Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Peptidy a proteiny mléka

Adéla Balajková

Bakalářská práce
2007

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Adéla BALAJKOVÁ**
Studijní program:	**B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Chemie a technologie potravin**
Téma práce:	**Peptidy a proteiny mléka**

Zásady pro vypracování:

1. **Zpracovat teorii peptidů a proteinů**
2. **Zpracovat stručný souhrn peptidů a proteinů mléka s popisem jejich funkce (vlastnosti)**
3. **Zpracovat přílohový materiál se strukturami peptidů a proteinů**

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Dle doporučení vedoucího práce

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.**
Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce: **8. ledna 2007**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. června 2007**

Ve Zlíně dne 2. května 2007

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická

L.S.

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

ABSTRAKT

Mléko jakožto sekret mléčné žlázy savců, obsahuje kromě mléčného tuku a laktosy, významnou skupinu bílkovin a peptidů. Tyto látky jsou velmi důležité z nutričního hlediska, význam peptidů spočívá v úpravě trávicího traktu, krevního tlaku… Dělí se z hlediska fyziologické a biologické funkce. Bílkoviny mléka dělíme na dvě hlavní skupiny, kasein a syrovátkové bílkoviny. Tyto skupiny mají rozdílné zastoupení aminokyselin a to má vliv na jejich funkčnost. Jejich přítomnosti se využívá v potravinářském průmyslu, např. při srážení mléka.

Klíčová slova: mléko, proteiny, peptidy

ABSTRACT

Milk is a secretion of lacteal gland of mammal containing important group of protein and peptide except milk fat and laktose. These substances are important for nutritional viewpoint, signification of peptide is in regulation of GIT, blood pressure etc. Milk proteins are devided out on two groups, casein and whey protein. These groups have different amino acids and they can influence the function of bodies. Their present may be taken advantage of food industry, e.g. milk coagulation.

Keywords: milk, protein, peptide, amino acid

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Ráda bych poděkovala a Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. a také prof. Ing. Pavlovi Březinovi, CSC. za odborné vedení, spolupráci, trpělivost a velmi cenné rady, které mi pomohly při tvorbě mé bakalářské práce.

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

OBSAH

ÚVOD **7**

I TEORETICKÁ ČÁST **8**

1 PEPTIDY MLÉKA **9**

1.1 STRUKTURA PEPTIDŮ A JEJICH DĚLENÍ 9

1.2 VÝZNAM PEPTIDŮ MLÉKA 11

1.3 BIOAKTIVNÍ PEPTIDY MLÉKA 14

1.3.1 Ochranné peptidy mléka 15

1.3.1.1 Antimikrobiální peptidy 15

1.3.2 Fyziologicky aktivní peptidy mléka 18

1.3.2.1 Opioidní peptidy 18

1.3.2.2 Hypotenzní peptidy 20

1.3.2.3 Peptidy vázající kovy 22

1.3.2.4 Antioxidativní peptidy 22

1.3.2.5 Neuroendokrinní peptidy 23

1.3.2.6 Prolaktin 23

1.3.3 Produkce a funkčnost bioaktivních peptidů 24

2 PROTEINY MLÉKA **26**

PROTEINY VYKAZUJÍ MNOHO FUNKCÍ: 26

2.1 FUNKCE A STRUKTURA PROTEINŮ 26

2.2 BIOLOGICKÁ ROLE MLÉČNÝCH PROTEINŮ 28

2.3 KASEINY 29

2.4 PROTEINY SYROVÁTKY 33

Laktoferrin 36

α-Laktalbumin 36

β-laktoglobulin 37

Osteopontin 37

Mléčné glykoproteiny 37

ZÁVĚR **39**

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **40**

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK **43**

SEZNAM OBRÁZKŮ **44**

SEZNAM TABULEK **45**

SEZNAM PŘÍLOH **46**

PŘÍLOHA P I. **48**

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

ÚVOD

Mléko je sekret mléčné žlázy savců. Nejvíce je využíváno mléko kravské. V rozvinutých zemích tvoří 98 % z vyrobeného mléka, v rozvojových zemích pouze 2/3, zbývající část tvoří mléka jiného původu – buvolí, ovčí, kozí a velbloudí. Výroba mléka se celosvětově trvale zvyšuje, každoročně vzrůstá zhruba o 1 %. Zvyšování produkce je předpokládáno jak v rozvinutých a rozvojových zemích tak i zemích v přechodném období (bývalý východní blok), největší nárůst je však očekáván v rozvojových zemích. Jednou z příčin vyššího podílu rozvojových zemí na produkci mléka je to, že mléko od zvířat jiných než krávy bude tvořit větší podíl světové produkce mléka. V průběhu let dochází k výrazným změnám v požadavcích na jednotlivé mléčné výrobky, spotřeba mléka se podstatně mění po celém světě. Konzumní mléko a čerstvé mléčné výrobky zaznamenávají stálý pokles spotřeby. Trend se přesunuje k výrobkům s nižším obsahem tuku, ke zvyšování spotřeby trvanlivého mléka a také dalších výrobků s delší trvanlivostí, celosvětově se výrazně zvyšuje spotřeba fermentovaných mléčných výrobků, zejména jogurtů a zhruba o 2 až 4 % se ročně zvyšuje spotřeba sýrů.

Jeho primární funkcí je výživa novorozenců a proto patří právem do významného zdroje lidské výživy. Mléko se skládá z 88 % vody a 12 % sušiny. Obsahuje dusíkaté látky, bílkoviny, peptidy, laktosu a také tuk (asi ze 4%). Mléko je významným zdrojem především vápníku, jehož hlavní funkcí je podíl na stavbě kostí a zubů. Cílem této práce je podívat se na mléko podrobněji, zaměřit se na jeho složení-hlavně peptidy a proteiny, charakterizovat jejich strukturu a také zaměřit se na fyziologické a biologické funkce jednotlivých peptidů/proteinů, které mají význam především pro člověka.

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

I. TEORETICKÁ ČÁST

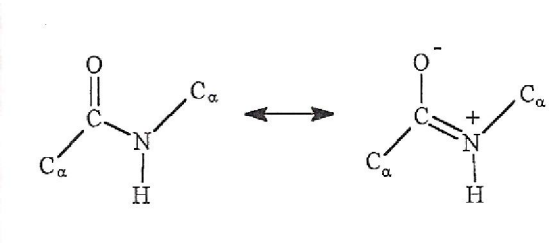
Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

1 PEPTIDY MLÉKA

1.1 Struktura peptidů a jejich dělení

Peptidy mají v organismech řadu významných funkcí a často také vykazují význačné biologické účinky. Jsou to polymery aminokyselin, v nichž je karboxylová skupina jedné aminokyseliny vázána na aminovou skupinu druhé aminokyseliny amidovou vazbou. Vazba, která se takto vytvoří, se nazývá **peptidová vazba** (-CO-NH-). Spojením, resp. kondenzací, dvou aminokyselin vznikne dipeptid (příloha 1), ze tří molekul aminokyselin tripeptid atd. Každý lineární peptid má jeden C-konec (volná –COOH skupina) a N-konec (volná $–NH_2$ skupina). Kromě lineárních peptidů mohou kondenzací aminokyselin vznikat také cyklické struktury, které nemají volné C- a N- konce. Takové sloučeniny se nazývají cyklické peptidy. Příkladem jednoduchých cyklických dipeptidů mohou být 3,6-disubstituované 2,5-dioxopiperaziny. [1]

V důsledku rezonančních interakcí atomů má peptidová vazba částečně charakter dvojné vazby (obr.1). Všech šest atomů leží takřka v jedné rovině a peptidová vazba je rigidním (tuhým, nepoddajným) planárním útvarem. [1]

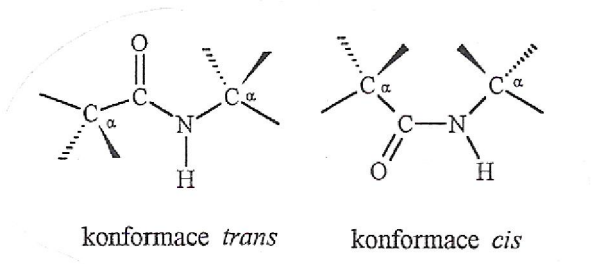


Obr. 1 Peptidová vazba [1]

(substituenty na uhlíku C_α nejsou vyznačeny)

Díky rigiditě vazby se peptidové skupiny mohou vyskytovat v konformaci ***cis*** nebo ***trans*** (obr.2). V přirozených peptidech a proteinech se vyskytují téměř výhradně energeticky výhodnější sloučeniny s konformací ***trans***. [1]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.



Obr. 2 Konformace *trans* a *cis* peptidové vazby [1]

V oblasti peptidové vazby se mohou volně otáčet pouze substituenty na uhlících C_α a ty jsou potom hlavními činiteli určujícími konformační strukturu peptidového řetězce. Uhlík C_α se do peptidového řetězce zapojuje dvěma jednoduchými vazbami, vazbou C_α –N a vazbou C_α –C. Ostatní skupiny peptidového řetězce se mohou otáčet kolem těchto vazeb. Stupeň otáčení je dán ***úhly rotace*** kolem vazby C_α –N (úhel φ) a vazby C_α –C (úhel ψ), tzv. ***torzními úhly***. [1]

Peptidy se zpravidla klasifikují podle velikosti molekuly (počtu vázaných aminokyselin), tvaru řetězce, druhu vazeb v peptidovém řetězci i podle dalších hledisek. [1]

Podle původu se peptidy dělí na:

- ***rostlinné***
- ***živočišné***

Podle počtu vázaných aminokyselin (monomerů) se peptidy označují jako:

- ***oligopeptidy*** (obsahují 2-10 molekul aminokyselin v řetězci)
- ***polypeptidy*** (obsahují 11-100 molekul aminokyselin)

Podle typu řetězce se peptidy dělí na:

- ***lineární peptidy*** (je jich většina)
- ***cyklické peptidy*** [1]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Peptidy, které obsahují pouze aminokyseliny se nazývají **homeomerní**, peptidy obsahující i další sloučeniny jsou peptidy **heteromerní**. Heteromerními peptidy mohou být: nukleopeptidy, lipopeptidy, glykopeptidy, fosfopeptidy, chromopeptidy, metalopeptidy. [1]

