



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI  
RISORSE NATURALI E AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN  
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

Peptidi bioattivi: caratteristiche e applicazione nell'industria  
alimentare

Relatore  
Prof. Vianello Fabio  
Correlatrice  
Dott.ssa Tonolo Federica

Laureando  
Hajir Marouane  
Matricola n. 2018064

ANNO ACCADEMICO 2023/2024



# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>1: INTRODUZIONE</b> .....	5
1.1 CONTESTO E IMPORTANZA APPLICAZIONI PEPTIDI BIOATTIVI .....	5
1.2: SCOPO E OBIETTIVO TESI.....	6
<b>2: PEPTIDI BIOATTIVI: CONCETTI FONDAMENTALI</b> .....	7
2.1: DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE PEPTIDI BIOATTIVI .....	8
2.2 : MECCANISMO D'AZIONE DEI PEPTIDI BIOATTIVI .....	9
2.2.1: PEPTIDI OPIOIDI.....	10
2.2.2: PEPTIDI OSTEOPROTETTIVI .....	11
2.2.3: PEPTIDI ANTIPERTENSIVI .....	13
2.2.4: PEPTIDI IMMUNOMODULANTI.....	14
2.2.5: PEPTIDI ANTILIPIDEMICI E IPOCOLESTEROLEMICI .....	14
2.2.6: PEPTIDI ANTIOSSIDANTI .....	16
2.2.7: PEPTIDI ANTIMICROBICI.....	17
2.2.8: PEPTIDI ANTIDIABETICI.....	19
2.2.9: PEPTIDI ANTICANCEROGENI.....	20
<b>3: METODO SINTESI E PRODUZIONE PEPTIDI</b> .....	22
3.1 FONTI PEPTIDI NEGLI ALIMENTI .....	22
3.1.1 PEPTIDI BIOATTIVI DI ORIGINE ANIMALE .....	22
PEPTIDI BIOATTIVI DELL'INDUSTRIA ITTICA.....	27
3.2 PEPTIDI BIOATTIVI DI ORIGINE VEGETALE: .....	29
<b>4: SINTESI CHIMICA PEPTIDI BIOATTIVI</b> .....	31
4.1 FERMENTAZIONE.....	31
4.2 IDROLISI CHIMICA.....	32
4.3 IDROLISI ENZIMATICA .....	33
<b>5: APPROCCI PER PURIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE</b> .....	34
<b>6: SFIDE E LIMITAZIONI</b> .....	36
6.1: SFIDE TECNOLOGICHE.....	36
6.1.1: Stabilità peptidi durante lavorazione .....	36
6.1.2: Sfide nella formulazione .....	36
6.2: SFIDE ECONOMICHE .....	37
6.2.1: Costi di produzione e scarsa economia di scala.....	37
6.3: SFIDE REGOLATORIE .....	37
<b>7: CONCLUSIONI</b> .....	38
<b>8: BIBLIOGRAFIA</b> .....	39

## RIASSUNTO

L'industria alimentare sta assumendo un ruolo sempre più rilevante nel panorama globale, motivata da diversi fattori, tra cui l'incremento costante della popolazione mondiale, i mutamenti climatici e un crescente focus sull'attenzione alla salute pubblica.

In questo contesto, la comunità scientifica si è soffermata sui peptidi bioattivi come risorsa promettente. Questi piccoli frammenti proteici, derivati da proteine alimentari, non solo forniscono valore nutrizionale, ma esercitano attività biologica nell'organismo.

Si è scoperto che posseggono diverse funzioni benefiche che possono impattare positivamente il nostro corpo quali attività antipertensive, antiossidanti, antidiabetiche, attività antimicrobica, abilità di fissare e legare i minerali ed altre numerose funzioni. Grazie a queste numerose proprietà la ricerca su questi prodotti è aumentata, di conseguenza la letteratura è triplicata di volume nell'ultimo decennio, e attualmente il mercato globale dei peptidi bioattivi, è stato valutato a 48,6 miliardi di USD nel 2020 e dovrebbe raggiungere i 95,7 miliardi di USD entro il 2028.

Nell'industria alimentare queste molecole sono usate nella produzione di alimenti nutraceutici e funzionali, che hanno attirato molta attenzione, particolarmente per il loro impatto nella salute umana e per la prevenzione di alcune patologie.

Quest'industria ha trovato interesse in questi frammenti proteici in quando hanno anche proprietà tecnologiche utili, ad esempio emulsionante, organolettiche (conferimento diversi sapori), mentre altri potrebbero essere potenzialmente allergeni.

Le funzionalità di queste molecole non sono legate solamente all'industria alimentare, ma sono usate largamente anche nell'industria cosmetica e farmaceutica, e l'esplorazione dei peptidi bioattivi per applicazioni cosmetiche ha aperto nuove possibilità in questo settore.

Lo scopo di questa tesi è di far conoscere ai lettori le potenzialità dei peptidi bioattivi nel mercato globale, focalizzandosi sull'industria alimentare, e di come questi composti abbiano la potenzialità di diventare un nuovo metodo tramite il quale un'azienda alimentare potrebbe differenziare il proprio prodotto oppure potrebbe generare un valore aggiunto dai propri scarti di lavorazione.

## **ABSTRACT**

The food industry is playing a growing role in the world market due to various factors such as the constant increase in the world population, changing climate factors and greater attention to public health.

In this context, the scientific community has focused on bioactive peptides as a promising resource. These small protein fragments, derived from food proteins, not only provide nutritional value, but exert biological activity in the body.

It has been discovered that they possess various beneficial functions that can positively impact our body such as antihypertensive, antioxidant, antidiabetic activity, antimicrobial activity, ability to fix and bind minerals and numerous other functions. Thanks to these numerous properties, research on these products has increased, consequently the literature has tripled in volume in the last decade, and currently the global market for bioactive peptides has been valued at USD 48.6 billion in 2020 and is expected to reach USD 95.7 billion by 2028.

In the food industry these molecules are used in the production of nutraceutical and functional foods, which have attracted much attention, particularly for their impact on human health and for the prevention of certain diseases.

This industry has found interest in these protein fragments as they also have useful technological properties, for example emulsifying, organoleptic (giving different flavors), while others could potentially be allergenic.

The functionalities of these molecules are not only linked to the food industry but are also widely used in the cosmetic and pharmaceutical industries, and the exploration of bioactive peptides for cosmetic applications has opened up new possibilities in this sector.

The purpose of this thesis is to introduce readers to the potential of bioactive peptides in the global market, focusing on the food industry, and how these compounds have the potential to become a new method by which a food company could differentiate its product or could generate added value from its processing waste.

# 1: INTRODUZIONE

## 1.1 CONTESTO E IMPORTANZA APPLICAZIONI PEPTIDI BIOATTIVI

L'incessante crescita demografica globale pone sfide senza precedenti nel campo dell'alimentazione e nutrizione umana, spingendo la ricerca scientifica a esplorare nuovi orizzonti per garantire fonti alimentari sostenibili e salubri, implementando le tecnologie già presenti per quanto riguarda la scoperta di novel food e la sicurezza alimentare (Beddington, 2010). In questo contesto, i peptidi bioattivi emergono come protagonisti rivoluzionari nell'industria alimentare, offrendo non solo soluzioni innovative per il crescente fabbisogno nutritivo, ma anche promettendo benefici terapeutici in quanto possiedono un ampio spettro di effetti benefici, come funzioni antiossidanti, antinfiammatorie, antipertensive, antitumorali, antidiabetiche, antimicrobiche anti-invecchiamento. Dato il loro rapido sviluppo, è importante rivisitare la conoscenza di questi composti, compresa la loro produzione, bioattività, bioaccessibilità, disponibilità commerciale e gli ultimi lavori nel campo della bioinformatica strutturale. Grazie al vario campo di applicazioni in cui i peptidi bioattivi possono essere applicati, si è notato che la ricerca e pubblicazioni di questo composto sono triplicate (figura 1), e la dimensione del mercato dei peptidi bioattivi è stata valutata a 4.961 milioni di dollari nel 2023 e si prevede che raggiungerà 10.711 milioni di dollari entro il 2030 (Global Bioactive Peptides Market Size By Source, By Application, By Functionality, By Geographic Scope And Forecast Report ID: 32824 | Published Date: Apr 2024 | No. of Pages: 202 | Base Year for Estimate: 2023)

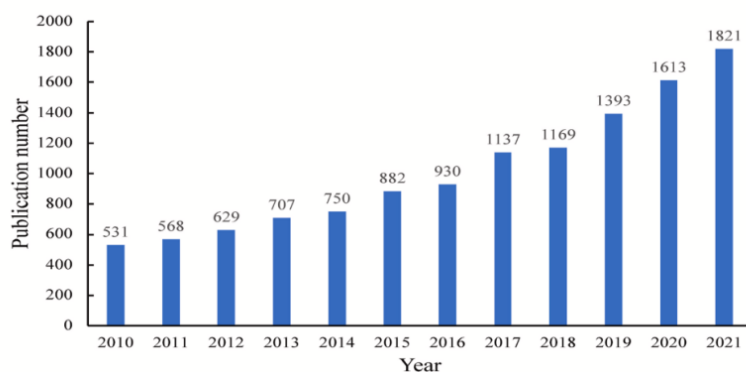


Fig. 1: Aumento delle pubblicazioni sui peptidi bioattivi. Sono state incluse tutte le pubblicazioni di ricerca che presentavano il termine “bioactive peptides” come parole chiavi. Immagine presa dal Web of science 2022.

## 1.2: SCOPO E OBIETTIVO TESI

La presente tesi si propone di esaminare il ruolo e il potenziale dei peptidi bioattivi come possibili ingredienti dei novel food, delineando le loro funzioni biologiche, le diverse tecnologie di produzione ed estrazione, la loro efficacia e le prospettive future nel settore alimentare.

Attraverso un'analisi approfondita, si intende fornire una panoramica generale sull'importanza di questi composti, , partendo dall'analisi delle caratteristiche dei peptidi bioattivi, comprese le loro proprietà chimiche, strutture e origine; evidenziando come la loro applicazione possa contribuire significativamente alla sostenibilità e all'innovazione nell'ambito della sicurezza alimentare globale e la battaglia per ridurre gli sprechi alimentari attraverso la valorizzazione dei sottoprodotti alimentari. Si poi prosegue, quindi, esplorando le potenziali applicazioni nell'industria alimentare, valutando quale sia l'efficacia di questi composti in diversi contesti, individuando diversi formulati di peptidi bioattivi che possono rappresentare un valido compromesso a problemi che il mondo odierno presenta.

## 2: PEPTIDI BIOATTIVI: CONCETTI FONDAMENTALI

Le proteine sono molecole naturali che svolgono diverse funzioni vitali nel nostro corpo, permettendo la crescita, rinnovamento dei tessuti, permettono la digestione, lo sviluppo delle difese immunitarie ed altre numerose funzioni essenziali per il funzionamento del corpo umano.

A partire da numerose proteine, soprattutto alimentari, possono essere prodotti dei frammenti proteici conosciuti anche come peptidi. Sono definiti bioattivi quei peptidi (BAPs: bioactive peptides) che esercitano un effetto benefico sulle funzioni corporee e sul mantenimento della salute generale e presentano dimensioni inferiori a 6kDa e una sequenza da 2 a 20 amminoacidi (Chakrabarti 2018). Finchè questi peptidi sono incorporati all'interno della proteina nativa, non mostrano alcuna attività biologica, ma una volta liberati grazie all'idrolisi enzimatica, come per esempio digestione enzimatica e fermentazione microbica, possono svolgere diverse funzioni, tra le quali un'azione antiipertensiva, antinfiammatoria e antiossidante.

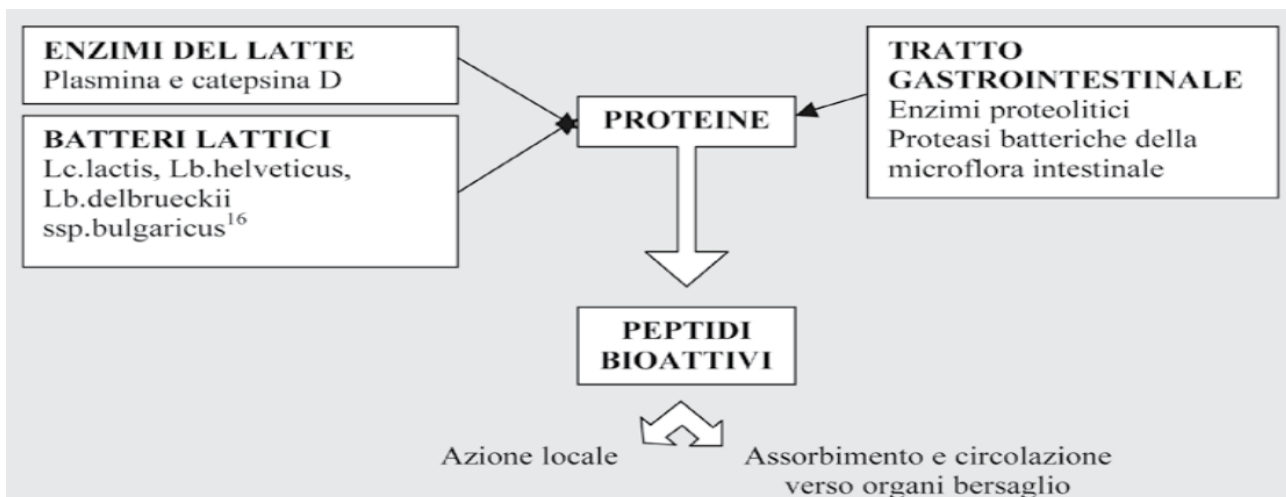


Fig. 2: Schema di processo formazione peptidi bioattivi grazie a fermentazione e digestione (Casali, 2016)



## 2.1: DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE PEPTIDI BIOATTIVI

I peptidi, una volta rilasciati a seguito dell'azione proteolitica degli enzimi digestivi, possono agire *in loco* o attraversare la barriera gastrointestinale e giungere nel circolo sanguigno. Successivamente possono essere diretti verso diversi organi, esplicando le loro azioni regolatorie (Lorenzo et al., 2018). Le applicazioni che questi composti hanno dimostrato di possedere, soprattutto nel mercato dell'industria alimentare e farmaceutica (Lima and Pedriali Moraes, 2018), hanno comportato la necessità di aumentare la ricerca sui metodi di isolamento, analisi, purificazione, identificazione e quantificazione. Inoltre, visto che la concentrazione di peptidi naturalmente presente negli alimenti non è estremamente elevata, si è reso necessario sintetizzare i peptidi isolati da queste matrici per poterli studiare dal punto di vista fisiologico, chimico-fisico, farmacologico, biochimico e clinico. Sono stati sviluppati e migliorati complessivamente tre metodi di sintesi peptidica: la sintesi chimica, che utilizza reagenti chimici per mediare la formazione del legame peptidico (Boeriu et al., 2010), sintesi enzimatica, in cui la formazione del legame peptidico è catalizzata da enzimi (Bongers and Heimer, 1994), e la sintesi della tecnologia del DNA ricombinante, basata sull'uso di tecniche di clonazione e ribosomiali da sistemi biologici per la formazione di peptidi (Sewald and Jakubke, 2005). I peptidi bioattivi possono essere utilizzati sia nell'industria farmaceutica sia in quella alimentare. Tuttavia, prima di passare ad una reale applicazione degli stessi dev'essere testata sia l'assenza di alcun effetto collaterale e sia la loro efficacia biologica. In particolare, è necessario valutare la resistenza alla digestione e la modalità con cui si combinano con i componenti dell'alimento, quali lipidi, carboidrati. Come già citato, gli alimenti che contengono peptidi bioattivi prendono il nome di alimenti funzionali, ovvero " un alimento può essere definito funzionale se per esso è dimostrato l'effetto benefico su una o più funzioni biologiche dell'organismo oltre ad avere una adeguata attività nutrizionale" ("Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document," 1999).

