



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE
BIOMEDICINA COMPARATA ED ALIMENTAZIONE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

PEPTIDI BIOATTIVI: ORIGINE ED EFFETTI BENEFICI

Relatore: Prof. Fabio Vianello
Correlatore: Dr. Federica Tonolo

Laureando: Francesco Masiero
Matricola n.: 2007462

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

RIASSUNTO

I peptidi bioattivi sono delle corte sequenze di amminoacidi generalmente derivate da proteine alimentari. Queste molecole possono essere ottenute tramite vari processi come per esempio: l'idrolisi chimica, l'idrolisi enzimatica e la fermentazione degli alimenti. Attualmente c'è una continua ricerca e un continuo studio per quanto riguarda i loro potenziali benefici per la salute umana. La comunità scientifica, infatti, sta dedicando risorse significative per comprendere i loro meccanismi d'azione e potenziali applicazioni terapeutiche. Alcune attività dei peptidi bioattivi riguardano la capacità di operare come inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), svolgendo quindi un ruolo antipertensivo, oppure la capacità antimicrobica contro specifici patogeni e la loro azione antiossidante che rappresenta un mezzo per contrastare lo stress ossidativo, coinvolto nella patogenesi delle malattie croniche. La loro potenziale inclusione in alimenti funzionali o integratori alimentari potrebbe anche valorizzare i sottoprodotti alimentari, contribuendo ad un approccio sostenibile nella riduzione degli sprechi alimentari globali.

Lo scopo di questa tesi è analizzare i peptidi bioattivi dalla loro origine alla loro applicazione, evidenziandone eventuali benefici e criticità.

ABSTRACT

Bioactive peptides are short sequences of aminoacids generally derived from dietary proteins. These molecules can be obtained through various processes such as chemical hydrolysis, enzymatic hydrolysis, and food fermentation. They are currently being researched and studied for their potential health benefits to humans. The scientific community is dedicating significant resources to understanding their mechanisms of action and potential therapeutic applications. Some of the activities of bioactive peptides include the ability to act as angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, thereby playing an antihypertensive role, or their antimicrobial capacity against specific pathogens and their antioxidant action, which serves as a means to counteract oxidative stress involved in the pathogenesis of chronic diseases. Their potential inclusion in functional foods or dietary supplements could also enhance food by-products, contributing to a sustainable approach in reducing global food waste.

The aim of this thesis is to analyze bioactive peptides from their origin to their application, highlighting any potential benefits and criticisms.

INDICE

| | |
|--|----|
| RIASSUNTO | 3 |
| ABSTRACT | 3 |
| STATO DELL'ARTE | 6 |
| COSA SONO I PEPTIDI BIOATTIVI | 7 |
| DEFINIZIONE E CONCETTO DI PEPTIDI BIOATTIVI..... | 7 |
| FUNZIONI FISILOGICHE DEI PEPTIDI BIOATTIVI | 8 |
| POTENZIALI APPLICAZIONI | 9 |
| ORIGINE DEI PEPTIDI BIOATTIVI..... | 9 |
| PEPTIDI BIOATTIVI DI ORIGINE VEGETALE..... | 10 |
| PEPTIDI BIOATTIVI DEL LATTE | 10 |
| PEPTIDI BIOATTIVI DEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI | 12 |
| PEPTIDI BIOATTIVI DELLA CARNE..... | 12 |
| PEPTIDI BIOATTIVI DELL'INDUSTRIA ITTICA..... | 13 |
| PEPTIDI BIOATTIVI DELLE UOVA..... | 14 |
| MECCANISMI DI PRODUZIONE DEI PEPTIDI BIOATTIVI | 15 |
| IDROLISI CHIMICA | 15 |
| IDROLISI ENZIMATICA..... | 16 |
| FERMENTAZIONE MICROBICA..... | 16 |
| DNA RICOMBINANTE..... | 17 |
| NOVEL TECHNOLOGIES | 17 |
| FRAZIONAMENTO E PURIFICAZIONE..... | 19 |
| PURIFICAZIONE TRAMITE MEMBRANE | 20 |
| PURIFICAZIONE TRAMITE CROMATOGRAFIA | 21 |
| IDENTIFICAZIONE TRAMITE STRUMENTI BIOINFORMATICI | 21 |
| EFFETTI BENEFICI | 22 |
| PEPTIDI ANTIOSSIDANTI | 23 |
| PEPTIDI ANTIPERTENSIVI | 25 |
| PEPTIDI ACE INIBITORI..... | 25 |
| PEPTIDI INIBITORI DELL'ENDOTELINA | 26 |
| PEPTIDI ANTIMICROBICI..... | 27 |
| PEPTIDI IMMUNOMODULANTI..... | 27 |
| PEPTIDI OSTEOPROTETTIVI | 28 |

| | |
|---|----|
| PEPTIDI IPOLIPEMIZZANTI | 30 |
| PEPTIDI ANTIDIABETICI | 32 |
| PEPTIDI ANTICANCRO | 32 |
| PEPTIDI OPPIOIDI | 33 |
| PEPTIDI ANTICOAGULANTI | 33 |
| PEPTIDI ANTICARIOGENI..... | 34 |
| ASSORBIMENTO | 34 |
| APPLICAZIONI | 35 |
| DISPONIBILITÀ COMMERCIALE DEI PEPTIDI BIOATTIVI | 35 |
| LIMITI | 35 |
| CONCLUSIONI | 36 |
| BIBLIOGRAFIA | 37 |
| SITOGRAFIA | 39 |

STATO DELL'ARTE

L'alimentazione svolge un ruolo cruciale nella nostra quotidianità, essa ci fornisce i nutrienti essenziali per il corretto funzionamento del nostro organismo.

Questi nutrienti includono macromolecole come carboidrati, proteine e lipidi, che sono necessari per le nostre funzioni biologiche.

Un'altra parte fondamentale della nostra dieta è rappresentata da tutte quelle molecole bioattive, ovvero che esercitano un effetto sui processi biologici dei tessuti viventi.

Tra le molecole bioattive possiamo trovare le vitamine, i polifenoli e anche i peptidi bioattivi.

I peptidi bioattivi sono una categoria molto vasta di molecole formate da pochi aminoacidi che stanno suscitando sempre più interesse nella letteratura scientifica.

Negli ultimi dieci anni le pubblicazioni di ricerca in merito a questi peptidi, infatti, sono triplicate (Figura 1).

Attualmente sono conosciuti più di 4400 diversi peptidi bioattivi, riportati nel database BIOPEP-UWM [1], ai quali vengono conferite diverse attività benefiche per il nostro organismo, ad esempio: antitrombotiche; antipertensive; immunomodulanti [1].

Ma non solo, alcuni peptidi bioattivi presentano anche attività di interesse tecnologico, ad esempio emulsionante [2], attività organolettiche (conferiscono un sapore amaro) e altri potrebbero pure essere degli allergeni [3].

Il mercato globale dei peptidi bioattivi, esclusi i farmaci peptidici, è stato valutato a 48,6 miliardi di USD nel 2020 e dovrebbe raggiungere i 95,7 miliardi di USD entro il 2028 [11].

Dati questi pretesti, i peptidi bioattivi hanno 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.

Lo scopo di questa tesi quindi è analizzare in maniera critica gli studi in merito ai peptidi bioattivi di origine alimentare sulla base delle evidenze scientifiche attuali, definendo:

- l'origine di questi peptidi; gli effetti evidenziati dagli studi;
- il grado di assorbimento;
- le loro possibili applicazioni;
- i limiti.

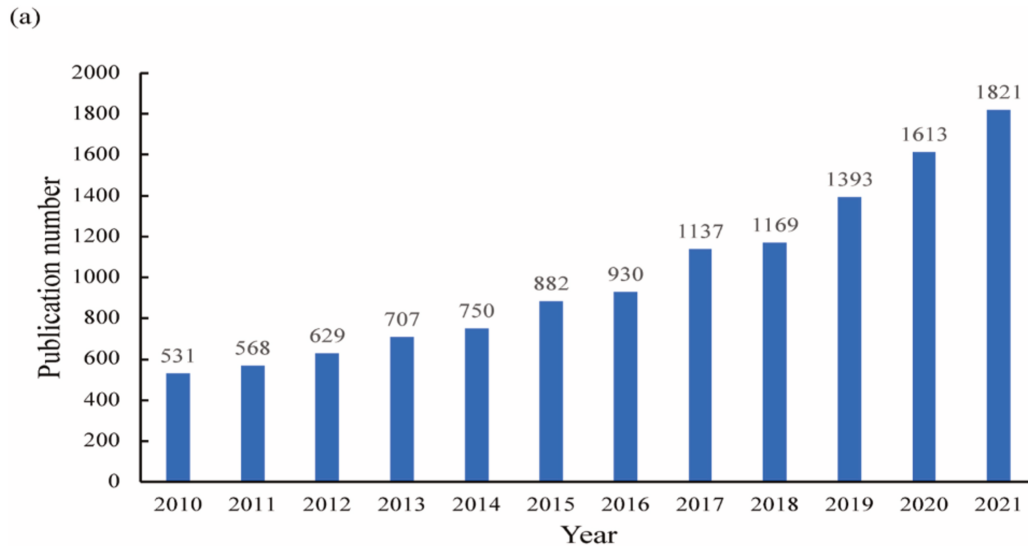


Figura 1 Aumento delle pubblicazioni di ricerca sui peptidi bioattivi. Il numero di pubblicazioni all'anno che includono il termine "peptide bioattivo" come parole chiave è stato tracciato. I dati sono stati ottenuti da Web of Science nel maggio 2022. [4]

COSA SONO I PEPTIDI BIOATTIVI

DEFINIZIONE E CONCETTO DI PEPTIDI BIOATTIVI

I peptidi bioattivi (*BAPs: bioactive peptides*) sono delle molecole definite da un peso molecolare inferiore a 6 kDa e una sequenza da 2 a 20 amminoacidi che sono in grado di esercitare una attività biologica all'interno del nostro organismo. [5]

Questi peptidi sono criptati all'interno delle sequenze primarie delle proteine e possono essere liberati attraverso l'azione di:

- agenti chimici che agiscono con la proteina in questione durante la lavorazione di un alimento;
- enzimi proteolitici esogeni o endogeni;
- fermentazione microbica.

Parliamo dunque di componenti specifici con effetti biologici sul nostro organismo.

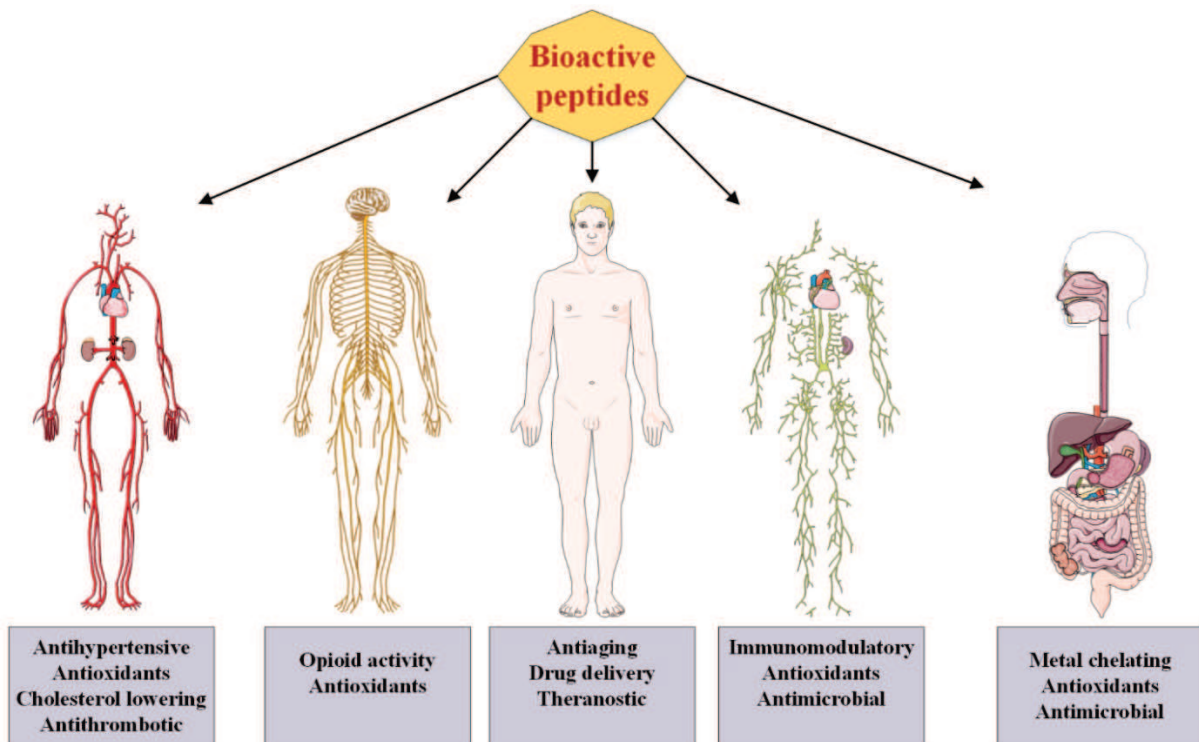


Figura 2: Possibili applicazioni dei peptidi bioattivi. [6]

FUNZIONI FISILOGICHE DEI PEPTIDI BIOATTIVI

Diversi peptidi bioattivi potrebbero interagire in diversi metabolismi e potrebbero migliorare rapidamente la salute degli organismi, mostrando quindi un ruolo fisiologico e farmacologico.