1.2 Význam peptidů mléka

Peptidy se v potravinách vyskytují jako produkty metabolismu, tedy v důsledku genetických dispozic živočišného nebo rostlinného organismu. V živých organismech vznikají z aminokyselin buď jednoduchou biosyntézou nebo hydrolýzou prekurzorů vyráběných v rámci proteosyntézy. Při zpracování a skladování potravin vznikají také sekundárně enzymovou a neenzymovou hydrolýzou bílkovin (proteolýzou). Mohou také vznikat při záhřevu aminokyselin na vyšší teploty. [1]

Syrovátka obsahuje jak přirozeně obsažené peptidy, tak i peptidy vytvořené hydrolýzou různých složek mléka (např. působením enzymu *chymosinu* z kaseinu). Peptidy jsou potenciálními prostředky pro úpravu trávení, krevního tlaku (brzdění ACE – *angiotensin*-konvertující enzym), pro zlepšení využitelnosti živin a imunity a proti alergiím. Některé působí podobně jako drogy (opiáty). [2]

Glykomakropeptidy

Mimořádně příznivý biologický účinek je přisuzován glykomakropeptidům (GMP) nebo z nich derivovaným peptidům, které stimulují cholecystokinin – hormon regulující hospodaření s energií a příjem potravin. Ten se uvolňuje z buněk trávicího traktu, inhibuje agregaci krevních destiček a podporuje příznivou mikroflóru. Ve studii *in vitro* se potvrdil účinek GMP proti přilnutí kariogenních bakterií na povrch zubů, což by mohlo příznivě působit proti vzniku zubního kazu. Kvůli tomu, že GMP obsahuje nedostatek fenylalaninu, je použitelný jako složka potravin pro pacienty s fenylketonurií. [2]

Glycomakropeptid (GMP) a glykosylovaná část kaseinmakropeptidů (CMP) jsou přítomny ve sladké syrovátce vznikající po štěpení κ-kaseinu a precipitaci kaseinu *reninem*. Tato bílkovina chybí v kyselé syrovátce po vysrážení kaseinů snížením pH na 4.6. Glycomakropeptid (GMP) snižuje chuť k jídlu stimulací hormonu slinivky břišní cholecystokininu (CCK), ovlivňuje produkci pigmentu v melanocytech, účinkuje jako prebiotikum a vykazuje imunomodulační účinky. Fyziologická aktivita GMP závisí na jeho glykosylaci. [2]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Laktokininy

Jsou to peptidy vytvořené především z α-laktalbuminu. Laktokininy společně s kasokininy z kaseinu zřejmě působí proti vysokému krevnímu tlaku. Fungují jako tzv. ACE inhibitory (*Angiotensin-I* Converting Enzyme), které konvertují *angiotenzin I* (vasodilatátor) na angiotenzin II (vasokonstriktor). Uvedené peptidy se uvolňují z bílkovin enzymovou hydrolýzou buď během trávení v trávicím traktu nebo během výroby potravin. [2]

Na trhu již existuje několik výrobků tohoto typu (**Calpis, Evolus, BioZate**) nebo jsou laktokininy a kasokininy přímo součástí funkčních potravin určených ke snižování tlaku. Mají obvykle formu fermentovaných mléčných nápojů nebo hydrolyzátů mléčných bílkovin. [2]

Další peptidy jako **laktofericin** vykazují antimikrobiální aktivitu. Laktofericin, peptid odvozený od laktoferinu, vykazuje ochranné vlastnosti proti střevním patogenům, vykazuje *in vitro* antibakteriální a antikvasinkové účinky a to díky železu vázajícímu účinku (ionty železa mohou katalyzovat oxidační reakce), ale i přímo interakcí s povrchovými strukturami bakterií. [2]

Hořké peptidy jsou odštěpovány z určitých oblastí kaseinových řetězců, které se vyznačují zvýšenou hydrofobicitou. V současné době je popsána struktura asi 45 hořkých peptidů. Struktura některých z nich však neodpovídá žádnému úseku kaseinových řetězců. Ostatní jsou přibližně rovnoměrně odvozeny od α_{s1}- a β-kaseinu, jeden od α_{s2}-kaseinu. Z přirozeného materiálu nebyl dosud izolován žádný peptid odpovídající úseku κ-kaseinu. Hořké peptidy vznikají v průběhu výroby a zrání sýra enzymovou hydrolýzou kaseinových molekul a jejich vznik je ovlivněn řadou faktorů – kvalitou výchozí suroviny a syřidla, použitou mikroflórou, solením, atd. Tyto peptidy přispívají k arómatu sýra, což je potvrzeno skutečností, že byly izolovány jak z hořkých, tak i nehořkých sýrů. [3, 4, 5, 6]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Tab.1 Zastoupení celkových a volných aminokyselin v izolovaných frakcích peptidů (hodnoty uvedeny v relativních %) [3]

Aminokyselina	**Frakce 1 (hořká)**		**Frakce 2 (nehořká)**	
	celkové	**volné**	**celkové**	**volné**
Asp	3,86	0,74	2,16	0,26
Thr	2,82	3,15	3,61	3,73
Ser	2,04	4,19	2,01	3,20
Glu	18,80	3,38	9,85	1,28
Pro	23,60	31,80	32,81	36,52
Cys	0,24	-	-	-
Gly	1,94	2,16	1,84	1,96
Ala	3,50	4,03	5,82	6,37
Val	7,54	9,30	11,67	13,10
Met	2,16	2,04	2,93	3,18
Ile	3,32	3,08	6,54	7,43
Leu	4,45	4,57	13,27	15,26
Tyr	2,21	4,25	1,29	0,62
Phe	19,11	25,54	0,78	0,54
His	2,29	2,21	3,41	3,40
Lys	2,13	2,53	2,01	1,67
Arg	-	-	-	1,51

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

1.3 Bioaktivní peptidy mléka

Mléčné proteiny jsou prekurzory mnoha různých biologicky aktivních peptidů. Tyto peptidy, které jsou inaktivní uvnitř sekvence proteinů, mohou být uvolňovány např. enzymatickou proteolýzou během trávení nebo technologickým zpracováním proteinové suroviny. [7]

Například imunomodulační peptidy kaseinu stimulují bujení lidských bílých krvinek a fagocytující aktivitu mikrofágů. Antimikrobiální peptidy zabíjí alergizující mikroorganismy. Antitrombotické peptidy potlačují vázání fibrinogenu na specifické části receptoru krevních destiček a také inhibují hromadění krevních destiček. Kaseinofosfopeptidy mohou fungovat jako nosiči pro různé minerály, převážně pro vápník. [8] Peptidy, které inhibují hromadění krevních destiček, stimulují imunitní systém, inhibují *angiotensin I* konvertující enzym a které jsou spojeny se střevní absorpcí vápníku, mohou být také izolovány z kravských kaseinových hydrolyzátů. Bioaktivní peptidy ze syrovátkových proteinů a jejich fyziologické účinky získaly méně pozornosti než ty získané z kaseinu. [9] Rozlišujeme různé typy bioaktivních peptidů: imunostimulační, opioidní, antimikrobiální…atd [10, 11]

Při identifikaci peptidů vznikají potíže díky limitujícím znalostem sestavování bioaktivních peptidů. Hydrolyzáty mléčných proteinů jsou známy svou složitostí a mohou pojmout stovky různých peptidových sekvencí. Identifikace bioaktivních peptidů fermentovaných mléčných výrobků je pracným a těžkým úkolem. Ta zahrnuje několik rafinačních kroků, hlavně v kombinaci různých chromatografických technik. Finální frakce stále obsahují četné složky, které mohou vyvolat rozdíl mezi aktivitou peptidovou izolovaných peptidů a aktivitou individuálních chemicky syntetizovaných peptidů. [11, 12]

Specifické produkty trávení mléčných bílkovin jsou tzv. bioaktivní peptidy zahrnující exorfiny (kasomorfiny)(příloha 1), fosfopeptidy a imunopeptidy. Sekvence bioaktivních peptidů nejsou v polypeptidovém řetězci intaktních bílkovin syrovátky v aktivním stavu. Během natrávení proteinů syrovátky ve střevě dochází k uvolnění peptidů a jejich zapojení do regulace trávení i ovlivnění metabolizmu cestou stimulace sekrece hormonů. [2]

Terapeutický efekt bílkovin syrovátky může být dán i produkcí bioaktivních peptidů během fermentace. Ve studii, ve které byly mléčné bílkoviny separovány a fermentovány, potlačil α-laktalbumin buněčné dělení kultivovaných buněk. Snížení buněčné proliferace těmito bioaktivními peptidy může být přičítáno i stavu snížení výskytu rakoviny tlustého střeva a konzumace jogurtů. Bioaktivní peptidy vykazují i prospěšný efekt u produktů mimo

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

potravinářství, např. u kosmetických přípravků a farmak. Peptidy syrovátky mají dle určitých teorií i vliv na tzv. inhibitory ACE. Poslední poznatky totiž prokázaly, že adipocyty mají autokrinní/parakrinní renin-angiotensinový systém a že tvorba tuku v adipocytech je regulována angiotensinem II. Takto by tedy bylo možné aktivitou ACE inhibitorů přispět k antiobéznímu efektu proteinů syrovátky. [2]

Fosfopeptidy získané z kaseinu jsou běžně užívané jako dietetické a farmaceutické doplňky. Dnes mají bioaktivní peptidy funkci spíše produktů určených pro péči o zdraví, poskytující terapeutický význam při infekcích nebo v prevenci před onemocněním. [13]