Quindi una sostanza alimentare bioattiva dovrebbe fornire un effetto biologico misurabile nell'intervallo di dosi normalmente assunte nel cibo e questa bioattività dovrebbe essere misurata ad un livello fisiologicamente realistico (Möller et al., 2008a). Seguendo questa definizione, i peptidi bioattivi derivati dal latte, dalla carne, dal pesce e dalle uova sono i rispettivi componenti in grado di influenzare alcuni aspetti fisiologici funzioni, agendo infine sullo stato di salute dell'organismo.

## 2.2 : MECCANISMO D'AZIONE DEI PEPTIDI BIOATTIVI

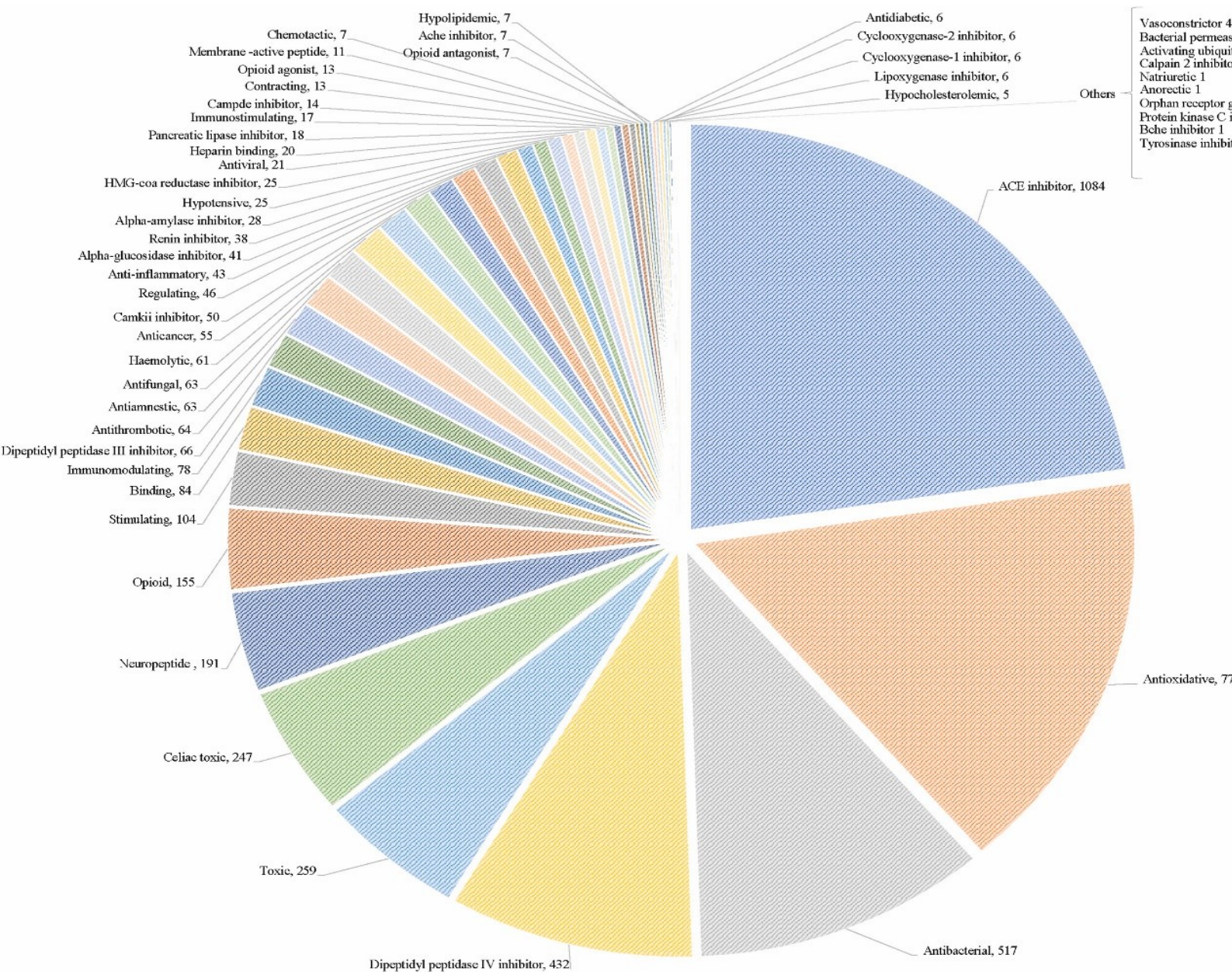


Fig. 3: Distribuzione di peptidi bioattivi con diverse bioattività. Basato su 4485 peptidi bioattivi riportati nel database BIOPEP (giugno 2022). (Du and Li, 2022).

I peptidi bioattivi hanno diverse azioni biologiche a seconda della classe di aminoacidi, della carica netta, delle strutture secondarie, della sequenza e della massa molecolare (Pripp, 2008). L'attività di questi peptidi contro malattie, generalmente è considerata inferiore rispetto a farmaci peptidomimetici sintetici, ma l'uso di peptidi bioattivi offre diversi vantaggi, quali la sicurezza del prodotto naturale, basso impatto nella salute, e gli ulteriori benefici nutrizionali dei peptidi come fonte di aminoacidi essenziali. I di- e tripeptidi sono facilmente assorbiti a livello intestinale (Adibi and Morse, 1971), però poco si conosce sull'assunzione intestinale di peptidi bioattivi con peso molecolare maggiore. Un' esempio è che, per esercitare le proprietà anti-ipertensive dei peptidi bioattivi, i peptidi devono essere assorbiti dall'intestino e raggiungere le cellule obiettivo nei vasi sanguigni in concentrazioni notevoli.

La maggior parte dei peptidi bioattivi scoperti, non sono assorbiti nel tratto intestinale; di conseguenza molte proteine e peptidi possono agire direttamente nel tratto intestinale o attraverso i recettori e la segnalazione cellulare nell'intestino (Miner-Williams et al., 2014). Un certo numero di proteine sembrano agire direttamente nell'intestino, come gli IGF, lattoferrina e immunoglobuline (Miner-Williams et al., 2014).

Sono state osservate diverse azioni che questi peptidi bioattivi possono esercitare nel corpo, in particolare (Möller et al., 2008a) :

- Oppioide
- Osteoprotettivi
- Antipertensiva
- Immunomodulante
- Antilipemica
- Antiossidante
- Antimicrobica
- Antidiabetica
- Anticancerogena

### 2.2.1: PEPTIDI OPPIOIDI

Il dolore è uno dei segnali che indica che c'è un problema nel corpo, e oltre ad essere una sensazione spiacevole, è spesso accompagnata da stimoli gravi e debilitanti. Attualmente vengono utilizzati i farmaci oppioidi per alleviare tale dolore, nonostante siano associato ad innegabili effetti collaterali.

I farmaci più usati sono (Rakowski et al., 2019):

- Rilassanti muscolari come il probantino e il gruppo della belladonna come l'atropina
- Dilatatori vascolari come papaverina cloridrato o nitroglicerina
- Farmaci antinfiammatori come indometacina, ibuprofene e fenilbutazone
- Analgesici non narcotici come aspirina e paracetamolo
- Analgesici narcotici come Demerol e metadone cloridrato.

I peptidi oppioidi presentano generalmente una catena compresa tra i 5 e gli 80 aminoacidi, e possono avere 2 fonti, endogena o esogena (Pérez de Vega et al., 2018). Questi composti si legano perlopiù ai recettori nella superficie della cellula nervosa, causando il rilascio di un segnale che riduce il dolore.

Gli oppioidi esogeni con attività simile alla morfina, entrano nel corpo tramite fonti di cibo, oppure tramite la somministrazione di farmaci e supplementi. I prodotti caseari sono la miglior fonte di esorfine a causa della similarità che hanno con le sequenze con i peptidi esogeni oppioidi, e i peptidi Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu derivato dalla proteina alfa della caseina del latte bovino hanno dimostrato di avere attività narcotica (Teschemacher et al., 1997).

## 2.2.2: PEPTIDI OSTEOPROTETTIVI

Una maggiore disponibilità di calcio solubile nell'intestino aiuta a migliorare la mineralizzazione ossea e, di conseguenza, a prevenire l'osteoporosi. Tuttavia, il calcio non è l'unico elemento coinvolto nel metabolismo osseo. Gli studi sull'assorbimento del calcio e sui parametri del metabolismo osseo possono essere condotti solo in condizioni sperimentali specifiche, come una dieta povera di calcio o una carenza di vitamina D.

Il latte è una buona fonte di calcio (circa 120 mg/100g), ma contiene anche altri componenti benefici per la salute delle ossa, tra cui peptidi bioattivi. Alcuni studi indicano che questi peptidi del latte possono influenzare positivamente la salute ossea modulando l'espressione genica di specifici marcatori di proliferazione, come la ciclina A e la chinasi ciclina-dipendente 2. (Möller et al., 2008a) I peptidi bioattivi derivati dalle proteine del latte mostrano potenziale per strategie efficaci contro l'osteoporosi, come evidenziato da ricerche precedenti, suggerendo promettenti interventi terapeutici e preventivi futuri (Möller et al., 2008a).

A livello di peptidi, i fosfopeptidi della caseina (CPP) possono aumentare l'assorbimento intestinale del calcio formando complessi solubili con fosfato di calcio. Tuttavia, uno studio su donne in postmenopausa che consumavano latte arricchito con CPP non ha mostrato effetti sul metabolismo acuto del calcio (24h) in termini di PTH (paratormone) intatto, calcio ionizzato, calcio totale, fosfato

ed escrezione urinaria di calcio. I peptidi ottenuti dal siero, in particolare dalla frazione basica del siero (milk basic protein= MBP), hanno anche mostrato effetti positivi sul metabolismo osseo. Un'altra prova di 16 giorni su uomini adulti sani ha mostrato che l'integrazione giornaliera di 300 mg di MBP ha aumentato significativamente la concentrazione sierica di osteocalcina e ridotto l'escrezione urinaria di N-telopeptidi legati da croci di collagene di tipo I, indicando una stimolazione della formazione ossea e una riduzione del riassorbimento osseo.

Rivedendo i rapporti sugli effetti osteoprotettivi delle proteine e dei peptidi derivati dagli alimenti, è evidente che i benefici di queste sostanze sulla formazione ossea dovrebbero essere confermati da studi a lungo termine. Sia i componenti della caseina che del siero di latte sembrano avere un notevole potenziale benefico per l'assorbimento del calcio e il metabolismo osseo. Questo potenziale dipende chiaramente dall'età, dal contenuto di calcio e vitamina D della dieta, e dalla dieta di base. Un effetto positivo sull'assorbimento del calcio da parte dei CPP è stato osservato in soggetti umani quando la dieta era basata su riso, ma non su cereali integrali. (Möller et al., 2008a)

Tabella 1: Effetto proteine e peptidi osteoprotettivi (Möller et al., 2008a).

Protein/peptide	Effect	Model	Refs
Casein	Absorption of intestinal calcium ↑	Animal	[77, 53, 39]
	Calcium retention ↑	Animal	[79]
	Calcium retention →	Animal	[40]
at low dietary calcium	Bone mineral content →		
	Soluble calcium in the intestine ↓	Animal	[82]
	Calcium retention ↓		
at high dietary calcium and no vitamin D	Plasma calcium ↑		
	PTH ↑		
	Bone mineral density ↑	Animal	[82]
CCPs	25(OH)D <sub>3</sub> ↑		
	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ↓		
	Calcium absorption ↑	Animal	[76]
depending on diet	Femur calcification ↑		
	Calcium absorption ↑/ →	Human	[25]
	Calcium metabolism →	Human	[57]
Milk basic protein	Formation of pits ↓	Cell culture	[96]
	Bone mineral density ↑	Animal	[96]
	Bone breake force resistance ↑		
	Urinary deoxypyridinoline ↓	Human	[2]
	Bone mineral density ↑		
	Urinary marker of cross-links ↓	Human	[101]
Lactoferrin	Osteocalcin ↑		
	Urinary marker of cross-links ↓		
	Anabolic factor in osteoporosis	Cell culture, animal	[12, 56]

PTH parathyroid hormone, CCPs casein phosphopeptides, 25(OH)D<sub>3</sub> 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 1,25-Di-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>

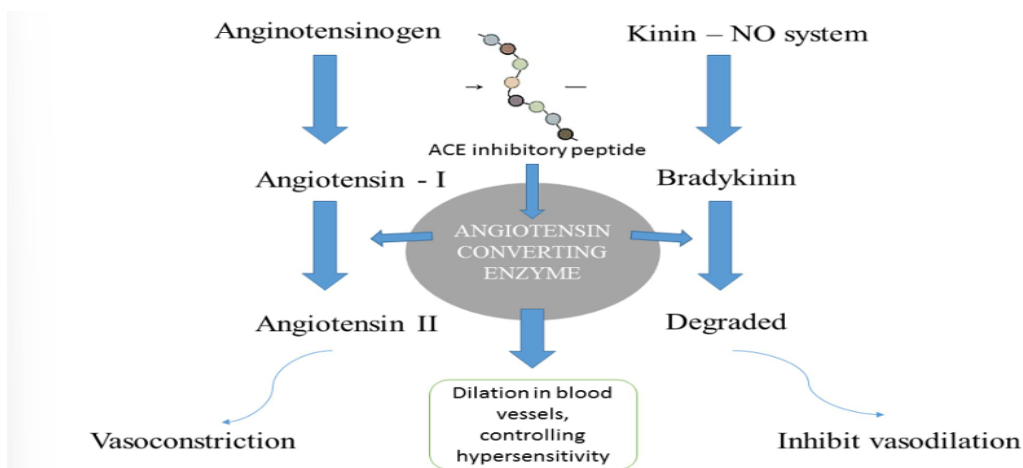
↑/↓/ → : increase/decrease/no effect

### 2.2.3: PEPTIDI ANTIPERTENSIVI

L'ipertensione rappresenta una delle principali cause di mortalità a livello globale, associata a gravi complicanze cardiovascolari. La sua vasta incidenza richiede un approccio globale alla salute, mentre il crescente numero di adulti diagnosticati sottolinea l'urgenza di sviluppare nuove strategie farmacologiche. Questa patologia è caratterizzata da livelli persistentemente elevati di pressione sanguigna, oltre i limiti considerati normali, e la sua diffusione è strettamente legata a malattie cardiovascolari e renali. Alcuni peptidi potrebbero influenzare i meccanismi di regolazione della pressione sanguigna nel corpo.

