

## SÜT PROTEİNİ KAYNAKLI ACE-İNİHİBİTÖR PEPTİTLERİ: OLUŞUMU, ETKİ MEKANİZMASI ve BİYOYARARLILIKLARI

Ali Koçak, Tuba Şanlı\*

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 12.02.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 28.03.2016

Kabul tarihi / Accepted: 30.03.2016

### Özet

Süt proteinleri, günümüzde biyoaktif peptitlerin temel kaynağını oluşturmaktadır. Biyoaktif peptitler, ana protein sekansı içerisinde inaktif formda bulunmasına karşın, laktik asit bakterileri tarafından sütün fermente edilmesi ve enzimatik hidroliz yoluyla açığa çıkabilmektedir. *In vivo* ve *in vitro* ortamda en çok çalışılan biyoaktif peptit grubunu anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör peptitleri oluşturmaktadır. Bu fonksiyona sahip peptitlerden valin-prolin-prolin (VPP) ve izolösin-prolin-prolin (IPP) peptitleri en çok izole edilen biyoaktif peptitler arasında yer almaktadır. Süt proteini kaynaklı peptitler, hipertansiyon tedavisinde ilaçlar kadar etkili olmasa da, bu tip peptitler doğal ve yan etkisiz alternatifler olarak görülmektedir. Bu makalede, süt kaynaklı antihipertansif peptitlerin yapıları, oluşumları ve biyoyararlılıkları hakkında yapılan bazı çalışmalar tartışılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Süt proteinleri, Antihipertansif peptitler, ACE, Süt ürünleri

## MILK PROTEINS DERIVED ACE-INHIBITORY PEPTIDES: FORMATION, IMPACT MECHANISM and BIOAVAILABILITY

### Abstract

Milk proteins are currently the main source of bioactive peptides which are inactive within the sequence of native protein but can be released by proteolysis during milk fermentation with lactic acid bacteria and by enzymatic hydrolysis. The most studied group of bioactive peptides *in vivo* and *in vitro* up until now are angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. The main peptides which have been linked to this property are the tri peptides such as those having the amino acid sequence of valin-prolin-prolin (VPP) and izolösin-prolin-prolin (IPP). The peptides derived from milk proteins are not as potent as the drugs used for hypertension treatment, but hold a promise as safer and natural therapeutic agents without any adverse effect. In this review, some studies related to with structure, formation and bioavailability of milk derived antihypertensive peptides were discussed.

**Keywords:** Milk proteins, Antihypertensive peptides, ACE, Dairy products

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ tcetin@agri.ankara.edu.tr,

☎ (+90) 312 596 1527,

☎ (+90) 312 318 2219

## GİRİŞ

Biyoaktif peptitler, vücut fonksiyonları ve sağlık üzerinde pozitif etkileri olan spesifik protein kısımları olarak tanımlanmaktadır (1, 2). Ana protein sekansı içinde inaktif durumda bulunan bu peptitler (3), öncül proteinlerden sindirim enzimleriyle enzimatik hidroliz, proteolitik starter kültürler aracılığıyla fermantasyon ve bitki ya da mikroorganizma kaynaklı enzimler aracılığıyla proteoliz sırasında açığa çıkmaktadır (4-6). Ana protein molekülünden açığa çıkan söz konusu peptitler (7), vücut içinde hormon benzeri düzenleyici bileşen olarak görev alabilmekte (8), amino asit boyutu ve içeriğine bağlı olarak vücutta antihipertansif, antioksidatif, opioid, antimikrobiyel etki, bağışıklık sistemini düzenleme gibi birçok biyolojik aktivite gösterebilmektedir (8-10).

Biyoaktif peptitler için önemli bir kaynak olarak gösterilen süt proteinleri bilim adamları için yaygın bir araştırma konusu olmuş ve yapılan çalışmalarda süt ve süt ürünlerinde fizyolojik ve biyolojik pek çok fonksiyona sahip biyoaktif peptidin varlığı tespit edilmiştir (7, 11-14). Bunlar arasında; anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE; EC 3.4.15.1) inhibitörleri olarak da bilinen antihipertansif peptitler en fazla çalışma konusu olanlardır (15).

