

Biologicznie aktywne peptydy pochodzące z białek mleka^{*)}

MAŁGORZATA DAREWICZ, ANNA IWANIAK, PIOTR MINKIEWICZ

Katedra Biochemii Żywności, Wydział Nauki o Żywności,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 2, 10-729 Olsztyn

Otrzymano 08.08.2013

Zaakceptowano 16.09.2013

Darewicz M., Iwaniak A., Minkiewicz P.

Biologically active peptides derived from milk proteins

Summary

Milk proteins possess a wide range of nutritional and biological properties. They are used as a source of energy, amino acids, vitamins, and minerals which are needed for the growth and development of organisms. Milk proteins contain physiologically active peptides encrypted in the protein sequences. Peptides with biological activity are produced during gastrointestinal digestion or food processing and could play an important role in metabolic regulation and modulation. This suggests the potential use of biopeptides as nutraceuticals and ingredients of functional foods to promote health and reduce the risk of diseases. Milk-derived bioactive peptides were shown to have antihypertensive, antithrombotic, antimicrobial, antioxidative, opioid, mineral-binding properties and anticancer activities. *In vitro* and *in vivo* studies are currently being carried out to identify milk bioactive peptides as well as to study their bioavailability and molecular mechanisms of action. Milk as a traditional food product can serve as the example of a functional food and be relevant for health-promoting as well as health-preventing factors.

Keywords: biological activity, bioactive peptides, milk, proteins

Białka mleka charakteryzują się wieloma właściwościami odżywczymi i biologicznymi. Są źródłem energii, aminokwasów, witamin, składników mineralnych niezbędnych do wzrostu i rozwoju organizmu. Mleko krowie zawiera ok. 5% laktozy, 4% tłuszczu, 3,2% białka i 0,7% składników mineralnych (29). Wahania w zawartości poszczególnych składników uzależnione są m.in. od stadium laktacji czy stanu odżywienia zwierzęcia. Obok nadal prowadzonych eksperymentów dotyczących wartości odżywczych składników mleka, współczesne badania naukowe koncentrują się na ich potencjale biofunkcyjnym (29, 33). Udowodniono, że ich aktywność biologiczna może być kojarzona m.in. z obecnością białek pełniących rolę prekursorów biologicznie aktywnych peptydów (33). Każde białko może być źródłem peptydów o zróżnicowanej aktywności biologicznej (np. przeciwnadciśnieniowej, antymikrobiologicznej lub antynowotworowej). Potencjalnie biologicznie aktywne fragmenty białek to motywy strukturalne odpowiadające bioaktywnym peptydom, pozostające nieaktywne w sekwencjach białek macierzystych. Po uwolnieniu z białek prekursorowych przez enzymy

proteolityczne mogą wpływać na funkcje fizjologiczne organizmu (11, 19). Takie peptydy mogą być stosowane jako element profilaktyki, a nawet terapii wielu schorzeń cywilizacyjnych. Większość komercyjnie dostępnych na rynku światowym produktów spożywczych zawierających peptydy bioaktywne to produkty mleczarskie. W badaniach klinicznych dla przynajmniej dwóch z nich o nazwach handlowych Calpis[®] (Japonia) i Evolus[®] (Finlandia) udowodniono możliwość działania profilaktycznego. W produktach tych zidentyfikowano peptydy przeciwnadciśnieniowe Ile-Pro-Pro oraz Val-Pro-Pro. Innymi przykładami produktów handlowych z bioaktywnymi peptydami są: hydrolizat białek serwatkowych „BioZate” (USA), zawierający fragmenty pochodzące z laktoglobuliny- β (β -LG) oraz „C12 peptide[®]” (Holandia) stosowany jako dodatek do żywności i wzbogacony peptydem przeciwnadciśnieniowym o sekwencji Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys otrzymanym w wyniku hydrolizy kazeiny (33).