In particolare, hanno dimostrato possedere le seguenti attività [1]:

- Antipertensiva
- Antiossidante
- Oppioide
- Immumomodulante
- Antimicrobica
- Ipolipemizzante
- Antidiabetica
- Osteoprotettiva
- Anticancerogena
- Anticariogenica
- Ileo contraente

I *BAPs* mostrano le attività differenti grazie a fattori intrinseci come [7]:

- Sequenza specifica dell'amminoacido;
- Lunghezza,
- Composizione,

- Carica
- Amminoacido presente al carbossile o al terminale amminico dei peptidi.

In particolare l'aspetto che influenza di più la loro azione riguarda la possibilità di raggiungere o meno il sito di riconoscimento. Ciò dipende dalla loro idrofobicità o solubilità [7].

POTENZIALI APPLICAZIONI

Le persone attente alla salute e quelle con predisposizioni specifiche potrebbero essere i gruppi target per alimenti arricchiti con peptidi bioattivi. Per questo motivo possiamo asserire che c'è certamente un potenziale per l'applicazione di proteine e peptidi bioattivi. [1] Tuttavia, siamo ancora molto distanti da queste applicazioni, nei paragrafi successivi spiegheremo il perché.

In particolare, i peptidi bioattivi attirano l'interesse in quanto offrono l'opportunità di valorizzare matrici alimentari che, altrimenti, verrebbero scartate o eliminate. Questo è particolarmente rilevante considerando che, secondo le Nazioni Unite, circa un terzo degli alimenti prodotti per il consumo umano viene sprecato [2].

ORIGINE DEI PEPTIDI BIOATTIVI

I peptidi bioattivi possono essere ricavati sia da alimenti vegetali ed animali ricchi in proteine ma anche da scarti della filiera agro-alimentare.

I peptidi bioattivi possono essere prodotti attraverso vari meccanismi, come per esempio:

1. Durante la digestione gastro-intestinale, grazie all'azione di enzimi proteolitici come la tripsina;
2. Tramite un'idrolisi enzimatica o chimica;
3. Durante la trasformazione o lo stoccaggio degli alimenti, per esempio, attraverso la fermentazione (ad es. *Lactobacillus helveticus*) [1];

Da notare quindi che le proteine da cui derivano i peptidi bioattivi non svolgono generalmente alcuna bioattività, risulta fondamentale infatti l'attività di enzimi, isolati o secreti dai microrganismi, per permettere il rilascio dei peptidi dalla proteina nativa in cui si trovano nella forma incriptata ed inattiva e passare alla forma attiva. Sebbene l'idrolisi enzimatica sia l'approccio più comune per generare *BAPs* dalle proteine alimentari [1], la fermentazione è principalmente rilevante per alcuni prodotti come il latte, la bevanda di soia e altri prodotti acquosi. La produzione di peptidi bioattivi da fonti proteiche può essere classificata in base alla loro origine: vegetali, animali, derivati animali, pesce.

PEPTIDI BIOATTIVI DI ORIGINE VEGETALE

L'industria agroalimentare contemporanea affronta una doppia sfida: gestire ingenti quantità di sottoprodotti generati dai processi di trasformazione e soddisfare una crescente domanda di prodotti lavorati di origine vegetale [8]. I residui generati dalla trasformazione alimentare possono costituire dal 5 al 50% della materia prima originale. Essi rappresentano sia una sfida ambientale sia una sfida finanziaria legata allo smaltimento ma potrebbero anche essere visti come una potenziale fonte per innovativi approcci di riutilizzo. [9] Durante la lavorazione di alimenti vegetali, vengono prodotte considerevoli quantità di scarti, quali scafi, semi e sansa. Questi scarti sono suddivisibili in residui agricoli come melassa, bucce e industriali come bucce e pannelli di semi oleosi [8]. Parallelamente, l'interesse crescente per le proteine vegetali, spinto da fattori quali preferenze dietetiche, credenze religiose e consapevolezza ambientale, rende la valorizzazione di tali residui una grossa opportunità economica nell'ottica di ridurre l'impatto ambientale ed aumentare la sostenibilità della filiera agro-alimentare.

I peptidi bioattivi, derivati da queste fonti di sottoprodotti vegetali, si sono dimostrati non solo promettenti dal punto di vista funzionale, ma anche capaci di potenziare le proprietà tecnologiche di vari alimenti, quali carni lavorate, formaggi e salse, migliorando fattori come l'emulsione e le proprietà gelificanti [9]. In una panoramica globale, i semi oleosi, i cereali e i legumi si distinguono come fonti primarie di proteine vegetali. Di rilievo è la farina di soia, con la sua notevole produzione annua e un'abbondante presenza proteica, assieme ai residui di cereali, come quelli di grano e riso, che, pur avendo un contenuto proteico leggermente inferiore, si impongono come fonti proteiche emergenti data la loro vasta produzione [9]. Alla luce di questi dati, l'intersezione tra il riciclo di sottoprodotti agroindustriali e la produzione di peptidi bioattivi rappresenta un terreno fecondo per l'innovazione, promettendo non solo di affrontare le sfide dello spreco alimentare e della sostenibilità, ma anche di svelare nuove strade per soddisfare il bisogno globale di proteine in maniera etica e ecologicamente sostenibile. [8]

PEPTIDI BIOATTIVI DEL LATTE

Il latte, ricco di nutrienti essenziali come proteine, grassi, carboidrati, vitamine e minerali, soddisfa le fondamentali necessità nutrizionali dell'essere umano [1].

La produzione lattiero-casearia globale nel 2019 ha raggiunto circa 852 milioni di tonnellate, con un aumento dell'1,3%. Particolarmente significativo è l'incremento del 4,2% registrato in India, il maggiore produttore mondiale di latte [5].

Sebbene bufali e vacche siano le principali fonti commerciali di latte, non bisogna dimenticare altre specie come cammelli, equini, capre, asini, pecore, mithun e yak [5].

Diversi studi hanno evidenziato i benefici del latte e dei suoi derivati sulla salute, suggerendo una possibile riduzione dell'incidenza di disturbi metabolici grazie ai peptidi bioattivi presenti [5]. La composizione dei *BAPs* potrebbe variare a seconda di fattori genetici e ambientali [III]. La crescente produzione di latte bovino, consumato regolarmente da circa 600 milioni di persone in tutto il mondo [III], ha visto un aumento del 41% dal 1983 al 2013 [10].

Questi fattori hanno stimolato altresì la ricerca sui componenti minoritari del latte, in particolar modo, la ricerca dei peptidi bioattivi in ambito lattiero-caseario risulta quella più studiata.

Qui sotto viene riportata una tabella contenente le principali proteine del latte, fondamentali per quanto riguarda la ricerca dei peptidi bioattivi in quanto ogni peptide bioattivo viene ottenuto prima separando una determinata frazione proteica e poi idrolizzando con determinate metodologie che verranno discusse in seguito.

Tabella 1 Principali proteine presenti nel latte di diverse specie [1]

| Species | Protein | Total Casein | α S1-Casein | α S2 Casein | κ -Casein | β -Casein | Total Whey | α -Lactalbumin | β -Lactoglobulin |
|---------|---------|--------------|--------------------|--------------------|------------------|-----------------|------------|-----------------------|------------------------|
| (g/L) | | | | | | | | | |
| Camel | 25–45 | 26.4 | 5 | 2.2 | 0.8 | 12.8 | 6.6 | 3.5 | - |
| Cow | 31–38 | 27.2 | 10–15 | 3–4 | 3–4 | 9–11 | 4.5 | 1–1.5 | 3.3–4 |
| Donkey | 13–28 | 27.2 | 0.2–1 | 0.2 | - | 3.9 | 7.5 | 1.8–3 | 3.2–3.7 |
| Goat | 25–39 | 25 | 0–7 | 4.2 | 4–4.6 | 11–18 | 6 | 1.2 | 2.1 |
| Human | 9–17 | 5.6 | 0.3–0.8 | - | 0.6–1 | 1.8–4 | 8 | 1.9–2.6 | - |

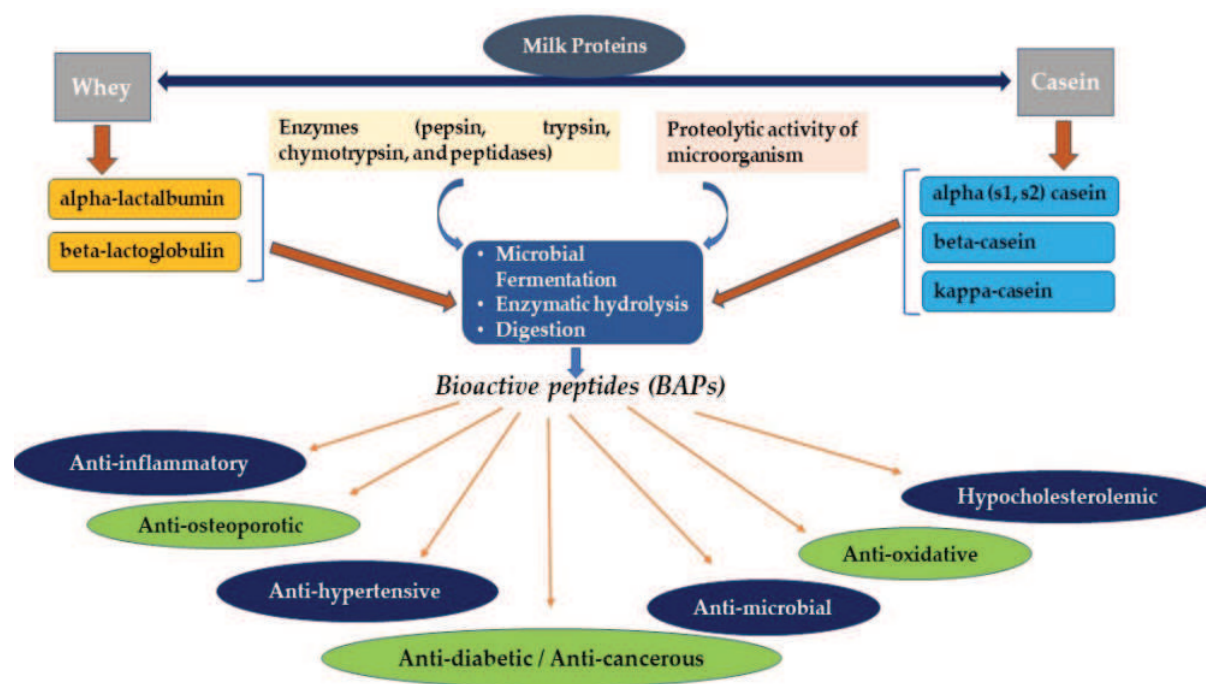


Figura 3 Panoramica dettagliata dei metodi di produzione di *BAPs* derivati dalle proteine del latte e dei loro potenziali impieghi. [1]

PEPTIDI BIOATTIVI DEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI

Come precedentemente illustrato, la presenza di singoli peptidi bioattivi può subire modifiche in funzione di fattori genetici e ambientali [III].

Partendo da questo presupposto, i prodotti derivati dal latte diventano ancora più complessi sotto il punto di vista dei peptidi bioattivi, in quanto il profilo peptidico già variabile a seconda del latte subisce modificazioni al seguito di tantissime variabili, ad esempio:

- durata della fermentazione;
- ceppi batterici o fungini utilizzati;
- cottura;
- enzimi nativi del latte;
- aggiunta di enzimi come il caglio.

Tutto questo rende l'identificazione dei peptidi presente negli alimenti (qui abbiamo parlato dei prodotti lattiero caseari ma in generale parliamo di tutti i prodotti trasformati o lavorati) un argomento molto complesso.

Studi evidenziano che *Lactobacillus helveticus*, per esempio, quando fermenta la caseina, produce significativi peptidi ACE-inibitori [5]. Questo rende il Grana Padano e il Parmigiano Reggiano delle presunte fonti di tali peptidi [11].

Diversi studi hanno confermato l'efficacia della fermentazione selettiva come tecnica di produzione di peptidi con attività biologiche, indicando un potenziale per ulteriori miglioramenti nella produzione di prodotti lattiero-caseari fermentati [5].

PEPTIDI BIOATTIVI DELLA CARNE

L'impiego di carni per la produzione di peptidi bioattivi diventa interessante specialmente se permette di dare un valore aggiunto agli scarti di lavorazione.

Diverse fonti di carne come pollo, anatra, suino, bovino, cervo e ovino si pensa che presentino peptidi bioattivi con attività antipertensive, antiossidanti, antitrombotiche, antimicrobiche, antitumorali e antidiabetiche [12].

Svariati peptidi con diverse proprietà bioattive sono stati riconosciuti e isolati da varie carni e loro sottoprodotti, alcuni esemplificati nella Figura 4. La maggioranza dei peptidi bioattivi derivati dalle proteine della carne manifesta funzioni antiossidanti e di inibizione dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) [12].