Birçok ticari süt ürününün biyoaktif peptit içerdiği bildirilmekte ve bu peptitlerin temel olarak starter kültürler aracılığıyla fermantasyon ve olgunlaşma işlemleri sırasında açığa çıktığı bilinmektedir (8). Bazı ülkelerde, ACE-inhibitör peptitlerini içeren bazı fonksiyonel gıdalar orta derecede hipertansiyon tedavisinde beslenmenin bir parçası olarak önerilmektedir (16). Bu fonksiyonel gıdalardan; Evolus (Finlandiya), Calpis (Japonya), Casein DP-Peptio (Japonya), Ameal S-120 (Japonya), Danaten (Fransa) gibi ACE-inhibitör peptitlerini içeren ticari süt ürünleri hipertansiyona ek ya da alternatif tedavi yöntemi olarak kullanılabilir (17). Bunlar arasında Calpis ve Casein DP-Peptio, Japonya'da "Sağlık İçin Kullanılan Gıdalar" (Food for Specified Health Uses, FOSHU) listesinde yer almaktadır (15).

### ACE-İNİHİTÖR PEPTİTLERİNİN ETKİ

#### MEKANİZMASI

ACE, kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynayan renin-anjiyotensin sisteminde (RAS) bulunan önemli bir enzim olarak tanımlanmaktadır

(18, 19). Vücutta akışkan dengesinin ve kan basıncının düzenlenmesinde rol oynayan RAS, proteolitik bir sistem olup, kardiyovasküler sistemin kontrolünde etkili olan önemli metabolik yollardan biridir (20, 21).

RAS'ta, karaciğerden sentezlenen anjiyotensinojen proteini, böbrekten salgılanan renin enziminin etkisiyle anjiyotensin-I'e dönüştürülür. Anjiyotensin-I ise akciğerlerde üretilen ACE tarafından damar daraltıcı özelliğe sahip anjiyotensin-II'ye dönüştürülmektedir (20, 22). Anjiyotensin II varlığı kan basıncının yükselmesine neden olmakta ve aldosteron salgılanmasını uyarmaktadır (23, 24). Buna ek olarak, ACE; kallikrein-kinin sistemine de katılarak bu sistemde yer alan ve damar genişletici fonksiyonu olan bradikininin inhibe etmektedir (21). Sonuç olarak, ACE-inhibitörleriyle anjiyotensin II oluşumunun engellenmesi, damarların daralmasını önleyerek kan basıncının düşmesini sağlar (25). Bu nedenle ACE inhibisyon aktivitesi, hipertansiyon tedavisinde yararlı bir metot olarak görülmektedir (16, 26).

Dünya genelinde yaygın bir rahatsızlık olan hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklarla bağlantılı olan, kontrol edilebilir bir risk faktörüdür (15). Captopril, enalapril, alacepril, lisinopril gibi ACE inhibisyonu sağlayan birçok ilaç hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır (27). Ancak, bu tür sentetik inhibitörlerin kronik kuru öksürük, hipotansiyon, deri döküntüleri, böbrek fonksiyonunda bozulmalar gibi birçok yan etkileri olduğu bildirilmektedir (15). Hipertansiyon tedavisinde gıda proteini kaynaklı doğal ACE-inhibitör peptitlerinin kullanımı, yan etkileri olmadığı için daha güvenli bir alternatif olarak görülmektedir (15, 28). Bununla birlikte; doğal kaynaklı biyoaktif peptitlerin genellikle sentetik benzerlerine göre daha yüksek konsantrasyonlarda aktivite gösterdiği bildirilmekte ve bu peptitleri içeren fonksiyonel gıdaların, hastalığın tedavisinden ziyade hastalığı önleme amacıyla kullanılması önerilmektedir (17). Bazı sentetik ve süt kaynaklı ACE-inhibitör peptitlerinin %50 ACE inhibisyonu sağlamak için gereken peptit konsantrasyonunu ifade eden IC50 değerleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Süt proteinlerinin proteolitik starter kültürler kullanılarak hidrolizi, biyoaktif peptitlerin açığa çıkmasında geniş ölçüde kullanılan bir tekniktir. Bu sayede ACE-inhibitör peptitlerini içeren fermente sütler, tıbbi gıdaların geliştirilmesinde önemli bir araç haline gelmiştir (28).