1.3.1 Ochranné peptidy mléka

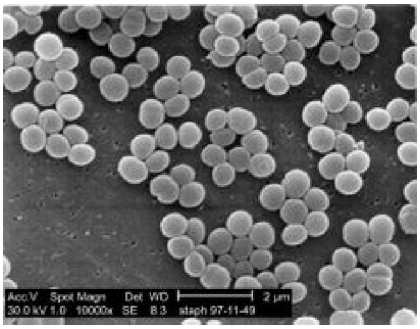
1.3.1.1 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální aktivita mléka je spojována hlavně s laktoferrinem. Částečnou hydrolýzou laktoferrinu *pepsinem* vznikají hydrolyzáty, jejichž antimikrobiální účinnost je vyšší než v nestráveném laktoferrinu. Identifikované antimikrobiální peptidy byly nazvány **laktoferricíny**, vzniklé z N-koncové části molekuly a mající antimikrobiální aktivitu vůči různým G^+ a G^- bakteriím, kvasinkám a vláknitým houbám. [14]

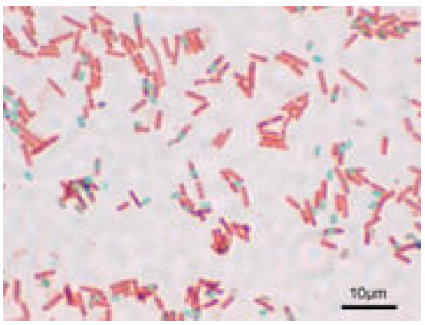
Antimikrobiální mléčné proteiny, jako je laktoferin, byly popsány už v dřívějších literaturách. [19] Během této doby byly podrobněji popsány glykopeptidy s baktericidní aktivitou proti *Staphylococcus aureus* a rodu *Streptococcus*. Obecně, jejich význam pro rozvoj komerčních antimikrobiálních produktů byl ignorován. [16] Nicméně, byl obnoven zájem o užívání bioaktivních peptidů a to jejich využitím ve zdravotnickém průmyslu.

Kasecidin, získaný *chymosinem* při trávení kaseinu při neutrálním pH, byl mezi prvními ochrannými peptidy a byl vystavený aktivitě *in vitro* proti rodům *Staphylococcus, Sarcina, Bacillus subtilis, Diplococcus pneumoniae* a proti *Streptococcus pyogenes*. [17] (Příloha 3)

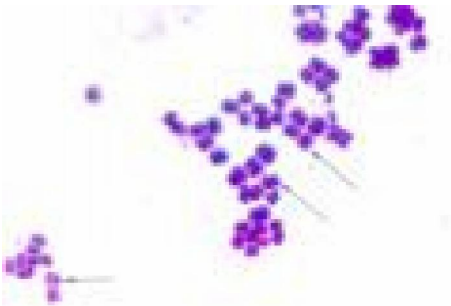
Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.



Obr. 3 *Staphylococcus aureus* [18]



Obr. 4 *Bacillus subtilis* [18]



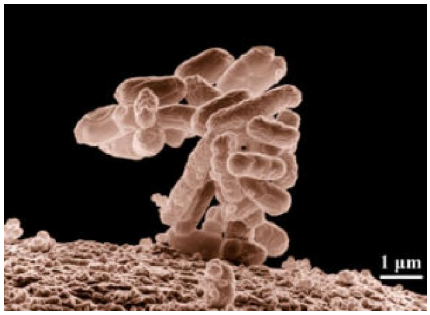
Obr. 5 *Sarcina* [18]

Kasocidin-I, kationaktivní peptid získaný z α_{s2}-kaseinu, zabraňoval růstu *Escherichia coli* a *Staphylococcus carnosus*.[18] **Isracidin**, N-koncová část α_{s1}-kaseinu, chránil myši proti *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. Tyto peptidy chránily také ovce a krávy proti mastitidě. [17]

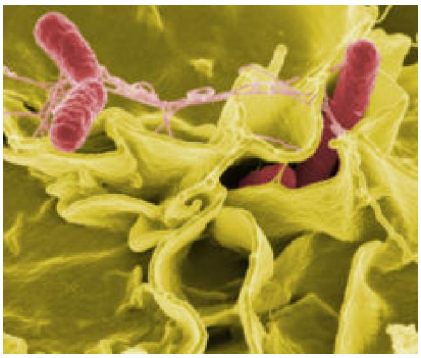
Starší zprávy byly zaměřeny na antimikrobiální peptidy získané proteolytickým trávením kravského laktoferinu. Hydrolyzáty byly aktivní proti G^+ (*Bacillus, Listeria* a *Strepto-*

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

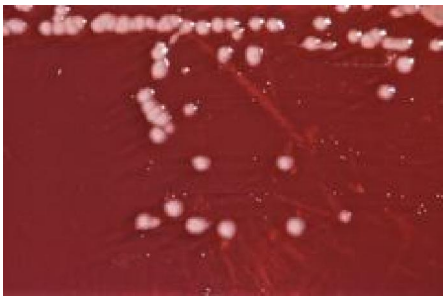
coccus) a G^- (*E.coli, Klebsiella, Salmonella, Proteus* a *Pseudomonas*) mikroorganismům *in vitro*. [20]



Obr. 6 *E. Coli* [18]



Obr. 7 *Salmonella* [18]



Obr. 8 *Pseudomonas* [18]

Další účinný baktericidní peptid, specificky vytvořený pomocí *pepsinu* při degradaci laktoferinu, byl nazván **laktofericin B**, opět vykazoval aktivitu proti G^+ i G^- mikroorganismům. [20, 21] V současnosti je již dokázáno, že se laktofericin tvoří po příjmu laktoferinu v lidském žaludku. [22]

Mléko také obsahuje peptidy, které projevují fungicidní vlastnosti. Fungicidní aktivita laktoferinu nebo peptidů (př. laktofericin B), byla demonstrována na *Candida albicans*. [23, 24]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Baktericidní peptidy vypomáhají při antimikrobiální ochraně novorozeneckého trávicího traktu a tudíž přispívají k ochraně střev. Imunostimulační aktivita může také mít přímý vliv na jejich odolnost proti bakteriím a virovým infekcím u dospělého člověka. [14]

1.3.2 Fyziologicky aktivní peptidy mléka

1.3.2.1 Opioidní peptidy

Jedná se o krátké sekvence aminokyselin, které napodobují efekt opiátů v mozku. Mohou být produkovány samovolně (samotným) tělem např. endorfiny nebo mohou být absorbovány z částečně stráveného jídla. Účinek těchto peptidů se různí, ale všechny se podobají opiátům. Opioidní peptidy potravin obsahují cca 4-8 aminokyselin. Peptidy produkované tělem samotným bývají obvykle delší. [25]

Opioidní aktivita byla jako první prokázána u kravského β-kaseinového hydrolyzátu Brantlem a *kol*. Prekurzory biologicky aktivních peptidů byly demonstrovány *in vivo* po trávení mléka. Peptidy s aktivitou opioidů obsahovaly **laktorfiny**, zbytky 50-53 aminokyselin z kravského a lidského α-laktalbuminu a 102-105 aminokyselin z kravského β-laktoglobulinu. [9]

Opioidní peptidy produkované tělem

- Endorphin
- Dynorphin
- Enkephalin

Opioidní peptidy potravin

- Kasomorfiny (z mléka) [25]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Tab. 2: Některé známé kasomorfiny [25]

β-Kasomorfin 1-3	Struktura: H-Tyr-Pro-Phe-OH Chemický vzorec: $C_{23}H_{27}N_3O_5$ Molekulová hmotnost: 425.48 $g \cdot mol^{-1}$
β-Kasomorfin 1-4	Structura: H-Tyr-Pro-Phe-Pro-OH Molekulová hmotnost: 522.61 $g \cdot mol^{-1}$
β-Kasomorfin 1-4, amid	Structura: H-Tyr-Pro-Phe-Pro-NH_2 Chemický vzorec: $C_{28}H_{39}N_5O_7$ Molekulová hmotnost: 557.64 $g \cdot mol^{-1}$
β-Kasomorfin 5	Structura: H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-OH Chemický vzorec: $C_{30}H_{37}N_5O_7$ Molekulová hmotnost:594.66 $g \cdot mol^{-1}$
β-Kasomorfin 7	Structura: H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-OH Chemický vzorec: $C_{41}H_{55}N_7O_9$ Molekulová hmotnost: 789.9 $g \cdot mol^{-1}$
β-Kasomorfin 8	Structura: H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-OH Chemický vzorec: $C_{46}H_{62}N_8O_{10}$ Molekulová hmotnost: 887.00 $g \cdot mol^{-1}$

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Kasomorfin

Je peptid získaný z proteinů mléka, konkrétně kaseinu a někteří vědci ho považují za návykový. V lidském těle jsou kasomorfiny zpravidla štěpeny na inaktivní dipeptidy pomocí enzymu *dipeptidyl peptidasy IV* (DPP-IV). Tento enzym byl nalezen v trávicím traktu a některých endokrinních buňkách. [25]

60 **70**

Tyr – Pro – Phe – Pro – Gly – Pro – Ile – Pro – Ans – Ser – Leu

dílčí část β-kaseinu (β-kasomorfin 11), [27]

1.3.2.2 Hypotenzní peptidy

Angiotensin-I (ACE, peptidyldipeptidová *hydrolása*), upravuje vnější krevní tlak. ACE zvyšuje krevní tlak převáděním *angiotensinu I*, uvolněného z *angiotensinogenu I reninem*, do účinného nervu vyvolávajícího smrštění cév angiotensinem II. V několika potravinových proteinech byly objeveny různé ACE inhibitory. Sekundární ACE-zpomalující peptidy a kasokininy představují odlišné zlomky/části hovězího α_s - a β-kaseinu. Např.: α_{s1}-kasein f(23-27), f(194-199) a β-kasein f(43-68), f(177-183), f(191-202)) mohou být vytvořeny *trypsinem*. Fermentace nebo bakteriální *proteinásy* mohou uvolňovat např. peptidy α_{s1}-kasein f(104-109) a β-kasein f(169-175), f(74-79) a f(84-86). Také syrovátkové proteiny obsahují ACE-zpomalující peptidy; nejvyšší aktivita byla nalezena u peptidů β-laktoglobulinu f(80-82), f(142-148) a α-laktalbuminu f(104-108). [14]

Obvykle má angiotensin II. následující účinky:

- zúžení krevních cév
- srdeční hypertrofie
- stimulace kůry nadledvinek uvolňováním aldosteronu
- stimulace zadní hypofýzy k uvolnění vasopresinu [26]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

74 76 84 86

Ile – Pro – Pro Val – Pro – Pro

Dílčí část β-kaseinu (kasokinin), [27]

23 27 34

Phe – Phe – Val – Ala – Pro – Phe – Pro – Gln – Val - Phe – Gly – Lys

1 9

Arg – Pro – Lys – His – Pro – Ile – Lys – His – Gln

Dílčí části α_{s1}-kaseinu (kasokinin), [27]

Působení mezi rozdílnými peptidovými inhibitory signalizuje, že zapojení do ACE je silněji ovlivňováno C-koncovými tripeptidovými složkami substrátu.