Możliwości otrzymywania

Bioaktywne peptydy pochodzące z białek mleka po raz pierwszy opisano w 1950 r., kiedy wykazano, że spożywanie fosfopeptydów skutkuje nasileniem

^{*)} Praca sfinansowana ze środków Katedry Biochemii Żywności UWM w Olsztynie.

procesu kalcyfikacji u niemowląt z krzywicą (11). Bioaktywne peptydy mogą być uwolnione ze swoich białkowych prekursorów w wyniku hydrolizy enzymatycznej prowadzonej przez enzymy układu trawiennego, procesów fermentacji prowadzonych z udziałem proteolitycznych kultur starterowych, proteolizy z udziałem enzymów pochodzenia roślinnego lub z mikroorganizmów bądź kombinacji wymienionych metod (16). Wykazano, że podczas trawienia głównych składników kazeiny mleka może być uwalnianych ok. 10-60 mg bioaktywnych peptydów, a z 1 g białka mleka można teoretycznie otrzymać 24-65 mg peptydów opioidowych (4). Podczas otrzymywania bioaktywnych peptydów w warunkach *in vitro* najczęściej stosowanym enzymem jest trypsyna (20). W pracach przeglądowych omówiono wykorzystanie w celu otrzymania bioaktywnych peptydów z białek m.in. mleka także innych enzymów trawiennych, takich np. jak chymotrypsyna, pankreatyna, pepsyna oraz ich kombinacji, a także enzymów pochodzenia mikrobiologicznego (4, 6, 14, 16, 20). W wielu badaniach udowodniono zarówno możliwości uwalniania bioaktywnych peptydów podczas fermentacji mikrobiologicznych, jak i ich obecność w produktach końcowych takich procesów – tj. serach oraz fermentowanych napojach mleczarskich (8, 16, 33). Przykładowo, najbardziej znane tripeptydy o aktywności przeciwnadciśnieniowej, tj. Val-Pro-Pro oraz Ile-Pro-Pro pochodzące w kolejności z kazeiny- β (β -CN) i - κ (κ -CN), zostały zidentyfikowane w mleku poddanym fermentacji z udziałem szczepów *Lactobacillus helveticus* oraz *Saccharomyces cerevisiae* (33), a także w różnych gatunkach sera (3). Stwierdzono, że zawartość bioaktywnych peptydów zwiększa się w miarę dojrzewania sera, np. sery szwajcarskie zawierają od 94,5 mg Ile-Pro-Pro do 224,0 mg Val-Pro-Pro w 1 kg (3). Z kolei dawka peptydów przeciwnadciśnieniowych, która wynosiła od 1,2 do 1,6 mg na dobę (tj. ok. 95 ml fermentowanego mleka), powodowała obniżenie skurczowego ciśnienia krwi pacjentów z nadciśnieniem tętniczym o 14,9 mmHg, a rozkurczowego – o 8,8 mmHg.

Wchłanianie i transport

Aktywność biopeptydów wykazywana w warunkach *in vitro* nie zawsze przekłada się na efekty biologiczne *in vivo* ze względu na mechanizmy molekularne absorpcji, transportu oraz podatności na degradację do nieaktywnych fragmentów (12). Fundamentalne znaczenie ma zachowanie stabilnej, natywnej struktury peptydów podczas interakcji z receptorem (28). Trawienie białek w przewodzie pokarmowym zaczyna się w żołądku od hydrolizy pepsyną i jest kontynuowane w świetle jelita cienkiego z udziałem trypsyny, α -chymotrypsyny, elastazy oraz karboksypeptydazy A i B, a także endopeptydazy i dipeptydazy, co prowadzi do wytworzenia mieszaniny oligopeptydów i wolnych aminokwasów. Wchłanianie wolnych aminokwasów odbywa się poprzez transport aktywny

