

УДК 591.146-02:616.12-008.331.1

КАЗОКІНІНИ – ПЕПТИДИ З АНТИГІПЕРТЕНЗИВНОЮ АКТИВНІСТЮ, ЯКІ УТВОРЮЮТЬСЯ З БІЛКІВ КАЗЕЇНОВОГО КОМПЛЕКСУ МОЛОКА

Б. Луговий, В. Юкало

Тернопільський державний технічний університет імені Івана Пулюя,
вул. Руська, 56, Тернопіль 46001, Україна,
e-mail: biotech@tu.edu.te.ua

Білки казеїнового комплексу молока є попередниками олігопептидів, які гальмують активність ангіотензиноперетворювального ферменту, важливого компонента ренін-ангіотензин-альдостеронової системи організму. Підвищена активність цього ферменту призводить до надмірного продукування ангіотензину-ІІ і розвитку артеріальної гіпертензії, а згодом також інших серцево-судинних захворювань. Більшість казеїнових пептидних інгібіторів АПФ мають антигіпертензивний ефект *in vivo*, завдяки чому їх названо „казокінінами” за аналогією з дією ендогенного вазодилататора брадикініну. Розглянуто історію відкриття, методи отримання та наявність казокінінів у кисломолочних продуктах та сирах.

Ключові слова: казокініни, казеїни, інгібітори АПФ, артеріальна гіпертензія.

Білки казеїнового комплексу молока - α s-, β - і κ -казеїни – становлять близько 80% від сумарного білка коров'ячого молока (2,7 г/100 г молока) і є попередниками низькомолекулярних фізіологічно активних пептидів, окремі з яких – це інгібітори ангіотензиноперетворювального ферменту (АПФ). Цей фермент є компонентом ренін-ангіотензин-альдостеронової системи організму і відіграє важливу роль у регулюванні кров'яного тиску та водно-електролітному гомеостазі [46]. АПФ перетворює декапептид ангіотензин-І в октапептид ангіотензин-ІІ – найсильніший ендогенний вазоконстриктор, і його надмірне продукування призводить до розвитку артеріальної гіпертензії та низки серцево-судинних захворювань [15]. Тому інгібітори цього ферменту розглядають як ефективні антигіпертензивні та кардіопротекторні засоби й успішно використовують у клініці [1]. Деякі ендогенні пептиди, такі як енкефаліни, брадикінін і речовина Р, є конкурентними інгібіторами для АПФ [26, 49]. Серед екзогенних природних пептидів інгібітори АПФ вперше виділені з отрути змії *Bothrops jararaca* [12, 39]. Деякі харчові білки з таких продуктів, як м'ясо сардин і тунця, желатин, кукурудза, соєві боби, теж є попередниками пептидних інгібіторів АПФ [9].

Тривалий час білки казеїнового комплексу молока вважали джерелом амінокислот, тобто матеріалом для пластичного обміну, що потрібний для поповнення амінокислотного пулу людського організму. Відомо, що амінокислотний скор ка-

зеїну коров'ячого молока (після яєчного альбуміну) близький до „ідеального” білка. Амінокислотну послідовність білків казеїнового комплексу коров'ячого молока розшифровано всередині 1970-х років. Про регуляторні фізіологічні властивості продуктів розщеплення казеїнових білків уперше стало відомо 1979 р., коли група німецьких учених під керівництвом Віктора Брантла виявила опіатні властивості трипсинового гідролізату казеїну. Перші ж дані про пептидні інгібітори АПФ з'явилися 1982 р., коли японські дослідники Магууата зі співавт. [28] виділили такі пептиди з коров'ячого молока методом трипсинового протеолізу загального казеїну. Згодом пептидні інгібітори АПФ було виділено з різних субодиниць білків казеїнового комплексу шляхом протеолізу травними ферментами, молокозгортальними препаратами чи протеазами молочнокислих бактерій, а окремі пептиди синтезовано відповідно до фрагментів первинної структури цих білків (див. таблицю).

Відомий дослідник фізіологічно активних казеїнових пептидів Ганс Мейзель з Федерального інституту молока у місті Кіль (Німеччина) 1993 р. запропонував називати казеїнові пептиди з АПФ-інгібіторною активністю казокінінами, завдяки їхній брадикініноподібній дії [30]. Гальмування активності АПФ казокінінами, виявлене *in vitro*, дало змогу виявити структурно-функціональний зв'язок між будовою пептидних інгібіторів та спорідненістю до АПФ [30]. Детальніше розглянемо дані про механізм інгібіторного впливу казеїнових пептидів на активність АПФ.