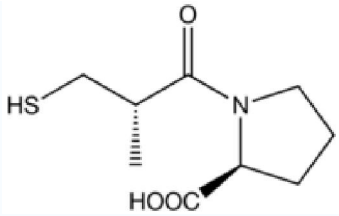
I když tato substrátová specifita není zřetelně vysvětlena, ACE preferují substráty nebo kompetitivní inhibitory obsahující hydrofobní aminokyselinové zbytky. Množství známých ACE inhibitorů, jako jsou kasokininy a laktokininy, obsahují prolin, lysin nebo arginin jako C-koncové aminokyseliny. [14]

ACE inhibitory (obr.5)

ACE inhibitory jsou farmaceutickou skupinou, užívané především při léčbě vysokého tlaku a při selhání srdce. Můžeme je rozdělit do 3 skupin podle jejich molekulové struktury: [26]

Ø **Sulfhydryl-obsahující ACE inhibitory**

- Captopril (Capoten®), první ACE inhibitor [26]



Obr. 9 Captopril, první ACE inhibitor [26]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Ø **Dikarboxylát-obsahující ACE inhibitory**

- Enalapril (Vasotec®/Renitec®)
- Ramipril (Altace®/Tritace®/Ramace®/Ramiwin®)
- Quinapril (Accupril®)
- Perindopril (Coversyl®)
- Lisinopril (Lisodur®/Lopril®/Prinivil®/Zestril®)
- Benazepril (Lotensin®) [26]

Ø **Fosfát-obsahující ACE inhibitory**

- Fosinopril (Monopril®) [26]

1.3.2.3 Peptidy vázající kovy

Fosfopeptidy vázající kovy mohou tvořit rozpustné fosfátové soli organického původu a mohou mít zároveň funkci nosičů pro různé kovy. Fosfopeptidy odpovídají různým fosforylovým částem molekul kaseinu. Např.: α_{s1}-kasein f(43-58), f(59-79), f(43-79), α_{s2}-kasein f(1-24) a f(46-70) a β-kasein f(1-28), f(2-28), f(1-25), f(33-48) byly izolovány z hydrolyzátů všech kaseinů. Navíc, peptidy vázající jiné kovy byly uvolňovány ze syrovátkových proteinů, např.: z β-laktoglobulinu, α-laktalbuminu a lactoferrinu. Tyto proteiny nejsou fosforylovány, kovy se pravděpodobně váží přes jiná vazebná místa než kasein. Studie β-laktoglobulinu a α-laktalbuminu ukázaly, že odvozené (sekundární) peptidy měly vyšší afinitu k železu než přirozené peptidy. [14]

1.3.2.4 Antioxidativní peptidy

Mléko obsahuje několik antioxidantů, jako např. vitamíny a enzymy. Peptidy vzniklé trávením mléčných proteinů mají antioxidativní účinek. Mléčné sekundární antioxidativní peptidy jsou složeny z 5-11 aminokyselin včetně hydrofobních aminokyselin, prolinu, histi-

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

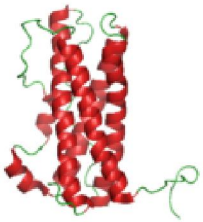
dinu, tyrosinu nebo tryptofanu. Poměr aktivity a antioxidační mechanismus peptidů není zcela znám. Antioxidační aktivita hydrolyzátů se zdá být závislá na aminokyselinové sekvenci sekundárních peptidů. Výsledky ukazují, že hydrolyzáty z mléčných proteinů by mohly být používány jako přírodní antioxidanty ve funkčních potravinách a v prevenci oxidačních reakcí u sterilované potravy. Kromě toho, jsou potřebné studie k objasnění role antioxidativních peptidů v ochranné funkci u člověka. [28]

1.3.2.5 Neuroendokrinní peptidy

Mléko, které je typickou tekutinou savců, obsahuje několik neuroendokrinních peptidů ve větších koncentracích. Tyto neuroendokrinní peptidy mohou být syntetizovány nebo zpracovány v mléčných žlázách savců nebo vylučovány do mléka prostřednictvím různých drah. Navíc, určité mléčné proteiny, př. kasein, mohou být enzymaticky zpracovávány k uvolňování „exorfinu“ – peptidů s opioidní aktivitou. [29]

1.3.2.6 Prolaktin

Prolaktin (PRL) je peptidovým hormonem primárně spojeným s laktací. Hypofýza reguluje jeho sekreci pomocí neuroendokrinních nervových buněk v hypothalamu. [30]



Obr. 10 Prolaktin [30]

Prolaktin má mnoho účinků:

- Nejdůležitějším z nich je stimulace prsní žlázy k produkci mléka. Zvýšená koncentrace prolaktinu během těhotenství způsobí zvětšení prsních žláz a zvyšuje se produkce mléka. Nicméně, vyšší úroveň progesteronu během těhotenství okamžitě zastavuje produkci mléka. K produkci mléka dochází, pokud po porodu klesají hladiny tohoto hormonu [30]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

- Prolaktin připravuje tělo k sexuálnímu uspokojení. Hormon ovládá účinek dopaminu, který je odpovědný za sexuální vzrušení. Význam prolaktinu může být ukazatelem pro množství sexuálního uspokojení a relaxace. [30]

Struktura prolaktinu:

Prolaktin je jediný řetězec polypeptidu o 199 aminokyselinách. Jeho struktura je podobná růstovému hormonu a placentárnímu laktogenu. Molekula obsahuje 3 disulfidické můstky. Předpokladem pro zvýšenou sekreci prolaktinu je adenom podvěsku mozkového, nadbytek thyrotropin-uvolňujícího hormonu (TRH, Thyrotropin-Releasing Hormone), vedlejší účinek mnoha anti-psychotických léků. Předpokladem pro sníženou sekreci prolaktinu je bulimie a nadbytek dopaminu. [30]

1.3.3 Produkce a funkčnost bioaktivních peptidů

Mléčné proteiny vykonávají široký okruh nutričních, funkčních a biologických činností. Mnoho mléčných proteinů má specifické biologické vlastnosti. Zvyšující pozornost je nyní zaměřená na fyziologicky aktivní peptidy odvozené od mléčných proteinů. Tyto peptidy jsou inaktivní v sekvenci molekuly základního proteinu a mohou být uvolňovány činností zažívacího traktu z mléka, kvašením mléka nebo hydrolýzou proteolytickými enzymy. Studie identifikovaly velký počet peptidových sekvencí se specifickými biologickými vlastnostmi, hlavně v mléčných proteinech a také byly dány předpoklady k jejich uvolnění. Zdravotní výhody připsané peptidům v těchto tradičních produktech (tj. jogurt, kyselé mléko, sýry) nebyly doposud pevně stanoveny. [31]

Je zde významný komerční zájem užívání sekundárních bioaktivních peptidů mléka pro aplikace v potravinářském průmyslu. V současnosti jsou sekundární peptidy kaseinu vyráběny na průmyslové úrovni a jsou zvažovány pro použití jako dietní doplňky a jako farmaceutické přípravky. Dosud nejčastější cestou k produkci bioaktivních peptidů bylo enzymatické trávení. Proteolytické enzymy a jejich různé enzymatické kombinace (*alkalasa, chymotrypsin, pankreatin, pepsin*), stejně jako i enzymy bakteriálního původu, jsou používány k výrobě bioaktivních peptidů. Po hydrolýze jsou peptidy rozděleny užitím jiných metod, jako např. srážení se solí nebo rozpouštědly, ultrafiltrace nebo chromatografie. (příloha 3) [14]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Výskyt mnoha biologicky aktivních peptidů v kravském mléce je dnes dobře a pevně stanoven, ale musí být vyřešeny základní a technologické problémy předtím, než tyto látky budou moci být optimálně využívány pro lidskou výživu a zdraví. Účinnost a spolehlivost bioaktivních peptidů může být ověřena také provedením studií na zvířatech pro potvrzení užitečných účinků a pro objasnění nepříznivých účinků. Molekulární studie jsou potřebné k zavedení mechanismů těchto peptidů. Také by měly být prozkoumány úpravy technologií k produkci bioaktivních peptidů nebo vývojové trendy alternativních procesů. [14]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

2 PROTEINY MLÉKA

Proteiny jsou polymery aminokyselin, které vznikly procesem proteosyntézy. Ve své molekule obsahují více než 100 aminokyselin vzájemně spojených peptidovou vazbou. Kromě peptidových vazeb se na vytváření struktury podílejí i vazby disulfidové (-S-S-), esterové a amidové. [32]

Proteiny vykazují mnoho funkcí:

- Stavební (kolagen, elastin, keratin)
- Transportní a skladovací (hemoglobin, transferin)
- Zajišťující pohyb (aktin, myosin)
- Katalytické, řídící a regulační (enzymy, hormony, receptory…)
- Ochranné, obranné (imunoglobulin, fibrin, fibrinogen) [33]

2.1 Funkce a struktura proteinů

Chemickou stavbu molekul proteinů popisuje tzv. kovalentní struktura proteinu. Zahrnuje sekvenci aminokyselinových zbytků (primární strukturu), mimo to i všechna jiná kovalentní spojení (disulfidové i jiné kovalentní můstky, jsou-li přítomny) a kovalentně připojené další skupiny (prostetické skupiny). [32]