I peptidi antipertensivi sono i peptidi che una volta rilasciati dalla proteina nativa, hanno l'abilità di modulare il sistema renina-angiotensina e regolare la pressione sanguigna nel corpo. Lo stesso effetto è già stato ottenuto tramite l'uso di farmaci sintetizzati, e lo stessa validità è stato dimostrata dai peptidi ACE inibitori che sono stati isolati da orzo, aglio, girasole, gelatina, ecc. con l'uso di enzimi simili alla  $\beta$ -lattoglobulina,  $\alpha$ -lattoalbumina e  $\gamma$ -Zeina.(Bhandari et al., 2020).La pressione sanguigna è fisiologicamente controllata dal sistema renina-angiotensina (RAS) e da chinina-ossido nitrico (NO). L'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE, dipeptidasi), l'enzima più importante per la regolazione della pressione, in quanto agisce come catalizzatore della conversione dell'Angiotensina-I (un ormone peptidico) a Angiotensina-II, rimuovendo il residuo istidinico del C-terminale, che risulta in vasocostrizione e ad un conseguente innalzamento della pressione sanguigna. I peptidi ACE inibitori bloccano la conversione, con effetto vasodilatatore, controllando direttamente l'ipersensibilità. L'enzima ACE degrada anche la bradichinina (prodotta dalla chinina-sistema NO), che possiede proprietà vasodilatatorie; quindi, gli inibitori ACE controllano la pressione sanguigna prevenendo l'insorgenza di malattie cardiovascolari.

Fig. 4 : Meccanismo azione peptidi bioattivi con attività antipertensiva (Bhandari et al., 2020).



#### 2.2.4: PEPTIDI IMMUNOMODULANTI

L'attività immunomodulante è essenziale affinché il sistema immunitario umano funzioni correttamente.

L'effetto immunomodulatore dei peptidi bioattivi dipende dalla regolazione delle citochine, dalla formazione di anticorpi, dalla stimolazione del sistema immunitario tramite specie reattive dell'ossigeno, dai cambiamenti conformazionali nella tubulina e dall'inibizione della sintesi proteica. Al momento, l'esatto meccanismo d'azione dell'effetto immunomodulante dei peptidi non è ancora completo, nonostante ciò si pensa che l'attività immunomodulante sia una combinazione di attivazione di macrofagi, stimolazione alla fagocitosi, conta leucocitaria elevata, un'aumentata induzione di citochine, NO, immunoglobuline, cellule NK (natural killer), effetti stimolatori sugli splenociti e sulle cellule CD4+, CD8+, CD11b+, CD56+ (Chalamaiah et al., 2018).

Inoltre, il contenuto di aminoacidi, la sequenza, la lunghezza, la carica, l'idrofobicità e la struttura peptidica sono collegati alla funzione immunomodulante.

A questo proposito, è stato dimostrato che gli idrolizzati di proteine di soia a basso peso molecolare e molti peptidi carichi positivamente stimolano l'immunomodulazione (Kong et al., 2008). Numerosi peptidi bioattivi generati dalle piante con azione immunomodulante, tra cui Leu-Asp-Ala-Val-Asn-Arg e Met-Met-Leu-Asp-Phe, possiedono bassi pesi molecolari (686 e 655 Da, rispettivamente) e caratteristiche idrofobiche (Qian et al., 2016).

#### 2.2.5: PEPTIDI ANTILIPIDEMICI E IPOCOLESTEROLEMICI

Tutti gli agenti che aiutano a ridurre i livelli di lipidi e lipoproteine nel sangue sono detti ipolipidemici e possono e sono usati come strumento per la prevenzione del colesterolo (elevati livelli di grasso nei vasi sanguigni). Diversi studi hanno dimostrato di come un elevato livello di trigliceridi post-prandiali possano risultare in fenomeni di insulino-resistenza, aterosclerosi, obesità, che possono essere ridotte abbassando l'attività della lipasi e del suo cofattore colipasi, necessari per la scissione dei trigliceridi e per la loro assunzione (Möller et al., 2008a). Solitamente sono necessari livelli di colesterolo delle low density lipoprotein (LDL) di circa 50mg/dL per la normale produzione di acidi biliari, vitamina D e ormoni steroidei nel corpo (Steinberg and Witztum, 2009). Uno strumento utile per tenere sotto controllo i livelli di LDL è rappresentato dai peptidi bioattivi, ed è stato dimostrato

che l'attività ipocolesterolemica dei peptidi è svolta dalla capacità di legare direttamente gli acidi biliari e gli steroli neutrali nell'intestino.

Alcuni studi hanno individuato che il tetrapeptide VVYP rappresenta una delle sostanze con il maggior effetto inibitorio delle lipasi, determinando un'alterazione nell'assorbimento dei grassi, portando a una riduzione dei trigliceridi post-prandiali nel flusso sanguigno (Möller et al., 2008a).

Altri autori, per studiare l'effetto ipolipidico, hanno usato delle proteine del pesce (più precisamente resti di carne sulle ossa delle carcasse di salmone FPH) come nutrimento a topi Zucker geneticamente obesi e diversi parametri coinvolti nel metabolismo dei lipidi sono stati comparati alla nutrizione con proteine della soia e caseina (Wergedahl et al., 2004). L'FPH ha ridotto i livelli di mRNA di d-5- e d-6-desaturasi rispetto alla caseina e il rapporto tra i diversi livelli di colesterolo HDL: il colesterolo totale era maggiore nei ratti Zucker e nei ratti Wistar alimentati con proteine di pesce idrolizzate (FPH) e proteine di soia rispetto a quelli alimentati con caseina. (Möller et al., 2008b)

Tabella 2: Peptidi e proteine coinvolte nel metabolismo dei lipidi (Möller et al., 2008b)

Protein/peptide	Effect	Model	Refs
Protamine	pp. Triglycerides ↓	Animal	[99]
Globin digest	pp. Triglycerides →	Human	[73]
	pp. Triglycerides ↓	Animal	[36]
	pp. Triglycerides ↓	Human	[35]
	Fecal fat →	Human	[70]
	Fat oxidation →		
VVYP	Weight →		
	pp. Triglycerides ↓ HTGL ↑	Animal	[36]
Proteins from			
Wheat germ	Lipase activity ↓	In vitro	[7]
wheat flour	Lipase activity ↓	in vitro	[94]
Soybean cotyledon	Lipase activity ↓	In vitro	[78]
Defatted rice bran	Lipase activity ↓	In vitro	[100]
Fish protein hydrolysate	mRNA of-desaturases ↓ HDL-C/total C ↑ ACAT ↓	Animal	[103]
Lupin protein isolate	Total C ↓, VLDL- + LDL-C ↓	Animal	[89]
conglutin γ	LDL-uptake ↑, LDL-degradation ↑	Cell culture	
α' Subunits of soybean 7S globulin	Plasma C ↓, triglycerides ↓ VLDL receptor binding ↑	Animal	[20]

pp Postprandial, C cholesterol, HTGL hepatic triglyceride lipase, ACAT acyl-CoA:cholesterol acyltransferase

↑/↓/ → Increase/decrease/no effect



## 2.2.6: PEPTIDI ANTIOSSIDANTI

Le specie reattive ossigeno ( ROS) causano uno squilibrio ossidativo che si traduce in stress ossidativo, associato a numerose patologie quali artrite reumatoide, malattie cardiovascolari, diabete, infiammazione generalizzata e cancro (Ibrahim et al., 2018). Queste molecole vengono prodotte nel processo metabolico, assieme alle RNS (specie reattive dell'azoto), ed assieme possono agire anche nei prodotti alimentari, degradando le proteine, lipidi, membrane cellulari, DNA, formando composti tossici. (Chi et al., 2015). Le proprietà antiossidanti dei peptidi bioattivi sono legate alla loro composizione, struttura e idrofobicità. Prolina, acido glutammico, tirosina, istidina, metionina, cisteina, lisina, glicina, leucina. Isoleucina, fenilalanina, treonina e valina sono esempi di aminoacidi con proprietà antiossidanti (Górska-Warsewicz et al., 2018).

Esistono molti prodotti sintetici in commercio con proprietà antiossidanti capaci di proteggere o rallentare l'ossidazione lipidica ed estendere la shelf-life dei prodotti alimentari, nonostante ciò si ha una percezione negativa di questi prodotti sintetici antiossidanti a causa dell'attenzione verso la propria salute. Molti biopeptidi antiossidanti hanno una catena amminica che va dalle 4 alle 16 unità con un peso molecolare di 0,4-2kDa, e si è osservato che il peso molecolare dei peptidi incide sul tragitto verso i siti bersaglio e il meccanismo di digestione intestinale che di conseguenza, potrebbe aumentare la capacità antiossidante in vitro (Toldrá et al., 2018). Si è notato che i diversi peptidi espletano diverse funzioni antiossidanti in base alla loro composizione:

- Peptidi contenenti tirosina: Trasferimento atomi ossigeno
- Peptidi contenenti cisteina, triptofano e istidina: Trasferimento singolo elettrone ad un radicale libero, cosicché da neutralizzare la sua attività ossidante, che risulterà in una forma debolmente reattiva
- Aminoacidi aromatici contenenti tirosina, fenilalanina: Donare protoni a radicali senza elettroni (Ajibola et al., 2011)
- Peptidi contenenti istidina: Donare molecole idrogeno, intrappolare radicali lipidi derivati perossilici, o la capacità chelante degli ioni metallici del gruppo imidazolico, sottraendo i metalli alle reazioni di ossidoriduzione di cui sono catalizzatori (Walters et al., 2018)

È stato dimostrato tramite diversi studi che i peptidi vegetali idrolizzati ottenuti da scarti di lavorazione sono un'ottima fonte di biopeptidi antiossidanti, come la crusca di sesamo conferisce metionina contenente zolfo e cisteina) (Görgüç et al., 2019); noccioli di prugna (Met-Leu-Pro-Ser-Leu-Pro-Lys, His-Leu-Pro-Leu-Leu e Asn-Leu-Pro-Leu-Leu) (González-García et al., 2014).

## 2.2.7: PEPTIDI ANTIMICROBICI

L'attività antimicrobica nei peptidi è una caratteristica ricercata, in quanto rappresenta uno strumento alternativo agli antimicrobici tradizionali per la protezione contro un ampio spettro di batteri, funghi, virus e protozoi, esercitando allo stesso tempo un'azione di protezione all'alimento, estendendone la shelf life.

Questi peptidi bioattivi antimicrobici( AMP) sono prodotti come metaboliti della digestione, e possono essere classificati in piccoli (hanno dalle 2-20unità amminoacidiche), normali (ricche in lisina e arginina) e anfipatiche (Toldrá et al., 2023). La loro struttura è accumulata da residui idrofobici( leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, triptofano ) (Görgüç et al., 2020).

Gli AMP esercitano l'attività antimicrobica causando una rottura nella membrana nei microbi, e ci riescono in quanto questi peptidi antimicrobici contengono principalmente strutture  $\alpha$ -elicoidali che sono cationiche e di natura anfipatica, mentre un numero minore sono idrofobi  $\alpha$ -peptidi elicoidali. Questa parte cationica dei peptidi è responsabile per l'interazione elettrostatica con i fosfolipidi anionici portando alla formazione di pori nella membrana citoplasmatica .A causa della formazione dei pori si verifica uno squilibrio ionico attraverso la membrana e quindi la lisi cellulare (Bhandari et al., 2020).

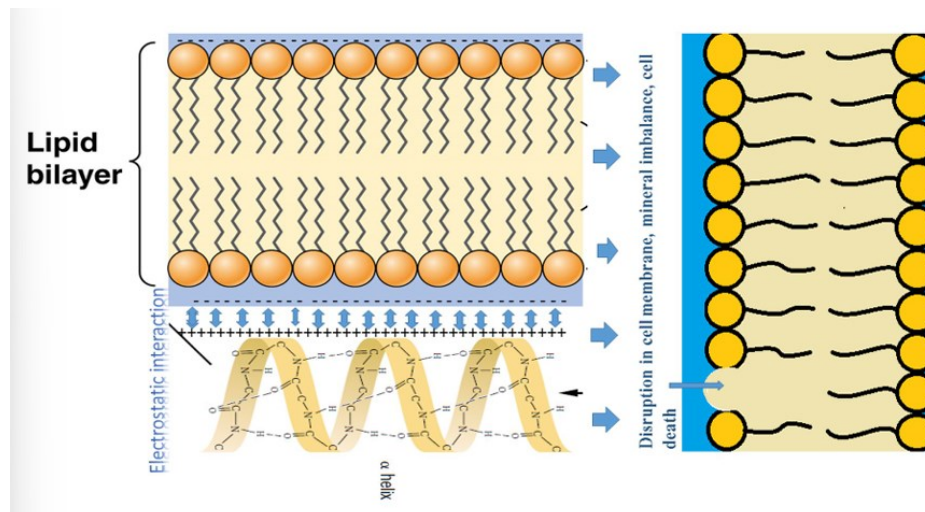
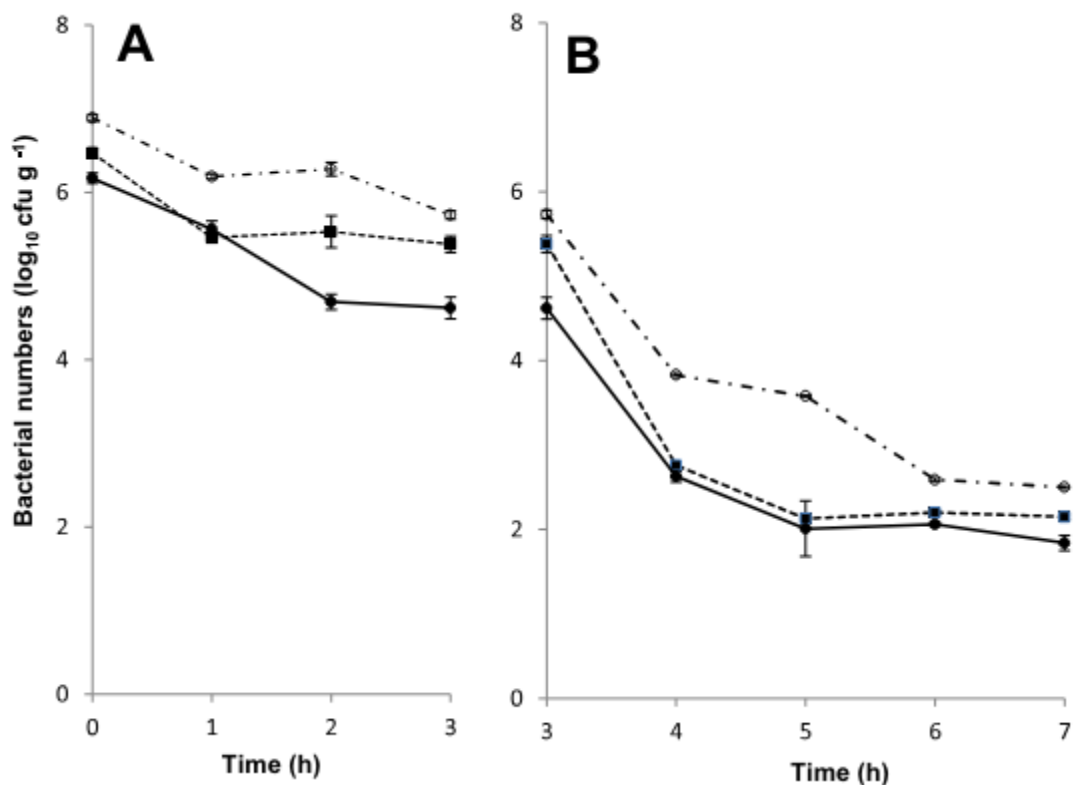


Fig.5: Azione antimicrobica peptidi bioattivi (Bhandari et al., 2020).