z udziałem przenośników zależnych i niezależnych od jonów sodu. Istnieją dowody wskazujące, że bioaktywne peptydy pochodzące z mleka mogą być wchłaniane i przedostawać się do krwiobiegu w postaci niezmięnionej, a następnie wpływać na funkcje fizjologiczne organizmu (30). Wchłanianie peptydów przez jednowarstwowe komórki nabłonka jelitowego może odbywać się w różny sposób. Di- i tripeptydy są transportowane za pomocą nośnika PepT1. PepT1 znajduje się w obrębie rąbka szczoteczki jelita cienkiego i przenosi di- oraz tripeptydy wprost do komórek nabłonka jelitowego. Następnie są one hydrolizowane przez peptydazy cytoplazmatyczne do aminokwasów, które są transportowane wzdłuż błony boczno-podstawnej z udziałem nośnika aminokwasów. Niektóre di- i tripeptydy odporne na działanie peptydaz wewnątrzkomórkowych mogą nadal pozostawać w niezmięnionej formie i być przenoszone za pomocą nośnika aminokwasów wzdłuż błony. Istnieje możliwość absorpcji bioaktywnych peptydów także na drodze przenikania przez szczelne połączenia jelitowe tworzone przez białka membranowe znajdujące się w płynie cytoplazmatycznym. Pętle zewnątrzkomórkowe tych białek są szczelnie ze sobą połączone, ale na ich spoinie znajdują się niewielkie pory umożliwiające przenikanie związków niskocząsteczkowych na drodze biernej dyfuzji. Wykazano, że peptyd przeciwnadciśnieniowy z kazeiny- β o sekwencji Val-Pro-Pro ulegał wchłanianiu na drodze mechanizmu „szczelnego połączenia”. W wyjątkowych przypadkach oligopeptydy wykazujące powinowactwo do powierzchni błony komórkowej mogą być przenoszone przy wykorzystaniu mechanizmu transcytozy, aczkolwiek mechanizm ten nie przyczynia się w sposób istotny do wchłaniania peptydów (28). Przeprowadzono badania dotyczące mechanizmu transportu bioaktywnych peptydów w komórkach Caco-2. Wykazano, że peptydy przeciwnadciśnieniowe, w tym inhibitory ACE (np. Ile-Phe i Ala-Phe) oraz opioidowe zachowują stabilną strukturę podczas przenikania przez monowarstwę nabłonka (30, 34). Stwierdzono, że efektywność transportu zależy od ładunku, masy cząsteczkowej oraz hydrofobowości peptydów (30).

Biologiczna aktywność peptydów białek mleka

Podstawowym kryterium podziału bioaktywnych peptydów może być ich aktywność fizjologiczna. Wiele peptydów wykazuje kilka rodzajów aktywności jednocześnie, np. makropeptyd uwalniany pod wpływem chymozyny z κ -CN (31). Peptydy zidentyfikowane w białkach mleka charakteryzują się m.in. aktywnością: przeciwnadciśnieniową, przeciwrzepliwą, antymikrobiologiczną, antyoksydacyjną, opioidową, wiążącą metale i mikroelementy, przeciwnowotworową (14).

Peptydy o aktywności przeciwnadciśnieniowej to najlepiej poznana grupa biologicznie aktywnych peptydów pochodzących z białek mleka (13). Większość