Зазначимо, що серед учених ще немає остаточного уявлення про механізм такого впливу. Вивчення кореляції між структурою та активністю різних пептидних інгібіторів АПФ свідчить про важливий вплив трипептидної послідовності на С-кінці молекули субстрату. Проте точний механізм субстратної специфічності ще не повністю з'ясовано. Відомо, що АПФ зв'язується із субстратами чи конкурентними інгібіторами, які містять гідрофобний (ароматичний чи з аліфатичним ланцюгом) залишок у вже згаданій трипептидній послідовності на С-кінці молекули. Дослідження гальмувань активності АПФ дипептидами різної структури доводять, що С-кінцеві залишки триптофану, тирозину, фенілаланіну чи проліну були більше споріднені до АПФ. Однак усі казокініни, наприклад, мають на С-кінці залишки проліну, лізину чи аргініну, а наявність позитивно зарядженого С-термінального залишку лізину чи аргініну у казокінінах, брадикініні та у деяких синтетичних інгібіторах не узгоджується з відомою моделлю активного центру АПФ, запропонованою Ондетті, згідно з якою дві катіонні групи на поверхні активного центру АПФ (аргініловий залишок та йон цинку) формують йонні зв'язки з негативно зарядженими термінальними групами субстратів. Проте сучасні дані про зв'язок між структурою й активністю пептидних інгібіторів АПФ свідчать, що позитивний заряд гуанідинової чи ϵ -аміногрупи С-термінального залишку аргініну або лізину, відповідно, має вирішальний вплив на АПФ-інгібіторну активність. Наприклад, заміщення аргінілового залишку у С-кінці брадикініну призводить до втрати інгібіторного ефекту на АПФ. Тому Meisel припускає, що у механізмі гальмування АПФ також бере участь взаємодія між позитивно зарядженою групою С-термінального амінокислотного залишку інгібітора і певним негативно зарядженим сайтом зв'язування, який може відрізнятись від каталітичної ділянки в активному центрі АПФ

[13]. Таке припущення підкріплене результатами теоретичного вивчення структури пептидів з використанням пакета програм молекулярного графічного моделювання НАМОГ і підрахунками та аналізом молекулярних електростатичних потенціалів (MEPs). Виявилось, що пептидні ІАПФ мають подібні властивості їхніх MEPs, а неактивні до АПФ молекули, як, наприклад, *desArg*⁹-брадикінін, суттєво від них відрізняються внаслідок втрати позитивного потенціалу у С-кінці молекули. Крім того, олігопептиди можуть перебувати у декількох конформаційних станах і один пептид може займати різне просторове положення, взаємодіючи з різними сайтами зв'язування.

На особливу увагу заслуговують фізіологічні ефекти, виявлені казокінінами *in vivo*, оскільки про антигіпертензивну дію можна говорити лише в тому випадку, якщо активна речовина після аліментарного надходження є резистентною до ентеральних пептидаз, всмоктується у кров, досягає своєї тканини-мішені і виявляє фізіологічний ефект. Зокрема, з'ясовано антигіпертензивну дію казокінінів у разі їхнього внутрішньовенного і перорального введення спонтанно-гіпертензивним (SHR*) щурам. Такі казокініни відповідали трипсиновим фрагментам (Maquyama зі співавт. [25]) і пептидам, утвореним під час дії приклітинної протеїнази *Lactobacillus helveticus* на α ₁- β - і κ -казеїни (Yamamoto зі співавт. [52, 53]). Пероральне введення трипсинового гідролізату загального казеїну спричинило антигіпертензивний ефект у SHR-щурів (Karakі зі співавт. [20]). Saito зі співавт. [43, 44] описали дозозалежні антигіпертензивні ефекти казокінінів після їхнього перорального введення SHR-щурам. Дослідження, виконані на добровольцях, дали змогу виявити антигіпертензивний ефект препарату з трипсинового гідролізату загального казеїну, який призначали по 10 г двічі на добу протягом чотирьох тижнів (Sekiya зі співавт. [45]). Maeno зі співавт. [24] виділили β -казеїновий пептид *KVLPVPQ* з антигіпертензивною дією *in vivo* із препарату, отриманого внаслідок дії протеїнази з *L. helveticus*. Однак несподівано цей пептид виявив низьку інгібіторну активність на АПФ *in vitro*. З'ясувалось, що під час травлення під дією панкреатичних протеаз відбувалося розщеплення гептапептиду *KVLPVPQ* до гексапептиду *KVLPVP*, який мав високу АПФ-інгібіторну активність і антигіпертензивний ефект *in vivo* на SHR-щурів. Отже, можна зробити висновок, що антигіпертензивні пептиди можуть утворюватися під дією травних ферментів не тільки з високомолекулярних білків, таких як казеїни, а й з пептидів-попередників, які потрапляють в організм з їжею.