Tuttavia, le funzioni bioattive dei peptidi della carne sono state principalmente esaminate *in vitro*, per cui i dati ottenuti potrebbero non coincidere sempre con quelli *in vivo*, dato che il peptide potrebbe subire modifiche prima di interagire col suo obiettivo.

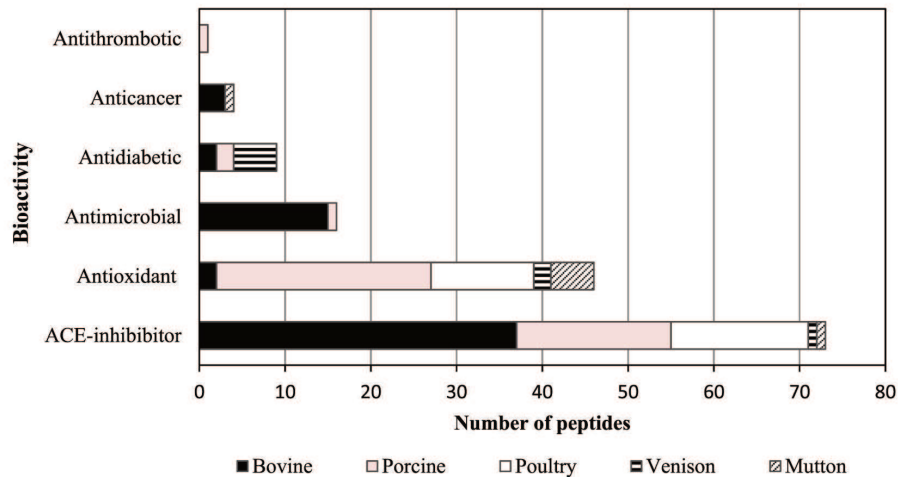


Figura 4: Distribuzione di peptidi bioattivi identificati da diverse fonti di carne. I peptidi che possiedono più attività vengono conteggiati in ciascuna categoria. [12]

PEPTIDI BIOATTIVI DELL'INDUSTRIA ITTICA

La valorizzazione degli scarti della pesca attraverso la produzione di peptidi bioattivi rappresenta una soluzione sostenibile e innovativa per affrontare il problema del massiccio spreco di risorse nel settore ittico. [2]

L'industria della pesca, essenziale per il sostentamento umano e per l'economia globale, produce una considerevole quantità di sottoprodotti ricchi di proteine, quali teste, pelli, pinne e interiora, che spesso vengono scartati senza tentativi di recupero.

Questi materiali, che rappresentano oltre il 60% della biomassa, possono invece diventare una fonte preziosa di peptidi bioattivi attraverso processi come l'idrolisi enzimatica, trasformandoli in ingredienti di valore aggiunto per prodotti alimentari e farmaceutici.

I peptidi bioattivi estratti dall'idrolizzato proteico del pesce hanno manifestato un considerevole potenziale, non soltanto per le loro proprietà antiossidanti e antipertensive (dimostrate *in vitro*), ma anche per la loro notevole capacità emulsionante, schiumogena e addensante. Queste caratteristiche risultano particolarmente interessanti anche sotto il profilo tecnologico [9].

Investire nella ricerca e nello sviluppo di tecnologie avanzate per la produzione di peptidi da scarti ittici non solo mitiga il problema degli sprechi, ma apre anche la via a nuove opportunità di mercato, creando prodotti che soddisfano la crescente domanda di alimenti e integratori salutari e sostenibili.

Inoltre, essi offrono vantaggi ambientali, trasformando quello che altrimenti sarebbe un rifiuto in risorse preziose e socio-economiche, attraverso la creazione di nuovi settori e posti di lavoro nel campo dell'innovazione alimentare e della biotecnologia. [2]

PEPTIDI BIOATTIVI DELLE UOVA

Nonostante le uova siano universalmente riconosciute e impiegate come una fonte di nutrienti essenziali da molte culture e gruppi etnici in tutto il mondo, il loro consumo ha risentito di una decrescita negli ultimi anni, specialmente nei paesi sviluppati. Tale diminuzione è prevalentemente attribuibile alle preoccupazioni riguardanti il loro elevato contenuto di colesterolo e grassi. [13] Per quanto riguarda il loro utilizzo, è interessante osservare che il 30% del totale delle uova consumate viene impiegato in prodotti trasformati, come dolci, paste, zuppe disidratate e dessert. [14] Questa tendenza ha spinto la ricerca verso nuove modalità per sfruttare al meglio l'uovo. Una delle risposte è stata l'isolamento di specifiche proteine provenienti dall'albume e dal tuorlo per la produzione di alimenti funzionali. Qui possiamo far rientrare anche i peptidi bioattivi, ottenuti attraverso l'idrolisi enzimatica delle proteine dell'uovo, in particolar modo nelle uova che altrimenti verrebbero buttate. [14]

Tabella 2 Esempi di peptidi bioattivi derivati dalle proteine dell'uovo e metodiche di produzione [14]

| Biological activity | Egg proteins | Enzymatic hydrolysis conditions | Peptides |
|---------------------------|--------------------|--|--|
| Antioxidant activity | Ovalbumin | Pepsin, pH 7.4, 37 °C, 3 h | Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu, Ser-Ala-Leu-Ala-Met |
| | Egg white proteins | Alcalase, pH 10.66, 50 °C | Asp-His-Thr-Lys-Glu, Phe-Phe-Glu-Phe-His, Met-Pro-Asp-Ala-His-Leu |
| | Phosvitin | Trypsin, pH 8, 37 °C, 24 h | His-Met-Tyr |
| | Egg yolk proteins | Pepsin, pH 3.5, 37 °C, 2 h | Tyr-Ile-Asn-Gln-Met-Pro-Gln-Lys-Ser-Arg-Glu |
| Antihypertensive activity | Ovalbumin | Pepsin (pH 2.0), trypsin (pH 7.8), and chymotrypsin (pH 8.0), 37 °C, 24 h | Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu, Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu |
| | Ovalbumin | Thermolysin (pH 7.5), pepsin (pH 2.0), trypsin (pH 7.5), and chymotrypsin (pH 7.5), 37 °C, 2 h | Leu-Trp, Ile-Lys-Trp |
| | Ovotransferrin | Thermolysin, pH 8.0, 55 °C, 3 h; pepsin, pH 2.0, 37 °C, 3 h | Ile-Arg-Try, Leu-Lys-Pro, and Ile-Gln-Try |
| | Egg white proteins | Alcalase, pH 10.0, 50 °C, 180 min | Thr-Asn-Gly-Ile-Ile-Arg |
| Antimicrobial activity | Ovalbumin | Trypsin and chymotrypsin, pH 7.8, 37 °C, 6 h | Ser-Ala-Leu-Ala-Met, Ser-Ala-Leu-Ala-Met-Val-Tyr, Tyr-Pro-Ile-Leu-Pro-Glu-Tyr-Leu-Gln, Glu-Leu-Ile-Asn-Ser-Trp, Asn-Val-Leu-Gln-Pro-Ser-Ser, Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu-Pro-Glu-Tyr-Leu, Gly-Ile-Ile-Arg-Asn, Thr-Ser-Ser-Asn-Val-Met-Glu-Glu-Arg |
| | Lysozyme | Pepsin, pH 1.0, 37 °C, 1 h, followed by trypsin, pH 8.0, 37 °C, overnight | Ile-Val-Ser-Asp-Gly- en (Asp-Gly-Met-Asn-Ala-Trp, His-Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr-Arg) |
| | Ovalbumin | Flavourzyme, pH 7.0, 50 °C, 1 h; pepsin, pH 2.0, 37 °C, 2 h; trypsin, pH 7.5, 37 °C, 3 h; neutrase, pH 7.0, 50 °C, 4 h; papain, pH 6.5, 50 °C, 5 h | Arg-Val-Ala-Ser-Met-Ala-Ser-Glu-Lys-Met-Lys-Ile |
| | Lysozyme | Alcalase, pH 7.5, 50 °C, 3 h | Asx-Ser-Gly-Arg-Ala-Leu |
| Anticancer activity | Ovomucin | Pronase (from <i>Streptomyces griseus</i>), pH 8.4, 37 °C, 24 h | Glycopeptides with 120 000 Da and 220 000 Da |
| | Phosvitin | Trypsin, pH 8.0, 37 °C, overnight | Phosphor-oligopeptides with phosphorus (0–19 wt%) |

MECCANISMI DI PRODUZIONE DEI PEPTIDI BIOATTIVI

Per produrre un peptide bioattivo devo partire da una matrice alimentare che lo contiene all'interno della sua frazione proteica.

Questa matrice alimentare può venire digerita tramite idrolisi chimica, idrolisi enzimatica, fermentazione microbica. Ultimamente emergono anche nuove tecnologie.

IDROLISI CHIMICA

L'idrolisi chimica è una tecnica economica che consiste nell'impiego di diversi acidi e alcali al fine di liberare i peptidi bioattivi da una matrice proteica.

Dal punto di vista nutrizionale comporta una scarsa qualità del prodotto finale e una minore funzionalità biologica. Questo lo si deve all'utilizzo di pH estremi e di temperature elevate [7]. Per questo motivo i risultati ottenuti idrolizzando chimicamente i prodotti della pesca conferivano quantità inferiori rispetto all'idrolisi enzimatica [7].

Un altro aspetto da considerare durante il trattamento termico e alcalino delle proteine è la possibilità che si formino amminoacidi reticolati come la lisinoalanina (LAL), specialmente in presenza di condizioni quali pH elevato, alta temperatura e tempi di esposizione prolungati.

Il meccanismo di formazione della lisinoalanina avviene in due fasi.

1. Inizialmente, gli ioni idrossido catalizzano l'eliminazione dei residui di cisteina e serina formando un intermedio chiamato deidroalanina.
2. Successivamente, il doppio legame della deidroalanina reagisce con il gruppo ϵ -NH₂ della lisina, risultando nella formazione di un legame incrociato di lisinoalanina.

Questo legame rende indisponibile la lisina, un aminoacido essenziale.

Oltre all'effetto di limitazione nutrizionale, quindi un'impossibilità da parte degli enzimi di liberare lisina, studi su cavie di laboratorio hanno evidenziato che la lisinoalanina (LAL) può avere effetti tossici sui reni (nefromegalia) [15].

Così, non è un metodo preferito per la generazione del peptide, ma molti ricercatori lo hanno usato, come indicato nella Tabella 3. [7]

Tabella 3: Esempi di peptidi bioattivi generati tramite idrolisi chimica [7]

| Source | Hydrolysis Method | Bioactivity | Reference |
|---|--|---|-----------------------|
| Broccoli with scientific name <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italic</i> | Hydrolysis by a chemical like acetone | ACE inhibition resulted in Antihypertensive activity | Lee et al. (2006) |
| Bitter melon 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) |

IDROLISI ENZIMATICA

Il metodo preferito e più comunemente utilizzato per la generazione di peptidi bioattivi è l'idrolisi enzimatica, questa comporta una minore concentrazione di sostanze chimiche tossiche e residui di solventi organici rispetto a quella chimica. Questi enzimi rompono i legami delle proteine e portano alla produzione di peptidi bioattivi. Questo metodo richiede condizioni specifiche come attività enzimatica, concentrazione del substrato, temperatura e pH. [7]

È possibile aggiungere anche più di un enzima per ottenere il peptide d'interesse se questi sono attivi nelle medesime condizioni di temperatura e pH. Molti enzimi sono stati utilizzati per la generazione di peptidi da diverse fonti ricche di proteine, alcuni di essi sono menzionati in Tabella 4.

Tabella 4: Esempi di peptidi bioattivi generati tramite idrolisi enzimatica [7]

| Source | Hydrolysis Method | Bioactivity | Reference |
|---|--|--|---------------------------|
| Broccoli with the scientific name <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italic</i> | Enzymatic hydrolysis by enzymes like Chymotrypsin as well as Thermolysin | ACE inhibition resulted in Antihypertensive activity | Dang et al. (2019) |
| Bambara bean | Enzymatic hydrolysis by Thermolysin, Alcalase, and Trypsin | Antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activity | Mune et al. (2018) |
| Hydrolyzed egg white | <i>In-vivo</i> digestion in SHR | Increased ACE2 expression | Liao et al. (2019a) |
| Pea protein hydrolysates | Enzymatic hydrolysis by Pepsin and Thermoase | Antihypertensive activity | Liao et al. (2019b) |
| Lentil | Enzymatic hydrolysis by Savinase | Antihypertensive and antioxidant activity | García-Mora et al. (2017) |

FERMENTAZIONE MICROBICA

Anche questo è un metodo economico rispetto alla digestione enzimatica.

Tramite la fermentazione, i microrganismi degradano la proteina e possono produrre dei peptidi bioattivi come riportato nella Tabella 5.

In particolare, la produzione di peptidi bioattivi si deve all'azione delle proteasi native combinata a quella degli enzimi microbici ed alla riduzione del pH. [7]

Tuttavia, la produzione di peptidi utilizzando questa tecnologia a livello industriale è limitata a causa della bassa quantità di peptidi prodotti e della loro specificità [7].