Çizelge 1. Bazı süt kaynaklı ve sentetik ACE-inhibitörlerinin IC<sub>50</sub> değerleri

Peptit Sekansı	Peptit Bölgesi	IC <sub>50</sub> Değeri (µmol)	Kaynak
VPP	β-Kazein f(84-86)	9	(29)
IPP	β-Kazein f(74-76)	5	(29)
RYLGY	α <sub>s1</sub> -Kazein f(90-94)	0.71	(30)
AYFYPEL	α <sub>s1</sub> -Kazein f(143-149)	6.58	(30)
LHLPLP	β-Kazein f(133-138)	5.5	(31)
Captopril	Sentetik ACE-Inhibitörü	0.022	(32)
YLAHK	α-laktoalbumin f(104-108)	ND*	(33)
LQKW	β-laktoglobulin f(58-61)	3.5	(33)
LLF	β-laktoglobulin f(103-105)	82.4	(33)

\*ND: Not Detected

### SÜT PROTEİNİ KAYNAKLI ACE-İNİHİTÖR PEPTİTLERİ

Kazeinin hidrolizi ile açığa çıkan kazokininler ve serum proteinlerinden α-laktoalbumin ve β-laktoglobulinin hidrolizi sonucunda meydana gelen laktokininler ACE-inhibisyon aktivitesi gösterebilmektedir (Çizelge 2) (19, 27). Kazein hidrolizatlarının serum proteini hidrolizatlarına göre daha yüksek ACE inhibisyon aktivitesi gösterdiklerinin bilinmesine karşın, β-laktoglobülin'den açığa çıkan Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg gibi serum proteini kaynaklı bazı peptitler de yüksek antihipertansif etki gösterebilmektedir (9). Hipertansif farelerle yapılan bir çalışmada, β-laktoglobülin'den izole edilen ve "β-laktosin B" f(142-145) olarak adlandırılan bir peptidin farelere oral yolla verildiğinde, önemli ölçüde antihipertansif aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (34).

ACE-inhibitör peptitlerinin inhibisyon aktiviteleri temelde spesifik C-terminali sekansı ile belirlenir. C-terminalinin inhibitör peptitlerin ACE'ye bağlanması için gerekli olan bölge olduğu (25) ve enzimin C-terminalinde hidrofobik aminoasit bulunan peptitleri substrat olarak tercih ettiği bildirilmektedir (36). Bundan dolayı, C-terminalinde Arg, Trp, Tyr, Phe, Lys veya Pro bulunan peptitler ACE'ye bağlanma ihtimali yüksek, inhibitör etkili

peptitlerdir (25, 37). Ayrıca, moleküler ağırlığın da ACE inhibisyon etkisinde önemli bir özellik olduğu ve genel olarak ACE-inhibitör peptitlerinin hidrofobik aminoasit içeren kısa zincirli, düşük molekül ağırlığına sahip peptitler olduğu bildirilmektedir (17).

Süt kaynaklı ACE-inhibitör peptitleri arasında VPP [β-CN f(84-86)] ve IPP [β-CN f(74-76)] en çok çalışılan peptitlerdir (25). Bu peptitler, FDA (Food and Drug Administration) tarafından GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsüne alınmış ve gıdalarda tansiyon düşürücü fonksiyonel bileşen olarak kullanılmasına onay verilmiştir (38). Hipertansif hastalar üzerinde yapılan klinik çalışmalarda, VPP ve IPP peptitlerini içeren fermente sütün günlük 150 mL tüketilmesi sonucunda kan basıncında 1.5-10 mmHg arasında bir düşüş sağlandığı görülmüştür (39). Hafif hipertansiyonlu hastalarla yapılan bir başka çalışmada; 4 hafta boyunca günlük 95 mL VPP ve IPP içeren Calpis içeceği tüketen hastaların sistolik kan basıncında 9.4±3.6 mmHg düşüş olduğu gözlemlenmiştir (40).

