeg potječu.
- Fermentirana mlijeka i sirevi predstavljaju glavne izvore bioaktivnih peptida među komercijalnim mliječnim proizvodima.
- Stoga oni mogu biti dobar izvor antihipertenzivnih, antitrombotičnih, opioidnih, antimikrobnih, imunomodulatornih, antioksidativnih peptida i peptida koji vežu mineralne tvari.
- Vrsta i količina bioaktivnih peptida prisutnih u nekom siru velikim dijelom ovisi o uvjetima tijekom zrenja, dužini trajanja zrenja te karakteristikama mlijeka iz kojeg je sir proizveden.
- Aminokiselinski sastav i sekvence određuju biološku aktivnost bioaktivnih peptida.
- Bioaktivni peptidi podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke mogu pozitivno djelovati na krvožilni, živčani, imunološki i probavni sustav, te mogu imati više potencijalnih ili dokazanih funkcija odjednom.
- Antihipertenzivni peptidi Va-Pro-Pro (VPP) i Ile-Pro-Pro (IPP) predstavljaju najpoznatije bioaktivne peptide mlijeka i mliječnih proizvoda, a zbog višestruko dokazanog pozitivnog utjecaja na humani organizam danas se mogu naći u komercijalno dostupnim proizvodima kao što su fermentirana mlijeka „Calpis“ i „Evolus“.
- Biološka aktivnost bioaktivnih peptida podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke istražen je u mnogim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima korištenjem animalnih i humanih modela. Ipak, značajno veći dio istraživanja proveden je u *in vitro* uvjetima, dok je dio istraživanja provedenih u *in vivo* uvjetima stavio naglasak na korištenje animalnog modela. Stoga, potencijalni i dokazani učinak mnogih spomenutih bioaktivnih peptida na zdravlje čovjeka treba biti dodatno istražno.

6. Literatura

1. Akuzawa R., Miura T., Kawakami H. (2009). Bioactive Components in Caseins, Caseinates, and Cheeses. U: Bioactive Components in Milk and Dairy Products. (ur. Park W.Y.). Wiley-Blackwell. Iowa. SAD.
2. Antunac N., Lukač Havranek J. (1999). Proizvodnja, sastav i osobine ovčjeg mlijeka. *Mljekarstvo*. 49(4): 241-254.
3. Antunac N., Samaržija D., Lukač Havranek J. (2000). Hranidbena i terapijska vrijednost kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo*. 50(4): 297-304.
4. Ashar M. N., Chand R. (2004). Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft*. 59: 363-366.
5. Basiricò L., Catalani E., Morera P., Cattaneo S., Stuknyte M., Bernabucci U., De Noni I., Nardone A. (2015). Release of angiotensin converting enzyme-inhibitor peptides during *in vitro* gastrointestinal digestion of Parmigiano Reggiano PDO cheese and their absorption through an *in vitro* model of intestinal epithelium. *Journal of Dairy Science*. 98(11): 7595-7601.
6. Biadala A., Konieczny P. (2018). Goat's milk-derived bioactive components. *Mljekarstvo*. 68(4): 239-253.
7. Boutrou R., Gaudichon C., Dupont D., Jardin J., Airinei G., Marsset-Baglieri A., Benamouzig R., Tome' D., Leonil J. (2013). Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 97: 1314-1232.
8. Bütikofer U., Meyer J., Sieber R., Wechsler D. (2007). Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*. 17: 968-975.
9. Caetano-Silva M.E., Bertoldo-Pacheco M.T., Paes-Leme A.F., Neto F.M. (2015). Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC-MS/MS. *Food Research International*. 71: 132-139.
10. Cattaneo S., Stuknyte M., Ferraretto A., De Noni I. (2016). Impact of the *in vitro* gastrointestinal digestion protocol on casein phosphopeptide profile of Grana Padano cheese digestates. *LWT – Food Science and Technology*. 77: 356-361.
11. Choi J., Sabikhi L., Hassan A., Anand S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*. 65(1): 1-12.
12. Donkor O.N., Henriksson A., Singh T.K., Vasiljevic T., Shah N.P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*. 17: 1321-1221.
13. Elfahri K.R., Donkor O.N., Vasiljevic T. (2014). Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*. 38: 37-46.
14. Eriksen E. K., Vegarud G. E., Langsrud T., Almaas H., Lea T. (2008). Effect of milk proteins and their hydrolysates on *in vitro* immune responses. *Small Ruminant Research*. 79(1): 29-37.