* Spontaneously hypertensive rats – щурі з генетично детермінованою гіпертензією.

Пептидні інгібітори ангіотензиноперетворювального ферменту, отримані з казеїнових білків коров'ячого молока, за R.J. FitzGerald і Н. Meisel [13]

Білок-пептид	Фрагмент	Первинна структура ¹	IC ₅₀ ² , μМоль/л	Фермент-ний гідроліз	Пептид-ний синтез	Джерело
α _{S1} -Казеїн	f (23-34)	FFVAPFPEVFGK	77	+	-	[27,28]
	f (23-27)	FFVAP	6	+	-	[27]
	f (24-27)	FVAP	10	-	+	[26]
	f (25-27)	VAP	2	-	+	[26]
	f (27-30)	PFPE	>1000	-	+	[26]
	f (28-34)	FPEVFGK	140	+	-	[26]
	f (32-34)	FGK	160	-	+	[26]
	f (104-109)	YKVPQL	22	+	-	[24]
	f (142-147)	LAYFYFYP	65	+	-	[40]
	f (143-148)	AYFYFPE	106 "	+	-	[52]
	f (157-164)	DAYPSGAW	98	+	-	[40]
	f (194-199)	TTMPLW	16	+	-	[25]
	f (197-199)	PLW	36	-	+	[25]
	f (198-199)	LW	50	-	+	[25]
β-Казеїн	f (57-64)	SLVLPVPE	39	+	-	[52]
	f (60-66)	YPFPGPIP	500	-	+	[32]
	f (74-76)	IPP	5	+	-	[36]
	f (84-86)	VPP	9	+	-	[36]
	f (108-113)	EMPFPK	423"	+	-	[40]
	f (169-174)	KVLPVP	5	-	+	[24]
	f (169-175)	KVLPVPQ	1000	+	-	[24]
	f (177-179)	AVP	340	-	+	[26]
	f (177-181)	AVPYP	80	-	+	[26]
	f (177-183)	AVPYPQR	15	+	-	[26]
	f (179-181)	PYP	220	-	+	[26]
	f (181-183)	PQR	> 400	+	-	[26]
	f (193-198)	YQQPVL	280	+	-	[40]
	f (193-202)	YQQPVLGPVR	300	-	+	[32]
κ-Казеїн	f (25-34)	YIPIQYVLSR	Не визначена	-	+	[11]
	f (35-41)	YPSYGLNY	Не визначена	-	+	[11]
	f (58-59)*	YP	720	+	+	[53]
	f (108-110)	IPP	5	+	-	[36]

¹ Амінокислоти позначені однолітерним кодом.

² Концентрація пептидів, за якої активність АПФ загальмована на 50%.

" IC₅₀ наведено у мкг/мл

* Ця послідовність також трапляється в α_{S1}- (f 146-147) та β-казеїні (f 114-115).