Yapılan araştırmalarda, VPP ve IPP peptitlerinin Asya kökenli hastalarda kan basıncını Kafkas kökenli hastalara göre daha fazla düşürdüğü belirlenmiştir. Buna ek olarak, Danimarkalı ve

Çizelge 2. Süt proteinlerinden açığa çıkan ACE-inhibitör peptitleri

Peptit Bölgesi	Peptit Sekansı	Kan Basıncında Düşüş (mmHg)	Elde edilişi	Kaynak
β-CN f(74-76)	IPP	-28.3	<i>Lb. helveticus</i> ve <i>S. cerevisiae</i> ile fermantasyon	(29)
β-CN f(84-86)	VPP	-32.1	<i>Lb. helveticus</i> ve <i>S. cerevisiae</i> ile fermantasyon	(29)
β-CN f(133-138)	LHLPLP	-21.9	<i>E. faecalis</i> ile fermantasyon	(31)
β-CN f(133-139)	LHLPLPL	-7.7	<i>E. faecalis</i> ile fermantasyon	(31)
α <sub>s1</sub> -CN f(90-94)	RYLGY	-25	Pepsin ile hidroliz	(30)
α <sub>s1</sub> -CN f(143-149)	AYFYPEL	≈ -21	Pepsin ile hidroliz	(30)
β-Lg f(58-61)	LQKW	-18.1	Termolisin ile hidroliz	(35)
β-Lg f(103-105)	LLF	≈ -20	Termolisin ile hidroliz	(35)

CN: Kazein Lg:Laktoglobülin Lb:Lactobacillus E: Enterococcus S: Saccharomyces

Flemenk hastalarda VPP ve IPP içeren fermente süt tüketmeleri sonucu kan basıncında herhangi bir etki gözlemlenmediği tespit edilmiştir. Sonuçlar genetik özelliklerin ve beslenme davranışlarının VPP ve IPP peptitlerinin antihipertansif etkileri üzerinde önemli rolü olabileceğini göstermektedir (41, 42).

### SÜT ÜRÜNLERİNDE ACE-İNHİBİTÖR PEPTİTLERİ

Süt proteinlerinden ACE-inhibitör aktivitesine sahip peptitlerin açığa çıkmasında enzimatik hidroliz en yaygın kullanılan metottür (43). Biyoaktif peptitlerin enzimatik yolla elde edilmesinde; tripsin, pepsin ve kimotripsin gibi pankreatik enzimler etkilidirler (7, 18, 37). Tripsin'in *in vitro* koşullarda en etkili pankreatik enzim olduğu bilinmekle birlikte, farklı IC50 değerine sahip ACE-inhibitör peptitlerinin,  $\alpha$ -laktalbumin ve  $\beta$ -laktoglobülin fraksiyonlarının pepsin, tripsin, kimotripsin, pankreatin, elastaz ve karboksipeptidaz kombinasyonlarıyla hidrolizi sonucu da üretilebildiği bildirilmektedir (43).

Fermente süt ürünlerin üretiminde kullanılan proteolitik aktiviteye sahip çeşitli starter kültür bakterileri, biyoaktif peptitlerin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (8, 18, 24, 43). Bu grubun büyük bir kısmını oluşturan laktik asit bakterileri doğada ve aynı zamanda insanın sindirim sisteminde bulunup, biyoaktif peptitlerin üretiminde etkilidirler (44). Yoğurt, kefir gibi fermente süt ürünlerinden açığa çıkan birçok ACE-inhibitör peptidi tanımlanmıştır (45-47).

Fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* (37), *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* ve *Lb. acidophilus*'un (15, 48) çeşitli suşlarının süt proteinlerinden ACE-inhibitör peptitlerin oluşumunu sağladığı bildirilmektedir (Çizelge 3). Bununla birlikte;

diğer laktik asit bakterileriyle karşılaştırıldığında *Lb. helveticus* yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğundan daha yüksek ACE-inhibitör aktiviteli ürün elde etmek için tercih edilen mikroorganizma olmaktadır (48).

Peynir, süt ürünleri arasında biyoaktif peptitlerce zengin bir kaynak olarak görülmektedir. Bu durum, peynirin olgunlaşması süresince gerçekleşen proteolitik aktiviteyle ilişkilendirilmektedir (8). Bununla birlikte, süte uygulanan ısıl işlem normu, kullanılan starter kültür, olgunlaşma süresi ve olgunlaşma koşulları peynirde bu peptitlerin konsantrasyonunu etkileyen temel faktörlerdir (51).

Peynirde biyoaktif peptit konsantrasyonunun peynirin olgunlaşma derecesine bağlı olduğu bildirilmektedir (7, 9). Yapılan çalışmalar, orta derecede olgunlaştırılmış peynirlerin en yüksek ACE-inhibitör aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir (52). Orta derecede olgunlaştırılmış Gouda peynirinde ACE-inhibitör aktivitesinin, daha uzun süre olgunlaştırılmış Gouda peynirinin 2 katı olduğu belirlenmiştir (43).