Tabella 5: Esempi di peptidi bioattivi generati mediante fermentazione microbica [7]

| Source | Hydrolysis Method | Bioactivity | Reference |
|-----------------------------------|---|--|-------------------------------|
| <i>Cucumis sativus</i> (Cucumber) | Microbial fermentation by <i>Lactobacillus pentosus</i> | ACE inhibition resulted in Antihypertensive activity | Fideler et al. (2019) |
| Iraqi camel milk | Microbial fermentation by <i>Lactobacillus plantarum</i> | Antimicrobial | Muhialdin and Alghoory (2018) |
| Bean seed flour | Microbial fermentation by <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v | Antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activity | Jakubczyk (2018) |
| Camel milk | Microbial fermentation by <i>Lactococcus lactis</i> KX881782 and <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM9126 | Antioxidant antidiabetic anticancer, and antihypertensive activity | Ayyash et al. (2018) |
| Oyster | Microbial fermentation by <i>Bacillus cereus</i> SU12 | Anticancer and antioxidant activity | Umayaparvathi et al. (2014) |

DNA RICOMBINANTE

La tecnologia del DNA ricombinante viene frequentemente impiegata nella produzione di proteine e ormoni, trovando largo impiego in ambito medico. Oltre a ciò, tale tecnica è stata adottata per potenziare la produzione e l'efficienza di specifici peptidi bioattivi [7].

Grazie a questa tecnica è possibile produrre contemporaneamente vari peptidi, esprimendo la loro regione codificante in microbi come *Escherichia coli*.

Un esempio è stata la produzione di peptidi antimicrobici (AMP) del latte tramite sovraespressione della lattoferricina bovina B-W10 (LfcinB-W10), un nuovo derivato del peptide antimicrobico cationico lattoferricina Lf (f17–41) in *E. coli*.

Allo stesso modo, combinando la lattoferricina bovina e il peptide antimicrobico inducibile degli insetti, la tanatina, è stato sviluppato un peptide antimicrobico ibrido [16].

NOVEL TECHNOLOGIES

Oltre alle tecnologie più utilizzate e descritte nei paragrafi precedenti, per la produzione di peptidi bioattivi si possono anche utilizzare le tecnologie innovative, queste permettono di modificare il grado di idrolisi. Le tecnologie innovative testate sono: alta pressione idrostatica; estrazione tramite ultrasuoni; estrazione assistita tramite microonde; campi elettrici pulsati; riscaldamento ohmico; idrolisi con acqua subcritica [7]. L'uso di queste tecniche nella produzione di peptidi non è diffuso, ma l'interesse degli scienziati sta aumentando a causa della buona produzione di peptidi, vengono elencati alcuni esempi nella Tabella 6.

Tecniche come il riscaldamento ohmico e i campi elettrici pulsati tuttavia non sono ampiamente studiate per la produzione di peptidi [7].

Pertanto, risulta necessario confermare che i peptidi generati dalle tecnologie innovative abbiano un'efficacia e una sicurezza superiori rispetto alle tecnologie convenzionali [7].

Ciò può essere raggiunto attraverso ulteriori ricerche, e questi futuri studi possono dissipare i dubbi sull'uso di queste tecnologie innovative e aumentare la loro effettiva utilizzazione nel mondo reale.

Tabella 6: Produzione di peptidi bioattivi mediante *novel technologies* [7]

| Novel Technology | Source of Protein | Treatment Used | Conditions Used | Hydrolysate/ Peptides Size | Findings of Study | References |
|-------------------------------|---|--|--|---|---|--------------------------------|
| High Hydrostatic Pressure | The protein of kidney bean | HHP treatment before enzymatic hydrolysis by Alcalase | For 15 min, the pressure was 0.1, 300, 400, and 600 MPa, whereas 0.1 was the control group. | After HHP treatment, 300 MPa shows suitable peptides with 25 and 50 kDa | HHP pretreatment significantly increased the antioxidant potential of peptides. | Al-Ruwaih et al. (2019) |
| High Hydrostatic Pressure | Beta-lactoglobulin (β -LG) from bovine milk | HHP treatment before enzymatic hydrolysis by trypsin | For 10 min, the pressure was 0.1, 400, and 600 MPa, where 0.1 was a control group. | HHP pretreated beta-lactoglobulin (β -LG) hydrolyzed by trypsin results in 2 new peptides at 400 MPa | At 400 MPa, the %age production of peptides is higher than control, and at 600 MPa | Boukil et al. (2018) |
| Ultrasonic Extraction | The protein of (the <i>Erythrina edulis</i>) plant | Pretreatment with Ultrasonication followed by hydrolysis with enzymes (Flavourzyme and Alcalase) | For 10 min, the frequency was 80 kHz, and the amplitude was 100%, but the control was not pretreated. | The results of SDS-PAGE showed bands with a molecular weight of 8-20 kDa by ultrasonic pretreatment. | Antioxidant peptides obtained from pretreatment of ultrasonication show more significant ACE inhibitory and ABTS radical scavenging activity compared to control. | Guerra-Almonacid et al. (2019) |
| Ultrasonic Extraction | Concentrate of Milk protein | pre-treatment with Ultrasonication followed by hydrolysis with enzyme (Neutrase) | A combination of variables like hydrolysis time, enzyme/substrate (E/S) ratio, and treatment time were set and resulted in 20 experiments. | After sonication, the molecular weight was not determined. | Results showed that the ACE inhibitory activity was highest at 4.11 min ultrasonic pretreatment, 2.32 h enzymatic hydrolysis time, and 2.33% E/S ratio. | Uluko et al. (2013) |
| Microwave Assisted Extraction | A protein of ginkgo nut and Bovine serum albumin | Microwave-assisted Continuous protein digestion with an immobilized enzyme (Bromelain for Protein of ginkgo nut and Trypsin for BSA) | The continuous microwave power was 100–700 and 300–600 for 5–20 and 30 min for Protein of BSA and ginkgo nut, respectively. | At 300, 500, and 700 W, the BSA-derived peptides showed a molecular weight between 3 and 14 kDa, and at 300 W, the protein of ginkgo nut peptides showed a molecular weight of (<1 kDa) | No bioactivity was measured from these peptides; only their production was determined by enzymatic digestion by an immobilized enzyme and continuous microwave hydrolysis. It increases the number of peptides for BSA and is a fast method for peptide generation. | Chen et al. (2014) |

| Novel Technology | Source of Protein | Treatment Used | Conditions Used | Hydrolysate/ Peptides Size | Findings of Study | References |
|-------------------------------|---|---|---|---|---|-----------------------|
| Microwave Assisted Extraction | Collagen obtained from sea cucumber | Microwave-assisted hydrolysis with alkaline protease | Different power levels of microwave were used at 0 (control), 50, 150, 200, 250, and 300 W | At 250 W, smaller peptides were formed, and their molecular weight ranged between 1–5 KDa, and the number of larger peptides (> 5 Kda) reduced at this condition by 9.7% compared to the control group. | The hydroxyl radical scavenging activity of peptides obtained from this microwave-assisted hydrolysis at different power levels was higher than control. So, the smaller peptides can be used as natural antioxidants. | Li et al.(2019b) |
| Pulsed Electric Field | Sea bass fish and sea bream Residues like heads, bones, and gills | Water extraction, methanol extraction, and water extraction that PEF assisted | The potential difference of 7000 V, the pulse width of 20 μ s, pulse number of 100, and frequency of 10hz were set while performing PEF. | unknown | Water extraction that PEF assisted resulted in extracting residues (heads, bones, and gills) from sea bass fish and sea bream. These extracts yielded significantly increased DPPH radical scavenging activity to water extracts. | Franco et al. (2020) |
| Pulsed Electric Field | Egg white protein | Hydrolysis by an enzyme (Alcalase) followed by a pulsed electric field | The pulse frequency was 3000 Hz, with the strength of 10 kV cm^{-1} , and the pulse number was 300 at different time intervals like at 0 (control), 1, 3, and 5 h, while performing a pulsed electric field. | PEF further hydrolyzed the peptides with < 1 KDa molecular weight. | Antioxidant activity of PEF treated 3rd Fraction was significantly higher compared to control. | Lin et al.(2013) |
| Ohmic Heating Treatment | whey (Sweet) | Whey processing followed by Ohmic heating | The frequency was 60 Hz, the temperature was 72–75 °C, and the electric fields were at different levels like (0 (control), 2, 4, 5, 7, and 9 V cm^{-1} for 15 min while performing ohmic heating but the control was only pasteurized. | Unknown | Peptides generated on 2 and 4 V and 2 V showed good ACE inhibitory activity and higher DPPH radical scavenging activity, respectively, compared to the control. | Costa et al. (2018) |
| Novel Technology | Source of Protein | Treatment Used | Conditions Used | Hydrolysate/ Peptides Size | Findings of Study | References |
| Subcritical Water Hydrolysis | Collagen and skin of Tuna | Subcritical water hydrolysis | The hydrolysis was performed for 5 min at pressure (50–100 bar), and temperature (150–300 °C) | At 280 °C, peptides' size was <600 Da | The antioxidant activity was highest at a temperature of 280 °C and a pressure of 80 bar for both hydrolysates. | Ahmed and Chun (2018) |
| Subcritical Water Hydrolysis | Porcine placenta | Pretreatment with Subcritical water followed by Tryptic hydrolysis | The temperature and pressure while performing SCW treatment were 200 °C and 37.5 MPa, respectively. It was compared with pre-heating for 1 h at 90 °C. | Pretreatment with Subcritical water followed by tryptic hydrolysis led to smaller peptides (626, 106, and 500 Da) production but alone, SCW treatment was unable to produce smaller peptides. | Pretreatment with Subcritical water followed by tryptic hydrolysis has improved digestion compared to pre-heated samples. | Jung et al. (2014) |

FRAZIONAMENTO E PURIFICAZIONE

Dopo l'idrolisi con uno dei metodi menzionati in precedenza viene prodotta una miscela di peptidi e aminoacidi nota come idrolizzato proteico grezzo. Il frazionamento e la purificazione vengono eseguiti per separare i peptidi specifici da questo idrolizzato. Il principio di frazionamento dei peptidi si basa sulla dimensione, sulla carica e sull'idrofobicità dei peptidi o degli idrolizzati.

Vengono utilizzati metodi di isolamento, purificazione o frazionamento diversi. Il processo di produzione di peptidi, frazionamento, purificazione e loro effetti sul corpo sono riassunti nella Figura 5. [7]

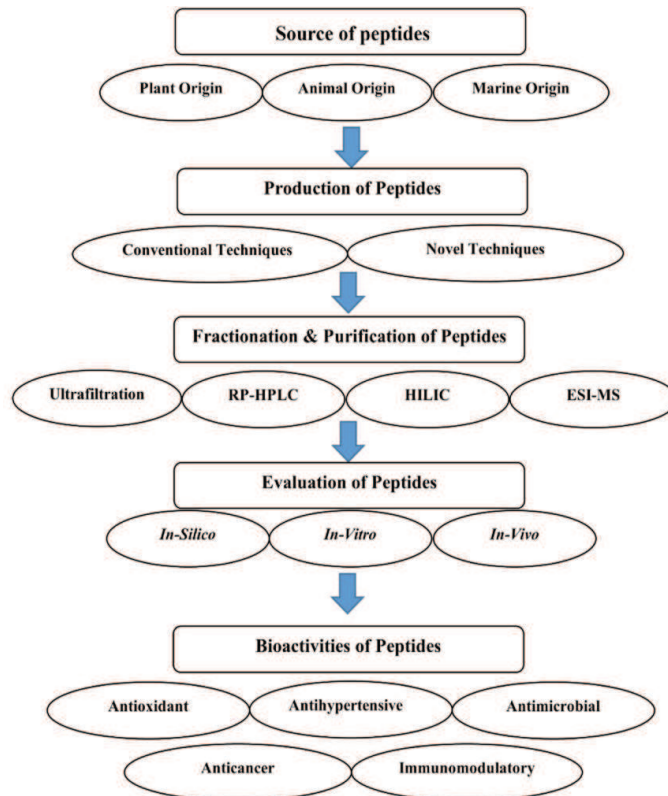


Figura 5: Schema di produzione dei peptidi bioattivi [7]

Frazionamento e purificazione possono essere eseguiti utilizzando la filtrazione a membrana, la cromatografia e le combinazioni. Ognuna di queste tecniche però presenta dei limiti.