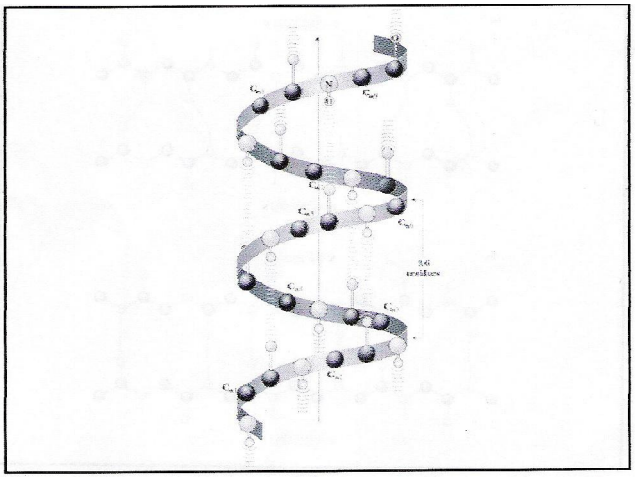
- **Primární struktura** popisuje počet a pořadí aminokyselinových zbytků v řetězcích. Sekvence AMK (aminokyselin) se uvádí vždy od N-konce k C-konci hlavního řetězce, v souladu se směrem proteosyntézy. Primární struktura proteinů je dána sledem AMK zbytků v molekule proteinu, které jsou specificky kódovány pořadím nukleotidů v DNA a nemění se ani s denaturací příslušného proteinu. [32]

- **Sekundární struktura** je prostorové uspořádání atomů (konformace) v hlavním polypeptidovém řetězci. Konformace je dána sledem jednotlivých AMK z primární struktury, která určuje pozdější uspořádání celé výsledné molekuly. Lze je rozdělit do dvou základních typů:

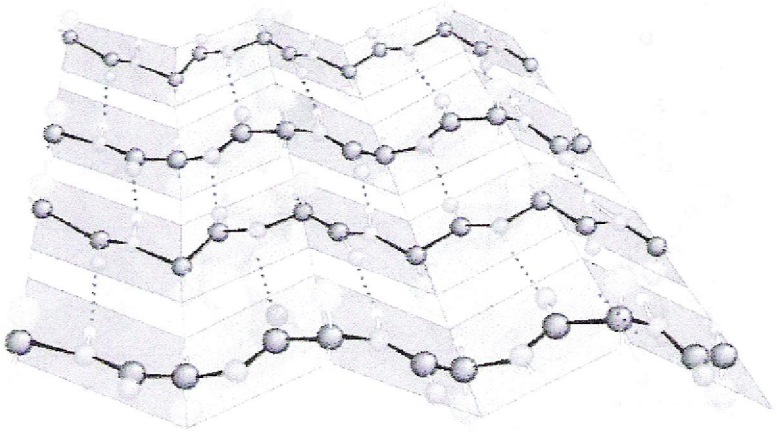
Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

- pravidelné (α-helix, β-list)

- nepravidelné (β-ohyb) [32]



Obr. 11 α-helix [34]



Obr. 12 β-list [34]

Ø **Terciární struktura** popisuje celkovou konformaci polypepridového řetězce a prostorové uspořádání postranních řetězců. Je výsledkem stabilizujících interakcí mezi postranními řetězci úseků s různou sekundární strukturou. [32]

Ø **Kvarterní struktura** je přítomna jen u některých molekul. Kvarterní strukturou se pak rozumí počet a prostorové uspořádání podjednotek v oligomerní molekule. [32]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Mléčné proteiny jsou tvořeny dvěma hlavními typy proteinů:

- Kaseiny (zhruba 80 % mléčných proteinů)
- Syrovátkovými (sérovými) proteiny (asi 20 % proteinů mléka) [1]

Tab. 3 Složení proteinů kravského mléka [2]

Proteiny	**Podíl v %**	**Obsah v $g \cdot dm^{-3}$**
Kaseiny celkem	80	25,6
α_s-kasein	42	13,4
β-kasein	25	8,0
γ-kasein	4	1,3
κ-kasein	9	2,9
Proteiny syrovátky celkem	20	6,4
α-laktalbumin	4	1,3
sérový albumin	1	0,3
β-laktoglobulin	9	2,9
Imunoglobuliny	2	0,6
Polypeptidy (proteosy, peptony)	4	1,3

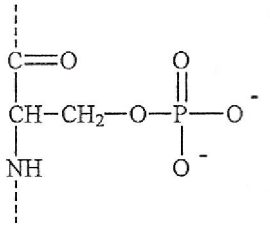
2.2 Biologická role mléčných proteinů

Mléko je jedním ze zdrojů potravy pro kojence. Mléčné proteiny zastávají mnoho důležitých biologických rolí, ale některé stále nebyly dokázány. Protože kasein se váže na vápník a fosfor, trávení těchto proteinů uvolňuje důležité množství těchto minerálů. [14]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

2.3 Kaseiny

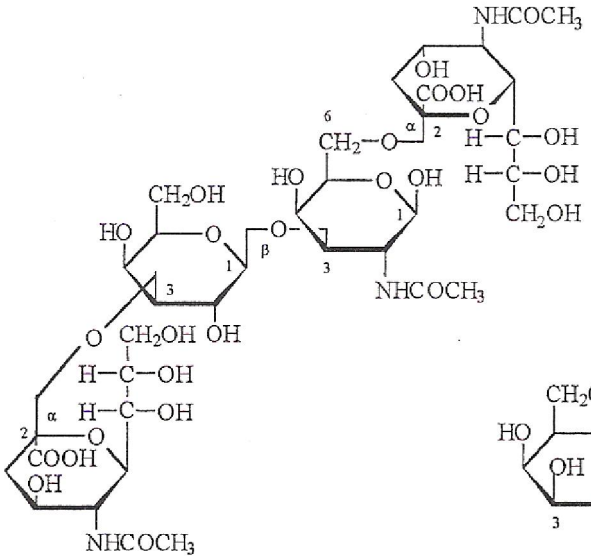
Hlavní složkou kaseinové frakce mléka jsou **α_s – kaseiny**. V kravském mléce se vyskytuje α_{s1} – kasein a α_{s2} – kasein (oba ve čtyřech genetických variantách A,B,C a D, lišících se primární strukturou, nejčastější variantou je varianta B). α_s – kaseiny se řadí mezi fosfoproteiny, neboť obsahují 5 zbytků kyseliny fosforečné (fosfátový zbytek se váže přes AMK serin). [14]



Obr. 13 Fosfoserin vázaný v proteinech [7]

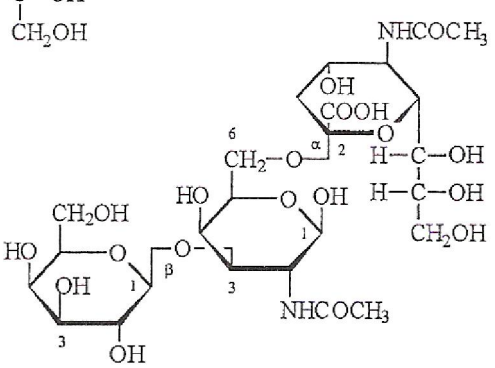
Za produkty degradace β-kaseinů proteolytickými enzymy mléka jsou považovány **γ-kaseiny** (pI = 5,8-6,0). Ve dvou genetických variantách (A a B) se v kravském mléce vyskytují **κ-kaseiny**. Molekula varianty B se skládá ze 169 zbytků aminokyselin. Molekuly se vyskytují jako trimery a vyšší oligomery spojené vzájemně disulfidovými vazbami. Na rozdíl od předchozích kaseinů jsou v molekulách κ-kaseinů přítomny sacharidy př. D-galaktosa (β- D-Gal*p*), N-acetyl-D-galaktosamin (β-D-Gal*p*NAc) a N-acetyl-neuraminová kyselina (α-NeuAc). Hlavní složkou κ-kaseinů (56 %) je rozvětvený tetrasacharid (obr. 8), v menším množství se vyskytují κ-kaseiny s vázaným rozvětveným trisacharidem (18,4 %, obr. 9), disacharidem (6,3 %, obr. 10) a N-acetyl-D-galaktosaminem (0,8 %, obr. 11). [31]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.



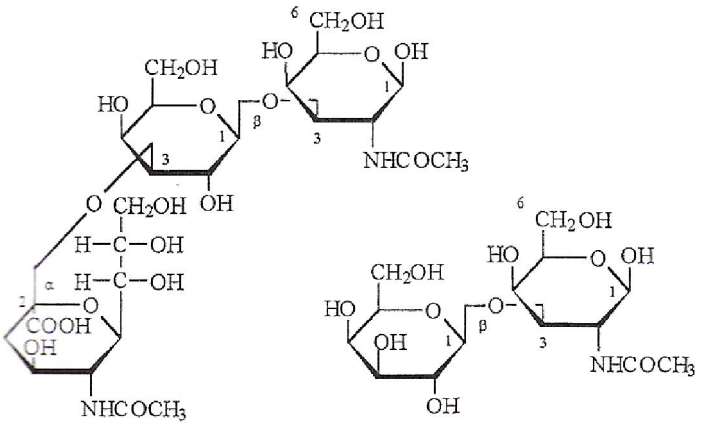
Obr. 14

A-NeuAc-(2→3)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*NAc-(6→2)-α-NeuAc



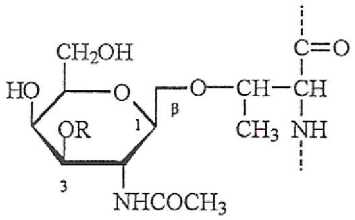
Obr. 15

β-D- Gal*p*-(1→3)-β-D- Gal*p*NAc-(6→2)-α-NeuAc [29]



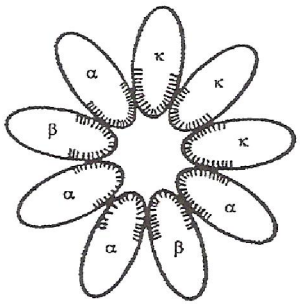
Obr. 16 A-NeuAc-(2→3)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D- Gal*p*NAc [27]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.