15. Filipović Dermić Z., Mikulec N., Bendelja Ljoljić D., Antunac N. (2014). Terapijska i zdravstvena svojstva kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo*. 64(4): 280-286.
16. Gagnaire V., Molle D., Herrouin M., Leonil J. (2001). Peptides identified during Emmental cheese ripening: Origin and proteolytic system involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(9): 4402-4413.
17. Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F., Addeo F. (2000). Production of Angiotensin-I-Converting-Enzyme-Inhibitory Peptides in Fermented Milks Started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9): 3898-3904.
18. Gobbetti M., Minervini F., Rizzello C. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*. 57(2/3): 173-188.
19. Gómez Ruiz J.A., Ramos M., Recio I. (2004). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*. 14: 1075-1080.
20. Gomez-Ruiz J. A., Taborda G., Amigo L., Recio I., Ramos M. (2006). Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology*. 223(5): 595-601.
21. Griffiths M.W., Tellez A.M. (2013). *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Frontiers in Microbiology*. 4: 1-9.
22. Havranek J., Kalit S., Antunac N., Samaržija D. (2014). *Sirarstvo*. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb.
23. Hayes M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Hill C., Stanton C. (2006). Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(3): 2260-2264.
24. Hernandez-Ledesma B., Garcia-Nebot M., Fernandez-Tome S., Amigo L., Recio I. (2014). Dairy protein hydrolysates: peptides for health benefits. *International Dairy Journal*. 38(2): 82-100.
25. Hernández-Ledesma B., Miralles B., Amigo L., Ramos M., Recio I. (2005). Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 1041-1048.
26. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=50502> (pristupljeno 4.5.2019.)
27. <https://www.yourdictionary.com/ic50> (pristupljeno 7.9.2019.)
28. Kenny O., FitzGerald R.J., O'Cuinn G., Beresford T., Jordan K. (2003). Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*. 13(7): 509-516.
29. Korhonen H., Pihlanto A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 16: 945-960.
30. Korhonen H.J. (2009). Bioactive Components in Bovine Milk. U: *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. (ur. Park W.Y.). Wiley-Blackwell. Iowa. SAD.
31. Kunda P.B., Benavente F., Catala-Clariana S., Gimenez E., Barbosa J., Sanz-Nebot V. (2012). *Journal of Chromatography A*. 1229: 121-128.

32. Leclerc P-L., Gauthier S.F., Bachelard H., Santure M., Roy D. (2002). Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*. 12: 995-1004.
33. Lorenzin P.C., Meisel H. (2005). Influence of trypsin action in yoghurt milk on the release of caseinophosphopeptide-rich fractions and physical properties of the fermented products. *International Journal of Dairy Technology*. 58(2): 119-124.
34. Madureira A.R., Tavares T., Gomes M.P., Pintado M.E., Malcata F.X. (2010). Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *American Dairy Science Association*. 93: 437-455.
35. Maeno M., Yamamoto N., Takano T. (1996). Isolation of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*. 79(8): 1316-1321.
36. Mann B., Althira S., Sharma R., Kumar R., Sarkar P. (2019). Bioactive Peptides from Whey Proteins. U: *Whey Proteins* (Deeth C.H., Bansal N., ur.). Academic Press. 519-547.
37. Mann B., Athira S., Sharma R., Bajaj R. (2017). Bioactive peptides in Yogurt. U: *Yogurt in Health and Disease Prevention*. (ur. Nagendra P. Shah). Elsevier Inc. 411-426.
38. Mann B., Kumari A., Kumar R., Sharma R., Prajapati K., Mahboob S., Athira S. (2014). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*. 52(6): 3235-3241.
39. Matar C., Goulet J. (1996). β -casomorphin 4 from milk fermented by a mutant of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*. 6(4): 383-397.
40. Meisel H., FitzGerald R.J. (2003). Biofunctional Peptides from Milk Proteins: Mineral Binding and Cytomodulatory Effects. *Current Pharmaceutical Design*. 9: 1289-1295.
41. Migliore-Samour D., Jollès P., (1988). Casein Prohormone with an immunomodulating role for the newborn. *Experientia*. 44(3): 188-193.
42. Miquel E., Gomez J.A., Alegría A., Barberá R., Farré R., Recio I. (2006). Identification of casein phosphopeptides after simulated gastrointestinal digestion by tandem mass spectrometry. *Eur Food Res Technol* 222: 48-53.
43. Mizushima S., Ohshige K., Watanabe J., Kimura M., Kadowaki T., Nakamura Y., Tochikubo O., Ueshima H. (2004). Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *American Journal of Hypertension*. 17(8): 701-706.
44. Mohanty D., Mohapatra S., Misra S., Sahu P.S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23:577-583.
45. Nguyen D.D., Johnson S.K., Buseti F., Solah V.A. (2015). Formation and Degradation of Beta-casomorphins in Dairy Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 55(14): 1955-1967.
46. Nielsen S. D., Beverly R. L., Qu Y., Dallas D. C. (2017). Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chemistry*. 232: 673-682.