Uno studio compiuto da (Segura-Campos et al., 2013) ha dimostrato che il peptide idrolizzato della farina di Chia( *Salvia hispanica L.*) ha inibito la crescita sia dei gram negativi ( *E.coli*, *T.typhi*, *S.flexneri*) sia dei gram positivi( *K.pneumonia*, *S.aureus*, *B.subtilis*, *S.agalactae* ) , anche alla concentrazione più bassa (  $1 \times 10^3$  UFC/mL).

In un altro studio compiuto, molto importante a capire l'attività antimicrobica degli AMP, (Abadía-García et al., 2013) hanno osservato di come il rilascio dei AMP, agisse contro il patogeno alimentare *Listeria monocytogenes*, quando i microrganismi probiotici sono stati aggiunti alla ricotta in condizioni simil gastrointestinali. Hanno osservato che la popolazione di *L.monocytogenes* si è ridotta di un intero logaritmo alla fine del periodo di conservazione della durata di 20 giorni.



d

Fig.6 : Sopravvivenza dei batteri probiotici aggiunti alla ricotta in: A) gastrico simulato succo (pH 2, tempo di permanenza 3 ore) e B) (pH 8, 1,5 mg mL 1 bile di bue; tempo di permanenza 4 ore).I risultati sono la media di tre esperimenti indipendenti con tre ripetizioni n=9 (Abadía-García et al., 2013).

■, *Lb. casei* 373; ○, *Lb. rhamnosus* GG 53103; ●, Yomix<sup>®</sup> 205; ▲, Control.

## 2.2.8: PEPTIDI ANTIDIABETICI

Il diabete è uno dei disturbi metabolici più preoccupanti a livello globale a causa della sua rapida e diffusa crescita. Le forme più comuni di questa malattia sono il diabete di tipo I (insulino-dipendente) e il diabete di tipo II (non insulino-dipendente), che rappresentano rispettivamente circa il 5-10% e il 90-95% dei casi (Islam et al., 2022). Il diabete di tipo II è una malattia cronica ed è uno dei maggiori fattori per il rischio di malattie cardiovascolari, attribuita come collegamento tra la insulino resistenza e un'elevata pressione sanguigna (Connolly et al., 2014), e questa malattia rappresenta un'inadeguata secrezione di insulina o dalla resistenza ad essa, caratterizzando alti livelli di glucosio nel sangue e da una sub-ottimale derivazione energetica del cibo.

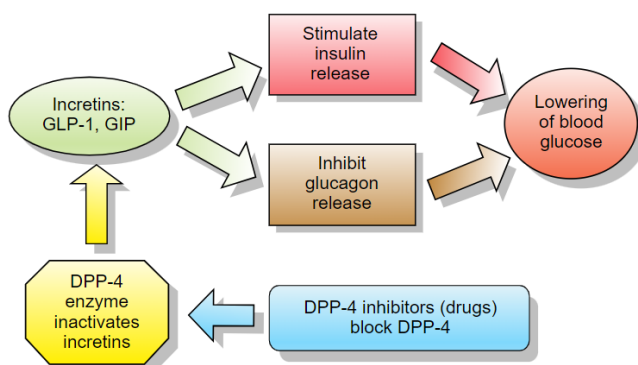
Nonostante sia una malattia generalmente sotto controllo con farmaci sintetici mirati a questa insulino deficienza, essi presentano effetti collaterali quali perdita peso, nausea, iperglicemia, epatiti.

Alcuni peptidi bioattivi possono essere d'aiuto al contenimento di questa malattia, in quanto l'alfa-amilasi o l'alfa-glucosidasi, e gli inibitori di dipeptil peptidasi IV (DPP 4) hanno un'azione nel limitare l'assorbimento dei carboidrati, di conseguenza abbassando l'iperglicemia post-prandiale (Cheung et al., 2015) e sono capaci di compiere questo agendo come antagonisti del recettore del peptide-1 simile al glucagone (GLP-1) (Samtiya et al., 2022).

Alcuni studi, come quello di (Matsui et al., 1999), hanno individuato i peptidi come Tyr-Tyr-Pro-Leu gli antidiabetici più efficaci, isolati dai muscoli di sardina idrolizzati.

Nonostante diversi studi dimostrino di come alcuni peptidi bioattivi abbiano attività antidiabetica, è necessaria una maggiore investimento nella ricerca dei loro meccanismi inibitori e di regolazione dei livelli del glucosio nei tessuti periferici (Islam et al., 2022).

Fig.7 : Meccanismo azione inibitori DPP IV ("Inibitori della dipeptidil-peptidasi IV," 2023).



## 2.2.9: PEPTIDI ANTICANCEROGENI

Il cancro è una crescita incontrollata di cellule nel corpo, e secondo le statistiche dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, è una delle principali cause di morte a livello mondiale. Diverse ricerche hanno descritto che nel 2018 ci furono circa 18,1 mln di nuovi malati di cancro, con 9,1 mln di morti quell'anno; ed è stato predetto che le nuove diagnosi di casi di cancro raggiungeranno i 24 mln, con 14,5 mln di morti nell'anno entro il 2035 (Bray et al., 2018). In commercio ci sono diversi farmaci citotossici anticancerogeni usati per il trattamento di chemioterapia, e la somministrazione di questi, sebbene essenziale per il trattamento di molti tipi di cancro, è spesso accompagnata da effetti collaterali indesiderati. Questi effetti collaterali possono includere: mielosoppressione, neuropatia, tossicità gastrointestinale, compromissione sistema immunitario.

Quindi, le fonti naturali di nuovi composti antitumorali come le proteine alimentari, possono fornire sostituti agli agenti antitumorali già esistenti (Islam et al., 2022). Una valida alternativa ai farmaci, è rappresentata dalla lunosina, un peptide bioattivo contenente 43 unità amminoacidiche con un peso di 5kDa, scoperto per la prima volta nei semi di soia e successivamente individuato in altre piante (Rizzello et al., 2016). Questo peptide esercita i suoi effetti antitumorali attraverso diversi meccanismi:

- Inibizione della proliferazione cellulare: Agisce interferendo con il ciclo cellulare delle cellule cancerogene, rallentandone la divisione e la proliferazione, specie sulla crescita delle cellule MCF7, associate al cancro del seno, regolandone l'espressione genica (Görgüç et al., 2020).
- Regolazione epigenetica: Agisce sulle modifiche epigenetiche che regolano l'espressione genica, inibendo l'attivazione dei geni oncogeni e promuovendo quelli oncosoppressori. Hanno un'azione preventiva, specie sul cancro del seno tramite un meccanismo di attivazione del percorso del TGF $\beta$ . (Görgüç et al., 2020). Numerosi autori hanno osservato che, oltre ad avere un'azione preventiva contro il cancro al seno, la lunosina agisce anche contro i tumori alla prostata e i gastro-intestinali, prevenendo il rischio d'incidenza di questi tumori dell'80%.
- Induzione apoptosi: Promuove morte programmata delle cellule tumorali, processo necessario per impedire crescita incontrollata. Uno studio, l'attività in vitro della lunasina è stata valutata confrontando la crescita di tumori iniziati da cellule del carcinoma polmonare di Lewis (LLC) o di melanoma B16-F0 in topi C57BL/6 trattati con

lunasina e i topi non trattati. È stato scoperto che la lunasina inibisce la crescita delle cellule murine LLC e delle cellule del melanoma murino B16-F0 in vivo e nei topi C57BL/6 (Devapatla et al., 2017; Görgüç et al., 2020).

La letteratura afferma che, diversi peptidi bioattivi possono essere considerati come farmaci chemioterapeutici alternativi con diverse formulazioni, solo dopo aver confermato le sperimentazioni tossicologiche e terapeutiche. Questi composti potrebbero essere utilizzati come coadiuvanti nelle terapie tradizionali o come supplemento dietetico preventivo. Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche cliniche per determinare dosaggi ottimali e possibili effetti collaterali.

Tabella 2 : Diversi tipi di cancro e l'attività anti-cancerogena dei peptidi idrolizzati muscolari (Islam et al., 2022)

Cancer cell lines	Cancer types	Enzymatic hydrolysates	Anti-cancer activity of protein hydrolysates	Ref.
MCF-7	Human breast carcinoma	Salmon alcalase and protamex hydrolysates	40%–74.7% inhibition under the concentration of 1 mg/mL	[93, 106]
HepG2	Human liver cancer	Striped box turtle ( <i>C. trifasciata</i> ) protamex hydrolysate	94.16% inhibition activity at 1 mg/mL	[93]
HT-29	Human colon carcinoma	Oyster ( <i>S. cucullata</i> ) hydrolysate	IC <sub>50</sub> values of 90.31 ± 0.45, 70.87 ± 0.82, and 60.21 ± 0.45 µg/mL for 24, 48, and 72 h of incubation, respectively	[76]
AGS	Human gastric cancer	Solitary tunicate ( <i>S. clava</i> ) alcalase hydrolysate	64.4% activity at the concentration of 1 mg/mL	[107]
HeLa	Human cervical cancer	Solitary tunicate ( <i>S. clava</i> ) alcalase hydrolysate	51.5% activity at concentration of 1 mg/mL	[107]

### 3: METODO SINTESI E PRODUZIONE PEPTIDI

#### 3.1 FONTI PEPTIDI NEGLI ALIMENTI

I peptidi bioattivi, come già spiegato, sono inattivi nella proteina madre, in quanto solo dopo l'azione di qualche enzima che frammenta proteina possono essere liberati e possono esercitare la loro azione. Per esempio possono essere rilasciati tramite:

- durante la digestione enzimatica grazie a enzimi proteolitici (tripsina)
- durante fermentazione microbica
- Durante maturazione e stoccaggio alimenti, a causa di diversi agenti, come il *Lactobacillus helveticus* (Möller et al., 2008b)

La maggior parte della produzione dei peptidi deriva da fonti alimentari, specie da origini: vegetali, animali, pesce, derivati animali.

##### 3.1.1 PEPTIDI BIOATTIVI DI ORIGINE ANIMALE

###### PEPTIDI BIOATTIVI DELLA CARNE

L'industria della carne rappresenta una delle maggiori fonti da cui possiamo derivare i peptidi bioattivi, grazie sia all'importanza e all'estensione di questo settore, ma soprattutto perché permette di valorizzare gli scarti di lavorazione, che variano in base al settore e all'animale coinvolto:

- Bovini: Circa il 40-50% del peso vivo viene considerato come scarto di produzione, che è rappresentato maggiormente da ossa, pelle, organi interni, testa, zoccoli
- Pollame: Gli scarti rappresentano circa il 20-30% del peso vivo
- Suini: Percentuale degli scarti oscilla tra il 30-40% (Karwowska et al., 2021)

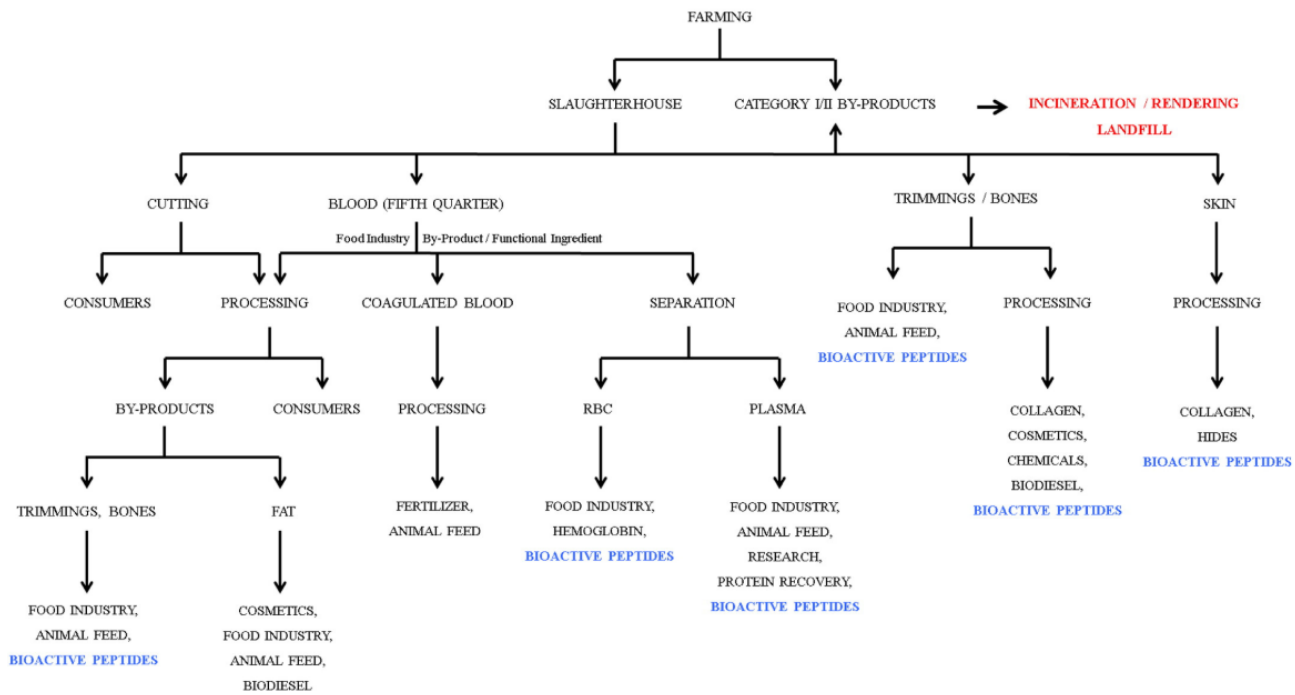


Fig.8 : Il diagramma presentato rappresenta il flusso di lavorazione dei sottoprodotti derivanti dall'industria della carne, mostrando come diverse frazioni dei sottoprodotti vengano utilizzate per la produzione di ingredienti funzionali, tra cui peptidi bioattivi. Questo processo si articola attraverso diverse fasi di trasformazione, che consentono di valorizzare i materiali di scarto attraverso la produzione di composti bioattivi utili per vari settori industriali.(Lafarga and Hayes, 2014).