Obr. 17 N-acetyl-β-D-galaktosamin vázaný v proteinu na threonin [25]

Kaseiny nejsou v mléce ve formě monomerů, ale jsou agregovány do kaseinových komplexů a micel. [26] K agregaci molekul α_s , β- a κ-kaseinů do sférických částic zvaných micely dochází při teplotách nad 5°C. Molekuly α_s , β- a κ-kaseinů jsou uspořádány nejprve do tzv. submicel tvaru rotačního elipsoidu po 25-30 molekulách (obr. 12). [30]



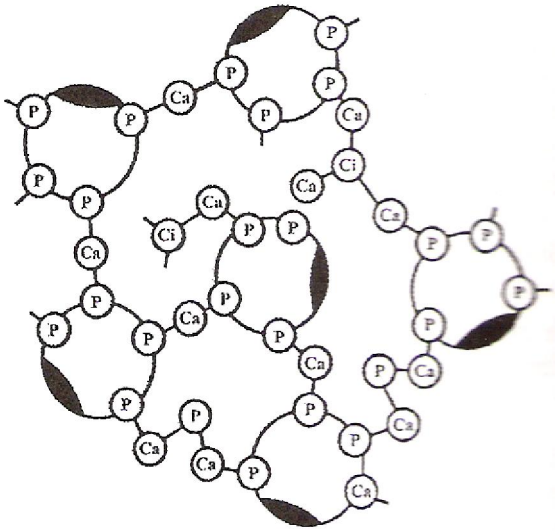
Obr. 18 Příčný řez typickou submicelou

(čárkovaně je vyznačena hydrofobní část molekul) [7]

Nepolární části jednotlivých molekul jsou orientovány do centra submicel, kde se uplatňují hydrofobní interakce. Polární části molekul kaseinů, tzn. fosfoserinové zbytky molekul α_s-kaseinů a β-kaseinů a threoninový zbytek s vázanými oligosacharidy v molekule κ-kaseinů, interagují s vápenatými ionty a vodou. [10] Jednotlivé submicely se vzájemně spojují do micel prostřednictvím fosfátových (fosfoserinových) skupin α_s-kaseinů a β-kaseinů (κ-kasein nemá v molekule vazebnou oblast) a vápenatých iontů buď přímo nebo prostřednictvím volných fosfátů a citrátů. (obr. 13) [11]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Typická micela kravského mléka obsahuje asi 20 000 molekul kaseinů. Micelu tvoří zhruba z 93 % kaseiny, asi 3 % hmotnosti je Ca^{2+} iontů, 3 % anorganického (volného) fosfátu, 2 % fosfátu vázaného jako fosfoserin, 0,4 % citrátu a do 0,5 % bývá Na, K a Mg iontů. Počet micel bývá asi 1.10^{12} v 1 ml mléka. [35]



Obr. 19 Vzájemné spojení submicel prostřednictvím fosfátů (P),

vápenatých iontů (Ca) a citrátů (Ci);

plně je vyznačena nevazebná oblast s molekulami κ-kaseinu [12]

α_{s1}-kasein je hlavní součástí kaseinu, vykazuje nejvyšší záporný náboj v neutrálním pH. α_{s1}-kasein má velmi kyselou oblast mezi zbytky 38 a 78, která je zodpovědná za velmi pevnou vazbu s vápníkem a fosforem. Má také silně hydrofobní oblast u zbytku 20. [14]

α_{s2}-kasein vykazuje mírnou hydrofobicity. V jeho kaseinové sekvenci jsou 3 fosfopeptidové oblasti mezi AMK(5-18, 49-68, 126-145) a velká hydrofobní oblast (90-120) s malým nábojem. [11] V mléce existuje jako disulfidicky spojený dimer a je pravděpodobné, že monomery mají intramolekulární disulfidické můstky mezi Cys36 a Cys40. [14]

β-kasein je hlavní součást kaseinu, která je nejvíce hydrofobním kaseinem. Má největší oblast vysoké hydrofobicity mezi AMK(55-90 a 130-209) a velmi kyselou N-koncovou

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

oblast u AMK 24. Má také dvě důležité oblasti. Jednu pohotově štěpí *plasmin* (štěpí vazby mezi AMK 28-29, 105-106/107-108) a druhá část je velmi citlivá na *chymosin* (189-190/192-193). [14]

κ-kasein je protein, který tvoří 10-12 % celkového kaseinu. Hraje rozhodující roli ve stabilizaci kaseinových micel v mléce a po enzymatickém štěpení ovlivní destabilizaci koloidního kaseinového systému. Enzymatické štěpení, které způsobí tuto změnu, je velmi důležité z nutričního hlediska pro kojence a také pro produkci mnoha druhů sýrů. N-koncová část (1-95) nese čistě kladný náboj, je velmi hydrofobní a vzájemně silně reaguje s jinými molekulami kaseinu. [14]

2.4 Proteiny syrovátky

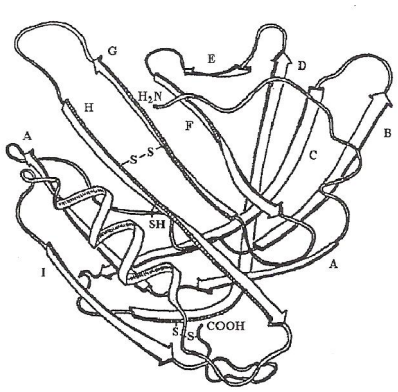
Syrovátkové (sérové) proteiny tvoří asi z 50 % globulární protein β-laktoglobulin (obr.14). Syrovátka je spolehlivým zdrojem velkého počtu vysoce kvalitních a biologicky aktivních bílkovin, uhlovodanů a minerálů. Níže jsou popsány charakteristiky hlavních i vedlejších bílkovin a dalších složek syrovátky. [2]

Hlavními bílkovinami syrovátky jsou β-laktoglobulin a α-laktalbumin; mezi vedlejší bílkoviny syrovátky řadíme proteósy-peptony, krevní bílkoviny a laktoferin. Bílkoviny syrovátky jsou snadno stravitelné, profil aminokyselin splňuje a dokonce převyšuje požadavky na tzv. esenciální amninokyseliny dané FAO (Světová potravinářská a zemědělská organizace) a WHO (světová zdravotnická organizace). V rámci zlepšování purifikačních technologií byly prokázány imunomodulační účinky (ovlivnění obranyschopnosti organizmu) jednotlivých proteinů. Jeho polypeptidový řetězec je tvořen 162 aminokyselinami (pI 5,35 - 5,41). V mléce je přítomen jako dimer. Při záhřevu a také v přítomnosti vysokých koncentrací vápenatých iontů a v prostředí o pH nad 8,6 nevratně denaturuje. Termicky částečně denaturovaný protein reaguje s dalšími mléčnými proteiny (κ-kaseinem, α-laktalbuminem) za vzniku dimerů spojených disulfidovou vazbou. [2]

Bílkoviny syrovátky našly uplatnění i v dětské výživě a to v řadě přípravků s převahou obsahu syrovátky, ale i jako hydrolyzáty bílkovin syrovátky u dětí s intolerancí na bílkoviny kravského mléka. Aktivní oblastí současného výzkumu je vytvoření sekvencí biologicky aktivních peptidů během trávicího procesu s výsledným účinkem na sekreci střevních enzymů a na zvýšení obranyschopnosti organizmu. [2] Minoritními, ale biologicky významnými

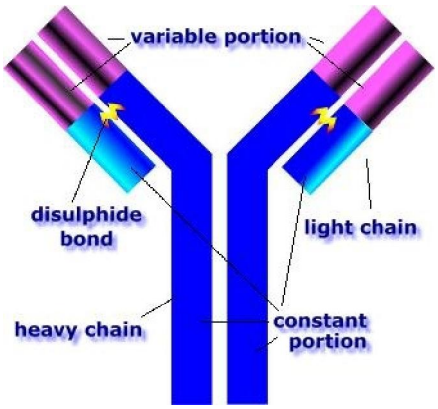
Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

proteiny jsou vysokomolekulární globulární glykoproteiny imunoglobuliny s účinností protilátek. [8]



Obr. 20 Struktura β-laktoglobulinu kravského mléka [9]

Funkci protilátek v těle plní glykoproteiny, označované jako **imunoglobuliny**. Během imunitní odpovědi jsou syntetizovány a vylučovány plasmatickými buňkami, diferencovanými B-lymfocyty. Molekula imunoglobulinu má tvar písmene Y, a skládá se ze dvou identických lehkých (L, light) řetězců, a dvou těžkých (H, heavy) řetězců, které jsou navzájem spojeny pomocí disulfidových můstků. Každý řetězec můžeme pomyslně rozdělit na funkční oblasti, domény. Část řetězců směrem k N-konci se nazývá variabilní oblast, naopak úsek řetězce směrem k C-konci je oblast konstantní. [36, 37, 38]



Obr. 21 Imunoglobulin

(variable portion - variabilní část, disulphide bond- disulfidický můstek, light chain- lehký řetězec, heavy chain- těžký řetězec, constant portion – konstantní oblast)

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

„Nožička“ imunoglobulinu je tvořena těžkými řetězci, „raménko“ je pak tvořeno lehkým řetězcem a těžkým řetězcem. Tyto části imunoglobulinu se nazývají antigen vázající fragmenty (Fab). Přechod ramének v nožičku se nazývá závěs (hinge). V tomto místě je molekula velmi pohyblivá, raménka se mohou otevírat nebo zavírat podle velikosti antigenu, na který se váží. V místě závěsu také na molekulu působí enzymy, jako je *papain* nebo *pepsin*, které ji štěpí. [36, 37, 38]

Ø *Lehký řetězec*

Známe dva typy lehkých řetězců, kapa (κ) a lambda (λ). Oba sestávají z cca 211 až 217 aminokyselin (M_r = 23 000). Jsou si velmi podobné, přesto se v jedné molekule nikdy nevyskytují oba typy, imunoglobulin vždy obsahuje buď dva řetězce κ nebo dva řetězce λ. [36, 37, 38]

Ø *Těžký řetězec*

Existuje několik typů těžkých řetězců, které se liší strukturou konstantní oblasti. Jsou označovány jako γ, α, μ, δ a ε. Těžký řetězec α a γ se skládají z přibližně 450 aminokyselin, ε tvoří asi 550 aminokyselin. [36, 37, 38]