PURIFICAZIONE TRAMITE MEMBRANE

Durante la purificazione dei peptidi dagli idrolizzati proteici, la filtrazione a membrana è considerata il primo passo. In particolare, si utilizzano per lo più delle membrane di ultrafiltrazione. [7] I vantaggi di questa tecnologia includono la protezione dell'ambiente, il basso consumo energetico, l'operatività semplice, l'assenza di reazioni chimiche e la possibilità di eseguirla a temperatura ambiente. Le principali limitazioni di questa tecnica includono l'incrostazione e la presenza di prodotti finali impuri in alcuni casi, nonché la desalinizzazione, un altro problema che può essere risolto mediante tecniche di cromatografia o membrane di nanofiltrazione. [7] Pertanto, il prodotto finale ottenuto mediante questa tecnica dovrebbe essere ulteriormente purificato. Questa tecnica è stata utilizzata per pre-purificare dei peptidi con peso molecolare <math>< 3 \text{ kDa}</math> dallo sgombro e, successivamente, rilevare una buona attività antiossidante. [17]

PURIFICAZIONE TRAMITE CROMATOGRAFIA

La cromatografia è considerata la tecnica d'elezione per la purificazione dei peptidi. La tecnica ampiamente utilizzata per la desalinizzazione, la purificazione e la determinazione del peso molecolare dei peptidi è la cromatografia per gel filtrazione o cromatografia per esclusione molecolare, il cui principio si basa sulla separazione dei peptidi nella base della loro differenza di dimensione. I principali vantaggi di questa tecnica includono il basso costo, l'operatività semplice e priva di inquinamento, l'alta selettività e l'alta risoluzione. Inoltre risulta efficace per tutte le molecole bioattive sensibili alla concentrazione di ioni/metallici, ai cambiamenti di pH e alle condizioni ambientali avverse. Dal lato opposto però sono tecniche che richiedono tempo e hanno una risoluzione che viene influenzata dalla qualità del riempimento della colonna, dal volume e dalla concentrazione del campione, dalla dimensione delle particelle, dall'altezza del letto, dall'uniformità delle particelle e dalla velocità di flusso.[7]

Ad esempio, la cromatografia per gel filtrazione è stata utile a purificare tre sub-frazioni dei peptidi da un idrolizzato di proteina di semi di colza. Questi peptidi purificati mostravano una buona attività antiossidante rispetto all'idrolizzato puro. [18]

La tecnica più efficace e ampiamente utilizzata per l'identificazione, la separazione e la purificazione dei peptidi è l'HPLC (cromatografia liquida ad alta prestazione). Il suo principio si basa sulla separazione delle molecole con diversa idrofobicità tra la fase stazionaria e il campione, poiché le frazioni debolmente idrofobiche vengono eluite prima delle frazioni altamente idrofobiche. I vantaggi di questa tecnica includono ampia applicabilità, alta risoluzione, elevata efficienza di separazione, elevata sensibilità, buona stabilità e facilità d'uso. Tuttavia presenta anche alcuni svantaggi come il costo elevato. Anche qui l'efficienza può essere influenzata dalla velocità di flusso, dalla temperatura e dal pH. Nello studio [19], mediante RP-HPLC vengono separate 52 frazioni di peptidi dall'idrolizzato di proteine della crusca di riso, 15 di quelle hanno poi mostrato un'alta attività antiossidante.

IDENTIFICAZIONE TRAMITE STRUMENTI BIOINFORMATICI

Le tecniche viste poc'anzi richiedono molto tempo, per superare questa sfida, sono stati sviluppati molti strumenti di bioinformatica. Con l'aiuto di questi strumenti è possibile prevedere: la fonte dei peptidi, il loro peso molecolare, la loro struttura molecolare, la loro interazione con il substrato e la loro funzione bioattiva. Risultano molto pratici anche per il fatto che sono facilmente accessibili, economici e consentono anche di prevedere quale proteina è in grado di produrre peptidi bioattivi specifici. I database di peptidi più comunemente utilizzati sono menzionati nella Tabella 7 [7].

Tabella 7: Principali database di peptidi bioattivi [7]

| Website | Name | Description |
|---|-----------------------------|---|
| https://pepcalc.com/ | Peptide property calculator | The calculations, as well as the estimations about the peptides' physiochemical properties, can be made by it |
| http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/ | Peptide ranker | It ranks the peptides based on predicted bioactivity |
| http://web.expasy.org/protparam/ | Protparam tool | The protein of interest it computation the parameters like physical or chemical |
| http://www.uwm.edu.pl/biochemia | BIOPEP | It is a database of bioactive peptides |
| http://web.expasy.org/Peptide-cutter/ | Peptide cutter | In native protein, it predicts the cleavage site for potential peptides production. |
| www.Uniprot.org | Uniprot | provide resources for protein sequencing and functional information |
| http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/ | Pepdraw tool | The primary structure of a peptide can be drawn by this tool, and it also calculates peptides' theoretical properties |
| http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/ | ToxinPred | It can design the non-toxic and toxic peptides as well as it can predict their toxicity |
| www.Swepep.org | SwePep | it is a relational database for endogenous peptides |

In particolare, il database per i peptidi introdotto dall'Università di Warmia e Mazury, noto come BIOPEP-UMW, fornisce anche informazioni su peptidi allergenici, sensoriali e biologicamente attivi [3].

Un altro strumento utile è il QSAR (relazione quantitativa tra struttura e funzione), esso è un modello matematico per confermare e prevedere l'attività di diversi peptidi.[7]

Tuttavia, sebbene gli strumenti di bioinformatica sopra menzionati possano prevedere molti aspetti dei peptidi bioattivi, i risultati non possono essere confermati prima delle opportune analisi sperimentali. [7]

EFFETTI BENEFICI

Sono stati isolati numerosi peptidi bioattivi che si distinguono per diversità e svolgono diverse funzioni biologiche, anche se principalmente testate *in vitro*.

Nel database BIOPEP sono riportati 4485 peptidi bioattivi [4]. La Figura 6 riassume questi peptidi e li categorizza in base alle diverse bioattività.

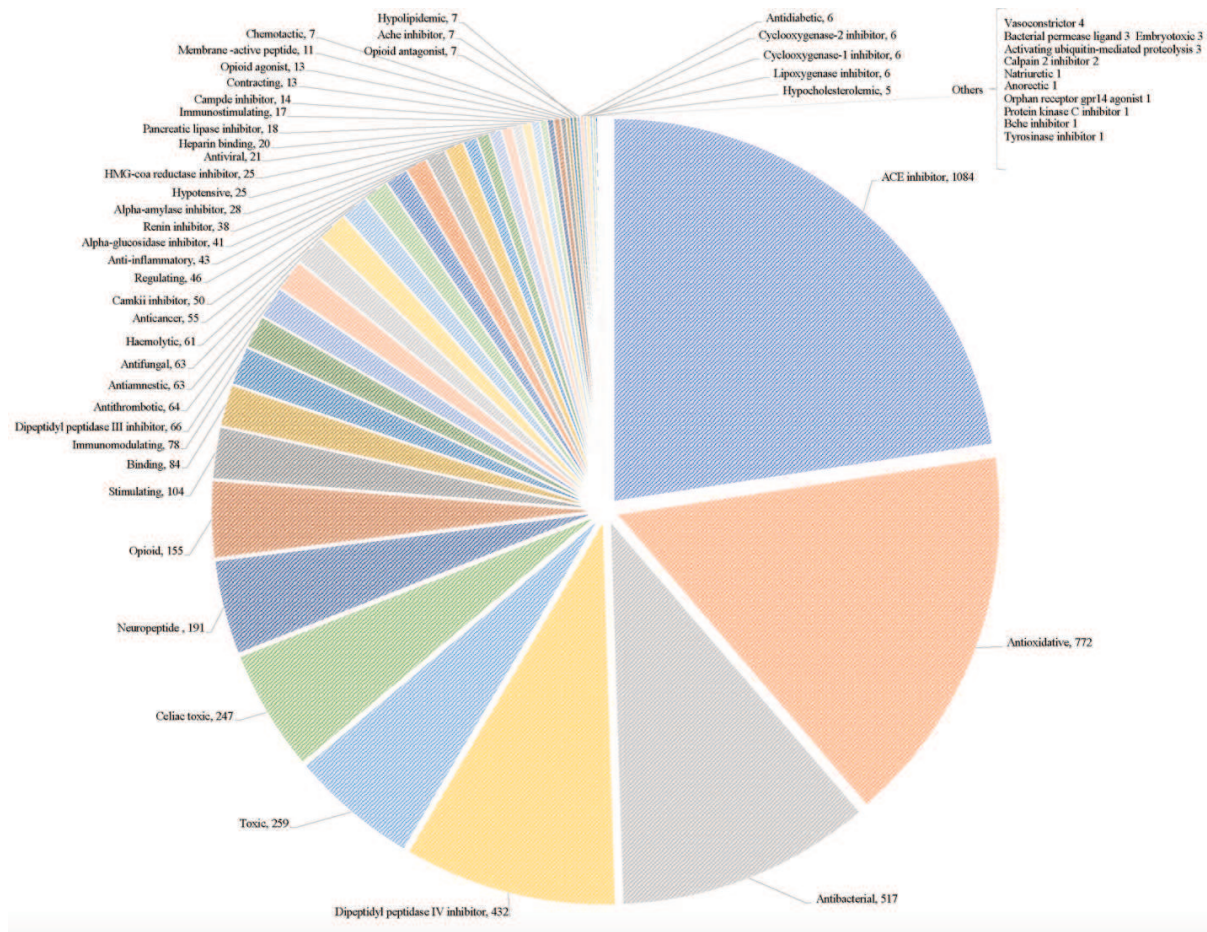


Figura 6: Distribuzione dei peptidi bioattivi con diverse bioattività. Basata su 4485 peptidi bioattivi riportati nel database BIOPEP (giugno 2022).[4]

Di seguito sono elencate alcune importanti funzioni di vari peptidi:

PEPTIDI ANTIOSSIDANTI

Durante il normale processo metabolico del corpo, vengono prodotti molti RNS (specie reattive di azoto) o ROS (specie reattive di ossigeno). L'aumento di questi radicali nel corpo provoca uno squilibrio ossidativo, noto come stress ossidativo. [20] Questo stress può portare a gravi condizioni come aterosclerosi, malattie cardiovascolari, cancro e malattie neurodegenerative, in quanto i radicali liberi possono danneggiare il DNA, i lipidi e le proteine delle cellule sane. [7] L'uso di prodotti con proprietà antiossidanti può prevenire tali danni. Per comprendere il potenziale terapeutico dei peptidi antiossidanti nel corpo umano, si può fare riferimento alla Figura 7.

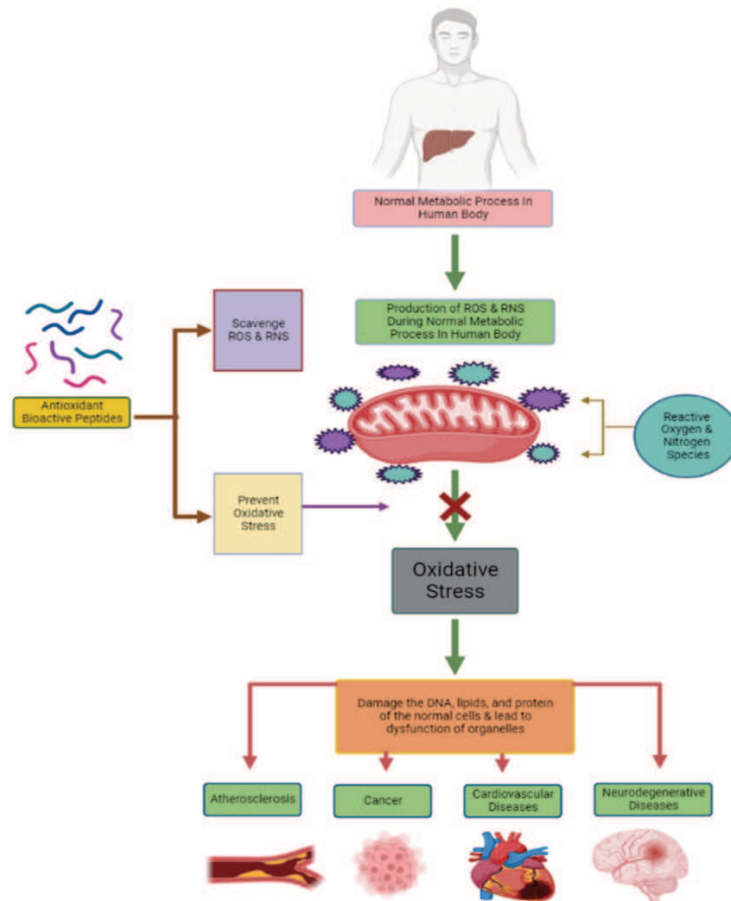


Figura 7: potenziale meccanismo dei peptidi bioattivi antiossidanti nel corpo umano [7]

La funzione fisiologica dei peptidi può essere esercitata nell'intestino, sede principale di produzione dei peptidi, oppure in organi differenti. Alcuni peptidi possono attraversare la barriera intestinale e con la circolazione sanguigna raggiungere altri sistemi [21].

Le modalità di azione svolte dai peptidi bioattivi antiossidanti possono essere varie:

1. Alcuni sono in grado di donare un protone H^+ ad un radicale libero in modo da neutralizzare la sua attività da ossidante;
 - a. il prodotto della reazione risulta essere una forma radicalica stabilizzata per risonanza dal peptide bioattivo antiossidante, questa forma è scarsamente reattiva e può essere ritrasformata nella forma nativa [22].
2. Spesso i peptidi bioattivi antiossidanti possono agire anche da chelanti metallici, sottraendo i metalli alle reazioni di ossidoriduzione di cui sono spesso catalizzatori, grazie alla presenza di specifici amminoacidi nella loro sequenza (es. istidina) [23].
3. Altri peptidi bioattivi agiscono indirettamente sulle specie ossidanti, interagendo con molecole chiave delle vie di segnale antiossidanti, inducendo l'espressione di geni che codificano per enzimi con azione protettiva nei confronti dello stress ossidativo cellulare, come la via di segnale costituita al sistema NF-E2-related factor 2(Nrf2) -

Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1) - Antioxidant Response Elements (ARE) [24].