Come si può vedere dal grafico riportato in Figura x, quest'industria rappresenta una fonte importante di peptidi bioattivi. Le parti più interessanti dell'animale, per quanto riguarda l'estrazione di peptidi bioattivi, sono il sangue, i ritagli, le ossa, gli organi interni e le ossa. I peptidi estratti da questi scarti hanno diverse possibilità di applicazione grazie alle loro proprietà biologiche, e possono agire come antimicrobici, antiossidanti, antinfiammatori, antipertensivi. La maggior parte dei peptidi isolati dalla carne e dai suoi sottoprodotti, manifestavano funzioni antiossidanti e di inibizione dell'enzima di conversione dell'angiotensina ACE (Madhu et al., 2022).

Un metodo innovativo e sostenibile per ridurre gli sprechi e generare composti di alto valore aggiunto è la valorizzazione dei sottoprodotti dell'industria della carne attraverso l'estrazione di peptidi bioattivi.



## PEPTIDI BIOATTIVI DELLE UOVA:

Le uova possono essere idrolizzate per produrre peptidi bioattivi con numerose proprietà benefiche per la salute umana, poiché sono una fonte ricca e versatile di proteine. L'industria delle uova sfrutta questa caratteristica utilizzando tecniche sofisticate per estrarre e purificare questi peptidi. Di seguito vengono descritti i principali motivi per cui le uova sono altamente valorizzate per l'estrazione di peptidi bioattivi:

-Ricchezza e diversità proteine: Le uova contengono una vasta gamma di proteine di alta qualità che possono essere idrolizzate per creare peptidi bioattivi. Le proteine principali dell'uovo includono: ovoalbumina( proteina più abbondante), ovotransferrina( nota per proprietà antimicrobiche e antiossidanti), ovomucoide, lisozima( rappresenta 5% peso uovo e possiede attività antimicrobiche significative), avidina( lega biotina, ed è usata per le sue caratteristiche tecnologiche).

I peptidi bioattivi derivanti dalle proteine delle uova hanno una ampia gamma di vantaggi:

-Antimicrobici: Per migliorare la sicurezza alimentare, i batteri patogeni possono essere uccisi da peptidi derivati dal lisozima e dall'ovotransferrina.(Abeyrathne et al., 2013)

-Proprietà antiossidanti: Gli peptidi derivanti da ovotransferrina e ovalbumina riducono lo stress ossidativo del corpo neutralizzando i radicali liberi.

-Ipotensivi: Alcuni peptidi hanno la capacità di impedire all'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) di funzionare, il che riduce la pressione sanguigna.

-Immunomodulatori: L'ovomucoide e i suoi peptidi possono alterare la risposta immunitaria, il che potrebbe favorire le malattie infiammatorie e autoimmuni. (Miguel and Aleixandre, 2006)

Come riportato da Yu et al., 2011, i peptidi Arg-Val-Pro-Ser-Leu derivati dalle uova, son stati sintetizzati chimicamente, e si è notato che presentavano funzioni ACE-inibitrici, ed inoltre si è notato che questi peptidi resistevano al tratto gastro-intestinale, preservando la loro funzionalità (Akbarian et al., 2022). Attualmente, la polvere di albume d'uovo, grazie al suo alto contenuto di amminoacidi e alla sua elevata shelf-life, è molto usata nell'industria alimentare e nella farmaceutica.

## PEPTIDI BIOATTIVI DEL LATTE

Il latte è uno degli alimenti più consumati nel mondo, specie in Europa ed in Italia, grazie alla prevalenza della dieta mediterranea, che include largamente l'uso di latte ma anche dei suoi prodotti trasformati. Si stima che attorno al 48,1% della popolazione italiana, faccia uso giornaliero di latte, registrando un aumento costante nel suo consumo e utilizzo. La diffusione d'uso di questo prodotto è dato anche dalle sue proprietà nutritive, in quanto il latte di tutti i mammiferi contiene gli stessi componenti principali, essenziali alla nostra dieta, ovvero acqua, proteine, grassi, carboidrati, vitamine e grassi (Claeys et al., 2014).

Recenti studi hanno affermato che il latte apporta un'ampia quantità di composti biologicamente attivi che difendono l'organismo da patogeni e malattie, con varie funzioni quali peptidi antimicrobici, proteine antibatteriche, oligosaccaridi, immunoglobuline (Park and Nam, 2015).

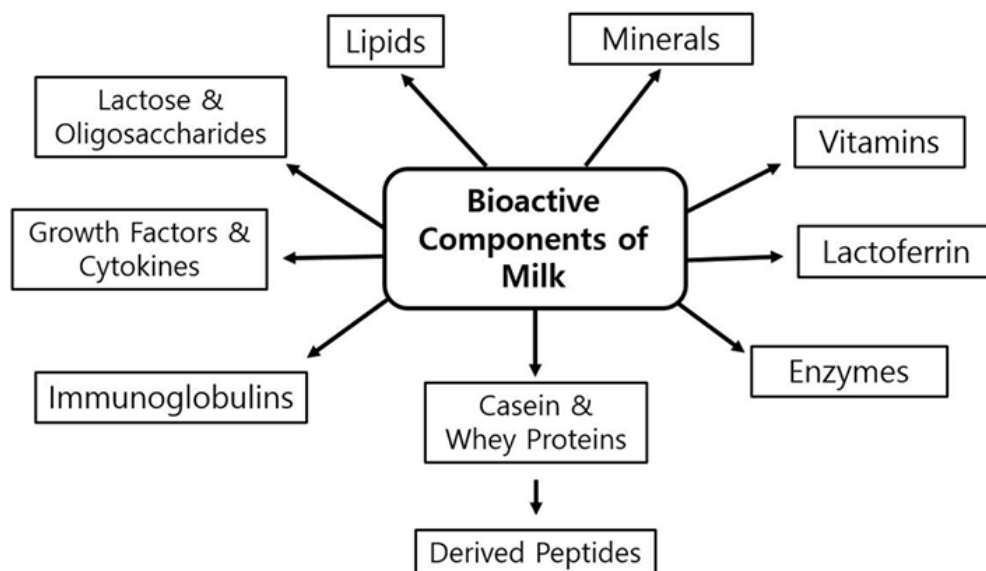


Fig.9: Principali composti bioattivi derivati dal latte (Park and Nam, 2015)

Quindi, oltre agli ottimi valori nutrizionali, il latte è un'ottima fonte di sostanze bioattive che regolano diverse funzioni biochimiche e fisiologiche, che hanno un impatto cruciale nella salute umana. Le funzioni di questi composti bioattivi sono state categorizzate in quattro macroaree:

- Sviluppo, attività e funzione gastrointestinale
- Accrescimento e funzione immunologica
- Sviluppo neonati
- Attività microbica, antibiotici e probiotici

## PEPTIDI BIOATTIVI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI

Come già descritto nel paragrafo precedente, il latte contiene una gran quantità di sostanze bioattive utili al nostro corpo e alla salute, e dopo quest'affermazione, sono degni di nota i prodotti derivanti dalla trasformazione del latte. Una volta che i peptidi bioattivi sono staccati dalla proteina madre mediante le diverse metodologie di produzione (idrolisi enzimatica, digestione, fermentazione microbica), il profilo peptidico di questi composti è già diverso a seconda delle trasformazioni che subisce il latte, che sono per esempio: cottura, fermentazione, aggiunta enzimi nativi del latte e del caglio (Haque et al., 2008). Molti peptidi bioattivi sono rilasciati durante i processi di fermentazioni, e le culture starter contengono numerosi enzimi responsabili per la degradazione delle proteine in peptidi e amminoacidi, di conseguenza, possiamo trovare molti di questi composti naturali in prodotti che hanno subito processi termici che hanno degradato le proteine per azione meccanica, oppure in prodotti che hanno subito un periodo di maturazione/fermentazione, e in molti prodotti caseari, abbiamo la coesistenza di entrambi questi processi.

Uno studio, effettuato sul formaggio Gouda a media maturazione, ha rilevato un contenuto maggiore dei peptidi bioattivi inibitori di ACE rispetto ai formaggi Gouda non stagionati e freschi, e ciò suggerisce che la concentrazione dei peptidi bioattivi nei formaggi aumenta con la stagionatura e maturazione, ma inizia a declinarsi quando il livello di proteolisi supera un certo livello di degradazione dei frammenti di peptidi attivi in frammenti inattivi, e di conseguenza la produzione di peptidi inibitori di ACE è bassa in presenza di prodotti che naturalmente hanno un basso livello di proteolisi, come lo yogurt, formaggio fresco o quark (Haque et al., 2008; Sieber et al., 2010).

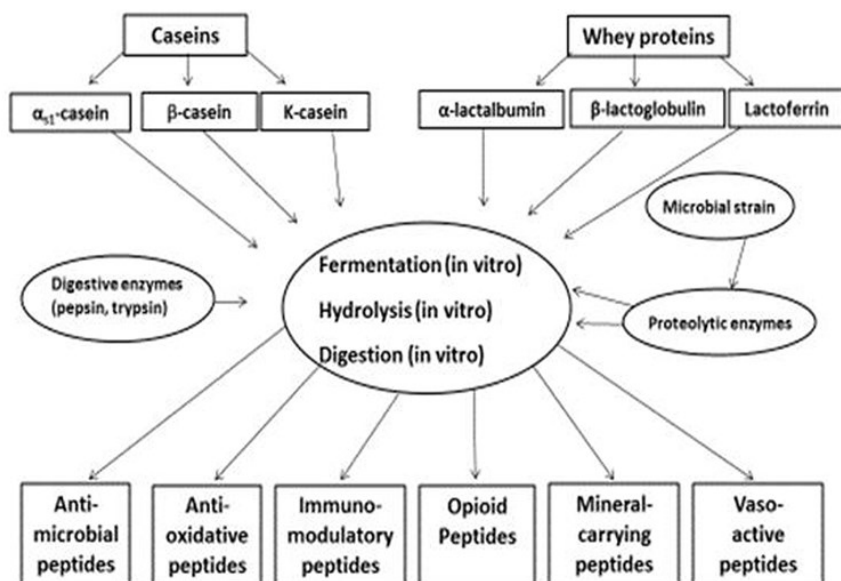


Fig.10: Funzionalità e proprietà fisiologiche dei peptidi bioattivi ricavati dal latte(Park and Nam, 2015).

## PEPTIDI BIOATTIVI DELL'INDUSTRIA ITTICA

Un'altra fonte da cui si possono ricavare peptidi bioattivi ad alto valore biologico è l'industria ittica, che rappresenta un settore economico di primaria importanza a livello globale. Questo settore rappresenta una fonte ricca e sostenibile per l'estrazione di questi composti bioattivi, in quanto è possibile recuperarli dai sottoprodotti della lavorazione del pesce, contribuendo così anche alla creazione di nuove opportunità economiche.

L'industria ittica è caratterizzata da un'elevata produzione di scarti e sottoprodotti derivanti da parti del pesce che non vengono usate per il consumo umano, che includono teste, spine dorsali, organi interni e pelle, e questi residui rappresentano il 50-80% del peso vivo(Lee et al., 2020). Questi scarti sono caratterizzati da un'elevato contenuto di proteine (fino 60%) sul peso secco (Sasidharan and Menon, 2020), e rappresentano una fonte preziosa di peptidi bioattivi con diverse caratteristiche.

Si è riscontrato che nei peptidi bioattivi ricavati dagli scarti dell'industria ittica, i peptidi ACE inibitori e i peptidi antiossidanti sono due dei peptidi più frequenti, con dimensioni che variano dai 300 ai 3000 Da di peso, con la maggioranza contenente dai 2 ai 13 amminoacidi (Ishak and Sarbon, 2018; Jakubczyk et al., 2020). Uno studio condotto da (Kang et al., 2020) ha investigato gli effetti antiossidanti e antipertensivi dei peptidi Leu-Trp-His-Thr-His (LWHTH), derivati da *Styela clava* (specie marina invasiva che si trova nei mari della Nuova Zelanda), come peptidi

promotori di effetti benefici alla salute, ed è stato individuato che i peptidi LWHTH si legavano al sito attivo dell'ACE, notando una riduzione notevole della pressione sanguigna in topi ipertensivi.

Sequence of Peptide	Source of Peptide	Activity	Reference
Seafood by-products			
GASSGMPG LAYA	<i>Pacific cod (G. macrocephalus)</i>	ACE inhibitory	Ngo et al. [161]
IVDR WYK VSAVI	olive flounder ( <i>P. olivaceus</i> ) surimi	ACE inhibitory	Oh et al. [175]
LSGYGP	tilapia ( <i>O. niloticus</i> ) skin	ACE inhibitory	Chen et al. [176]
LWHTH	tunicate ( <i>S. clava</i> )	ACE inhibitory	Kang et al. [160]
YP	Atlantic salmon ( <i>S. salar</i> )	DPP-IV inhibitory	Neves et al. [159]
WEGPK GPP GVPLT	Bluefin leatherjacket ( <i>N. septentrionalis</i> ) head	antioxidant	Chi et al. [152]
GSGGL GPGGFI FIGP	<i>N. septentrionalis</i> skin	antioxidant	Chi et al. [153]
GPDGR GADIVA GAPGQMV AGPK GAEGFIF	skipjack tuna ( <i>K. pelamis</i> ) bones	antioxidant	Yang et al. [150]
GIV GAP*GF GFA*GPA SGNIGFP*GPK GIPGPIGPP*GRP	tilapia ( <i>O. niloticus</i> ) skin	antioxidant	Thuanthong et al. [178]
GIPGAP	thornback ray ( <i>R. clavata</i> ) skin	antioxidant	Lassoued et al. [154]
PYSFK GFGPEL VGGRP	grass carp ( <i>C. idella</i> ) skin	antioxidant	Cai et al. [157] Cai et al. [179]
Plants and seeds			
ADGF AGGF AWDPE DWDPK ETTL SGAF	Wild hazelnut ( <i>C. heterophylla</i> )	antioxidant	Liu et al. [185]
LAYLQYTDfETR	pecan meal	antioxidant	Hu et al. [186]
SMRKPPG	peony ( <i>P. suffruticos</i> ) seed	antioxidant	Zhang et al. [187]

Tabella 3 : Peptidi bioattivi ottenuti da sottoprodotti industria ittica (Jakubczyk et al., 2020).

### 3.2 PEPTIDI BIOATTIVI DI ORIGINE VEGETALE:

Negli ultimi decenni, l'industria agroalimentare ha assistito ad un significativo spostamento dell'attenzione verso le fonti vegetali, e ciò è dovuto a diversi fattori, ma le due principali forze motrici di questo cambio sono la crescente consapevolezza della sostenibilità ambientale, ed il cambiamento delle abitudini alimentari dei consumatori.