z nich to inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) [EC 3.4.15.1.]. ACE katalizuje hydrolizę nieaktywnego prohormonu – angiotensyny I do angiotensyny II – jednego z najważniejszych czynników powodujących skurcz naczyń krwionośnych, a w konsekwencji podwyższenie ciśnienia krwi (1). Zwykle są to di- lub tripeptydy bogate w aminokwasy hydrofobowe. Wzrost hydrofobowości aminokwasów w pozycji C-końcowej sprzyja intensyfikacji aktywności przeciwnadciśnieniowej (24). Peptydy-inhibitory ACE są odporne na działanie endopeptydaz przewodu pokarmowego i mogą być, po pokonaniu bariery jelitowej, stosunkowo łatwo wchłaniane do krwi (28). Peptydy pochodzące z kazeiny, które uczestniczą w regulowaniu ciśnienia krwi, to kazokininy. Są to np. fragmenty kazeiny- α_{s1} (α_{s1} -CN): 23-24, 23-27, 146-147, 194-199, 102-109, kazeiny- α_{s2} (α_{s2} -CN): 174-179, 198-202, β -CN: 74-76, 84-86, 177-183, 193-202, κ -CN: 108-110 (7, 9). Podawanie szczerom podskórnie peptydów pochodzących z kazeiny hamowało aktywność ACE i obniżało ciśnienie skurczowe od 2 mmHg (β -CN 140-143) do 34 mmHg (α_{s1} -CN 23-24) (9). Wykazano, że hydrolizaty kazeiny mają większą aktywność przeciwnadciśnieniową niż hydrolizaty białek serwatkowych, zaś termolizyna, proteinaza K i trypsyna były enzymami zalecanymi do efektywnego otrzymywania peptydów hipotensyjnych. Charakterystyczne dla peptydów przeciwnadciśnieniowych pochodzących z białek serwatkowych są m.in. fragmenty 50-52/53 i 99-108 pochodzące laktoalbuminy- α (α -LA), fragmenty 9-14, 22-25, 78-80, 81-83, 142-146/148 pochodzące z β -LG oraz fragment 208-216 pochodzący z albuminy serum krwi (15). Peptydy te podane podskórnie szczerom obniżały ciśnienie krwi i nie wpływały na rytm serca. Jak dotąd peptydy uwolnione w wyniku hydrolizy laktoferyny znane były z właściwości antymikrobiologicznych i przeciwnowotworowych. Przeprowadzone badania (25) wykazały, że peptydy Leu-Ile-Trp-Lys-Leu, Arg-Pro-Tyr-Leu oraz Leu-Asn-Asn-Ser-Arg-Ala-Pro pochodzące z laktoferyny bydłowej obniżały ciśnienie krwi u szczerów. Spośród nich peptyd o sekwencji Leu-Ile-Trp-Lys-Leu charakteryzował się największą bioaktywnością, a efekt redukcji ciśnienia utrzymywał się przez 24 godziny od momentu jego podania.

Wykazano, że peptydy zwane kazoplatelinami, pochodzące z C-końcowego fragmentu krowiej κ -CN mają właściwości przeciwkrzepliwie. Są to następujące fragmenty: 106-116, 106-112, 112-116, 113-116 (14). Badania krwi 5-dniowych noworodków żywionych humanizowanymi odżywkami mlecznymi produkowanymi na bazie mleka krowiego potwierdziły obecność w osoczu peptydów o właściwościach antyagregacyjnych pochodzących z κ -CN (26).

Większość peptydów antybakteryjnych uwalnianych jest z białek mleka w wyniku hydrolizy enzymatycznej lub po jego ogrzaniu i/lub alkalizacji. Aktywność antybakteryjna peptydów przypisywana jest ich zdol-