Podle typu těžkého řetězce, rozdělujeme imunoglobuliny na pět tříd: IgG, IgA, IgM, IgD, a IgE. **IgG** je nejčastěji se vyskytující imunoglobulin, je přítomen v krvi i v tkáňovém moku. Je to jediný isotop, který může přecházet přes placentu a chrání tak plod před choroboplodnými zárodky ještě než se vytvoří jeho vlastní imunitní systém. Váže se na viry, bakterie i houby a dokáže je zničit. **IgA** tvoří asi 15% až 20% sérových imunoglobulinů. Proniká do trávicího traktu, nachází se v mléku, slzách a slinách. Je to protilátka, která pomáhá bojovat proti patogenům, které se dostaly na vnější nebo i vnitřní povrch těla. **IgM** se vyskytuje zpravidla jako pentamer, někdy i jako hexamer. Jsou to velké (900 kD), těžko rozpustné molekuly. IgM se vyskytuje hlavně v krevním séru, někdy i v tělních sekretech. Je to velmi dobrý aktivátor komplementu. (= soubor sérových faktorů C_1 až C_9, majících schopnost postupně se vázat na některé komplexy antigen-protilátka. Komplementy spolupůsobí ve specifické cytotoxicitě buněk a protilátek. Využívá se v řadě prakticky používaných imunologických testů. Jeho aktivita se ruší zahřátím). [36, 37, 38]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

Laktoferrin

Laktoferin je bílkovina schopná vazby a transportu a železa. Zvyšuje absorpci železa a není příčinou kojenecké zácpy jako anorganické preparáty železa. Z těchto důvodů je široce využíván v kojenecké stravě v Japonsku, Koreji a v dalších asijských zemích. Existuje řada dalších prospěšných vlastností, včetně antioxidačních vlastnosti, zlepšení parametrů obranyschopnosti a protirakovinné účinky. [2]

Laktoferrin zasahuje do růstu potenciálně škodlivých bakterií ve střevech. Připisuje se mu spousta dalších funkcí: anti-mikrobiální a anti-virové činnosti, úprava imunity a regulace růstu buněk. Laktoferrin zvyšuje fagocytózu a řídí vypouštění prozánětlivých cytokinů. Laktoferrin také snižuje ničivé účinky volných radikálů a má velmi protirakovinný účinek. [14] Laktoferin může být imunomodulační látkou a je považován za hlavní nespecifický faktor odolnosti vůči nemocem v prsní žláze. Důležité je, že když laktoferin uvolní své železo pro absorpci, může navázat volné železo v trávicím traktu. Tato vazebná schopnost železa potlačuje nežádoucí mikroflóru a podporuje žádoucí mikrobiální flóru střevního traktu potlačením růstu patogenních bakterií. Bakteriostatická aktivita laktoferinu je zkoumána pro případná užití jako konzervans. [2]

α-Laktalbumin

α-laktalbumin představuje okolo 25 % celkového obsahu bílkovin kravského mléka. 70 % bílkovin lidského mléka je obdobné syrovátkovým bílkovinám a 41 % těchto proteinů je tvořeno α-laktalbuminem. Tato bílkovina tvoří okolo 28 % celkového množství bílkovin lidského mléka. Doporučuje se přidávat bovinní (z kravského mléka) α-laktalbumin do kojenecké stravy, ale i do produktů určených lidem s omezeným příjmem proteinů. [2] Je druhým nejvýznamnějším proteinem v syrovátce. Poprvé byl izolován více než před 60 lety. Tento protein hraje podstatnou roli ve vývojových metodách, které studují chemické a fyziologické vlastnosti proteinů. Už dříve bylo objeveno, že funkce α-laktalbuminu není jenom nutriční, ale že je klíčovou složkou laktosové syntézy. Jednoduchý polypeptidový řetězec α-laktalbuminu je složen ze 123 AMK zbytků, zahrnujících osm cysteinů, které jsou kovalentně propojeny čtyřmi disulfidickými můstky. [14]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

β-laktoglobulin

β-laktoglobulin tvoří přibližně 50% celkového obsahu proteinů syrovátky kravského mléka.[2] β-laktoglobulin je globulární s dobře známou trojrozměrnou strukturou. Existuje velké množství geneticky určených forem, které jsou obecně přítomny buď jako A nebo B varianta. Váže kalcium a zinek a vykazuje částečnou sekvenční homologii s bílkovinami vázajícími retinol. β-laktoglobulin má četná vazebná místa pro minerály, vitamínů rozpustných v tucích a může být využit k zabudování žádoucích lipofilních složek jako tokoferolu a vitamínu A do nízkotučných produktů. [2]

Bovinní sérum albumin (BSA) je nejhojnějším proteinem. Představuje přibližně 50 % proteinů u krav v krevním séru. BSA je z 80 % odpovědný za osmotický krevní tlak a je také odpovědný za udržování pH krve. Vystupuje také jako excelentní proteinová rezerva a je důležitým transportním proteinem, společně se steroidními hormony, bilirubinem a kovovými ionty. BSA je mnoho let předmětem intenzivního výzkumu, který se zabívá jeho strukturou a odhaluje mimořádné rozmanité funkce. Primární struktura má 17 disulfidických můstků, které udržují molekulu ve struktuře, která se skládá z 9 smyček. [14]

β_2-Mikroglobulin byl poprvé izolován z proteinové frakce získané z kyselého kaseinu. Izolovaný protein byl nazván laktollin. Tento protein byl identifikován a popsán jako tetramer, β_2-mikroglobulin. Je to malý monomerní protein o 98 AMK (i když je to spíše peptid, protože má méně než 100 AMK) a má jeden disulfidický můstek. [14]

Osteopontin je velmi fosforylovaný kyselý glykoprotein. Byl nalezen v kostech stejně tak jako i v jiných tkáních. Vyskytuje se také v mléce i moči. Hraje důležitou adhezní nebo signalizační roli při zranění a je důležitý při mineralizaci a při resorpci v kostní matrix (je jedním z hlavních nekolagenních proteinů). Není ještě známo, zda-li mléčný osteopontin nebo peptidy z něj, jsou absorbovány z gastrontestinálního traktu nebo zda-li udrží svou biologickou funkci. [14]

Mléčné glykoproteiny

Několik méně důležitých glykoproteinů bylo nalezeno i v mléce. Jejich identifikace a funkce se stále objasňuje. Série blízce příbuzných vysoce kyselých glykoproteinů byla izolována

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

z kravské syrovátky a mleziva. Byly označeny jako M-1 glykoproteiny. M-1 glykoproteinové frakce mleziva obsahovaly mnohem více sacharidových složek než frakce izolované z mléka. M-1 glykoproteinové frakce mleziva vždy obsahovala galaktosu, glukosamin a galaktosamin. Jedním z glykoproteinů M-1 frakce mleziva je orosomukoid, také známý jako α_1-acid glykoprotein. [14]

Vysoce molekulární hmota glykoproteinů nalezená v kravském mléce byla identifikována jako **prosaposin**, který hrál důležitou roli ve vývoji, obnově a udržování nervového systému. Fyziologická funkce tohoto glykoproteinu není zatím přesně známa. [14]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

ZÁVĚR

Hlavní skupinou peptidů mléka jsou bioaktivní peptidy. Tyto peptidy dělíme z hlediska jejich biologické a fyziologické funkce do dvou větších podskupin a to na peptidy ochranné a na peptidy fyziologicky aktivní. Ochranné peptidy nás ochraňují především před různými bakteriemi, kvasinkami atd. Naopak fyziologicky aktivní peptidy mají již odlišnou funkci. Tato podskupina je různorodá, patří sem opioidní peptidy, které se svým složením i funkcí podobají opiátům; antimikrobiální peptidy, jejichž funkcí je ochrana trávícího traktu novorozenců; hypotenzí peptidy, které mají vliv především na vnější krevní tlak; neuroendokrynní peptidy a další. Proteiny dělíme na dvě dominantní skupiny a to na kasein a syrovátkové bílkoviny. Kasein je ze strukturního hlediska komplex fosfoproteinů a je zároveň hlavní bílkovinou mléka. Z AMK má vysoký obsah lysinu, naopak méně cysteinu a tryptofanu. Má několik frakcí a to α_{s1} – kasein a α_{s2} – kasein, β-kasein a κ-kasein. Syrovátkové bílkoviny mají vysokou nutriční hodnotu, z AMK mají vysoký obsah cysteinu a tryptofanu, méně methioninu. Mezi syrovátkové bílkoviny zařazujeme β-laktoglobulin, α-laktalbumin, serum (sérový) albumin, laktoferrin, imunoglobuliny, mléčné glykoproteiny a další.

V této práci jsou shrnuty peptidy a proteiny mléka. Doposud ovšem ještě nebyly objeveny a identifikovány všechny peptidy a proteiny. Výzkum v této oblasti může přinést velmi zajímavé poznatky hlavně v oblasti biologické a fyziologické funkce jednotlivých peptidů či proteinů.