Allo stesso tempo, le abitudini alimentari delle persone stanno cambiando. Infatti, vi è un crescente interesse per diete più sane e sostenibili, con maggiore attenzione ai benefici per la salute e all'impatto ambientale delle scelte alimentari individuali.

I vantaggi dei peptidi bioattivi naturali rispetto alle sostanze chimiche sintetiche come i prodotti farmaceutici sono particolarmente forti nelle regioni meno sviluppate del mondo, sia dal punto di vista dei costi che della disponibilità.

La funzionalità e i benefici dei peptidi e di altre sostanze benefiche è stata riconosciuta già dal 1991, quando un legislatore giapponese emanò la FOSHU (food for specific health use), attribuendo a certi alimenti la caratteristica di terapeutico, ed un esempio è rappresentato dall'utilizzo di "fine rice" come trattamento per combattere la dermatite atopica. (Hartmann and Meisel, 2007; Maestri et al., 2016).

I peptidi bioattivi di origine vegetale possono essere ottenuti da una varietà di piante e di sottoprodotti, ciascuno con un profilo peptidico unico e proprietà benefiche. Alcune delle fonte principali di peptidi sono:

1. Legumi: Sono tra le fonti più comuni e ricche di proteine vegetali dunque di peptidi bioattivi. Tra i legumi più abituali troviamo:
  - a. -Soia (*Glycine max*): Una delle fonti più conosciute di peptidi bioattivi, e diversi peptidi derivanti da questa pianta, come la lunasina, hanno dimostrato attività antinfiammatoria, antiproliferativa e ipocolesterolemizzante (Malaguti et al., 2014)
  - b. -Lenticchie (*Lens culinaris*): Prodotto ricco in proteine, specialmente di lisina e leucina, basso in grassi ed un eccellente fonte di carboidrati complessi. I peptidi bioattivi ricavati da questo legumi sono associati a proprietà antilipemiche, antitumorali (abbassano rischio cancro colon) e antidiabetiche. (Roy et al., 2010)
2. Cereali: Costituiscono uno degli prodotti più consumati, in quanto sono la fonte principale di carboidrati consumati dalla popolazione mondiale. Cereali come il grano, orzo, riso sono fonti ricche di peptidi bioattivi, e tra le funzioni principali di questi composti possiamo

l'attività antiossidante, antibatterica e antinfiammatoria (Gong et al., 2022). Tra gli alimenti più consumati globalmente possiamo trovare :

-Riso (*Oryza sativa*): Una delle colture principali alimentari del mondo e fonte importante di proteine. I peptidi derivati da questo cereale sono rappresentati principalmente da globulina, albumina e glutenina, e tra le proprietà benefiche del consumo di questi peptidi sono manifestate con proprietà antiossidanti, antipertensive e antidiabetica(Singh et al., 2023).

3. Semi oleosi: I semi oleosi come quelli di girasole, zucca, lino e chia sono ricchi di proteine che possono essere idrolizzate per produrre peptidi bioattivi.

Un esempio sono i peptidi dei semi di girasole mostrano proprietà antibatteriche e antiossidanti, mentre i peptidi dei semi di zucca sono stati studiati per i loro effetti antipertensivi e di promozione della salute cardiovascolare (Mazloomi-Kiyapey et al., 2019; Tonolo et al., 2024).

## 4: SINTESI CHIMICA PEPTIDI BIOATTIVI

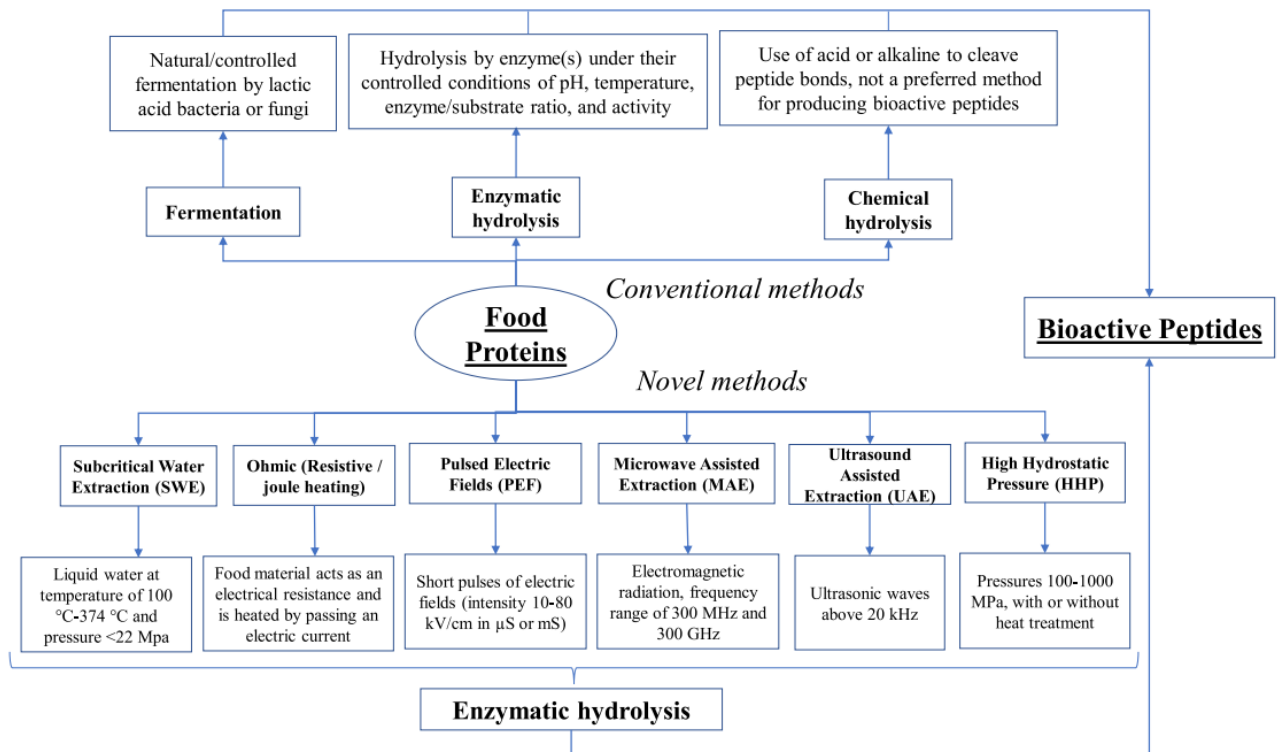


Fig.11: Caratteristiche dei metodi di estrazione classici e delle nuove tecnologie per la produzione di peptidi bioattivi (Ulug et al., 2021).

Come già spiegato nei capitoli precedenti, i peptidi bioattivi per poter esercitare le loro proprietà, devono essere liberati dalla frazione proteica che lo racchiude. Per far ciò esistono diversi metodi di estrazione e purificazione della matrice alimentare primaria da cui si desidera ricavare tale composto.

### 4.1 FERMENTAZIONE

Una delle tecniche più antiche riguardanti la conservazione degli alimenti, dove nella quale c'è anche la formazione di peptidi bioattivi. Questo complesso processo biochimico è avviato dalla presenza sia naturale che controllata dei batteri lattici acidi (LAB), molto importanti nella produzione di prodotti fermentati in quanto attribuiscono caratteristiche nutrizionali e tecnologiche all'alimento colpito, tra cui la consistenza e lo sviluppo aromatico (Savijoki et al., 2006). Nei prodotti fermentati a base di carne, questo processo causa un abbassamento di pH, che si traduce anche in una minor suscettibilità all'attacco microbico di batteri patogeni. Questo processo di fermentazione, è responsabile anche della degradazione delle proteine, aumentando le attività delle proteasi muscolari, e i polipeptidi generatisi da questa



degradazione muscolare sono ulteriormente degradate dagli enzimi batterici dei LAB durante la fermentazione, che rilasciano peptidi bioattivi (Wu et al., 2015). Per quanto riguarda i peptidi di origine vegetale ricavati tramite fermentazione, è stato effettuato un esperimento sulla bevanda di soia, comunemente detto latte di soia, che è stato sottoposto alla fermentazione, degradando le proteine in oligopeptidi, tri-peptidi e di-peptidi, che sono un’ottima fonte da cui ricavare peptidi bioattivi (Singh et al., 2014). La produzione di peptidi bioattivi tramite la fermentazione è un processo economico rispetto ad altre alternative chimiche, tuttavia la bassa resa di generazione di peptidi e la mancanza di specificità della formazione di peptidi rendono difficile lo sfruttamento industriale della fermentazione per produrre peptidi bioattivi (“Raveschot: Production of bioactive peptides by Lactobacil... - Google Scholar,” n.d.) .

## 4.2 IDROLISI CHIMICA

Rappresenta una delle tecniche più usate in quanto ha bassi costi di operazione e di facile esecuzione, richiedendo risorse minime. Per avviare questo processo si usano acidi o alcali, che riescono a scindere il legame peptidico e liberare gli amminoacidi che contengono all’interno i peptidi bioattivi di nostro interesse. (Wang et al., 2017). Questa tecnica, sebbene sia di facile applicazione, non garantisce un’elevata efficacia, in quanto presenta diverse limitazioni tecniche, quali il difficile controllo delle condizioni del processo, risultando in composizioni chimiche errate e variabili. L’idrolisi con sostanze chimiche e solventi forti, sottoposti ad alte temperatura e a svariati range di pH, si traducono in un’impoverimento nutrizionale e bassa funzionalità dell’alimento (Kristinsson and Rasco, 2000). L’applicazione di questa tecnica porta alla formazione di composti con valori nutrizionali e tecnologici ridotti rispetto all’estrazione tramite enzimi, limitandone l’interesse per l’industria alimentare (Wisuthiphaet et al., 2016).

Source	Hydrolysis Method	Bioactivity	Reference
Broccoli with scientific name <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	Hydrolysis by a chemical like acetone	ACE inhibition resulted in Antihypertensive activity	Lee et al. (2006)
Bitter gourd with the scientific name of <i>Momordica charantia</i>	Hydrolysis by a chemical like aqueous ethanol	Hydrolysate has Anti-inflammatory activity	Jones et al. (2018)
Celery with the scientific name of <i>Apium graveolens</i>	Hydrolysis by a chemical like ammonium sulfate	Antioxidant activity by scavenging free radicals	Yili et al. (2012)
Chilli pepper with the scientific name of <i>Capsicum annuum</i>	Hydrolysis by a chemical like Phosphate buffer	Hydrolysate has antimicrobial potential against many bacteria like <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida parapsilosis</i>	Ribeiro et al. (2007)
Sweet potato with the scientific name of <i>Ipomoea batatas</i>	Hydrolysis by a chemical like TFA	Hydrolysate has the anticancer potential	Chang et al. (2013)

Tabella 4: Produzione di Peptidi Bioattivi tramite idrolisi chimica (Naeem et al., 2022).

### 4.3 IDROLISI ENZIMATICA

In questo metodo, la scissione è attuata grazie all'incorporamento di enzimi commerciali, che permettono di ottenere i peptidi bioattivi, in quanto essi sono responsabili della scissione del legame peptidico della matrice proteica nella quale sono contenuti i peptidi bioattivi (Wouters et al., 2002). Affinché l'enzima possa svolgere le sue funzioni, deve prima legarsi al substrato e poi procedere con la catalisi enzimatica. Per questo motivo, l'enzima ha siti attivi specifici in cui si trovano residui che catalizzano la reazione con il substrato e residui che creano legami temporanei con il substrato. In questo modo si formano siti di legame e siti catalitici. Il complesso enzima-substrato è generalmente formato da legami idrogeno, legami idrofobici o interazioni di Van der Waals (Cruz-Casas et al., 2021). Una volta che l'enzima-substrato è in una specifica conformazione, può avvenire l'idrolisi proteica (Arshad et al., 2019). In generale, ci sono tre modi per eseguire l'idrolisi enzimatica:

- 1) utilizzando il metodo batch tradizionale
- 2) utilizzando enzimi immobilizzati
- 3) utilizzando membrane di ultrafiltrazione.

A causa dei suoi svantaggi, il metodo batch tradizionale è il meno utilizzato. Il costo elevato degli enzimi, le basse rese e la ridotta produttività, nonché la formazione di metaboliti secondari indesiderati dovuti all'autolisi enzimatica, limitano l'utilizzo di questi enzimi

A differenza di altre tecniche come la fermentazione, l'idrolisi chimica o la digestione, questo metodo ha alcune qualità vantaggiose nell'ottenere peptidi bioattivi. Il miglioramento della velocità di reazione è tra queste. L'enzima che viene aggiunto per scindere le proteine catalizza anche la reazione e la velocità è maggiore di circa  $10^6$ - $10^{12}$  volte rispetto a quando non è catalizzato (Martínez-Medina et al., 2019).

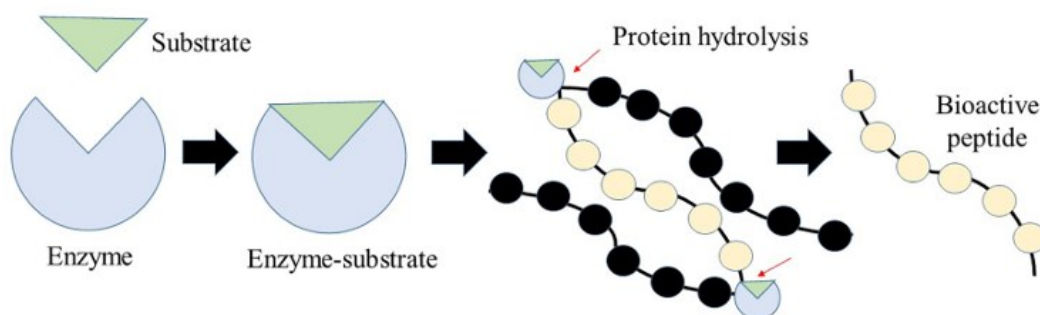


Fig.12: Rappresentazione grafica dell'idrolisi enzimatica per il rilascio dei peptidi bioattivi(Cruz-Casas et al., 2021) .

## 5: APPROCCI PER PURIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE

Dopo il processo di idrolisi delle proteine con uno dei sistemi sopracitati, i peptidi bioattivi sono rilasciati in un composto proteico idrolizzato grezzo, di conseguenza è necessaria un'ulteriore separazione e purificazione. È necessario compiere quest'operazione per poter permettere la separazione dei peptidi con funzionalità diverse dal composto grezzo, poiché alcuni di essi possono avere effetti antagonisti tra di essi (Cruz-Casas et al., 2021). Tramite la purificazione, è possibile ricavare una maggior concentrazione di queste molecole, ottenendo prodotti ad alta qualità che possono essere commercializzati come ingredienti alimentari funzionali o nutraceutici (Fernández et al., 2014).