Тривалий час не було інформації щодо утворення казокінінів у молочних продуктах. Проте сьогодні відомо, що пептидні інгібітори АПФ можуть утворюватися ще до моменту потрапляння у шлунково-кишковий тракт, а саме – у процесі приготування і дозрівання молочних продуктів, технологією виробництва яких передбачено процеси протеолізу білків молока і, зокрема, казеїнів. Nakamura зі співавт. [36] виділили казеїнові трипептиди *VPP* (фрагмент 84-86 β -казеїну) і *IPP* (фрагменти 74-76 β -казеїну і 108-110 κ -казеїну) – інгібітори АПФ з японського кисло-молочного напою Calpis™, для приготування якого використовували симбіотичну закваску, що містить *Lactobacillus helveticus* і *Saccharomyces cerevisiae*. Ці вчені з'ясували, що пероральне одноразове введення 5 мл/кг молочного напою Calpis™ SHR-щуром достовірно зменшує систолічний тиск через 6-8 год, що відповідає 0,6 і 0,3 мг/кг уведення *VPP* і *IPP*. Антигіпертензивну активність цих пептидів доведено дозозалежним ефектом. Отримані результати свідчать, що обидва пептиди відіграють визначну роль в антигіпертензивних ефектах кислого молока Calpis™. З іншого боку введення цього молочного продукту чи суміші трипептидів не змінює систолічного тиску крові у нормотензивних щурів, незважаючи на те, що кількість кислого молока і трипептидів, які вводили, була значно більшою від дози, яка є ефективною у SHR-щурів. Ці результати, на думку Nakamura зі співавт. [37], дають змогу припустити, що антигіпертензивна активність кислого молока і трипептидів *VPP* і *IPP* специфічна в разі гіпертензивного статусу організму. Потрібно зазначити про роль дипептидів як інгібіторів АПФ. Yamamoto зі співавт. [53] виявили, що дипептид Туг-Про, який концентрації 720 μ Моль/л гальмує активність АПФ наполовину, має виражений гіпотензивний ефект у SHR-щурів і може утворюватися з α S₁- (фрагмент 146-147), β - (фрагмент 114-115) і κ -казеїну (фрагмент 58-59). Описаний дипептид виявлено у кислому молоці, ферментованому культурою *Lactobacillus helveticus*, з'ясовано, що він може утворюватися внаслідок дії бактеріального ферменту – пост-пролін-дипептидил-амінопептидази на казеїнові пептиди [10].

Антигіпертензивні властивості пептидів, утворених з казеїнових білків молока, залежать від спроможності цих пептидів досягати тканин-мішеней, долаючи природні бар'єри у вигляді ендотеліальних пептидаз, можливості всмоктуватися у кров та циркуляторних пептидаз, які наявні у плазмі крові. Відомо, що гальмування АПФ у легенях, судинах, нирках та головному мозку є основою антигіпертензивної дії каптоприлу – найуживанішого фармацевтичного препарату з класу інгібіторів АПФ [50, 51]. З огляду на це резистентність до розщеплення пептидазами є необхідною передумовою для перорального чи внутрішньовенного призначення препаратів пептидів чи білкових гідролізатів з АПФ-інгібіторною активністю. Наприклад, фрагменти 23-27 і 104-109 α S₁-казеїну гальмували активність АПФ *in vitro*, однак антигіпертензивного ефекту *in vivo* не було відсутній [24, 25].

Фізіологічні ефекти казокінінів, уведених перорально, дають підстави вважати, що такі пептиди здатні в активній формі всмоктуватися у кров. Відомо, що деякі ди- і трипептиди можуть долати ентеральний бар'єр [7, 16]. Крім того, пептиди, які містять пролін, стійкіші до деградації травними ферментами [8, 21], а пеп-

тиди, які мають *Pro-Pro* послідовність на С-кінці молекули, резистентні до деградації проліноспецифічними пептидазами – пролідазами [22, 34, 54, 55]. Тому казокініни стійкі до травлення, ефективно всмоктуються у кишківнику, і, відповідно, мають антигіпертензивний ефект. З іншого боку, часткове розщеплення пептидів може потенціювати посилення АПФ-інгібіторної активності, як у вже згаданому прикладі з відщепленням С-кінцевого глутаміну від β -казеїнового гептапептидного фрагмента 169-175 до гексапептидного 169-174, унаслідок чого АПФ-інгібіторна активність *in vitro* збільшувалася від 1000 до 5 μ Моль/л [24].

Наведену вище думку Nakamura про те, що антигіпертензивна активність кислого молока і трипептидів *VPP* і *IPP* є специфічною в разі гіпертензивного статусу організму, підтверджують праці Ikemoto зі співавт. [18], автори яких виявили, що активність АПФ в аорті SHR-щурів значно вища, ніж у нормотензивних. Подібні результати отримали Okunishi зі співавт. [38], які визначили вищу активність АПФ у черевній аорті та у легенях у SHR-щурів порівняно з нормотензивними щурами лінії Вістар-Кіото (WKY). З'ясовано, що активність АПФ у серці, яєчках, нирках, легенях і мозку, а найбільше в аорті була послаблена після згодовування тваринам кисломолочного продукту Calpis™ [35]. Остаточним доказом всмоктання казокінінів у кров є експерименти, виконані Masuda зі співавт. [29]. Ці вчені ідентифікували вже згадані β -казокініни *VPP* і *IPP* у черевній аорті щурів, яким давали Calpis™, тоді як у тварин, яким цей продукт не призначали, β -казокініни не виявлено. Також ці автори довели, що після всмоктання β -казокініни досягали абдомінальної аорти і гальмували АПФ, а через 6 год з моменту перорального введення Calpis™ у SHR-щурів систолічний артеріальний тиск зменшувався приблизно на 26%.