Uzun süren olgunlaşma periyodunda oluşan peptitlerin yapısının bozulduğu ve ACE inhibitör aktivitesinin etkilendiği belirlenmiştir (53). Yapılan bir çalışmada 6 ay olgunlaştırılmış Parmesan peynirinden izole edilen  $\alpha_{s1}$ -kazein kaynaklı antihipertansif peptidin, 15 ay olgunlaştırılmış Parmesan'da bulunmadığı görülmüştür (43).

ACE-inhibitör peptitlerin varlığına ilişkin yapılan bir başka çalışmada, çeşitli starter kültürlerle üretilen Manchego peynirinde ACE-inhibitör aktivitesinin, olgunlaşmanın ilk 4 ayında düşük olduğu, 8. ayda maksimum seviyeye geldiği ve olgunlaşma süresi 12 aya ulaştığında ise tekrar düşüş gösterdiği tespit edilmiştir (49).

Sonuç olarak, peynirde biyoaktif peptit konsantrasyonu ve ACE-inhibitör etkisinin peynirin olgunlaşmasıyla artış gösterdiği (18), ancak;

Çizelge 3. Süt proteinlerinden ACE-inhibitör peptitlerini açığa çıkaran bazı mikroorganizmalar

Kullanılan Mikroorganizmalar	Öncül Protein	Peptit Sekansı	Kaynak
<i>Lb. helveticus</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ve <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	$\beta$ -CN, $\kappa$ -CN	VPP, IPP	(29)
<i>Str. thermophilus</i> ve <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	$\alpha_{s1}$ -CN, $\beta$ -CN	VRGPFPP, VVAPFPE, VPSERYL	(49)
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CRL 581 <i>Kluyveromyces marxianus</i> Z17	$\beta$ -Lg	ALPMHIR, IDALNENK, IIVTQTMK	(50)
	$\beta$ -CN	IPP, LGPVRGPFPP, QEPVLPVRGPFPP	(23)
	$\alpha_{s1}$ -CN, $\kappa$ -CN	LRFF, VLSRYP	(28)

*Lb.*:Lactobacillus *S.*: Saccharomyces *Lc.*:Lactococcus *Leu.*:Leuconostoc *Str.*: Streptococcus

Çizelge 4. Bazı peynir çeşitlerinden tanımlanan ACE-inhibitör peptitleri

Peynir Çeşidi	Peptit İçeriği	Kaynak
Manchego	VRYL, KKYNVPQL, IPL	(54)
Tilsit	VPP, IPP	(51)
Emmental	VPP, IPP	(51)
Gorgonzola	VPP, IPP, AYFYPEL, LHLPLP	(25)
Cheddar	VPP, IPP, RYLGY, AYFYPEL, RPKHPI	(25, 55)
Gouda	RPKHPIKHQ, YPFPGPIPN	(41)

proteoliz belirli bir seviyeyi geçtikten sonra aktif peptit kısımlarının yapısının bozularak inaktif forma dönüşmesi sonucunda azalmaya başladığı bildirilmektedir (7).

Peynirin olgunlaşması sırasında probiyotik starter kültürlerin de ACE-inhibitör aktivitesini arttırdığı görülmüştür (19). Yapılan çalışmalarda probiyotik kültür (*Lb. casei* 279 ve *Lb. casei* LAFTI® L26) ilavesinin 4°C'de olgunlaşan peynirin ACE-inhibitör aktivitesini önemli düzeyde arttırdığı belirlenmiştir (55). Çizelge 4'te bazı peynir çeşitlerinden izole edilen ACE-inhibitör peptitleri verilmiştir.

#### ACE-İNİHİBİTÖR PEPTİTLERİNİN

##### BİYOYARARLILIĞI

Mide-bağırsak sindirimi, biyoaktif peptitlerin bozulmasına ya da inaktif öncüllerinden aktif kısımların oluşumuna yol açabilir (25). Peptidaz aktivitesine karşı direnç, ACE-inhibitör peptitlerin oral yolla alımı sırasında antihipertansif etki gösterebilmesi için bir ön şart olarak görülmektedir (27, 36). Bu peptitlerin oral yolla alımından sonra antihipertansif etki gösterebilmesi için aktif peptitlerin bağırsaktan yapısı bozulmamış şekilde emilmesi gerekmekte ve hedef bölgelere ulaşabilmesi için plazma peptidazlarına karşı direnç göstermesi beklenmektedir (2, 18).