47. Pan D., Luo Y., Tanokura M. (2005). Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004. Food Chemistry. 91(1): 123-129.
48. Papadimitriou C.G., Vafopoulou-Mastrogiannaki A., Vieira Silva S., Gomes A-M., Malcata F.X., Alichanidis E. (2007). Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. Food Chemistry. 105(2): 647-656.
49. Park W.Y. (2009). Bioactive Components in Goat Milk. U: Bioactive Components in Milk and Dairy Products. (ur. Park W.Y.). Wiley-Blackwell. Iowa. SAD.
50. Park Y. W., Nam M. S. (2015). Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. Korean J. Food Sci. An. 35(6): 831-840.
51. Park Y.W., Juárez M., Ramos M., Haenlein G.F.W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. Small Ruminant Research. 68: 88-113.
52. Pihlanto A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. International Dairy Journal. 16: 1306-1314.
53. Pihlanto A. (2011). Milk Protein Products: Bioactive peptides. Encyclopedia of Dairy Sciences,. 2nd Edition: 879-886.
54. Pihlanto A. (2016). Milk Proteins: Bioactive Peptides. Encyclopedia of Dairy Sciences,. 2nd Edition: 879-886.
55. Pihlanto-Leppälä A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. Trends in Food Science and Technology. 11: 347-356.
56. Pihlanto-Leppälä A., Rokka T., Korhonen H. (1998). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. International Dairy Journal. 8: 325-331.
57. Pripp A. H., Sorenson R., Stepaniak L., Sorhaug T. (2006). Relationship between proteolysis and angiotensin I-converting enzyme inhibition in different cheeses. LWT-Food Science and Technology. 39(6): 677-683.
58. Quiros A., Hernández-Ledesma B., Ramos M., Amigo L., Recio I. (2005). Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. Journal of Dairy Science. 88(10): 3480-3487.
59. Recio I., Fuente M.A., Juárez M., Ramos M. (2009). Bioactive Vomponents in Sheep Milk. U: Bioactive Components in Milk and Dairy Products. (ur. Park W.Y.). Wiley-Blackwell. Iowa. SAD.
60. Reyes-Díaz A., González-Córdova A.A.F., Hernández-Mendoza A., Reyes-Díaz R., Vallejo-Cordoba B. (2017). Immunomodulation by hydrolysates and peptides derived from milk proteins. International Journal of Dairy Technology. 70: 1-9.
61. Rizzello C.G., Losito I., Gobbetti M., Carbonara T., De Bari M.D., Zambonln P.G. (2005). Antibacterial Activities of Peptides from the Water-Soluble Extracts of Italian Cheese Varieties. Journal od Dairy Science. 88(7): 2348-2360.
62. Rojas-Ronquillo R., Cruz-Guerrero A., Flores-Nájera A., Rodríguez-Serrano G., Gómez-Ruiz L., Reyes-Grajeda J.P., Jiménez-Guzmán J., García-Garibay M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides

- released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. International Dairy Journal. 26: 147-154.
63. Sabeena Farvin K.H., Baron C.P., Skall Nielsen N., Otte J., Jacobsen C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 – Characterisation of peptide fractions. Food Chemistry. 123: 1090-1097.
 64. Sadat-Mekmene L., Genay M., Atlan D., Lortal S., Gagnaire V. (2011). Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. International Journal of Food Microbiology. 146: 1-13.
 65. Sah B.N.P., Vasiljevic T., McKechnie S., Donkor O.N. (2016). Antioxidative and Antibacterial Peptides Derived from Bovine Milk Proteins. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 58(5): 726-740.
 66. Saint-Sauveur D., Gauthier S., Boutin Y., Montoni A., Fliss I. (2009). Effect of feeding whey peptide fractions on the immune response in healthy and *Escherichia coli* infected mice. International Dairy Journal. 19(9): 537-544.
 67. Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. Journal of Dairy Science. 83(7): 1434-1440.
 68. Samaržija D. (2015). Fermentirana mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb.
 69. Seppo L. (2001). The effect of *Lactobacillus helveticus* LBK-16H fermented milk on hypertension – a pilot study on humans. Milchwissenschaft. 57: 124-127.
 70. Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T., Korpela R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. American Journal of Clinical Nutrition. 77(2): 326-330.
 71. Sienkiewicz- Szlapka E., Jarmolowski B., Krawczuk S., Kostyra E., Kostyra H., Iwan M. (2009). Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. International Dairy Journal 19: 258-263.
 72. Silva S.V., Malcata F.X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. International Dairy Journal. 15: 1-15.
 73. Smacchi E., Gobetti M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. Food Microbiology. 17: 129-141.
 74. Stepaniak L., Fox P. F., Sørhaug T., Grabska J.J. (1995). Effect of peptides from the sequence 58-72 of β -casein on the activity of endopeptidase, aminopeptidase and X-prolyl-dipeptidyl amino-peptidase from *Lactococcus*. Agricultural and Food Chemistry. 43(3): 849-853.
 75. Stuknyte M., Cattaneo S., Masotti F., De Noni I. (2015). Occurrence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and in their digestates following *in vitro* static gastrointestinal digestion. Food Chemistry. 168: 27-33.
 76. Summer A., Foraggioni P., Franceschi P., Di Frangia F., Righi F., Malacarne M. (2017). Cheese as Functional Food: The Example of Parmigiano Reggiano and Grana Padano. Food Technology and Biotechnology. 55(3): 277-289.
 77. Sütas Y., Soppi E., Korhonen H., Syväoja E-L., Saxelin M., Rokka T., Isolauri E. (1996). Suppression of lymphocyte proliferation *in vitro* by bovine caseins hydrolyzed with *Lactobacillus casei* GG-derived enzymes. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 98(1): 216-224.

78. Tellez A., Corredig M., Brovko L.Y., Griffiths M.W. (2010). Characterization of immune-active peptides obtained from milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. Journal of Dairy Research. 77: 129-136.
79. Tratnik Lj., Božanić R. (2012). Mlijeko i mliječni proizvodi. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb.
80. Ueno K., Mizuno S., Yamamoto N. (2004). Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4. Letters in Applied Microbiology. 39(4): 313-318.
81. Yamamoto N., Akino A., Takano T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. Journal of Dairy Science. 77(4): 917-922.
82. Zsuzsanna B. (2008). Bioactive components of milk. Springer. New York. SAD.
83. Zucht H-D., Raida M., Adermann K., Mägert H-J., Frossmann W-G. (1995). Casocidin-I: a casein- α s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. FEBS Letters. 372(2-3): 185-188.

Životopis

Dana Janda rođena je 1994. godine u Zagrebu. Pohađala je VII. Gimnaziju u Zagrebu od 2009. do 2013. godine, a državnu maturu položila je 2013. godine. Služi se engleskim i njemačkim jezikom, a za engleski jezik položila je A stupanj državne mature 2013. godine. Osnovne vještine iz rada na računalu stekla je tijekom gimnazijskog obrazovanja. Godine 2017. završila je prediplomski studij Animalne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu obranom rada na temu „Tehnologija proizvodnje kumisa“ pod vodstvom mentorice doc. dr. sc. Ive Dolenčić Špehar te joj je dodjeljena diploma cum laude. Stručnu praksu u sklopu prediplomskog studija odradila je u laboratoriju Zavoda za opće stočarstvo. Godine 2017. upisala je diplomski studij Proizvodnja i prerada mlijeka na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a stručnu praksu odradila je u mini mljekari „Mliječno s potpisom d.o.o.“, gdje je uz do tada usvojena teorijska znanja stekla i praktično znanje. Sudjelovala je na Danu otvorenih vrata Agronomskog fakulteta. Tijekom studiranja iskusila je rad preko Student servisa u pekari i dućanu. U 2018./2019. godini dobitnica je stipendije za izvrsnost Sveučilišta u Zagrebu te Nagrade za marljivost i ostvarenje uzornih rezultata u studiranju na diplomskom studiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.