Questa via di segnale Nrf2/Keap1 regola l'omeostasi redox quando le cellule sono sottoposte a stress ossidativo [4].

PEPTIDI ANTIPERTENSIVI

L'ipertensione è universalmente riconosciuta come una delle principali cause di decesso legate a complicanze cardiovascolari [7]. Data la sua vasta incidenza e le sue ripercussioni gravi, è emergente la necessità di affrontarla come una sfida sanitaria globale. Il crescente numero di adulti diagnosticati con ipertensione evidenzia l'urgente bisogno di sviluppare nuove strategie farmacologiche [5]. Questa condizione, spesso definita come il "killer silenzioso", è caratterizzata da un aumento sostenuto dei livelli di pressione sanguigna sistolica e diastolica oltre i limiti considerati normali [7]. La sua diffusione e l'associazione con malattie cardiovascolari e renali la rendono una delle principali preoccupazioni sanitarie a livello mondiale. Ci sono diversi peptidi che potrebbero influenzare i meccanismi che regolano la pressione sanguigna nel corpo:

PEPTIDI ACE INIBITORI

Il sistema renina-angiotensina gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della pressione sanguigna. Funziona inizialmente attivando l'angiotensinogeno e convertendolo in angiotensina-I attraverso l'azione proteolitica della renina. In un secondo momento, l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), una dipeptidasi, agisce sul l'angiotensina-I, rimuovendo il residuo istidinico del C-terminale e generando l'angiotensina-II, un potente vasocostrittore [5]. Questa trasformazione, catalizzata dall'ACE, culmina nella produzione di angiotensina II, che induce vasocostrizione e, di conseguenza, un innalzamento della pressione sanguigna [1]. Oltre a questo, l'ACE è responsabile della degradazione della bradichinina, un neurotrasmettitore peptidico prodotto principalmente in risposta a traumi tissutali. La bradichinina agisce aumentando la permeabilità vascolare e favorendo la vasodilatazione [V]. Gli inibitori dell'ACE, pertanto, contribuiscono alla riduzione dell'ipertensione e sono considerati efficaci nella prevenzione di malattie cardiovascolari [1]. Il meccanismo potenziale dei peptidi inibitori dell'ACE nel corpo umano è illustrato nella Figura 9.

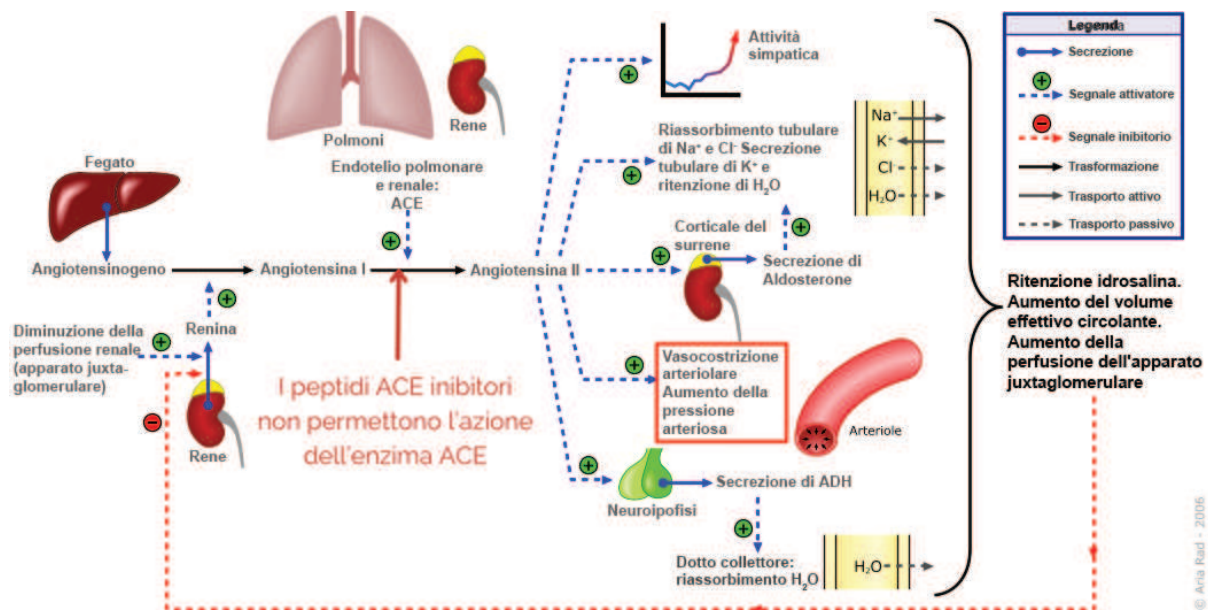


Figura 8: Schematizzazione del sistema renina-angiotensina [V]

Un esempio riguarda due tripeptidi, VPP e IPP, ottenuti dall'idrolisi di α S₁-caseina e β -caseina tramite proteasi extracellulari di *Lactobacillus*.

Questi peptidi sono stati identificati come peptidi anti-ipertensivi:

- In uno studio effettuato su un prodotto ottenuto fermentando proteine del latte con *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces cerevisiae* si è notata una riduzione della pressione arteriosa in ratti e umani. [1]
- Altri ricercatori hanno riscontrato una riduzione della pressione sanguigna nei soggetti ipertesi dopo una somministrazione di 21 settimane di 150 ml/giorno di prodotti a base di latte acido fermentati con *L. helveticus* e contenenti gli stessi peptidi bioattivi, rispetto a un gruppo di controllo senza rilevare effetti avversi per questi tripeptidi dopo il trattamento [1].

PEPTIDI INIBITORI DELL'ENDOTELINA

L'endotelina è un vasocostrittore ancora più forte dell'angiotensina II.

L'enzima di conversione dell'endotelina legato alla membrana (ECE, E.C. 3.4.24.71) converte l'endotelina precursore nell'endotelina attiva. Pertanto, un'inibizione dell'ECE porta a una minore pressione sanguigna. La ricerca in merito a questo tipo di attività riguarda solo prove biochimiche di peptidi ottenuti da residui della pepsina dall'appendice pirolitica del bonito e del manzo e dalla digestione triptica della β -lattoglobulina [1].

PEPTIDI ANTIMICROBICI

Data l'allarmante crescita della resistenza verso determinati agenti antimicrobici [VI], la ricerca si sta orientando verso l'identificazione di nuove molecole con proprietà antimicrobiche e una minore probabilità di sviluppare resistenze.

In questo contesto, i peptidi antimicrobici (AMP) emergono come una soluzione promettente. I peptidi bioattivi antimicrobici sono prodotti come metaboliti secondari e contengono fino a circa 50 residui di amminoacidi minori rintracciabili in una vasta gamma di organismi, essi rappresentano una barriera primaria contro le invasioni microbiche [26]. Questi peptidi comprendono amminoacidi idrofobici e idrofilici ai loro terminali, e questi sono stabiliti come i motivi strutturali utilizzati da questi peptidi per interagire con i microbi [1]. La loro importanza è accentuata dal fatto che, a differenza degli antibiotici tradizionali, presentano una resistenza microbica che si sviluppa lentamente [26]. La loro presenza in natura, che risale a milioni di anni fa, attesta la loro capacità di combattere efficacemente le infezioni [26]. Gli AMP si distinguono per la loro ampia diversità strutturale e funzionale, avendo la capacità di variare in termini di sequenza, struttura e meccanismo d'azione [26]. Questi peptidi esercitano la loro attività antagonista attraverso vari meccanismi, tra cui:

- l'interferenza con i processi vitali all'interno delle cellule microbiche [26], ad esempio, interagendo con le macromolecole [1]
- compromettendo le membrane microbiche [26], ad esempio, formando dei pori [1];
- producendo di molecole di segnalazione [25]
- producendo batteriocine [1].

I meccanismi vitali efficaci attraverso i quali i peptidi anti-microbici funzionano sono una distorsione della membrana cellulare attraverso interazioni elettrostatiche, che influenzano la permeabilità cellulare oltre all'inibizione potenziata della sintesi di proteine, RNA e DNA [1].

Ad esempio, i peptidi derivati dalla caseina α -1 sono attivi contro una vasta varietà di batteri Gram-positivi, tra cui *Staphylococcus aureus* [1]. Un rapporto completo ha identificato 207 peptidi antimicrobici dalle proteine del latte [1]. Inoltre, i risultati hanno suggerito che su 207 peptidi, 177 peptidi hanno sequenze uniche, e le attività anti-microbiche erano contro batteri Gram-negativi e Gram-positivi. Anche se rappresentano una promettente alternativa agli antibiotici, ci sono sfide associate alla loro produzione e stabilità [26].

PEPTIDI IMMUNOMODULANTI

L'immunomodulazione rappresenta un campo di studio che si concentra sulla stimolazione o inibizione del sistema immunitario del corpo. In questo contesto, è stata riconosciuta l'importanza dei peptidi bioattivi per la loro potenziale attività immunomodulatoria.

Nello specifico, i peptidi potrebbero influenzare la risposta infiammatoria e immunitaria attraverso la modulazione di percorsi chiave come il *peptide transporter 1*, NF-κB, JAK-STAT e MAPK, influenzando al contempo la funzione di citochine importanti come IL-10, IFN-γ e TGF-β [5]. Emergono studi che hanno esplorato la capacità di questi peptidi di proteggere l'organismo da agenti patogeni attraverso l'intensificazione o la modifica della risposta immunitaria [7]:

- Ad esempio, le proprietà immunomodulatorie dei peptidi derivati dai ceppi *Lactocaseibacillus rhamnosus* R0011 e *Lactobacillus helveticus* R0389 sono state esplorate attraverso l'utilizzo di soprannatanti privi di cellule ottenuti dalla fermentazione del latte. Questi peptidi hanno dimostrato potenziali proprietà inibitorie sulle citochine pro-infiammatorie e una stimolazione della produzione di IL-10, una citochina chiave nella regolazione dell'infiammazione [5].
- Un altro esempio è il peptide YFYPQL, derivato dalla caseina di bufalo. Questo peptide ha mostrato una riduzione dell'IFN-γ e un incremento nella produzione di IL-10, sottolineando la sua potenziale efficacia immunomodulatoria. [7]

PEPTIDI OSTEOPROTETTIVI

Una maggiore quantità di calcio solubile o disponibile nell'intestino contribuisce a migliorare la mineralizzazione ossea e, attraverso questo, a prevenire la malattia cronica dell'osteoporosi. Tuttavia, il calcio non è l'unico elemento coinvolto nel metabolismo osseo. Per tale motivo gli studi sull'assorbimento del calcio, sui parametri del calcio e del metabolismo osseo possono essere osservati solo in condizioni sperimentali specifiche, ovvero a un contenuto più basso di calcio nella dieta o durante una carenza di vitamina D [1].

Il latte è un alimento contenente un buon quantitativo di calcio (120 mg/100g) [IV]. Si ritiene che il latte contenga altri componenti efficaci per la salute delle ossa, tra cui alcuni peptidi bioattivi [1].

Ad esempio, emergono studi in letteratura che sottolineano il potenziale dei peptidi del latte nell'influenzare positivamente la salute delle ossa modulando l'espressione genica di specifici marcatori di proliferazione, quali la ciclina A e la chinasi ciclina-dipendente 2. In particolare, questi peptidi sono in grado di indurre la differenziazione degli osteoblasti attraverso l'attivazione della cascata di segnale mediata da Akt, influenzando l'espressione di geni marcatore chiave come RUNX2, OCN, ALP e COL1A1.

Il ruolo dei peptidi bioattivi (BAPs), derivati dalle proteine del latte, non si ferma qui: il loro potenziale nel fornire strategie efficaci contro malattie ossee, come l'osteoporosi, è stato corroborato anche da precedenti ricerche, evidenziando un orizzonte promettente per futuri interventi terapeutici e preventivi. [5]

- Durante un esperimento di 12 settimane su mini-pig, organismi modello più simili agli umani rispetto ai ratti, alimentando caseina si sono osservati piccoli effetti sull'assorbimento del calcio e sul metabolismo osseo rispetto alle proteine del siero di latte. Inoltre, in condizioni di basso apporto di calcio, i mini-pig alimentati con caseina mostravano una minore quantità di calcio solubile nell'intestino e una minore ritenzione di calcio, nonché livelli plasmatici più elevati di calcio e ormone paratiroideo (PTH), rispetto a quelli alimentati con proteine del siero di latte. [1]
- In presenza di una dieta con un alto contenuto di calcio ma priva di vitamina D, la densità minerale ossea e la concentrazione plasmatica di 25(OH)D3 erano più alte e 1,25(OH)2D3 più bassa negli animali alimentati con caseina rispetto alle proteine del siero di latte [1].

A livello di peptidi: i fosfopeptidi della caseina (CPPs) possono potenziare l'assorbimento intestinale del calcio, formando complessi solubili con fosfato di calcio.

- In uno studio dove è stato somministrato a donne in postmenopausa un latte arricchito con CPP, non sono stati riscontrati effetti sul metabolismo acuto del calcio (24h) in termini di PTH intatto, calcio ionizzato, calcio totale, fosfato e escrezione urinaria di calcio. [1]

Peptidi ottenuti dal siero, in particolare dalla sua frazione basica (milk basic protein, MBP) hanno anch'essi mostrato effetti positivi sul metabolismo osseo.