Il processo di purificazione è basato sulle caratteristiche fisiche e chimiche di queste molecole, come le dimensioni molecolari, carica, polarità, solubilità, e interazioni specifiche covalenti e non covalenti (Arumugam et al., 2018). Questo processo di purificazione, prevede come primo step la filtrazione tramite membrana, e in base alla dimensione dei pori delle membrane, si possono classificare questi processi in microfiltrazione, nanofiltrazione e ultrafiltrazione (Wen et al., 2020), di cui l'ultima la più diffusa. Questa tecnica è basata sulla trasmissione e ritenzione dei peptidi in base al loro volume idrodinamico e ai diametri dei pori della membrana, guidato il tutto da un gradiente di pressione fornito da una pompa (Bazinet and Firdaous, 2009), permettendo una separazione dei peptidi isolati per peso, in modo economico, veloce, preservando anche le proprietà fisiologiche dei peptidi. Nonostante ciò questa tecnica presenta diverse limitazioni, di cui le maggiori sono rappresentate dallo sporcamento e intasamento della membrana causato dalla formazione di un legame tra i peptidi idrofobici e la membrana, il che porta a una difficile estrazione di peptidi puri e all'uso di ingenti volumi per ovviare ai problemi legati con la membrana (Acquah et al., 2018; Dlsk and Václavíková, 2018).

Un'altra tecnica di purificazione dei peptidi bioattivi è rappresentata dalla cromatografia, che include diverse tecnologie e metodi di estrazione come GFC (gel filtration-cromatography), IEC (cromatografia scambio ionico), RP-HPLC (cromatografia inversa), UPLC (cromatografia liquida ad ultra-pressione), ESI-MS (spettrometria di massa a ionizzazione elettro spray) (de Castro and Sato, 2015).

Tutte queste tecniche di cromatografia si basano su un principio di interazione peptidica tra la fase mobile e la fase stazionaria (Jahandideh, 2018), mentre la cromatografia per esclusione permette la separazione dei peptidi in base alla loro dimensione e al peso molecolare. I vantaggi dell'uso della

separazione tramite HPLC sono molteplici, tra cui un ampio spettro di applicabilità di questa tecnica, alta efficienza di separazione e di sensibilità, buona stabilità, mentre i vantaggi sono rappresentati da un alto costo di operazione, i solventi usati non sono facilmente riutilizzabili in quanto poco eco-compatibili, e l'efficienza può essere influenzata dalla portata, temperatura e pH (Naeem et al., 2022).

Usando queste tecniche di cromatografia è possibile concentrare i peptidi bioattivi di un determinato peso molecolare, carica e idrofobicità, rendendo più facile il processo di purificazione (Issaq et al., 2002).

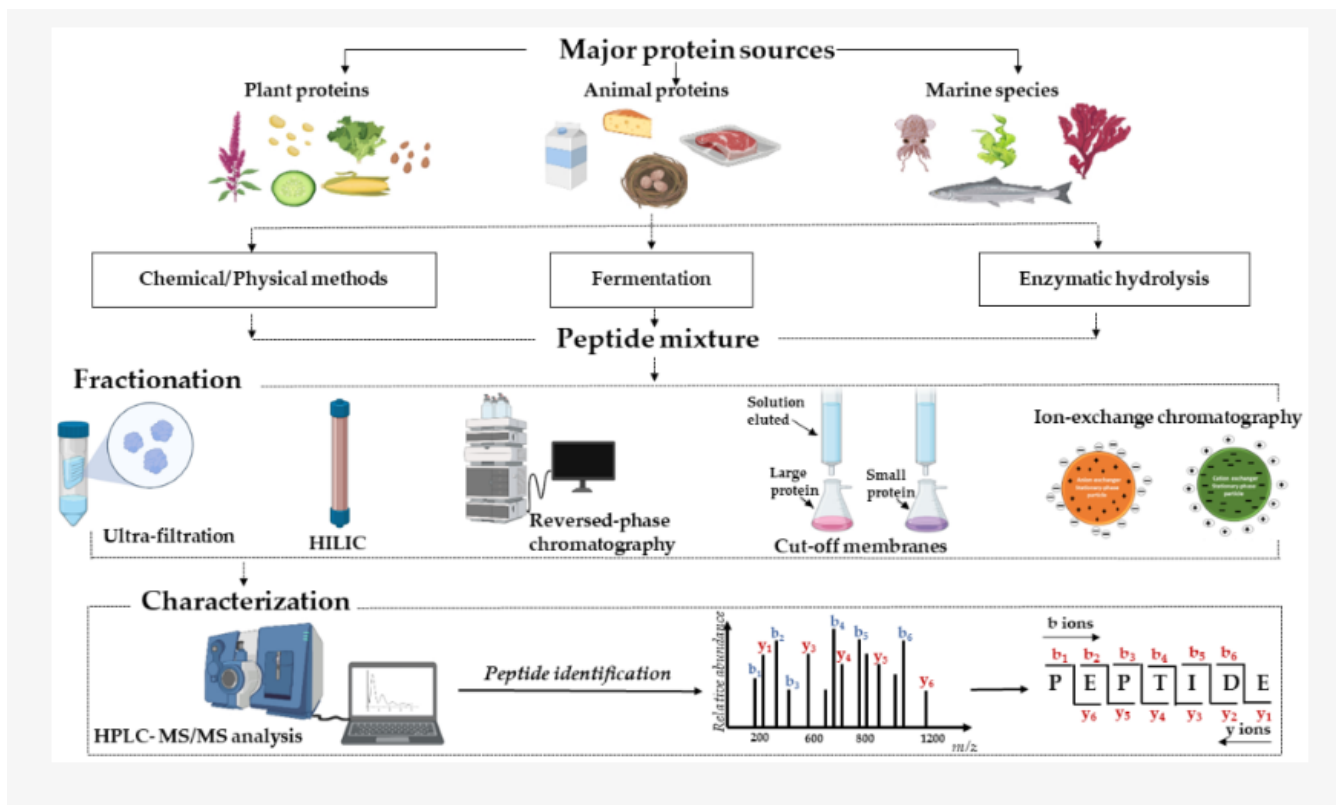


Fig.13 : Flusso di lavoro per l'identificazione di sequenze peptidiche da fonti proteiche alimentari (Nong and Hsu, 2022).

## 6: SFIDE E LIMITAZIONI

Nel settore alimentare, l'interesse per i peptidi bioattivi è cresciuto negli ultimi decenni grazie alla loro capacità di promuovere effetti salutari come antiossidanti, antipertensivi, antimicrobici e immunomodulanti. Tuttavia, l'implementazione su larga scala dei peptidi bioattivi nell'industria alimentare presenta numerose sfide e limitazioni, nonostante il loro potenziale. Tali ostacoli saranno esaminati in dettaglio in questo capitolo, con l'obiettivo di delineare i principali ostacoli che devono essere superati per sfruttare al meglio il potenziale di questi composti nell'industria alimentare.

### 6.1: SFIDE TECNOLOGICHE

#### 6.1.1: Stabilità peptidi durante lavorazione

La stabilità dei peptidi bioattivi durante i processi di lavorazione è una delle principali sfide nell'integrazione dei peptidi bioattivi nei prodotti alimentari. Durante la lavorazione degli alimenti, le elevate temperature, le variazioni di pH, l'esposizione a luce e l'ossigeno possono causare l'idrolisi o l'ossidazione dei peptidi. Queste modifiche possono ridurre o eliminare l'attività biologica che svolgono, rendendoli meno efficaci o addirittura inattivi. Pertanto, è essenziale mantenere l'integrità e la funzionalità dei peptidi bioattivi durante la produzione alimentare sviluppando tecnologie di incapsulamento o utilizzando additivi protettivi (Gedif and Tkaczewska, 2024).

#### 6.1.2: Sfide nella formulazione

È necessario considerare attentamente come i peptidi bioattivi interagiscano con proteine, lipidi e carboidrati quando vengono incorporati nelle matrici alimentari. La solubilità, la biodisponibilità e la percezione sensoriale del prodotto finale possono essere influenzate da queste interazioni. Pertanto, per creare alimenti funzionali con peptidi bioattivi, è necessario utilizzare un approccio trasversale che tenga conto della chimica degli alimenti, della scienza dei materiali e della nutrizione. Ciò è fatto per garantire che i peptidi mantengano la loro attività e che il prodotto sia accettabile dal punto di vista sensoriale. Un esempio può essere rappresentato dall'apporto che i peptidi bioattivi danno ad alcuni alimenti, che con le loro caratteristiche, forniscono un sapore amaro. Di solito questa sensazione è dovuta alle caratteristiche idrofobiche e alla massa molecolare, in quanto si è notato che i peptidi 4 KDa

(Kilodalton) sono molto più amari rispetto ai peptidi 1 KDa (Acquah et al., 2018; Görgüç et al., 2020)

## 6.2: SFIDE ECONOMICHE

### 6.2.1: Costi di produzione e scarsa economia di scala

A causa dei costi associati all'estrazione, alla purificazione e alla caratterizzazione dei peptidi, la produzione di peptidi bioattivi su scala industriale può essere costosa. Le tecnologie attualmente disponibili per produrre peptidi bioattivi di alta qualità, come l'utilizzo di enzimi specifici o processi di fermentazione controllata, potrebbero essere costose. La necessità di processi di purificazione estremamente specifici per ottenere peptidi con attività biologica definita complica la situazione e aumenta i costi.

Tutto ciò comporta ad una mancanza di economia di scala in questo settore, perché, a differenza di altri additivi alimentari, il mercato dei peptidi bioattivi non ha ancora raggiunto un volume di scambi tale da ridurre i costi unitari e di vendita. Questo limita la competitività di questo prodotto nel mercato rispetto ad altri ingredienti funzionali ampiamente utilizzati nell'industria alimentare e nutraceutica, come vitamine e minerali (Duffuler et al., 2022).

## 6.3: SFIDE REGOLATORIE

### 6.3.1: Regolamentazione e approvazione

La regolamentazione e l'approvazione dei peptidi bioattivi nell'industria alimentare sono difficili a causa delle rigide normative nelle varie giurisdizioni. La Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti d'America richiede che i nuovi ingredienti alimentari, inclusi i peptidi bioattivi, subiscano una valutazione della sicurezza approfondita prima di essere commercializzati. L'European Food Safety Authority (EFSA) fa la stessa cosa in tutta Europa, esaminando le prove scientifiche a disposizione per garantire che i peptidi siano sicuri ed efficaci. (Gedif and Tkaczewska, 2024).

## **7: CONCLUSIONI**

Grazie al potenziale per migliorare la salute e prevenire le malattie croniche, i peptidi bioattivi sono una delle frontiere più promettenti nel campo delle scienze e tecnologie alimentari. Abbiamo studiato le molteplici proprietà funzionali di questi componenti in questa tesi, tra cui attività antiossidanti, anti-ipertensive, anti-infiammatorie e immunomodulanti. Abbiamo sottolineato il loro ruolo fondamentale nel migliorare il valore nutrizionale degli alimenti. I peptidi bioattivi hanno innegabili potenzialità, ma l'industria alimentare ha ancora molti problemi che impediscono loro di essere utilizzati su larga scala. La loro instabilità durante la lavorazione e lo stoccaggio, nonché i problemi di isolamento e purificazione, sono importanti ostacoli. Inoltre, le rigide regole e i processi di approvazione necessari per introdurre nuovi ingredienti sul mercato ostacolano l'innovazione.

## 8: BIBLIOGRAFIA

- Abadía-García, L., Cardador, A., Martín del Campo, S.T., Arvízu, S.M., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C., García-Almendarez, B., Amaya-Llano, S.L., 2013. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *Int. Dairy J.*, 2012 IDF International Symposium on Cheese Ripening and Technology 33, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.04.005>
- Abeyrathne, E.D.N.S., Lee, H.Y., Ahn, D.U., 2013. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents--a review. *Poult. Sci.* 92, 3292–3299. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03391>
- Acquah, C., Stefano, E.D., Udenigwe, C.C., 2018. Role of hydrophobicity in food peptide functionality and bioactivity. *J. Food Bioact.* 4, 88–98. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.4164>
- Adibi, S.A., Morse, E.L., 1971. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *J. Clin. Invest.* 50, 2266–2275.
- Ajibola, C.F., Fashakin, J.B., Fagbemi, T.N., Aluko, R.E., 2011. Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 6685–6702. <https://doi.org/10.3390/ijms12106685>
- Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., Uversky, V.N., 2022. Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1445. <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>
- Arshad, N., Siow, H.-L., Ngoh, Y.-Y., Sofian, N.A.H.S., Gan, C.-Y., 2019. Enzyme and Bioactive Peptides—A Strategy for Discovery and Identification of Antihypertensive Peptides, in: *Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier, pp. 343–367. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00020-7>
- Arumugam, V., Venkatesan, M., Ramachandran, S., Sundaresan, U., 2018. Bioactive Peptides from Marine Ascidians and Future Drug Development—A Review. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 24, 13–18. <https://doi.org/10.1007/s10989-017-9662-9>
- Bazinet, L., Firdaous, L., 2009. Membrane processes and devices for separation of bioactive peptides. *Recent Pat. Biotechnol.* 3, 61–72. <https://doi.org/10.2174/187220809787172623>
- Beddington, J., 2010. Food security: contributions from science to a new and greener revolution. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 61–71. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0201>
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., Kumar, V., 2020. A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 26. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09823-5>
- Boeriu, C.G., Frissen, A.E., Boer, E., van Kekem, K., van Zoelen, D.-J., Eggen, I.F., 2010. Optimized enzymatic synthesis of C-terminal peptide amides using subtilisin A from *Bacillus licheniformis*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 66, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.03.010>
- Bongers, J., Heimer, E.P., 1994. Recent applications of enzymatic peptide synthesis. *Peptides* 15, 183–193. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)90189-9](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)90189-9)
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Casali, D., 2016. La ricchezza in Grana Padano e Parmigiano Reggiano di minerali buoni per la salute.
- Chalamaiah, M., Yu, W., Wu, J., 2018. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chem.* 245, 205–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087>
- Cheung, R.C.F., Ng, T.B., Wong, J.H., 2015. Marine Peptides: Bioactivities and Applications. *Mar. Drugs* 13, 4006–4043. <https://doi.org/10.3390/md13074006>