ności do przyjmowania struktury α -helikalnej oraz interakcji z błoną komórkową gospodarza, co prowadzi do tworzenia kanałów jonowych i w konsekwencji zmian przenikalności, a w kolejnym etapie – lizy komórek (17). Właściwości antymikrobiologiczne wobec *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* oraz *Candida albicans* wykazuje fragment 1-23 α_{s1} -CN (isracydyna) (17). Z kolei fragment 165-203 α_{s2} -CN (kazocydyna I) może hamować wzrost *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* (35). Inne przykłady peptydów o aktywności antymikrobiologicznej to: fragmenty 183-207 i 164-179 α_{s2} -CN oraz fragment 184-209 β -CN (17). Antybakteryjne właściwości posiada także κ -CN i izolat kazeiny. Podczas podskórnego podawania kazeiny myszom zakażonym bakteriami Gram(+) i Gram(-) stwierdzono jej charakter prewencyjny, chroniący zwierzęta przed śmiercią (21). Aktywność antybakteryjną wykazuje także fragment 106-169 κ -CN (GMP), zapobiegając np. adhezji bakterii *Actinomyces viscosus Ny1*, *Staphylococcus sanguis OMZ9*, *Staphylococcus mutans OMZ176*. Znalazło to zastosowanie w objętym ochroną patentową sposobie produkcji preparatów stomatologicznych (17, 22). GMP jest także zdolny do wiązania toksyny produkowanej przez *Vibrio cholerae*. Stwierdzono, że GMP stymuluje rozwój bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* oraz że odżywka wzbogacona w GMP redukuje nasilenie biegunki wywołanej enteropatogennym szczepem *E. coli* (22). Także białka serwatkowe są źródłem peptydów antybakteryjnych. Trypsyna uwalnia z α -LA fragmenty 1-5, (17-31)S-S(109-114), z β -LG fragmenty 15-20, 25-40, 78-83, 92-100, zaś chymotrypsyna z α -LA fragment (61-68)S-S(75-80) (22). Aktywność antybakteryjną tych peptydów w stosunku do bakterii Gram(+) stwierdzono zarówno w testach *in vitro*, jak i *in vivo* (22). Hydroliza enzymatyczna uwalnia z laktoferyny fragmenty o aktywności mikrobiologicznej, tj. laktoferynę (fr. 17-41) oraz laktoferampinę (fr. 268-284). Przeciwbakteryjne działanie fragmentów laktoferyny związane jest z możliwością wiązania jonów żelaza wymaganego do wzrostu niektórych bakterii i grzybów. Fragmenty te poprzez wiązanie się do fimbrialnych adhezyn bakterii uniemożliwiają adhezję bakterii na powierzchni komórek. Laktoferyna i jej peptydy wykazują również właściwości przeciwgrzybicze, przeciw pasożytnicze i przeciwwirusowe (10).

Peptydy białek mleka mogą także obniżać szybkość enzymatycznych i nieenzymatycznych procesów oksydacji. Te naturalne przeciwutleniacze hamując reakcje wolnorodnikowe, mogą zapobiegać chorobom degeneracyjnym oraz być stosowane jako środki konserwujące żywność. Głównymi składnikami peptydów antyoksydacyjnych są reszty aminokwasowe histydyny, tyrozyny, metioniny, lizyny i tryptofanu, które w postaci wolnej są także przeciwutleniaczami. Aktywność antyoksydacyjną wykazano w przypadku izolatu kazeiny, -CN i α_{s1} -CN oraz ich peptydów, ka-

zeinofosfopeptydów, izolatu białek serwatkowych, β -LG i α -LA (23).

Peptydy opioidowe to związki o farmakologicznym podobieństwie do opium. Efektami ich działania są np.: znieczulenie na ból, obniżenie ciśnienia krwi, uczucie sytości, obniżenie oraz zmiany zachowań seksualnych. Charakterystyczne dla peptydów opioidowych pochodzących z kazeiny- β są m.in. fragmenty: 60-70 (β -kazomorfin-11), 60-66 (β -kazomorfin-7), 60-64 (β -kazomorfin-5). Aktywność opioidową wykazuje również fragment 90-96 α_1 -CN (18). Wysoka zawartość reszt proliny w β -kazomorfinach sprzyja ich małej podatności na działanie wielu enzymów proteolitycznych. Dzięki temu mogą pokonywać barierę krew-mózg oraz wpływać na funkcjonowanie centralnego i obwodowego układu nerwowego za pośrednictwem receptorów opioidowych przysadki mózgowej, podwzgórza, rdzenia kręgowego, nadnerczy i przewodu pokarmowego. Podanie 1 mg β -kazomorfiny-5 na kg masy ciała u myszy poprawia ich zdolność do uczenia się i zapamiętywania (27).

W wyniku hydrolizy enzymatycznej prowadzonej z udziałem trypsyny, z kazeiny można otrzymać kazeinofosfopeptydy (CPP) (5). Charakterystyczną cechą tych peptydów wiążących i transportujących metale (np. Ca, Mg, Fe) czy mikroelementy (np. Zn, Se) jest powtarzająca się sekwencja ufosforylowanej seryny, a także zawartość kwasu glutaminowego. CPP wiążące metale z uwagi na wysoką koncentrację ładunku ujemnego są odporne na degradację w przewodzie pokarmowym (4). Zidentyfikowano następujące sekwencje CPP z α_1 -CN: 43-58, 45-55, 59-79, 66-74, 106-119; z α_2 -CN: 2-21, 46-70, 55-75, 126-136, 138-149; z β -CN: 1-25, 1-28, 2-28.