Про специфічність протеолітичних реакцій та їхній визначальний вплив на утворення з казеїнових білків саме антигіпертензивних пептидів свідчать оригінальні дослідження Nata зі співавт. [17], які перевірили дію казокінінів на пацієнтах з артеріальною гіпертензією розділених на дві групи. Пацієнти першої групи пили штучно підкислене молоко як плацебо протягом восьми тижнів, тоді як друга група стільки ж часу вживала кисломолочний продукт Calpis™. З четвертого тижня від початку вживання кислого молока по 95 мл/день систолічний артеріальний тиск у хворих другої групи достовірно зменшився, а в пацієнтів першої групи не змінився. Це і є доказом того, що пептидні інгібітори АПФ можуть утворюватися лише у певних протеолітичних реакціях. З огляду на це доцільно виконати скринінг усіх мікроорганізмів (їхніх протеаз), які використовують у виробництві різноманітних молочних продуктів та молокозгортальних ферментів у поєднанні з травними ферментами, на можливість утворення антигіпертензивних пептидів.

Тому наступним кроком стало дослідження умов, за яких можливе утворення таких пептидів у різноманітних кисломолочних продуктах і сирах. Meisel зі співавт. [31] довели, що у процесі вторинного протеолізу, який відбувається під час дозрівання сирів, можуть утворюватися АПФ-інгібіторні пептиди. Така фізіологічна активність сиру була пов'язана головню з фракцією низькомолекулярних пептидів. Було також з'ясовано, що низький рівень протеолізу, який є, наприклад, у разі виробництва свіжого сиру, йогурту, білкових гідролізатів з метою збагачення спеці-

альних продуктів харчування для спортсменів, визначає невисоку АПФ-інгібіторну активність цих продуктів [31]. Крім того, зазначимо, що на утворення інгібіторів АПФ впливає не тільки час протеолізу, а й активність протеолітичних ферментів мікрофлори, що є у складі заквасок та молокозгортальних препаратів, які застосовують для виробництва сирів. Rokka зі співавт. [41] виявили казокініни (фрагменти β -казеїну 177-183 і 193-202) у молоці, попередньо заквашеному культурою *Lactobacillus casei* subsp. *rahamnosus* і надалі обробленому пепсином і трипсином. Pihlanto-Leppälä зі співавт. [40] ідентифікували декілька казокінінів, які відповідають амінокислотним послідовностям α _{S1}- і β -казеїнів, з сирної сироватки в разі внесення до неї змішаної мезофільної закваски (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) та наступною обробкою пепсином і трипсином. При цьому слід відзначити, що саме лактококи входять до складу заквасок при виробництві багатьох молочних продуктів.

Ще у 1991 році Юкало В.Г. і Шуляк Т.Л. [6] вказали на можливість утворення біоактивних пептидів з білків молока під дією протеїназ лактококів і протеолітичних ферментів. Клітини лактококів володіють складною протеолітичною системою, до якої входять протеїнази і пептидази різної локалізації, а також транспортні системи для переносу вільних амінокислот та олігопептидів [23, 33]. Juillard зі співавт. [19] показали, що дія лише однієї протеїнази PrtP, виділеної з штаму Wg2 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* на β -казеїн, спричиняє утворення більш ніж 100 різних олігопептидів. Попередньо нами було відібрано протеолітично-активні штами лактококів з високими технологічними властивостями [4], змодельовано процес протеолізу β -казеїну лактококами, пепсином та фромазою [5] та показано, що інкубація лактококів *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* з β -казеїном призводить до утворення казокінінів [2, 3]. Їх продукція посилюється внесенням у середовище інкубації молокозгортаючого препарату фромази і є максимальною при синергічній дії на β -казеїн протеаз лактококів і пепсину. Gobbetti зі співавт. [14] виявили утворення пептидних інгібіторів АПФ у кислому молоці при використанні закваски *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (фрагменти β -казеїну 6-14, 7-14, 73-82, 74-82, 75-82) і *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (фрагменти β -казеїну 7-14, 47-52, 169-175 і κ -казеїну 155-160, 152-160). Характерним є те, що надалі ці пептиди виявились стійкими до дії трипсину і хімотрипсину та зберігались протягом усього процесу виготовлення молочного продукту; згадані види мікроорганізмів використовують у технології виробництва багатьох сирів. Зокрема, Smacchi і Gobbetti [47, 48] виділили АПФ-інгібіторні пептиди з таких сортів італійських сирів, як Mozzarella, Italicco, Crescenza, Gorgonzola. Saito зі співавт. [42] виявили АПФ-інгібіторну активність у зразках таких сортів сирів, як Gouda, Emmental, Blue, Camembert, Edam, Navarti. Найвища АПФ-інгібіторна активність *in vitro* та антигіпертензивний ефект *in vivo* зафіксовано у зразках сиру Gouda з 8- і 24-місячним періодами дозрівання. Було з'ясовано, що у цих зразках сиру утворюються чотири антигіпертензивні пептиди: фрагменти 1-9 і 1-13 α _{S1}-казеїну та фрагменти 60-68 і 109-119 β -казеїну.