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 1*, Vydání 1, 1999

[2] SALAVEC, M. (zpracováno dle odborných článků Walzern R.L.:

Health enhaning properties of whey proteins and whey fractions a Gerdes S.K.:

U.S. whey ingredents and weight management)

[3] BŘEZINA, P., *Souhrn vybraných prací z oblasti mikrobiologie, hygieny, chemie a technologie mléka a mléčných výrobků*, VŠCHT Praha, 1990, p. 356-360

[4] CIKÁNEK, D., BŘEZINA, P., PAVLÍKOVÁ, Š., JELÍNEK, J., IX. Sympozium o aromatických látkách v poživatinách, Bánská Bystrica, 1989

[5] BŘEZINA, P., JELÍNEK, J., PAVLÍKOVÁ, Š., RAUCH, P., POKORNÝ, J., *Sborník VŠCHT*, Praha, E.-Potraviny, v tisku

[6] VISSER, F. M. W., Neth. *Milk Dairy J.*, Vol.31, 1977, p.265

[7] MEISEL, H., *Biopolymers*, Vol.43, 1997, p.119

[8] MEISEL, H., Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications, *Livestock Production Science*, Vol.50, Issues 1-2, 1997, p.125-138

[9] Dostupné na: http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=11203

[10] NAKAMURA, Y. *at all*, *Journal of Dairy Science*, Vol.78, 1995, p. 777

[11] GOBETTI, M. *at all*, *Appl. Environ. Microbiol*., Vol. 66, 2000, p. 3898

[12] GOMEZ-RUIZ, J., A., RAMOS, M., RECIO, I., *International Dairy Journal*, Vol.12, 2002, p. 697

[13] Dostupné na: http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/83/6/1187

[14] ROGINSKI, H., FUQUAY, J.W., FOX, P.F., *Encyklopedia of dairy science*

[15] BULLEN, J. J., ROGERS, H. J., LEIGH, L., Iron binding proteins in milk and resistance to E.coli infections in infants, *Br. Med.J*., Vol.1, 1972, p.69-75

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

[16] LAHOV, E., EDELSTEN, D., SODE-MOGENSEN, M. T., SOFER, E., Properties of basic glycopeptides from cow milk protein by heat, *Milchwissenschaft*, Vol. 26, 1971, p.489-495

[17] LAHOV, E., REGELSON, W., Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides, *Food Chem. Toxicol.*, Vol.34, 1996, p.131-145

[18] Dostupné na: http://en. Wikipedia.org

[19] ZUCHT, H. D., RAIDA, M., ADERMANN, K., MAGERT, H. J., FORSMANN, W. G., Casocidin-I: a casein α_{s2} derived peptide exhibits antibacterial activity, *FEBS Lett.*, Vol. 372, 1995, p.185-188

[20] TOMITA, M., at all, Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin, *Journal of Dairy Science*, Vol. 74, 1991, p. 4137-4142

[21] JONES, E. M., at all, Lactoferricin, a new antimicrobial peptide, *J.Appl.Bacteriol.*, Vol. 77, 1994, p. 208-214

[22] KUWATA, H., YIP, T. T., TOMITA, M., HUTCHERS, T. W., Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin, *Biochim.Biophys.Acta*, Vol. 1429, 1998, p. 129-141

[23] BELLAMY, W. R., at all, Killing of Candida albicans by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin, *Med.Microbiol.Immunol.*, Vol. 182, 1993, p. 97-105

[24] WAKABAYASHI, H., at all, Cooperative anti-Candida effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifugal agents, *Microbiol.Immunol.*, Vol. 40, 1996, p. 821-825

[25] Dostupné na: http://en.wikipedia.org/wiki/Casomorphin

[26] Dostupné na: http://en.wikipedia.org/wiki/ACE_inhibitor#column-one#column-one

[27] Dostupné na:

http://www.dbalp.admin.ch/de/publikationen/docs/vortrag_2006_11_02_113.pdf

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

[28] PIHLANTO, A. [a]MTT *Agrifood Research Finland, Food Research*, FIN-31600 Jokioinen, Finland

[29] HAZUM, E., Division of Endocrinology, Glaxo Research Laboratories, *Five Moore Dive*, Research Triangle Park, NC 27709, USA

[30] Dostupné na: http://en.wikipedia.org/wiki/Prolactin

[31] KORHONEN, H., PIHLANTO, A., *International Dairy Journal* 16 (9), SEP 2006, p. 945-960

[32] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., *Potravinářská biochemie I*, 2005

[33] Dostupné na: http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/125270-bilkovina

[34] Dostupné na: http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BPOL/1.%20Struktura%20proteinu.pdf

[35] ROKKA, T. *at all*, *Milchwissenschaft*, Vol. 52, 1997, p. 675

[36] MURRAY, Robert K., at all, *Harperova biochemie*. Z angl. 23. vyd. přel. Lenka Fialová at. all, 4. vyd. v ČR. Praha: H & H, 2002, 872 s.

[37] MURRAY, Robert K., at all. *Harperova biochemie*. Z angl. 23. vyd. přel. Lenka Fialová at. all, 3.vyd. v ČR. Praha: H & H, 2001, 872 s.

[38] MURRAY, Robert K., at all, *Harperova biochemie*. Z angl. 23. vyd. přel. Lenka Fialová at. all, 2. vyd. v ČR. Praha: H & H, 1996. ix, 872 s.

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACE	angiotensin-konvertující enzym katalyzující změnu tzv. angiotensinu I na angiotensin II – tato látka působí jako silná vasokonstriktor (stahuje cévy)
G+	Grampozitivní (bakterie)
G-	Gramnegativní (bakterie)
CCK	Cholecystokinin
GMP	Glykomakropeptid
CMP	Kaseinmakropeptid
PRL	Prolaktin
TRH	Thyrotropin-uvolňující hormon (z angl. thyrotropin-releasing hormone)
AMK	Aminokyselina
BSA	Bovine Serum Albumin
Fab	Fragmenty

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Peptidová vazba……...9

Obr. 2 Konformace trans a cis peptidové vazby……10

Obr. 3 Staphylococcus aureus ……..16

Obr. 4 Bacillus subtilis ……....16

Obr. 5 Sarcina ……...16

Obr. 6 E.Coli ……17

Obr. 7 Salmonella ……..17

Obr. 8 Pseudomonas ……....17

Obr. 9 Captopril, první ACE inhibitor ……...21

Obr. 10 Prolaktin ……23

Obr. 11 α-helix ……27

Obr. 12 β-list ……...27

Obr. 13 Fosfoserin vázaný v proteinech ……..29

Obr. 14 A-NeuAc-(2→3)-β-D-Gal*p*-(1→3)- β-D-Gal*p*-NAc-(6→2)-α-NeuAc ……30

Obr. 15 β-D-Gal*p*-(1→3)- β-D-Gal*p*-NAc-(6→2)-α-NeuAc ……..30

Obr. 16 A-NeuAc-(2→3)- β-D-Gal*p*-(1→3)- β-D-Gal*p*-NAc ……....30

Obr. 17 N-acetyl- β-D-galaktosamin vázaný v proteinu na threonin ……...31

Obr. 18 Příčný řez typickou submicelou ……31

Obr. 19 Vzájemné spojení submicel prostřednictvím fosfátů, vápenatých iontů a citrátů ...32

Obr. 20 Struktura β-laktoglobulinu kravského mléka ……34

Obr. 21 Imunoglobulin ……34

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Zastoupení celkových a volných AMK v izolovaných frakcích peptidů ……...13

Tab. 2 Některé známé kasomorfiny ……19

Tab. 3 Složení proteinů kravského mléka ……28

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

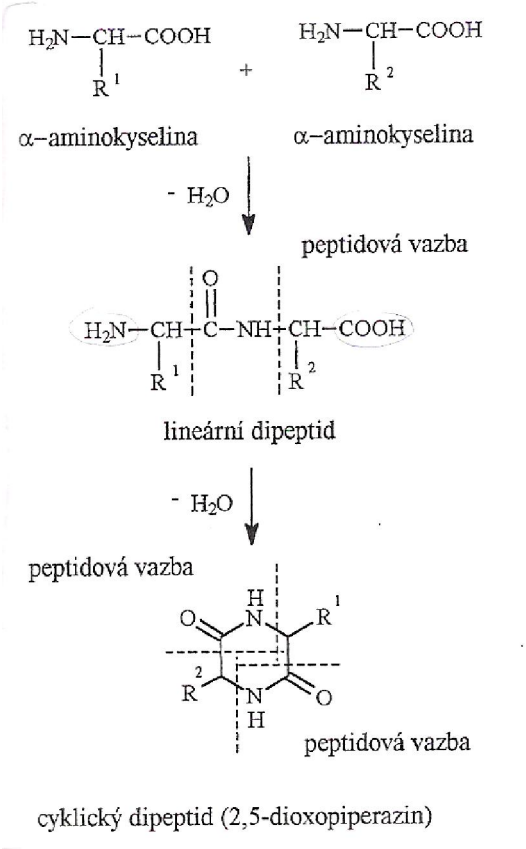
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I. Vznik lineárního a cyklického dipeptidu; Bovine β-casomorphin…...……47

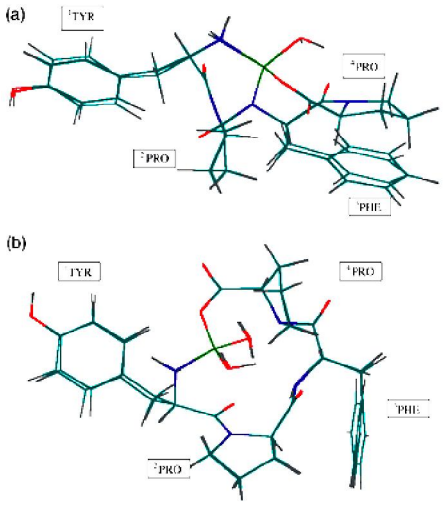
Příloha P II. Bioaktivní peptidy odvozené od mléčných proteinů……...48

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

PŘÍLOHA P I.



Vznik lineárního a cyklického dipeptidu [1]



Bovine β-casomorphin [27]

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.

PŘÍLOHA P II.

Bioaktivní peptidy odvozené od mléčných proteinů [14]

Bioaktivní peptidy	**Bílkovinný prekurzor**	**Bioaktivita**
Kasomorfiny	β-kasein	Opioidní a ACE inhibitor
α-kasein	α_{s1}-kasein	Opioidní
α-laktorfin	α-laktalbumin	Opioidní a ACE inhibitor
β-laktorfin	β-laktoglobulin	Opioidní a ACE inhibitor
Kasoxiny	κ-kasein	Opioidní antagonista
Laktoferroxiny	Laktoferrin	Opioidní antagonista
Kasokininy	α- a β-kasein	ACE inhibitor
Laktokininy	α-laktalbumin β-laktoglobulin	ACE inhibitor
Imunopeptidy	α- a β-kasein α-laktalbumin	Imunomodulační
Laktoferricin	Laktoferrin	Antimikrobiální
Fosfopeptidy	α- a β-kasein	Kovová vazba

Generated by Foxit PDF Creator © Foxit Software
http://www.foxitsoftware.com For evaluation only.