Obiecująco kształtują się właściwości przeciwnowotworowe kompleksów ludzkiej α -LA i kwasu oleinowego o nazwie HAMLET (Human alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) oraz bydłowej α -LA i kwasu oleinowego o nazwie BAMLET (Bovine alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) (2). W badaniach wykorzystano model ludzkiego glejaka implantowanego bezgranicznie szczurom. Kompleksy redukowały masę guza i opóźniały wystąpienie objawów jego ucisku wewnątrz mózgowia. Sugerowano, że mechanizm działania polegał na indukowaniu apoptozy komórek nowotworowych. Kompleksy te z pozytywnym wynikiem zastosowano także w leczeniu pacjentów z brodawczakami skórnymi (2). W badaniach prowadzonych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* wykazano, że także laktoferyna i jej fragmenty posiadają właściwości przeciwnowotworowe (32). Główną korzyść z zastosowania laktoferyny w terapii nowotworów wypływa z jej właściwości immunostymulacyjnych. Modyfikacja układu immunologicznego połączona z konwencjonalną radioterapią lub chemioterapią zwiększała skuteczność leczenia chorób nowotworowych.

Białka mleka i ich fragmenty mogą pełnić w surowcach i produktach żywnościowych rolę składników o określonych właściwościach biologicznych, co może być wykorzystywane w produkcji żywności funkcjonalnej, profilaktyce, a nawet terapii wielu schorzeń. Na rynku dostępne są produkty zawierające biopeptydy badane w warunkach hodowli komórkowych, a następnie na modelach zwierzęcych i ludziach w celu określenia ich biologicznego działania. Nowe techniki produkcji, np. techniki separacji membranowej, mikro- i nanokapsułkowania mogą dostarczyć rozwiązania poprawiające ich stabilność w produktach żywnościowych oraz podczas trawienia i wchłaniania.

Piśmiennictwo

1. Bhuyan B. J., Mughesh G.: Angiotensin converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *Curr. Sci.* 2011, 101, 881-887.
2. Brinkmann C. R., Thiel S., Otzen D. E.: Protein-fatty acid complexes: Biochemistry, biophysics and function. *FEBS J.* 2013, 280, 1733-1749.
3. Büttikofer U., Meyer J., Sieber R., Wlather B., Wechsler D.: Occurrence of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *J. Dairy Sci.* 2008, 91, 29-38.
4. Clare D. A., Swaisgood H. E.: Bioactive milk peptides: A prospectus. *J. Dairy Sci.* 2000, 83, 1187-1195.
5. Cross K. J., Huq N. L., Reynolds E. C.: Casein phosphopeptides in oral health-chemistry and clinical applications. *Curr. Pharm. Design* 2007, 13, 793-800.
6. Darewicz M., Dziuba J., Dziuba M.: Functional properties and biological activities of bovine casein proteins and peptides. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2006, 15, 1, 79-86.
7. Erdmann K., Cheung B. W. Y., Schröder H.: The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem.* 2008, 19, 643-654.
8. FitzGerald R. J., Murray B. A.: Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol.* 2006, 59, 118-125.
9. FitzGerald R. J., Murray B. A., Walsh D. J.: Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* 2004, 143, 980S-988S.
10. García-Montoya I. A., Cendón T. S., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q.: Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *BBA – General Subjects* 2012, 1820, 226-236.
11. Hartmann R., Meisel H.: Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007, 18, 163-169.
12. Hernández-Ledesma B., Quirós A., Amigo L., Recio I.: Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *Int. Dairy J.* 2007, 17, 42-49.
13. Iwaniak A., Dziuba J.: Animal and plant origin proteins as the precursors of peptides with ACE inhibitory activity. Proteins evaluation by means of in silico methods. *Food Technol. Biotechnol.* 2009, 47, 441-449.
14. Iwaniak A., Minkiewicz P.: Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2007, 6, 5-15.
15. Jäkälä P., Vapaatalo H.: Antihypertensive peptides from milk proteins. *Pharmaceuticals* 2010, 3, 251-272.
16. Korhonen H., Pihlanto A.: Bioactive peptides: novel applications for milk proteins. *App. Biotechnol. Food Sci. Policy* 2003, 1, 133-144.
17. López-Exposito I., Recio I.: Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008, 606, 271-293.
18. Meisel H., FitzGerald R. J.: Opioid peptides encrypted in milk proteins. *Brit. J. Nutr.* 2000, 84, S27-S31.
19. Minkiewicz P., Dziuba J., Darewicz M., Iwaniak A., Dziuba M., Nałęcz D.: Food peptidomics. *Food Technol. Biotechnol.* 2008, 46, 1-10.
20. Möller N. P., Scholz-Ahrens K. E., Roos N., Schrezenmeir J.: Bioactive peptides and proteins from foods: indications for health effects. *Eur. J. Nutr.* 2008, 47, 171-182.
21. Noursadeghi M., Bickerstaff M. C., Herbert J., Moyes D., Cohen J., Pepys M. B.: Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J. Immunol.* 2002, 169, 913-919.
22. Pellegrini A.: Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr. Pharm. Des.* 2003, 9, 1225-1238.