Дослідження, присвячені ідентифікації казокінінів у молочних продуктах дадуть змогу в майбутньому створити підходи для підбору протеолітичних ферментів та заквасок мікроорганізмів для керованої продукції натуральних кисломолочних продуктів і сирів, що могли б містити казокініни, які сьогодні розглядають як перспективні засоби з антигіпертензивною й кардіопротекторною активністю.

1. *Жарінов О.Й.* Захист серця і судин – майбутнє покликання інгібіторів ангіотензин перетворюючого ферменту // Медицина світу. 2000. Т. 8. №2. С. 80-85.
2. *Луговий Б.Л., Юкало В.Г., Гнатюк М.С.* Антигіпертензивна активність олігопептидних препаратів, отриманих при протеолізі β-казеїну лактококами у щурів з артеріальною гіпертензією // Медична хімія. 2000. №3. С. 16-19.
3. *Юкало В.Г., Луговий М.С.* Утворення антигіпертензивних пептидів при модельному протеолізі β казеїну // Фізіол. журн. 2000. Т. 46. №3. С. 78-83.
4. *Юкало В.Г., Луговий Б.Л., Дольна М.М.* Характеристика фізіологічних властивостей штамів *Lactococcus lactis ssp. lactis* // Наук. зап. Тернопіль. держ. пед. ун-ту. Сер. Біол. 2000. №2(9). С. 70-73.
5. *Юкало В.Г., Луговий Б.Л.* Виділення пептидних препаратів при комбінованій дії лактококів і молокозгортальних протеаз на β-казеїн // Експерим. та клінічна фізіологія і біохімія. 2001. №2(14). С. 21-25.
6. *Юкало В.Г., Шуляк М.С.* Протеоліз казеинов ферментами молочнокислих стрептококков // Тез. докл. Всесоюз. конф. „Химические превращения пищевых полимеров”: Калининград, 1991. С. 22.
7. *Adibi S.A.* Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption // Journal of Clinical Investigation. 1971. Vol. 50. P. 2266-2275.
8. *Adibi S.A., Kim Y.S.* Peptide absorption and hydrolysis / Physiology of the gastrointestinal tract / Ed: L.R. Johnson. New York: Raven Press, 1981. P. 1097-1099.
9. *Ariyoshi Y.* Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins // Trends in Food Science and Technology. 1993. Vol. 4. P. 139-144.
10. *Bouchier P.J., FitzGerald R.J., O'Cuinn G.* Hydrolysis of α_{S1}- and β-casein derived peptides with a broad specificity aminopeptidase and proline specific aminopeptidases from *Latococcus lactis subsp cremoris* AM2 // FEBS Letters. 1999. Vol. 445. P. 321-324.
11. *Chiba H., Yoshikawa M.* Bioactive peptides derived from food proteins // Kagaku to Seibutsu. 1991. Vol. 29. P. 454-458.
12. *Ferreira S.H., Barlet D.C., Green L.J.* Isolation of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* // Biochemistry. 1970. Vol. 9. N 13. P. 2583-2593.