- Chi, C.-F., Hu, F.-Y., Wang, B., Li, T., Ding, G.-F., 2015. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *J. Funct. Foods* 15, 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.045>
- Claeys, W.L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L., 2014. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 42, 188–201. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045>
- Connolly, A., Piggott, C.O., FitzGerald, R.J., 2014. *In vitro*  $\alpha$ -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Res. Int.* 56, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.021>
- Cruz-Casas, D.E., Aguilar, C.N., Ascacio-Valdés, J.A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M.L., Flores-Gallegos, A.C., 2021. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chem. Mol. Sci.* 3, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047>
- de Castro, R.J.S., Sato, H.H., 2015. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Res. Int.* 74, 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.013>
- Devapatla, B., Shidal, C., Yaddanapudi, K., Davis, K.R., 2017. Validation of syngeneic mouse models of melanoma and non-small cell lung cancer for investigating the anticancer effects of the soy-derived peptide Lunasin. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9661.2>
- Dlask, O., Václavíková, N., 2018. Electrodialysis with ultrafiltration membranes for peptide separation. *Chem. Pap.* 72, 261–271. <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0293-6>
- Du, Z., Li, Y., 2022. Review and perspective on bioactive peptides: A roadmap for research, development, and future opportunities. *J. Agric. Food Res.* 9, 100353. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100353>
- Duffuler, P., Bhullar, K.S., de Campos Zani, S.C., Wu, J., 2022. Bioactive Peptides: From Basic Research to Clinical Trials and Commercialization. *J. Agric. Food Chem.* 70, 3585–3595. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06289>
- Fernández, A., Zhu, Y., FitzGerald, R.J., Riera, F.A., 2014. Membrane fractionation of a  $\beta$ -lactoglobulin tryptic digest: effect of the membrane characteristics. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 508–515. <https://doi.org/10.1002/jctb.4144>
- Gedif, H., Tkaczewska, J., 2024. Sourcing, Use of Biopeptides, and Active Protein Hydrolysates as a Positive Response to Green Politics in the World—Current State and Challenges: A Review. *Food Bioprocess Technol.* <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03382-4>
- Gong, X., An, Q., Le, L., Geng, F., Jiang, L., Yan, J., Xiang, D., Peng, L., Zou, L., Zhao, G., Wan, Y., 2022. Prospects of cereal protein-derived bioactive peptides: Sources, bioactivities diversity, and production. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62, 2855–2871. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1860897>
- González-García, E., Marina, M.L., García, M.C., 2014. Plum (*Prunus Domestica L.*) by-product as a new and cheap source of bioactive peptides: Extraction method and peptides characterization. *J. Funct. Foods* 11, 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.020>
- Görgüç, A., Bircan, C., Yılmaz, F.M., 2019. Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. *Food Chem.* 283, 637–645. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.077>
- Görgüç, A., Gençdağ, E., Yılmaz, F.M., 2020. Bioactive peptides derived from plant origin by-products: Biological activities and techno-functional utilizations in food developments – A review. *Food Res. Int.* 136, 109504. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109504>
- Górska-Warsewicz, H., Laskowski, W., Kulykovets, O., Kudlińska-Chylak, A., Czacotko, M., Rejman, K., 2018. Food Products as Sources of Protein and Amino Acids-The Case of Poland. *Nutrients* 10, 1977. <https://doi.org/10.3390/nu10121977>

- Haque, E., Chand, R., Kapila, S., 2008. Biofunctional Properties of Bioactive Peptides of Milk Origin. *Food Rev. Int.* 25, 28–43. <https://doi.org/10.1080/87559120802458198>
- Hartmann, R., Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>
- Ibrahim, H.R., Isono, H., Miyata, T., 2018. Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. *Anim. Nutr. Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui* 4, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.05.004>
- Inibitori della dipeptidil-peptidasi IV, 2023. . Wikipedia.
- Ishak, N.H., Sarbon, N., 2018. A Review of Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides Deriving from Wastes Generated by Fish Processing. *Food Bioprocess Technol* 11, 2–16. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1940-1>
- Islam, Md.S., Wang, H., Admassu, H., Sulieman, A.A., Wei, F.A., 2022. Health benefits of bioactive peptides produced from muscle proteins: Antioxidant, anti-cancer, and anti-diabetic activities. *Process Biochem.* 116, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.007>
- Issaq, H.J., Conrads, T.P., Janini, G.M., Veenstra, T.D., 2002. Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *ELECTROPHORESIS* 23, 3048–3061. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200209\)23:17<3048::AID-ELPS3048>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200209)23:17<3048::AID-ELPS3048>3.0.CO;2-L)
- Jahandideh, F., 2018. Effects of Egg White Derived Peptides on Metabolic Syndrome Complications: Hypertension, Inflammation, and Insulin resistance [WWW Document]. ERA. <https://doi.org/10.7939/R3WS8J20D>
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Zielińska, E., Zieliński, D., 2020. Current Trends of Bioactive Peptides-New Sources and Therapeutic Effect. *Foods Basel Switz.* 9, 846. <https://doi.org/10.3390/foods9070846>
- Kang, N., Ko, S.-C., Kim, H.-S., Yang, H.-W., Ahn, G., Lee, S.-C., Lee, T.-G., Lee, J.-S., Jeon, Y.-J., 2020. Structural Evidence for Antihypertensive Effect of an Antioxidant Peptide Purified from the Edible Marine Animal *Styela clava*. *J. Med. Food* 23, 132–138. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.4415>
- Karwowska, M., Łaba, S., Szczepański, K., 2021. Food Loss and Waste in Meat Sector—Why the Consumption Stage Generates the Most Losses? *Sustainability* 13, 6227. <https://doi.org/10.3390/su13116227>
- Kong, X., Guo, M., Hua, Y., Cao, D., Zhang, C., 2008. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. *Bioresour. Technol.* 99, 8873–8879. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.056>
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A., 2000. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40, 43–81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>
- Lafarga, T., Hayes, M., 2014. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Sci.* 98, 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.036>
- Lee, J.-K., Patel, S.K.S., Sung, B.H., Kalia, V.C., 2020. Biomolecules from municipal and food industry wastes: An overview. *Bioresour. Technol.* 298, 122346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122346>
- Lima, T.N., Pedriali Moraes, C.A., 2018. Bioactive Peptides: Applications and Relevance for Cosmeceuticals. *Cosmetics* 5, 21. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010021>
- Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., Gómez, B., Barba, F.J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C., Toldrá, F., 2018. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends Food Sci. Technol.* 79, 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>
- Madhu, M., Kumar, D., Sirohi, R., Tarafdar, A., Dhewa, T., Aluko, R.E., Badgujar, P.C., Awasthi, M.K., 2022. Bioactive peptides from meat: Current status on production, biological activity, safety, and regulatory framework. *Chemosphere* 307, 135650. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135650>

- Maestri, E., Marmiroli, M., Marmiroli, N., 2016. Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. *J. Proteomics, Foodomics - Novel insights in food and nutrition domains* 147, 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.048>
- Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A.F.G., Hrelia, S., 2014. Bioactive Peptides in Cereals and Legumes: Agronomical, Biochemical and Clinical Aspects. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 21120–21135. <https://doi.org/10.3390/ijms151121120>
- Martínez-Medina, G.A., Barragán, A.P., Ruiz, H.A., Ilyina, A., Martínez Hernández, J.L., Rodríguez-Jasso, R.M., Hoyos-Concha, J.L., Aguilar-González, C.N., 2019. Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry 221–246. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00014-1>
- Matsui, T., Oki, T., Osajima, Y., 1999. Isolation and Identification of Peptidic  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors Derived from Sardine Muscle Hydrolyzate. *Z. Für Naturforschung C* 54, 259–263. <https://doi.org/10.1515/znc-1999-3-417>
- Mazloomi-Kiyapey, S.N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E., Nourmohammadi, E., 2019. Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *ARYA Atheroscler.* 15, 218–227. <https://doi.org/10.22122/arya.v15i5.1755>
- Miguel, M., Aleixandre, A., 2006. Antihypertensive Peptides Derived from Egg Proteins. *J. Nutr.* 136, 1457–1460. <https://doi.org/10.1093/jn/136.6.1457>
- Miner-Williams, W.M., Stevens, B.R., Moughan, P.J., 2014. Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? *Nutr. Res. Rev.* 27, 308–329. <https://doi.org/10.1017/S0954422414000225>
- Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., Schrezenmeir, J., 2008a. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur. J. Nutr.* 47, 171–182. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2>
- Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., Schrezenmeir, J., 2008b. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur. J. Nutr.* 47, 171–182. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2>
- Naeem, M., Malik, M., Umar, T., Ashraf, S., Ahmad, A., 2022. A Comprehensive Review About Bioactive Peptides: Sources to Future Perspective. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 28. <https://doi.org/10.1007/s10989-022-10465-3>
- Nong, N.T.P., Hsu, J.-L., 2022. Bioactive Peptides: An Understanding from Current Screening Methodology. *Processes* 10, 1114. <https://doi.org/10.3390/pr10061114>
- Park, Y.W., Nam, M.S., 2015. Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 35, 831–840. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831>
- Pérez de Vega, M.J., Ferrer-Montiel, A., González-Muñiz, R., 2018. Recent progress in non-opioid analgesic peptides. *Arch. Biochem. Biophys.* 660, 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.10.011>
- Pripp, A.H., 2008. Effect of peptides derived from food proteins on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr. Res.* 52. <https://doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1641>
- Qian, Z.-J., Ryu, B., Park, W.S., Choi, I.-W., Jung, W.-K., 2016. Inhibitory Effects and Molecular Mechanism of an Anti-inflammatory Peptide Isolated from Intestine of Abalone, *Haliotis Discus Hannai* on LPS-Induced Cytokine Production via the p-p38/p-JNK Pathways in RAW264.7 Macrophages. *J. Food Nutr. Res.* 4, 690–698. <https://doi.org/10.12691/jfnr-4-10-9>
- Rakowski, J.A., Holloway, R.W., Ahmad, S., Jeppson, C.N., James, J.A., Ghurani, G.B., Bigsby, G.E., Kendrick, J.E., 2019. A prospective randomized trial of intravenous ketorolac vs. acetaminophen administered with opioid patient-controlled analgesia in gynecologic surgery. *Gynecol. Oncol.* 155, 468–472. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.09.019>
- Raveschot: Production of bioactive peptides by Lactobacil... - Google Scholar [WWW Document], n.d. URL

- [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Production%20of%20bioactive%20peptides%20by%20lactobacillus%20species%3A%20From%20gene%20to%20application&author=C.%20Raveschot&publication\\_year=2018&pages=1-14](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Production%20of%20bioactive%20peptides%20by%20lactobacillus%20species%3A%20From%20gene%20to%20application&author=C.%20Raveschot&publication_year=2018&pages=1-14) (accessed 8.9.24).
- Rizzello, C.G., Tagliacozzi, D., Babini, E., Sefora Rutella, G., Taneyo Saa, D.L., Gianotti, A., 2016. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *J. Funct. Foods* 27, 549–569. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.023>
- Roy, F., Boye, J.I., Simpson, B.K., 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Res. Int., Molecular, Functional and Processing Characteristics of Whole Pulses and Pulse Fractions and their Emerging Food and Nutraceutical Applications* 43, 432–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.002>
- Samtiya, M., Samtiya, S., Badgujar, P.C., Puniya, A.K., Dhewa, T., Aluko, R.E., 2022. Health-Promoting and Therapeutic Attributes of Milk-Derived Bioactive Peptides. *Nutrients* 14, 3001. <https://doi.org/10.3390/nu14153001>
- Sasidharan, A., Menon, V., 2020. Proteins and Co-products from Seafood Processing Discards: Their Recovery, Functional Properties and Applications. *Waste Biomass Valorization* 11. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00812-9>
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
- Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document, 1999. . *Br. J. Nutr.* 81, S1–S27. <https://doi.org/10.1017/S0007114599000471>
- Segura-Campos, M.R., Salazar-Vega, I.M., Chel-Guerrero, L.A., Betancur-Ancona, D.A., 2013. Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT - Food Sci. Technol.* 50, 723–731. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.017>
- Sewald, N., Jakubke, H.-D., 2005. Peptides: chemistry and biology, Repr. ed. Wiley-VCH, Weinheim. activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Sci. Technol.* 90. <https://doi.org/10.1051/dst/2009049>
- Singh, B.P., Bangar, S.P., Alblooshi, M., Ajayi, F.F., Mudgil, P., Maqsood, S., 2023. Plant-derived proteins as a sustainable source of bioactive peptides: recent research updates on emerging production methods, bioactivities, and potential application. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 63, 9539–9560. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2067120>
- Singh, B.P., Vij, S., Hati, S., 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* 54, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.022>
- Steinberg, D., Witztum, J.L., 2009. Inhibition of PCSK9: a powerful weapon for achieving ideal LDL cholesterol levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9546–9547. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904560106>
- Teschemacher, H., Koch, G., Brantl, V., 1997. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 43, 99–117. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1997\)43:2<99::AID-BIP3>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1997)43:2<99::AID-BIP3>3.0.CO;2-V)
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M.-C., Mora, L., 2018. Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chem.* 267, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119>
- Toldrá, F., Reig, M., Gallego, M., Mora, L., 2023. Bioactive Peptides in Meat and Meat Products. *Meat Muscle Biol.* 7. <https://doi.org/10.22175/mmb.16243>
- Tonolo, F., Coletta, S., Fiorese, F., Grinzato, A., Albanesi, M., Folda, A., Ferro, S., De Mario, A., Piazza, I., Mammucari, C., Arrigoni, G., Marin, O., Cestonaro, G., Nataloni, L., Costanzo, E., Lodovichi, C., Rigobello, M.P., de Bernard, M., 2024. Sunflower seed-derived bioactive peptides show antioxidant and anti-inflammatory activity: From *in silico* simulation to the animal model. *Food Chem.* 439, 138124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138124>
- Ulug, S.K., Jahandideh, F., Wu, J., 2021. Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 108, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002>

- Walters, M.E., Esfandi, R., Tsopmo, A., 2018. Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption. *Foods Basel Switz.* 7, 172. <https://doi.org/10.3390/foods7100172>
- Wang, X., Yu, H., Xing, R., Li, P., 2017. Characterization, Preparation, and Purification of Marine Bioactive Peptides. *BioMed Res. Int.* 2017, 9746720. <https://doi.org/10.1155/2017/9746720>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., Ma, H., 2020. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 105, 308–322. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.019>
- Wergedahl, H., Liaset, B., Gudbrandsen, O.A., Lied, E., Espe, M., Muna, Z., Mørk, S., Berge, R.K., 2004. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. *J. Nutr.* 134, 1320–1327. <https://doi.org/10.1093/jn/134.6.1320>
- Wisuthiphaet, N., Klinchan, S., Kongruang, S., 2016. Fish Protein Hydrolysate Production by Acid and Enzymatic Hydrolysis. *King Mongkut's Univ. Technol. North Bangk. Int. J. Appl. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.14416/j.ijast.2016.11.004>
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J., NIZO Dairy Conference on Food Microbes 2001* 12, 91–109. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00151-0)
- Wu, J., Jahandideh, F., Yu, W., Majumder, K., 2015. Bioactive Peptides from Meat Proteins as Functional Food Components, in: *Functional Polymers in Food Science: From Technology to Biology*. pp. 181–208. <https://doi.org/10.1002/9781119108580.ch9>
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Wang, F., Yu, Y., Liu, B., Liu, J., Chen, F., 2011. Characterization of ACE-inhibitory peptide associated with antioxidant and anticoagulation properties. *J. Food Sci.* 76, C1149-1155. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02367.x>