- È stato riscontrato che tale frazione di siero sopprime la formazione di fosse da osteoclasti isolati dal coniglio in modo dose-dipendente [1].
- I ratti ovariectomizzati mostravano una densità minerale ossea (BMD) significativamente più alta, una maggiore energia di rottura del femore estratto e livelli urinari più bassi di deossipiridinolina quando alimentati con 0,01 o 0,1% di MBP, in confronto a un gruppo alimentato con una dieta di controllo [1].
- In uno studio umano con donne adulte sane, un'integrazione giornaliera di 40 mg di MBP per 6 mesi ha risultato una BMD significativamente più alta nel calcagno sinistro e in un'escrezione urinaria significativamente più bassa di N-telopeptidi collegati da croci del collagene di tipo I/creatinina e deossipiridinolina/creatinina rispetto a un gruppo placebo [1].
- In una prova di 16 giorni con uomini adulti sani, un'integrazione giornaliera di 300 mg di MBP ha risultato un aumento significativo della concentrazione sierica di osteocalcina e una significativa diminuzione dell'escrezione urinaria di N-telopeptidi legati da croci di collagene di tipo I [1], indicando che la formazione ossea era stimolata mentre il riassorbimento osseo era ridotto.

Rivedendo i report sugli effetti osteoprotettivi delle proteine e dei peptidi derivati dagli alimenti, è chiaro che le prove del beneficio di queste sostanze sulla formazione ossea dovrebbero basarsi su studi a lungo termine.

Sia i componenti della caseina che del siero di latte sembrano possedere un notevole potenziale benefico per l'assorbimento di calcio e il metabolismo osseo.

Se questo potenziale diventi rilevante dipende chiaramente dall'età e dal contenuto di calcio e vitamina D della dieta. Inoltre, dipende dalla dieta di fondo.

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 [1].

Tabella 8: panoramica delle proteine e peptidi osteo protettivi [1]

| Protein/peptide | Effect | Model | Refs |
|--|--|----------------------|--------------|
| Casein | Absorption of intestinal calcium ↑ | Animal | [77, 53, 39] |
| | Calcium retention ↑ | Animal | [79] |
| at low dietary calcium | Calcium retention → | Animal | [40] |
| | Bone mineral content → | | |
| | Soluble calcium in the intestine ↓ | Animal | [82] |
| | Calcium retention ↓ | | |
| | Plasma calcium ↑ | | |
| at high dietary calcium and no vitamin D | PTH ↑ | | |
| | Bone mineral density ↑ | Animal | [82] |
| | 25(OH)D ₃ ↑ | | |
| CCPs | 1,25(OH) ₂ D ₃ ↓ | | |
| | Calcium absorption ↑ | Animal | [76] |
| | Femur calcification ↑ | | |
| | Calcium absorption ↑/ → | Human | [25] |
| depending on diet | Calcium metabolism → | Human | [57] |
| | Formation of pits ↓ | Cell culture | [96] |
| Milk basic protein | 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)D₃ 25-Hydroxyvitamin D₃, 1,25(OH)₂D₃ 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

↑/↓/ → : increase/decrease/no effect

PEPTIDI IPOLIPEMIZZANTI

L'enzima triacilglicerolo lipasi (E.C. 3.1.1.3), insieme al suo cofattore proteico, la colipasi, svolge un ruolo cruciale nella degradazione dei trigliceridi assunti con la dieta e nell'assorbimento degli acidi grassi all'interno dell'intestino [1]. Un'attività diminuita di questa lipasi può determinare un'alterazione o un ritardo nell'assorbimento dei grassi, portando a una

riduzione dei trigliceridi postprandiali nel flusso sanguigno. È noto che alti livelli di trigliceridi postprandiali sono correlati a resistenza all'insulina, precoce aterosclerosi, obesità e altre manifestazioni della sindrome metabolica [1]. Studi hanno evidenziato come l'inibizione della lipasi possa ridurre i trigliceridi postprandiali e l'LDL a digiuno, favorire la perdita di peso, ottimizzare il controllo metabolico nel diabete di tipo 2 e prevenire l'insorgenza dello stesso [27] [28]. L'inibizione della lipasi può avvenire attraverso un contatto diretto con l'enzima o la colipasi, o inibendo l'adsorbimento dell'enzima all'interfaccia tra olio e acqua [1]. Altri studi hanno descritto un pool di peptidi ottenuti dall'idrolisi dell'emoglobina bovina con azione inibitoria della lipasi. Questi peptidi, prevalentemente composti da 3 o 4 amminoacidi e con un peso molecolare che varia da 100 fino a 1.500 Da, sono stati correlati alla riduzione di trigliceridi postprandiali negli umani [1]. Il tetrapeptide VVYP è stato identificato come una sostanza con il più forte effetto inibitorio della lipasi [1]. Altri autori hanno fornito prove per una riduzione stimata del 35% del colesterolo plasmatico e dei trigliceridi plasmatici nei ratti alimentando le subunità α' della globulina 7S della soia in una dieta ipercolesterolemizzante. Inoltre, l'attività dei recettori β -VLDL epatici dei ratti alimentati con le subunità α' della globulina 7S della soia ha avuto un aumento del 96% nella legatura, rispetto a una dieta di controllo ipercolesterolemizzante. [1] Tuttavia, uno studio recentemente pubblicato sull'uomo non è riuscito a dimostrare un maggiore contenuto di grasso fecale o un incremento dell'ossidazione dei grassi con i peptidi della globina [1].

Tabella 9: Proteine e peptidi che modulano il metabolismo lipidico [1]

| 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 | mRNA of-desaturases ↓ | Animal | [103] |
| hydrolysate | HDL-C/total C ↑ ACAT ↓ | | |
| Lupin protein isolate | Total C ↓, VLDL- + LDL-C ↓ | Animal | [89] |
| conglutin γ | LDL-uptake ↑, LDL-degradation ↑ | Cell culture | |
| α' Subunits | Plasma C ↓, triglycerides ↓ | Animal | [20] |
| of soybean | VLDL receptor binding ↑ | | |
| 7S globulin | | | |

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

↑/↓/ → Increase/decrease/no effect

PEPTIDI ANTIDIABETICI

Il diabete, in particolare il diabete di tipo 2 (che rappresenta il 90-95% dei casi di diabete), è una malattia comune in tutto il mondo (quarta causa di morte nell'Unione Europea).

Questa malattia origina da una secrezione insufficiente di insulina o dalla resistenza a essa, è caratterizzata da alti livelli di glucosio nel sangue e da una subottimale derivazione energetica dal cibo [VII].

La crescente prevalenza del diabete rappresenta un grave problema di salute pubblica con importanti conseguenze sia sociali che economiche [5].

Nonostante l'esistenza di numerosi farmaci sintetici disponibili sul mercato per il suo controllo, molti presentano effetti collaterali, quali iperglicemia e danni al fegato.

In questo contesto, l'interesse della ricerca si sta spostando verso soluzioni con minori effetti collaterali, focalizzandosi sui peptidi bioattivi (*BAP*) [5].

Questi composti hanno mostrato potenzialità nel regolare i livelli di glucosio nel sangue, attraverso l'inibizione di enzimi specifici, come la dipeptidil peptidasi-4 (DPP-IV) e α -glucosidasi, e agendo come agonisti del recettore del peptide-1 simile al glucagone (GLP-1) [5]. La DPP-IV, situata nella membrana cellulare e nel sangue, è responsabile della degradazione dell'incetina. Inibendola, si può potenziare l'emivita dell'ormone incetina, migliorando di conseguenza la capacità glucoregolatoria e insulinotropica [5].

È interessante notare che alcuni peptidi, come il peptide INNQFLPYPY derivante dall'idrolisato di caseina di capra, hanno dimostrato notevole efficacia nell'inibire la DPP-IV [5].

Nonostante queste promettenti scoperte, la ricerca riguardante l'utilizzo di peptidi bioattivi come terapia per il diabete è ancora in una fase preliminare e necessita di ulteriori approfondimenti [4].

PEPTIDI ANTICANCRO

Il cancro, caratterizzato da una crescita e proliferazione anomala delle cellule, è una malattia pervasiva e letale, rappresentando una delle principali cause di mortalità [7][4].

Nonostante l'esistenza di numerosi trattamenti chimici, questi possono dar luogo a resistenza e severi effetti collaterali [7]. Pertanto, la potenziale applicazione di peptidi bioattivi anti-cancerogeni risulta molto interessante per la ricerca scientifica.

I peptidi bioattivi anti-cancerogeni sono quelli che possono agire attraverso meccanismi quali:

- l'induzione dell'apoptosi,
- l'inibizione dell'angiogenesi tumorale,

- l'interferenza con le proteine chiave per la proliferazione cellulare e la modulazione della funzione immunitaria.

Bisogna precisare però che la mancanza di dati sulle proteine target nelle cellule neoplastiche rappresenta un ostacolo per lo screening dei peptidi anticancro mediante tecniche bioinformatiche [5][4]. I peptidi anticancro sono caratterizzati da amminoacidi che combinano proprietà cationiche e idrofobiche. Sembra proprio che sia la capacità di interfacciarsi alle membrane cellulari (hanno caratteristiche anfipatiche come i fosfolipidi) a giocare un ruolo fondamentale per la loro efficacia contro le cellule neoplastiche (*in vitro*) [5].

Uno studio recente ha riportato il potenziale anticancro dei peptidi derivati dalla lattotransferrina, i risultati hanno confermato che il peptide RRWQWR ha mostrato una notevole capacità anticancro sulle cellule *T-leucemia Jurkat* [5]. Un complesso formato da α -lattoalbumina e acido oleico ha ridotto significativamente i papillomi cutanee, resistenti al trattamento convenzionale, del 75% mentre il placebo ha portato a una riduzione di solo il 15% in uno studio in doppio cieco [1]. Uno studio precedente ha valutato gli attributi anticancro del peptide di fusione anticancro derivato dal latte (ACFP) utilizzando cellule di cancro ovarico umano [5]. Lo studio ha raccolto tessuti tumorali ovarici freschi da 53 pazienti e li ha coltivati per produrre linee cellulari primarie. I risultati hanno mostrato che il trattamento ACFP ha ostacolato la vitalità delle cellule cancerogene primarie attraverso una maggiore apoptosi, ma senza o con minima citotossicità contro le cellule normali del cancro ovarico [5].

PEPTIDI OPIOIDI

Alcuni peptidi hanno la capacità di legarsi ai recettori oppiacei e hanno effetti simili agli oppiacei, che possono essere invertiti da un antagonista oppiaceo come il naloxone. Proteine come il glutine del grano, l'emoglobina, gli α - e β -caseinati sono stati mostrati come fonti di peptidi derivati dall'alimento con attività oppioide dopo idrolisi peptica [1].

PEPTIDI ANTICOAGULANTI

Alcuni peptidi, chiamati casoplateline, derivati dalla k-caseina bovina hanno un effetto sulla coagulazione delle piastrine. Diverse casoplateline sono state segnalate per avere un'attività antitrombotica *in vitro* [1] e nei cavie dopo somministrazione parenterale [1]. Il KRDS, un analogo peptidico (f39–42) dalla lattotransferrina umana, ha inibito l'aggregazione piastrinica indotta da ADP dopo somministrazione parenterale [1].

PEPTIDI ANTICARIOGENI

Oltre alla loro capacità di legare ioni Ca^{2+} , i caseinofosfopeptidi possono anche migliorare la solubilità e la disponibilità di altri minerali come zinco, magnesio, ferro, cromo e selenio.

Pertanto, i caseinofosfopeptidi possono ridurre il rischio di una carenza di questi minerali essenziali [1].

ASSORBIMENTO

È noto che il nostro corpo riesce facilmente ad assorbire di-peptidi e tri-peptidi mentre si sa gran poco su peptidi più grandi. [1]

La biodisponibilità dei peptidi bioattivi (*BAPs*) rappresenta la quantità di peptidi assorbiti con le vie normali, dopo assunzione orale e distribuito in tessuti dell'obiettivo per esibire i beni bioactive.[1]

L'intestino tenue è la posizione primaria del tratto gastrointestinale dove si verifica principalmente l'assorbimento del peptide. I *BAP* sono benefici per la salute quando raggiungono i loro siti fisiologici di azione senza cambiamenti strutturali. [7] Oltre alle azioni digestive di proteasi e peptidasi endogene, le composizioni chimiche e nutrizionali della matrice alimentare e le loro forme fisiche (ad esempio, liquido, purea, gel, solido) sono anche fattori critici che possono influenzare le interazioni, digeribilità, biodisponibilità e biodisponibilità dei *BAP*. [7]

Va chiarito anche che una proteina non deve essere necessariamente assorbita per esercitare un effetto specifico (oltre all'apporto di nutrienti). Prendiamo come esempio lattoferrina e lattoperossidasi (proteine costituite da più di 20 amminoacidi): esse sono in grado di fornire una funzione immunomodulante che va ricondotta però solo nella loro forma isolata. Nell'ambiente latte esse, infatti, vengono combinate con altri fattori del latte stesso e subiscono una riduzione degli effetti [1].