23. Power O., Jakeman P., FitzGerald R. J.: Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids* 2013, 44, 797-820.
24. Pripp A. H., Isaksson T., Stepaniak L., Sørhaug T.: Quantitative structure activity relationship (QSAR) of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *Eur. Food Res. Technol.* 2004, 219, 579-583.
25. Ruiz-Giménez P., Salom J. B., Marcos J. F., Vallés S., Martínez-Maqueda D., Recio I., Torregrosa G., Alborch E., Manzanares P.: Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. *Food Chem.* 2012, 13, 266-273.
26. Rutherford K. J., Gill H. S.: Peptides affecting coagulation. *Brit. J. Nutr.* 2000, 84, (Suppl. 1), S99-S102.
27. Sakaguchi M., Koseki M., Wakamatsu M., Matsumura E.: Effects of systemic administration of beta-casomorphin-5 on learning and memory in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2006, 530, 81-87.
28. Segura-Campos M., Chel-Guerrero L., Betancur-Ancona D., Hernandez-Escalante V. M.: Bioavailability of bioactive peptides. *Food Rev. Int.* 2011, 27, 213-226.
29. Séverin S., Wenshui X.: Milk biologically active components as nutraceuticals: Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005, 45, 645-656.
30. Stenkiewicz-Szlapka E., Jarmolowska B., Krawczuk S., Kostyra E., Kostyra H., Bielkiewicz K.: Transport of bovine milk-derived peptides across a Caco-2 monolayer. *Int. Dairy J.* 2009, 19, 252-257.
31. Thomä-Worringer C., Sørensen J., López-Fandiño R.: Health effects and technological features of caseinomacropptide. *Int. Dairy J.* 2006, 16, 1324-1333.
32. Tuccari G., Barresi G.: Lactoferrin in human tumours: Immunohistochemical investigations during more than 25 years. *BioMetals* 2011, 24, 775-784.
33. Udenigwe C. C., Aluko R. E.: Food-protein derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci.* 2012, 71, R11-R24.
34. Zhu X.-L., Watanabe K., Shiraishi K., Ueki T., Noda Y., Matsui T.: Identification of ACE-inhibitory peptides in salt-free soy sauce that are transportable across Caco-2 cell monolayers. *Peptides* 2008, 29, 338-344.
35. Zucht H. D., Raida M., Adermann K. J., Forssman W. G.: Casocidin-I: a casein- α_2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.* 1995, 372, 185-188.

Adres autora: prof. dr hab. Małgorzata Darewicz, ul. Oczapowskiego 2, 10-729 Olsztyn; e-mail: darewicz@uwm.edu.pl