Yapılan çalışmalarda ACE-inhibitör peptit aktivitesinin mide-bağırsak sindiriminden ciddi bir şekilde etkilenmediği görülmüştür (54). Hipertansif farelerle yapılan bir çalışmada, VPP ve IPP peptitlerini içeren fermente sütün fareler tarafından oral yolla aldıktan sonra karın ana atardamarlarında bu peptitlerin belirlenmiş olması bu durumu desteklemektedir (56).

Yapılan bir başka çalışmada, ACE-inhibitör aktivitesine sahip ticari fermente süt ve peynir örneklerinin, pepsin ve korolaz PP enzimleri ile mide-bağırsak sindiriminden sonra ACE-inhibitör aktivitesinin stabil kaldığı ya da arttığı görülmüştür (57).

Birçok ACE-inhibitör peptidinin *in vitro* koşullarda aktivite göstermesine rağmen bazılarının oral yolla alındıktan sonra aynı aktiviteyi göstermediği bilinmektedir (24). Örneğin;  $\alpha_{s1}$ -kazeinden açığa çıkan peptit f (23-27) *in vitro* ortamda etkili bir ACE-inhibitörü iken, *in vivo* koşullarda antihipertansif etki göstermemektedir (36).

#### SONUÇ

Süt proteinleri kaynaklı ACE-inhibitör peptitlerin bilimsel açıdan geniş çaplı bir ilgi alanı oluşturduğu bilinmektedir. Bu peptitlerin antihipertansif etkileri, insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan birçok çalışmayla incelenmiştir. Ancak, bu alanda hala keşfedilmeyi bekleyen birçok nokta bulunmaktadır. Antihipertansif peptitlerin, sağlık üzerindeki pozitif etkilerinden dolayı yakın gelecekte birçok fonksiyonel gıdanın temel ham maddelerinden biri haline geleceği öngörülmektedir. Bunun yanında, bu peptitlerin hipertansiyon tedavisinde ilaçlar kadar etkili olmadığı bilindiğinden, antihipertansif peptitler genellikle günlük diyetle bulunması gerekli fonksiyonel bileşenler olarak kabul edilmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Dominguez-Gonzalez KN, Cruz-Guerrero A, Gonzalez-Marquez H, Gomez-Ruiz L, Garcia-Garibay M, Jimenez-Guzman J, Rodriguez-Serrano G. 2014. Antihypertensive and antithrombotic activities of a commercial fermented milk product made with *Lactobacillus casei shirota* and *Streptococcus thermophilus*. *Int J Dairy Technol*, 67: 358-364.
2. Bernabucci U, Catalani E, Basirico L, Morera P, Nardone A. 2014. In vitro ACE-inhibitory activity and *in vivo* antihypertensive effects of water-soluble extract by Parmigiano Reggiano and Grana Padano cheeses. *Int Dairy J*, 37: 16-19.