Ciò suggerisce che l'azione immunomodulatoria delle proteine primarie del latte è ben bilanciata e può sfuggire di controllo dopo l'isolamento o la neutralizzazione di alcuni componenti, degradati tramite azione enzimatica [1].

È importante notare che, una volta assorbiti nel flusso sanguigno, i peptidi possono diventare allergeni e indurre allergenicità o addirittura diventare tossici per gli esseri umani a causa della loro bioattività sconosciuta [4]. Per tale motivo, sono raccomandati screening preliminari di allergenicità e tossicità. Esistono diverse piattaforme web per la potenziale allergenicità e la valutazione della tossicità [VIII, IX, X, XI].

APPLICAZIONI

Terapeuticamente, i benefici dei peptidi bioattivi sono molti. Per esempio, hanno attività molto specifiche sui tessuti bersaglio e quindi hanno poco o nessun effetto tossico; sono inoltre efficaci anche alle basse concentrazioni. Al contrario, i peptidi bioattivi non hanno accumulo negli organismi e sono facilmente escreti e distrutti. A prima vista, questa caratteristica può essere considerata un punto negativo, ma a causa delle conseguenze negative che possono verificarsi nel corpo dalla tossicità dell'assunzione di farmaci, lo smaltimento tempestivo o la distruzione di questi farmaci dopo l'uso nel corpo può essere considerata una caratteristica molto auspicabile [5].

DISPONIBILITÀ COMMERCIALE DEI PEPTIDI BIOATTIVI

La maggior parte dei peptidi commerciali viene utilizzata per scopi farmaceutici e medici. Dall'identificazione del primo peptide sintetico (insulina) nel 1921, sono stati approvati più di 80 farmaci peptidici in tutto il mondo [4]. Nei prodotti lattiero-caseari sono state fatte la maggior parte delle rivendicazioni funzionali associate ai peptidi bioattivi.

Per quanto riguarda le applicazioni alimentari e nutraceutiche, molti paesi hanno approvato:

- Lactotripeptidi (Isoleucina-Prolina-Prolina [IPP] e Valina-Prolina-Prolina [VPP]), identificati da latte idrolizzato o fermentato, per l'uso alimentare per aiutare a ridurre la costrizione dei vasi sanguigni; [4]
- Nisaplin® (nisina A), purificato da batteri dell'acido lattico, è stato anche approvato per prolungare la shelf life del prodotto [4].
- Prodotti lattiero-caseari (Calpis®, Calpis Co. Ltd., Giappone) e margarina (Becel proactiv®, Evolus Co Ltd., Svizzera) commercializzati hanno attività antipertensiva a causa dei loro componenti bioattivi (VPP e IPP) [4].

LIMITI

Nonostante l'ampia documentazione circa l'attività biologica di proteine e peptidi *in vitro*, l'indagine scientifica legata ai peptidi bioattivi si scontra con diverse sfide e aree in cui la conoscenza è ancora parziale o insufficiente. Una lacuna significativa riguarda la validazione degli effetti osservati *in vitro* attraverso studi *in vivo* e clinici. Essa risulta necessaria per confermare il mantenimento delle attività biologiche evidenziate nei contesti cellulari o in provetta [5].

Inoltre, la ricerca è limitata dalla mancanza di chiarezza su aspetti chiave come:

1. La biodisponibilità, il trasporto a target cellulari specifici, e i meccanismi d'azione dei peptidi nei diversi sistemi corporei [7].
2. La produzione, separazione e purificazione dei peptidi puri, che si dimostra costosa sia in termini di tempo che di risorse economiche [7].
3. La resistenza strutturale dei peptidi all'azione degli enzimi digestivi e la conseguente capacità di giungere inalterati nel sangue [4].
4. La caratteristica amarezza dei peptidi, che influisce sull'accettabilità da parte dei consumatori e pone sfide riguardo alla loro commercializzazione [4].
5. La necessità di garantire la stabilità dei peptidi durante la conservazione del prodotto e di evitare effetti collaterali indesiderati rappresenta una sfida cruciale per i tecnologi alimentari nell'elaborazione di alimenti funzionali e nutraceutici.
6. Durante l'elaborazione dei peptidi o delle proteine, si formano diversi componenti che possono causare gravi preoccupazioni per la salute negli esseri umani, come componenti allergenici, lisinoalanina e D-amminoacidi e ammine biogene [5].
 - a. L'unico metodo utilizzato per formare formule di latte ipoallergeniche è l'idrolisi enzimatica [5].

Per il quarto punto, sono stati sviluppati database e strumenti utili per valutare il potenziale amaro dei *BAP* [I, XII], e le tecniche di incapsulamento rappresentano una possibile soluzione per mitigare questa problematica. Allo stesso tempo, altri fattori come la potenziale degradazione dei peptidi durante la digestione e la lavorazione degli alimenti, l'influenza del processo di riscaldamento sulla bioattività e la formazione di sostanze indesiderate, nonché le interazioni con altri ingredienti alimentari che possono ridurre la bioattività, necessitano di un'indagine più approfondita.

Pertanto, l'attestazione di effetti benefici per la salute umana richiede ulteriori studi controllati su soggetti umani.

CONCLUSIONI

I peptidi derivati dagli alimenti sono attraenti e stanno guadagnando terreno all'interno della comunità scientifica. Tuttavia, a causa della produzione su larga scala costosa e di bassa resa, nonché delle diverse problematiche farmacocinetiche (instabilità nell'ambiente gastrointestinale, scarsa biodisponibilità) e farmacodinamiche (interazione farmaco-corpo, meccanismo d'azione non chiaro), sono necessari ulteriori miglioramenti per garantire l'uso dei peptidi bioattivi nello sviluppo di nutraceutici funzionali o come farmaci alternativi ai farmaci convenzionali. [7] Le tecniche di incapsulamento potrebbero contribuire a migliorare la

biostabilità dei peptidi bioattivi somministrati per via orale proteggendoli dal contatto con gli enzimi digestivi [4].

BIBLIOGRAFIA

- [1] Möller N.P., Scholz-Ahrens K.E., Roos N., Schrezenmeir J., Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr.* 2008, 47(4), 171-82. doi: 10.1007/s00394-008-0710-2.
- [2] Halim N.R.A., Yusof H.M., Sarbon N.M. Functional and bioactive properties of fish protein hydolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends Food Sci & Technol.* 2016, 51, DOI: 10.1016/j.tifs.2016.02.007.
- [3] Iwaniak A., Minkiewicz P., Darewicz M. et al, BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. *Food Res Int.* 2016, 85, 155–161. doi: 10.1016/j.foodres.2016.04.031.
- [4] Du Z., Li Y., Review and perspective on bioactive peptides: A roadmap for research, development, and future opportunities. doi: 10.1016/j.jafr.2022.100353.
- [5] Samtiya M., Samtiya S., Badgujar P.C., Puniya A.K., Dhewa T., Aluko R.E., Health-Promoting and Therapeutic Attributes of Milk-Derived Proteins and Peptides in the Management of Diabetes Mellitus. 2022, doi: 10.3390/molecules27062144.
- [6] Akbarian M., Khani A., Eghbalpour S., Uversky V.N., Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 1445. doi: 10.3390/ijms23031445.
- [7] *International Journal of Peptide Research and Therapeutics.* 2022, 28, 155. doi: 10.1007/s10989-022-10465-3.
- [8] Jaouhari Y., Travaglia F., Giovannelli L., Picco A., Oz E., Oz F., Bordiga M. From Industrial Food Waste to Bioactive Ingredients: A Review on the Sustainable Management and Transformation of Plant-Derived Food Waste. *Foods.* 2023, 12, 11, DOI: 10.3390/foods12112183.
- [9] Pavlicevic M., Maestri E., Marmiroli M. Marine Bioactive Peptides-An Overview of Generation, Structure and Application with a Focus on Food Sources. *Mar Drugs.* 2020, 18, 8, DOI: 10.3390/md18080424.
- [10] Guha S., Sharma H., Deshwal G.K. et al. A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species. *Food Prod Process and Nutr.* 2021, 3, 2, DOI: 10.1186/s43014-020-00045-7
- [11] Summer A., Formaggioni P., Franceschi P., Di Frangia F., Righi F., Malacarne M. Cheese as Functional Food: The Example of Parmigiano Reggiano and Grana Padano. *Food Technol Biotechnol.* 2017, 55, 3, DOI: 10.17113/ftb.55.03.17.5233.

- [12] Madhu M., Kumar D., Sirohi R., Tarafdar A., Dhewa T., Aluko R.E., Badgujar P.C., Awasthi M.K. Bioactive peptides from meat: Current status on production, biological activity, safety, and regulatory framework. *Chemosphere*. 2022, 307, 1, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.135650.
- [13] Abeyrathne E.D., Lee H.Y., Ahn D.U. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents--a review. *Poult Sci*. 2013, 92, 12, DOI: 10.3382/ps.2013-03391.
- [14] Chang C., Lahti T., Tanaka T., Nickerson M.T. Egg proteins: fractionation, bioactive peptides and allergenicity. *J. Sci. Food Agric*. 2018, 98, DOI: 10.1002/jsfa.9150.
- [15] Friedman M., Lysinoalanine in food and in antimicrobial proteins. *Adv Exp Med Biol*. 1999, 459, 145-59. doi: 10.1007/978-1-4615-4853-9_10.
- [16] Singh A., Duche R.T., Wandhare A.G., Sian J.K., Singh B.P., Sihag M.K., Singh K.S., Sangwan V., Talan S., Panwar H. Milk-Derived Antimicrobial Peptides: Overview, Applications, and Future Perspectives. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2023, 15, 1, DOI: 10.1007/s12602-022-10004-y.
- [17] Wang X., Xing R., Liu S. et al., Purification and characterization of novel antioxidant peptides of different molecular weights from mackerel *Pneumatophorus japonicus* protein hydrolysate. *Chin. J. Ocean. Limnol*. 2015, 33, 159–168. doi: 10.1007/s00343-014-3369-y.
- [18] Xue Z., et al., Preparation and Antioxidative Properties of a Rapeseed (*Brassica Napus*) Protein Hydrolysate and Three Peptide Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57(12), 5287–93. doi: 10.1021/jf900860v.
- [19] Adebisi A.P., Adebisi A.O., Ogawa T., Muramoto K., Purification and characterisation of antioxidative peptides from unfractionated rice bran protein hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*. 2008, 43, 35-43. doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01379.x.
- [20] Mudgil P., Baby B., Ngoh Y-Y. et al, Molecular binding mechanism and identification of novel anti-hypertensive and anti-inflammatory bioactive peptides from camel milk protein hydrolysates. *Lwt*. 2019, 112, 108193. doi: 10.1016/j.lwt.2019.05.091.
- [21] Tonolo F., Fiorese F., Moretto L., et al., Identification of New Peptides from Fermented Milk Showing Antioxidant Properties: Mechanism of Action. *Antioxidants*. 2020, 9, 117. doi: 10.3390/antiox9020117.
- [22] Tadesse S.A., Emire S.A., Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. *Heliyon*. 2020, 6(8), e04765. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04765.
- [23] Zhu Y., Lao F., Pan X., Wu J., Food Protein-Derived Antioxidant Peptides: Molecular Mechanism, Stability and Bioavailability. *Biomolecules*. 2022, 12(11), 1622. doi: 10.3390/biom12111622.

- [24] Tonolo F., Folda A., Scalcon V., et al., Nrf2-Activating Bioactive Peptides Exert Anti-Inflammatory Activity through Inhibition of the NF- κ B Pathway. *Int J Mol Sci.* 2022, 23(8), 4382. doi: 10.3390/ijms23084382.
- [25] Sarkar T., Chetia M., Chatterjee S. Antimicrobial Peptides and Proteins: From Nature's Reservoir to the Laboratory and Beyond. *Front Chem.* 2021, 9, DOI: 10.3389/fchem.2021.691532.
- [26] Drent M.L., Larsson I., William-Olsson T., et al., Orlistat (Ro 18- 0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: a multiple dose study. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1995, 19, 221–226.
- [27] Hollander P.A., Elbein S.C., Hirsch I.B., et al., Role of orlistat in the treatment of obese patients with type 2 diabetes. A 1-year randomized double-blind study. *Diabetes Care.* 1998, 21, 1288–1294.
- [28] Saeedi P., Petersohn I., Salpea P., Malanda B., Karuranga S., Unwin N., Colagiuri S., Guariguata L., Motala AA., Ogurtsova K., Shaw JE., Bright D., Williams R. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019, 157, DOI: 10.1016/j.diabres.2019.107843.

SITOGRAFIA

- [I] https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep/start_biopep.php
- [II] <https://www.verifiedmarketresearch.com/product/bioactive-peptides-market/>
- [III] <https://www.fao.org/3/i3396e/i3396e.pdf>
- [IV] <https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/135810>
- [V] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Renin-angiotensin-aldosterone_system-it.png
- [VI] <https://amr-review.org/>
- [VII] <https://www.salute.gov.it/portale/nutrizione/dettaglioNotizieNutrizione.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=5900>
- [VIII] <https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg/>,
- [IX] <http://weballergen.bii.a-star.edu.sg/>,
- [X] <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/chalpred/>
- [XI] <http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>
- [XII] <http://virtualtaste.charite.de/VirtualTaste/>