13. *FitzGerald R.J., Meisel H.* Milk protein derived peptide inhibitors of angiotensin I converting enzyme // *British Journal of Nutrition*. 2000. Vol. 84. Suppl. 1. S. 33-37.
14. *Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E.* et al. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4 // *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. Vol. 66. N 9. P. 3898-3904.
15. *Hall J.E., Guyton A.C., Brands M.W.* Control of sodium excretion and arterial pressure by intrarenal mechanisms and the rennin angiotensin system / *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Second edition // Eds: Laragh J.H., Brenner B.M. New York: Raven Press Ltd., 1995. Vol. 1. P. 1451-1475.
16. *Hara H., Funabiki R., Iwata M., Yamazaki K.* Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained condition // *Journal of Nutrition*. 1984. Vol. 114. P. 1122-1129.
17. *Hata Y., Yamamoto M., Ohni M.* et al. A placebo controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects // *American Journal of Clinical Nutrition*. 1996. Vol. 64. P. 767- 771.
18. *Ikemoto F., Tanaka M., Ito S.* et al. Angiotensin converting enzyme (ACE) in the kidney: contribution to blood pressure regulation and possible role of brush border ACE // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1986. Vol. 8. Suppl. 10. S. 69-74.
19. *Juillard V., Laan H., Kunji E.R.S.* et al. The extracellular PI type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides // *Journal of Bacteriology*. 1995. Vol. 177. N 12. P. 3472-3478.
20. *Karaki H., Doi K., Sugano S.* et al. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1990. Vol. 96C. P. 367-371.
21. *Kim Y.S., Bertwhistle W., Kim Y.W.* Peptide hydrolyses in the brush border and soluble fractions of small intestinal mucosa of rat and man // *Journal of Clinical Investigation*. 1972. Vol. 51. P. 1419-1427.
22. *Kim Y.S., Brophy E.J., Nicholson J.A.* Rat intestinal brush border membrane peptidases. 2. Enzymatic properties, immunochemistry and interaction with lectins of two different forms of the enzymes // *Journal of Biological Chemistry*. 1976. Vol. 251. P. 3206-3214.
23. *Law J., Haandrikman A.* Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria // *International Dairy J.* 1997. Vol. 7. P. 1-11.
24. *Maeno M., Yamamoto N., Takano T.* Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790 // *J. of Dairy Science*. 1996. Vol. 79. N 8. P. 1316-1321.
25. *Maruyama S., Mitachi H., Awaja J.* et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of the C terminal hexapeptide of casein // *Agricultural and Biological Chemistry*. 1987. Vol. 51. N 6. P. 2557-2561.

26. *Maruyama S., Mitachi H., Tanaka H.* et al. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I converting enzyme inhibitors derived from casein // *Agricultural and Biological Chemistry*. 1987. Vol. 51. P. 1581-1586.
27. *Maruyama S., Nakagomi K., Tomizuka N., Suzuki H.* Angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II Isolation and bradykinin potentiating activity on the uterus and the ileum of rats // *Agricultural Biological Chemistry*. 1985. Vol. 49. P. 1405-1409.
28. *Maruyama S., Suzuki H.* A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein // *Agricultural Biological Chemistry*. 1982. Vol. 46. P. 1393-1394.
29. *Masuda O., Nakamura Y., Takano T.* Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing peptides to spontaneously hypertensive rats // *J. of Nutrition*. 1996. Vol. 126. P. 3063-3068.
30. *Meisel H.* Casokinins as bioactive peptides in the primary structure of casein / *Food Proteins – Structure Functionality* / Eds: K.D. Schwenke, R. Mothes. New York: VCH Weinheim, 1993. P. 67-75.
31. *Meisel H., Goepfert A., Guenther S.* ACE inhibitory activities in milk products // *Milchwissenschaft*. 1997. Vol. 52. P. 307-311.
32. *Meisel H., Schlimme E.* Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme derived from bovine Casein (Casokinins) / β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments / Eds: V. Brantl, H. Teschemacher. New York: VCH Weinheim, 1994. P. 27-33.
33. *Mierau I., Kunji E.R.S., Venema G., Kok J.* Caseins and peptide degradation in lactic acid bacteria // *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1997. Vol. 14. P. 279-301.
34. *Mock W.L., Green P.C.* Mechanism and inhibition of prolidase // *Journal of Biological Chemistry*. 1990. Vol. 265., N 32. P. 19606-19610.
35. *Nakamura Y., Masuda O., Takano T.* Decrease of tissue angiotensin I converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 1996. Vol. 60, N 3. P. 488-489.
36. *Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K.* et al. Purification and Characterization of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk // *J. of Dairy Science*. 1995. Vol. 78. N 4. P. 777-783.
37. *Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Takano T.* Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme // *J. of Dairy Science*. 1995. Vol. 78. N 6. P. 1253-1257.
38. *Okunishi H., Kawamoto T., Kurobe Y.* et al. Pathogenetic role of vascular angiotensin converting enzyme in the spontaneously hypertensive rat // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1991. Vol. 18. P. 649-659.
39. *Ondetti M.A., Rubin B., Cushman D.W.* Design of specific inhibitors of antihypertensive agents // *Science*. 1977. V. 196. P. 441-444.