3. Petrat-Melin B, Andersen P, Rasmussen JT, Poulsen N, Larsen LB, Young, JF. 2015. *In vitro* digestion of purified  $\beta$ -casein variants A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, B and I: effects on antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory capacity. *J Dairy Sci*, 98: 15-26.
4. Otte J, Lenhard T, Flambard B, Sorensen KI. 2011. Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *Int Dairy J*, 21: 229-238.
5. Espejo-Carpio F, De Gobba C, Guadix A, Guadix, EM. 2013. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. *Int Dairy J*, 38: 37-46.
6. Phelan M, Khaldi N, Shields DC, Kerins DM. 2014. Angiotensin converting enzyme nitric oxide inhibitory activities of novel milk derived peptides. *Int Dairy J*, 35: 38-42.
7. Haque E, Chand R, Kapila S. 2009. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Rev Int*, 25: 28-43.
8. Sanchez-Rivera L, Martinez-Maqueda D, Cruz-Huerta E, Miralles B, Recio I. 2014. Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Res Int*, 63: 170-181.
9. Korhonen H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications, *J Funct Foods*, 1(2): 177-187.
10. Elfahri KR, Donkor ON, Vasiljevic T. 2014. Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *Int Dairy J*, 38: 37-46.
11. Gonzalez-Gonzalez CR, Tuohy KM, Jauregi P. 2011. Production of angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *Int Dairy J*, 21: 615-622.
12. Pan D, Cao J, Guo H, Zhao B. 2012. Studies on purification and the mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate. *Food Chem*, 130: 121-126.
13. Ruiz-Gimenez P, Salom JB, Marcos JF, Valles S, Martinez-Maqueda D, Recio I, Torregrosa G, Alborch, E, Manzanares P. 2012. Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: identification of novel active peptides. *Food Chem*, 131: 266-273.
14. Hafeez Z, Cakir-Kiefer C, Roux E, Perrin C, Miclo L, Dary-Mouro A. 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Res Int*, 63: 71-80.
15. Rasika DMD, Ueda T, Jayakody LN, Suriyagoda LDB, Silva KFST, Ando S, Vidanarachchi JK. 2015. ACE-inhibitory activity of milk fermented with *Saccharomyces cerevisiae* K7 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007. *J Natl Sci Found*, 43(2): 141-151.
16. Shu G, Yang H, Chen H, Zhang Q, Tian Y. 2015. Effect of incubation time, inoculum size, temperature, pasteurization time, goat milk powder and whey powder on ACE inhibitory activity in fermented milk by *L. Plantarum* LP69. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 14(2): 107-116.
17. Hayes M, Tiwari BK. 2015. Bioactive carbohydrates and peptides in foods: an overview of sources, downstream processing steps and associated bioactivities. *Int J Mol Sci*, 16: 22485-22508.
18. Korhonen H, Pihlanto-Leppälä A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J*, 16: 945-960.
19. Beermann C, Hartung J. 2013. Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food Funct*, 4: 185-199.
20. Marques C, Amorim MM, Pereira JO, Pintado ME, Moura D, Calhau C, Pinheiro H. 2012. Bioactive peptides-are there more antihypertensive mechanisms beyond ACE inhibitor. *Curr Pharm Des*, 18: 4706-4713.
21. Majumder K, Wu J. 2015. Molecular targets of antihypertensive peptides: understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. *Int J Mol Sci*, 16: 256-283.
22. Udenigwe CC, Aluko RE. 2012. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing and potential health benefits. *J Food Sci*, 71(1): 11-24.

23. Villegas JM, Picariello G, Mamone G, Turbay MBE, De Giori GS, Hebert, EM. 2014. Milk-derived angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides generated by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Peptidomics*, 1: 22-29.
24. Saleh AS, M Zhang Q, Shen Q. 2014. Recent research in antihypertensive activity of food protein-derived hydrolyzates and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*, DOI: 10.1080/10408398.2012.724478
25. Stuknytė M, Cattaneo S, Masotti F, De Noni I. 2015. Occurrence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and in their digestates following *in vitro* static gastrointestinal digestion. *Food Chem*, 168: 27-33.
26. Hsieh CC, Hernández-Ledesma B, Fernandez-Tome S, Weinborn V, Barile D, de Moura Bell JM LN. 2015. Milk proteins, peptides, and oligosaccharides: effects against the 21st century disorders. *Biomed Res Int*, Article ID: 146840, 1-16.
27. Bhat ZF, Kumar S, Bhat HF. 2015. Antihypertensive peptides of animal origin: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, DOI:10.1080/10408398.2014.898241.
28. Li Y, Sadiq FA, Liu T, Chen J, He G. 2015. Purification and identification of novel peptides with inhibitory effect against angiotensin I-converting enzyme and optimization of process conditions in milk fermented with the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *J Funct Foods*, 16: 278-288.
29. Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Takano T. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J Dairy Sci*, 78(6): 1253-1257.
30. Contreras M, Carron R, Montero MJ, Ramos M, Recio I. 2009. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int Dairy J*, 19: 566-573.
31. Quirós A, Ramos M, Muguera B, Delgado MA, Miguel M, Aleixandre A, Recio I. 2007. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int Dairy J*, 17: 33-41.
32. Aleixandre A, Miquel M. 2012. Food peptides as antihypertensive agents. In: *Bioactive Food Proteins and Peptides Applications in Human Health*, Hettiarachchy NS (chief ed), CRC Press, USA, pp. 131-181.
33. El-Salam MH, El-Shibiny S. 2013. Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare, and yak milks and milk products. *Food Rev Int*, 29: 1-23.
34. Murakami M, Tonouchi H, Takahashi R, Kitazawa H, Kawai Y, Negishi H, Saito T. 2004. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide ( $\beta$ -lactosin B) isolated from a commercial whey product. *J Dairy Sci*, 87: 1967-1974.
35. Hernández-Ledesma B, Miguel M, Amigo L, Aleixandre MA, Recio I. 2007. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of synthetic  $\beta$ -laktoglobulin peptide sequences. *J Dairy Res*, 74: 336-339.
36. Fitz-Gerald RJ, Meisel H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br J Nutr*, 84(1): 33-37.
37. Hernández-Ledesma B, del Mar Contreras M, Recio I. 2011. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv Coll Interfac*, 165: 23-35.
38. Jing P, Qian B, He Y, Zhao X, Zhang J, Zhao D, Lv Y, Deng Y. 2014. Screening milk-derived antihypertensive peptides using quantitative structure activity relationship (QSAR) modelling and *in vitro/in vivo* studies on their bioactivity. *Int Dairy J*, 35: 95-101.
39. Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R. 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr*, 77: 326-330.
40. Hata Y, Yamamoto M, Ohni M, Nakajima K, Nakamura Y, Takano T. 1996. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr*, 64: 767-771.
41. Pihlanto A. 2013. Lactic fermentation and bioactive peptides. In: *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Marcelino K (ed), InTech, pp 310-332.
42. Hernández-Ledesma B, Garcia-Nebot MJ, Fernandez-Tome S, Amigo L, Recio I. 2014. Dairy protein hydrolysates: peptides for health benefits. *Int Dairy J*, 38: 82-100.
43. Choi J, Sabikhi L, Hassan A, Anand S. 2012. Bioactive peptides in dairy products. *Int J Dairy Technol*, 65(1): 1-12.

44. Singh BP, Vij S, Hati S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54: 171-179.
45. Rodriguez-Figueroa JC, Gonzalez-Cordova AF, Torres-Llanez MJ, Garcia HS, Vallejo-Cordoba B. 2012. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *J Dairy Sci*, 95(10): 5536-5543.
46. Unal G, Akalin AS. 2012. Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of yoghurt fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Dairy Sci. & Technol*, DOI 10.1007/s13594-012-0082-5.
47. Moslehishad M, Ehsani MR, Salami M, Mirdamadi S, Ezzatpanah H, Nasiaji AN, Moosavi-Movahedi AA. 2013. The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *Int Dairy J*, 29: 82-87.
48. Nielsen MS, Martinussen T, Flambard B, Sørensen KI, Otte J. 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time, *Int Dairy J*, 19: 155-165.
49. Gomez-Ruiz JA, Ramos M, Recio I. 2002. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int Dairy J*, 12: 697-706.
50. Chobert JM, El-Zahar K, Sitohy M, Dalgalarondo M, Métro F, Choiset Y, Haertlé T. 2005. Angiotensin I-converting-enzyme (ACE) inhibitory activity of tryptic peptides of ovine  $\beta$ -lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using different starters. *Dairy Sci. & Technol* 85(3): 141-152.
51. Bütikofer U, Meyer J, Sieber R, Walther B, Wechsler D. 2008. Occurrence of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides val-pro-pro and ile-pro-pro in different cheese varieties of swiss origin. *J Dairy Sci*, 91(1): 29-38.
52. Sieber R, Bütikofer U, Egger C, Portmann R, Walther B, Wechsler D. 2010. ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Sci. & Technol*, 90: 47-73.
53. Iwaniak A, Minkiewicz P, Darewicz M. 2014. Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 13: 114-134.
54. Gomez-Ruiz JÁ, Ramos M, Recio I. 2004. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *Int Dairy J*, 14: 1075-1080.
55. Ong L, Henriksson A, Shah NP. 2007. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* subsp. *Dairy Sci. & Technol*, 87: 149-165.
56. Masuda O, Nakamura Y, Takano T. 1996. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J Nutrit*, 126: 3063-3068.
57. Hernández-Ledesma B, Amigo L, Ramos M, Recio I. 2004. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J Agric Food Chem*, 52(6): 1504-1510.