40. *Pihlanto Leppälä A., Rokka T., Korhonen H.* Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from bovine milk proteins // *International Dairy Journal*. 1998. Vol. 8. P. 325-331.
41. *Rokka T., Syväoja E L., Tuominen J., Korhonen H.* Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk // *Milchwissenschaft*. 1997. Vol. 52. P. 675-678.
42. *Saito T., Nakamura T., Kitazawa H.* et al. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese // *J. of Dairy Science*. 2000. Vol. 83. N 7. P. 1434-1440.
43. *Saito Y., Wanezaki K., Kawato A., Imayasu S.* Antihypertensive effects of peptide in sake and its by products on spontaneously hypertensive rats // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 1994. Vol. 58. N 5. P. 812-816.
44. *Saito Y., Wanezaki K., Kawato A., Imayasu S.* Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 1994. Vol. 58. N 10. P. 1767-1771.
45. *Sekiya S., Kobayashi Y., Kita E.* et al. Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers // *J. of the Japanese Society of Nutrition and Food Science*. 1992. Vol. 45. P. 513-517.
46. *Skeggs L.T., Kahn J.E., Shumway N.P.* The preparation and function of the angiotensin converting enzyme // *J. of Experimental Medicine*. 1956. Vol. 103. P. 295-304.
47. *Smacchi E., Gobbetti M.* Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes // *Food Microbiology*. 2000. Vol. 17. P. 129-141.
48. *Smacchi E., Gobbetti M.* Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I converting enzyme // *Enzyme and Microbial Technology*. 1998. Vol. 22. P. 687-694.
49. *Steve B.R., Fernandez A., Kneer C.* et al. Human intestinal brush border angiotensin converting enzyme activity and its inhibition by antihypertensive ramipril // *Gastroenterology*. 1988. Vol. 94. P. 942-994.
50. *Unger T., Ganten D., Lang R.E., Scholkens B.A.* Persistent tissue converting enzyme inhibition following chronic treatment with Hoe498 and MK421 in spontaneously hypertensive rats // *J. of Cardiovascular Pharmacology*. 1985. Vol. 7. P. 36-41.
51. *Velletri P., Bean B.L.* The effect of Captopril on rat aortic angiotensin converting enzyme // *J. of Cardiovascular Pharmacology*. 1982. Vol. 4. P. 315-325.
52. *Yamamoto N., Akino A., Takano T.* Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790 // *J. of Dairy Science*. 1994. Vol. 77. P. 917-922.
53. *Yamamoto N., Maeno M., Takano T.* Purification and characterisation of an antihypertensive peptide from yogurt like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4 // *J. of Dairy Science*. 1999. Vol. 82. P. 1388-1393.

54. Yoshimoto T.M., Fischl M., Orłowski R.C., Walter R. Post proline cleaving enzyme and post proline dipeptidyl aminopeptidase comparison of two peptidases with high specificity for proline residues. // J. of Biological Chemistry. 1978. Vol. 253. P. 3708-3716.
55. Yoshioka M., Erickson R.H., Woodley J.F. et al. Role of rat intestinal brush border membrane angiotensin converting enzyme in dietary protein digestion // American J. of Physiology. 1987. Vol. 253. G. 781-786.

CASOKININS AS ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDES DERIVED FROM MILK CASEINS

B. Luhovyy, V. Yukalo

*Ivan Puluj Technical State University uа Ternopil',
Rus'ka str., 56, Ternopil' 46001, Ukraine,
e-mail: biotech@tu.edu.te.ua*

The angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived from milk proteins can to act as antihypertensive drugs *in vivo*. These peptides named casokinins can be obtained after proteolysis of α_{S1} -, β - and κ -caseins by digestive enzyme and lactic-acid bacteria proteases or by synthesis. The casokinins were detected in skim milk products and in famous cheeses. It is possible to use the selected strains of lactic-acid bacteria and ACE-inhibitory peptides supplement for milk products making with antihypertensive activity.

Key words: casokinins, caseins, ACE-inhibitors, and hypertension.

Стаття надійшла до редколегії 20.01.2002
Прийнята до друку 04.03.2002